



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOLOGIA**

DANÚSIA FERREIRA LIMA

**BIORREMEDIAÇÃO EM SEDIMENTOS IMPACTADOS POR
PETRÓLEO NA BAÍA DE TODOS OS SANTOS, BAHIA:
AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS
SATURADOS**

Salvador
2010

DANÚSIA FERREIRA LIMA

**BIORREMEDIAÇÃO EM SEDIMENTOS IMPACTADOS POR
PETRÓLEO NA BAÍA DE TODOS OS SANTOS, BAHIA:
AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS
SATURADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Manoel Jerônimo Moreira Cruz
Co-orientadora: Prof^a.Olívia Maria Cordeiro de Oliveira

Salvador
2010

DANÚSIA FERREIRA LIMA

**BIORREMEDIAÇÃO EM SEDIMENTOS IMPACTADOS POR
PETRÓLEO NA BAÍA DE TODOS OS SANTOS, BAHIA:
AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS
SATURADOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Geologia da Universidade Federal da Bahia para obtenção do título de Mestre em Geologia com ênfase em Geologia Ambiental, Hidrogeologia e Recursos Hídricos.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira- Co-Orientadora
UFBA

Prof. Dr. Jorge Alberto Trigüis
UENF

Prof. Dr. José Maria Landim Dominguez
UFBA

Prof.Dr. Antônio Fernando de Souza Queiroz
UFBA

Salvador, 04 de fevereiro, 2010

“Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pela graça de ter me permitido concluir este trabalho; aos meus pais, exemplos de força e dedicação, bases da minha educação, que semearam e cuidaram com atenção e carinho meu crescimento pessoal e profissional; a meu namorado pela compreensão em muitos momentos de ausência e a meus verdadeiros amigos que me deram a maior força e ajudaram no desenvolvimento e conclusão desse trabalho”.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro quero agradecer a Deus pela oportunidade da vida, pela realização deste trabalho, pela família maravilhosa que tenho, pelos amigos verdadeiros. A tua benção, Senhor!

Ao Prof. Dr. Manuel Jerônimo Moreira Cruz, pela orientação, confiança, incentivo e oportunidade de aprendizado na área de geologia. Você é à base desse meu sucesso! Muito Obrigado!

A Prof^a Dra. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira pela orientação, paciência, incentivo, oportunidade para realização deste trabalho e pelo aprendizado na temática de remediação de áreas impactadas por atividades petrolíferas. Mas acima de tudo por ter me recebido, confiado em mim, pela amizade, compreensão, e por sempre estar presente em todos os momentos de diálogo. Você é muito especial! Obrigada!

Ao curso e professores da Pós-Graduação em Geologia do Instituto de Geociências (UFBA) pela oportunidade e pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Jorge Alberto Trigüis, pesquisador renomado com grande sapiência na área de Geoquímica orgânica, pela disponibilidade sempre em transmitir seus conhecimentos. O senhor foi muito importante para o alcance dessa vitória. Meus sinceros agradecimentos!

À todos os colegas de pós-graduação pela amizade, companheirismo e alegrias compartilhadas... em especial a Martonio Sacramento, Amanda Silva, Robson Carneiro, Elder Resende... um grande beijo! E obrigada pela grande amizade.

Ao CNPq pelo apoio através da concessão da Bolsa de Mestrado. À FINEP, pelo apoio financeiro através do convênio FINEP-FAPEX nº01.05.0016.00, que permitiu a realização de todas as fases deste trabalho. Muito obrigada por tudo!

À toda equipe do Núcleo de Estudos Ambientais – NEA, em especial ao Prof. Dr. Antônio Fernando Souza pelo apoio recebido desde as primeiras etapas desta jornada... a Cícero Gonçalves da Silva, Izabel Biasi e Alexsandro Rocha que sempre se mostraram presente em todos os momentos de realização desse trabalho... aos bolsistas Karla Melo, Anderson Muniz, Robson Carneiro, Carine Santana, Valter Rebouças, Paulo Sergio, Consuelo Navarro, Paula Gimenez, Stefano, Joel, Everton Souza, Everton Melo, Pedro Posse, Davi, Juliana Medrado, Anselmo Chagas pela amizade, companheirismo, pelo aprendizado que tivemos juntos e por todo o apoio nos trabalhos de campo e laboratório... a Danilo Ribeiro pela ajuda na confecção dos mapas... ao mestrando Ícaro Tiago pela sua amizade e incentivo... Obrigada!!!

Ao Laboratório de Estudos de Petróleo (LEPETRO) do Instituto de Geociências (IGEO/UFBA) pela realização das análises de nitrato, amônia, fósforo, carbono orgânico, granulometria e extração dos compostos orgânicos... à coordenadora do LEPETRO, Dra. Karina Garcia, ao químico e amigo Marcos Melo... e em especial a Química Mestre Sarah Adriana e ao Técnico em química Jorge Palma que com sua

boa vontade, amizade me proporcionaram momentos de aprendizado. É de coração que agradeço, serei eternamente grata por tudo que fizeram por mim e para realização desse trabalho.

Aos motoristas do Instituto de Geociências. Em especial a Jairo que acompanhou e ajudou em muitas fases desse trabalho. Muito Obrigada!

Ao Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo-LENEP-UENF nas pessoas do Prof. Dr. Jorge Alberto Trigüis, à Química Dra. Eliane Soares de Souza e a Mestre Tatiany Fortini pela realização das análises Cromatográficas.

Ao Laboratório de Geoquímica CENPES/Petrobras na pessoa do Geólogo José Roberto Cerqueira pelas análises de compostos biomarcadores e análises isotópicas.

À Petrobras UN-BA, pela disponibilidade da área de campo para instalação do Laboratório de Simulação de Pedra Branca.

Ao Biólogo da Petrobras José Carvalho por todo o apoio na realização desse trabalho e por ter disponibilizado os funcionários Fabio e Valter que tanto ajudou no monitoramento do experimento.

Às minhas amigas Jamile Batista, Marta Araujo, Roberta Saback e Aline Soares, pela amizade, compreensão, apoio, incentivos fundamentais para realização deste trabalho. Pela disposição em me ajudar, meu Muito Obrigado!

À minha irmã, Denize Lima, pelo apoio incondicional, pela ajuda, por me acudir nas horas difíceis, pelo carinho e dedicação. Muito Obrigada!

À Césio Eloy, meu querido namorado, dedicado, admirável, companheiro de todas as horas, por tudo que tem me ajudado desde o primeiro momento que nos conhecemos. Obrigado pelo seu amor, carinho, compreensão, apoio, dedicação, muito incentivo, ânimo, força e conselhos... Muito Obrigada!

Aos meus pais, Domingos Lima e Dasdores Oliveira, meus ombros gigantes... do grande amor, carinho, afeto e dedicação plena, pelas constantes palavras de força, pela presença mesmo que a distância... com esforço incansável, pelas noites sem dormir, pelos domingos sem descanso que com certeza conseguiram construir com muito amor e carinho um lar de paz e amor, uma família maravilhosa. Vocês foram o alicerce desta minha vitória e que sem essa força jamais seria possível chegar até aqui!!!!

Os meus sinceros agradecimentos à todos!

"O futuro não é um lugar onde estamos indo, mas um lugar que estamos criando. O caminho para ele não é encontrado, mas construído e o ato de fazê-lo muda tanto o realizador quando o destino."

Antoine de Saint-Exupéry

LIMA, Danúsia Ferreira. Biorremediação em sedimento impactados por petróleo na Baía de Todos os Santos, Bahia: Avaliação da degradação dos Hidrocarbonetos Saturados. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

RESUMO

O desenvolvimento industrial e conseqüente expansão urbana na região de São Francisco do Conde, Candeias e Madre de Deus, municípios baianos localizados às margens da Baía de Todos os Santos (BTS), acarretou na redução de grandes áreas de manguezais. A biorremediação é uma técnica aplicada para amenizar diversos impactos ambientais, dentre eles os gerados por derivados do petróleo, através da introdução de microorganismos no ambiente, ou criando condições ótimas para os mesmos se desenvolverem. O presente estudo objetivou avaliar a degradação de hidrocarbonetos saturados através da técnica do bioestímulo em sedimento de manguezal impactado por atividades petrolíferas, testando a potencialidade de dois fertilizantes (NPK e OSMOCOTE) como agentes aceleradores da biodegradação dos componentes de petróleo, sob condições experimentais. A origem do óleo encontrado no substrato sedimentar contaminado se constituiu em investigação complementar. A metodologia utilizada no experimento se baseou no monitoramento do processo de biorremediação em unidades de simulação (aquários) com água do rio São Paulo e sedimento contaminado por óleo. O experimento foi realizado no período entre setembro e dezembro de 2008, em Laboratório de Simulação, montado na área de estudo. O monitoramento geoquímico foi realizado por cromatografia líquida, cromatografia gasosa (GC-FID) e cromatografia acoplada à espectrômetro de massas (GC/MS). Os resultados da avaliação da origem do contaminante demonstraram semelhanças com óleos da Bacia do Recôncavo, considerado ambiente com rocha geradora do tipo lacustre/doce. A razão hopano/esterano também indicou ambiente com deposição de matéria orgânica terrestre típica de óleos encontrados na Bacia do Recôncavo. Para entendimento do processo de biorremediação foi utilizada o monitoramento dos parâmetros físico-químicos, quantificação dos teores de nutrientes, as percentagens dos hidrocarbonetos saturados, aromáticos e NSO, e o comportamento dos compostos saturados ao longo de todo o experimento. O monitoramento dos parâmetros físico-químicos mostrou condições favoráveis para o processo de biorremediação durante todas as fases de investigação. Os resultados de cromatografia líquida evidenciaram em 90 dias de experimento, um enriquecimento dos compostos NSO, com redução do percentual de hidrocarbonetos saturados em 3% e aumento dos compostos não resolvidos em 95% nas unidades tratadas com NPK. Os perfis cromatográficos demonstraram uma maior degradação dos hidrocarbonetos saturados nas unidades com NPK, evidenciando uma melhor eficiência desse fertilizante no processo de bioestímulo testado. Os perfis das unidades tratadas com OSMOCOTE não sofreram modificações significativas durante o experimento.

Palavras- chave: Bacia do Recôncavo, bioestimulação, hidrocarbonetos saturados, estuário do Rio São Paulo, NPK, OSMOCOTE.

LIMA, Danúsia Ferreira. Bioremediation in impacted sediments by petroleum in Baía de Todos os Santos, Bahia: Evaluation of the degradation in the Saturated Hydrocarbon. Dissertation (Master thesis) – Geosciences Institute, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

ABSTRACT

The factory development and therefore the urban expansion in the São Francisco de Conde region, Candeias and Madre de Deus, baianos municipality located in the margin of the Todos os Santos Bay (BTS), led in the reduction of great areas of mangrove. The bioremediation is a technique applied to ease several environment impacts, among them the generated by petroleum derivate, through the introduction of microorganisms in the environment, or creating great conditions for their development. The present study aimed to evaluate the degradation of the saturated hydrocarbon through the technique of biostimulus in mangrove sediments impacted by petroliferous activities, testing the potentiality of two fertilizers (NPK and OSMOCOTE) as accelerators agents of biodegradation as petroleum components, under experimental conditions. The origin of the oil found it in the contaminated substrate sedimentary constituted in complementary investigation. The methodology used in the experiment was based in the monitoring of the bioremediation process in simulations units (aquarium) with water of the São Paulo river and sediments contaminated by oil. The experiment was performed in the period between September and December of 2008, in the Simulation Laboratory, mounted in the area studied. The geochemistry monitoring was performed by the liquids' chromatography, gas chromatography (GC-FID) and chromatography contained to the spectrometer of mass (GC/MS). The evaluation results for the origin of the contaminated demonstrated similarities with the oils of the Recôncavo Basin, considering the environment generator of a type lacustrine/sweet. The reason horpane/esterane also indicated a deposition in an environment with terrestrial organic matter typical of oils founded in the Recôncavo Basin. For the comprehension of the bioremediation process it was used a monitoring of the physical-chemical parameters, quantification of the nutrients levels, the percentage of the saturated hydrocarbon, aromatic and NOS, and the behavior of the saturated compound along of the all experiment. The monitoring of the physical-chemical parameters showed favored conditions for the bioremediation process during all experiment. The results of liquid chromatography evinced in 90 days of experiment, a enrichment of the compounds NOS, with reduction of the percentage of saturated hydrocarbon in 3% and increase of the compounds not resolved in 95% in the units treated with NPK. The chromatography profile demonstrated a great degradation of the saturated hydrocarbon in the units with NPK, evinced a better efficiency of these fertilizer in the process of biostimulus tested. The profile of units treated with OSMOCOTE does not suffer significantly modifications during the experiment.

Key-Words: Recôncavo Basin, bioestimulation, saturated hydrocarbon, stuary of the river São Paulo, NPK, OSMOCOTE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (a) Antiga base de poço onde foi construído o Laboratório de Simulação; (b) vista frontal; (c) vista lateral evidenciando o Laboratório, construído e cercado e (d) vista interna evidenciando as bancadas.	23
Figura 2. (a) Bancadas com aquários (unidades de simulação); (b) tubos de ensaio (provetas); (c) barras de madeira e (d) bombas de aquário.....	24
Figura 3. Fotografia aérea da foz do rio São Paulo localizado no município de São Francisco do Conde - BA desaguando na BTS, mostrando em destaque a localização do píer, da estação Pedra Branca e área de coleta. Fonte: modificado de BMA, 2005.	25
Figura 4. Placa de sinalização da área de estudo.....	26
Figura 5. Mapa de situação e localização da área de estudo. a) Mapa de situação da BTS; b) Fotografia aérea da área e em destaque c) Local de coleta. Fonte: Modificado da folha da Baía de Todos os Santos: SD-24-X-A-IV	27
Figura 6. Mapa geológico da Baía de Todos os Santos.....	29
Figura 7. Distribuição de sedimentos, segundo sua textura, na Baía de Todos os Santos	30
Figura 8. Mapa pluviométrico da região de estudo.	32
Figura 9. Dois tipos de vegetação encontrada nos manguezais da região de estudo: (a) <i>Avicennia schaueriana</i> (mangue siriúba), (b) <i>Rhizophora mangle</i> L.(mangue vermelho).	34
Figura 10. Esquema da atuação dos processos intempéricos no ambiente marinho. .	40
Figura 11. Ilustração conceitual importante a atenuação natural dos processos que afetam o destino hidrocarbonetos de petróleo.	45
Figura 12. Mecanismos de fitorremediação.....	47
Figura 13. Mecanismo de biodegradação dos contaminantes	50
Figura 14. Fertilizantes agrícolas NPK e OSMOCOTE.....	56
Figura 15. Caranguejo <i>Uca sp.</i>	66
Figura 16. Registro fotográfico de uma espécie de ave no manguezal da Praia do Cação, Madre de Deus, BA.....	67
Figura 17. Detalhe da <i>Avicennia schaueriana</i> ainda no estágio de crescimento.	68
Figura 18. Diagrama ternário mostrando a composição, em função das percentagens de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO, de 636 diferentes tipos de óleo	77
Figura 19. Estruturas químicas de alguns hidrocarbonetos. (a) saturados e (b) insaturados <i>n</i> -hexeno.....	78
Figura 20. Estruturas químicas de alguns hidrocarbonetos aromáticos benzenóides.	80
Figura 21. Estrutura química de um hidrocarboneto contendo enxofre na sua molécula.....	81
Figura 22. Estrutura química de um hidrocarboneto contendo nitrogênio na sua molécula.....	81
Figura 23. Estrutura química de biomarcadores de petróleo. (a) esteranos, (b) terpanos e (c) hopanos.	84
Figura 24. Importância relativa dos processos de intemperismo do óleo.....	87
Figura 25. (a) Área contaminada da floresta de manguezal do estuário do rio São Paulo, São Francisco do Conde/BA, (b) locais de amostragem: (1)Zona alagadiça; (2) exudação de óleo; (3) manchas de óleo.	110
Figura 26. Esquema mostrando a coleta e tratamento dos testemunhos utilizados na Simulação.....	111
Figura 27. Primeira etapa da montagem do experimento.	112

Figura 28. Segunda etapa da montagem do experimento. Unidades de simulação e suas identificações (a) Unidades referências, (b) unidades de biorremediação 1 e (c) unidades de biorremediação 2.	113
Figura 29. Figura esquemática mostrando as dimensões do aquário, da proveta e do suporte de madeira para as provetas.....	114
Figura 30. Terceira etapa da montagem do experimento. Montagem das bancadas: (a) bombas instaladas (b) provetas sendo colocadas no aquário (c) sistema de torneiras ligadas.	114
Figura 31. Etapas de um dia de Simulação. (a) Tanque de armazenamento de água, (b) sistema de torneira com uma pequena vazão, (c) aquário mostrando bolhas de ar, (d) parâmetros sendo mensurados, (e) aquários esvaziados com uma pequena vazão e (f) limite de água deixado nas unidades de simulação.	115
Figura 32. Procedimento de retirada das amostras das unidades de simulação. (a) Provetas com amostras, (b) e (c) proveta retirada do aquário, (d) amostras sendo homogeneizadas, (e) recipientes individuais para cada triplicata de aquário e (f) lavagem da bandeja entre a homogeneização das amostras.....	117
Figura 33. Coleta de amostras de sedimento para análise de compostos orgânicos, inorgânicos e análises granulométricas.	118
Figura 34. Equipamentos utilizados para mensurar os parâmetros físico-químicos. (a)refratômetro, (b) pH-metro, (c) condutivímetro e (d) oxímetro.....	119
Figura 35. Aparelho Liofilizador L101 utilizado para retirar a umidade das amostras.	120
Figura 36. Sistema Soxhlet utilizado para extração dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) no sedimento.	124
Figura 37. Espectrômetro de massas modelo MAT 252 <i>Thermo Finnigan</i> para análise da composição isotópica do carbono em extratos orgânicos ou óleos. Laboratório de análises isotópicas, CENPES/PETROBRAS.	126
Figura 38. Cromatograma do óleo total, razões baseadas em alturas da amostra 1 (a), 2(b), 3(c) e 4(d), % Saturados, Aromáticos e NSOs.....	130
Figura 39. Diagrama esquemático representando as percentagens médias dos hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NOS das amostras 1, 2, 3 e 4 analisadas.	131
Figura 40. Gráfico representando as percentagens dos hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO. A seta dá destaque ao enriquecimento dos compostos NSO.....	132
Figura 41. Perfis m/z 191 e m/z 217 do petróleo produzido na Bacia do Recôncavo..	135
Figura 42. Fragmentogramas de biomarcadores saturados cíclicos (m/z 191 e m/z 217) de amostra de óleo da Bacia do Recôncavo do Poço P128.	135
Figura 43. Fragmentogramas de biomarcadores saturados cíclicos (m/z 191 e m/z 217) (a e a ₁) Amostra 1, (b e b ₁) Amostra 2, (c e c ₁), Amostra 3 e (d e d ₁) Amostra 4....	136
Figura 44. Diagrama triangular mostrando a interpretação dos ambientes através da distribuição dos esteranos, adaptado do original de HUANG & MEINSCHEIN (1979).....	138
Figura 45. Diagrama triangular de classificação granulométrica (Shepard, 1954) do substrato sedimentar utilizado no processo de biorremediação.....	139
Figura 46. Gráfico de distribuição do tamanho de grãos em escala phi.	140
Figura 47. Gráfico com variação da temperatura nas unidades de simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.	142
Figura 48. Gráfico com variação do pH nas unidades de Simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.	144
Figura 49. Gráfico com variação da Salinidade nas unidades de Simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.	147
Figura 50. Gráfico com variação do O.D. nas unidades de simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.	149

Figura 51. Gráfico com variação dos teores de fósforo nas unidades de simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.....	151
Figura 52. Gráfico com variação dos teores de amônia nas unidades de simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.....	153
Figura 53. Gráfico com variação dos teores de nitrato nas unidades de simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.....	154
Figura 54. Gráfico com a média dos teores de fósforo, amônia e nitrato nas unidades de simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.	156
Figura 55. Gráfico com a variação dos teores de Carbono Orgânico (COT) nas unidades de simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.....	156
Figura 56. Estruturas químicas de hidrocarbonetos saturados (a) <i>n</i> -alcanos, (b) isoprenóides e (c) cicloalcanos.....	158
Figura 57. Estrutura química de hidrocarbonetos aromáticos com apenas um anel benzênico.	158
Figura 58. Estruturas químicas de compostos NSO.	158
Figura 59. Acúmulo de óleo ou seus derivados em tocas de caranguejo no manguezal do estuário do rio São Paulo.	159
Figura 60. Gráfico esquemático representando em percentagens os teores de hidrocarbonetos saturados (SAT), aromáticos (ARO) e compostos NSO da amostra <i>background</i> utilizado no experimento.....	160
Figura 61. Figura ilustrativa do aumento dos compostos NSO e conseqüente diminuição dos hidrocarbonetos saturados, comportamento sofrido por um óleo em processo de biodegradação.	160
Figura 62. Gráfico representando em percentagens os teores de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO nas unidades de simulação Referência (1, 2 e 3) ao longo do experimento. Setas destacando a redução dos hidrocarbonetos saturados.....	161
Figura 63. Gráfico comparando as percentagens os teores de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO das unidades de simulação Referência (1, 2 e 3) no 1º dia de experimento e a amostra <i>background</i>	162
Figura 64. Gráfico representando em percentagens os teores de hidrocarbonetos saturados (SAT), aromáticos (ARO) e compostos NSO nas unidades de simulação com NPK (1, 2 e 3) Setas destacando a redução dos hidrocarbonetos saturados.	163
Figura 65. Gráfico comparando as percentagens os teores de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO das unidades de simulação Referência (1, 2 e 3) e NPK (1, 2 e 3) no 90º dia de experimento.	164
Figura 66. Gráfico representando em percentagens os teores de hidrocarbonetos saturados (SAT), aromáticos (ARO) e compostos NSO nas unidades de simulação com OSMOCOTE (1, 2 e 3).	165
Figura 67. Gráfico comparando as percentagens os teores de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO das unidades de simulação Referência (1, 2 e 3), NPK (1, 2 e 3) e OSMOCOTE no 1º e 90º dia de experimento.	166
Figura 68. Gráfico com a média dos teores de hidrocarbonetos saturados (SAT), aromáticos (ARO) e compostos NSO das triplicatas (REF 1,2 e 3; NPK 1, 2 e 3; OSM.1, 2 e 3) ao longo do experimento.	167
Figura 69. Cromatograma dos Hidrocarbonetos Saturados da amostra <i>background</i> do substrato do manguezal.....	168
Figura 70. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades referências no 1º dia de simulação (a) referência 1, (b) referência 2 e (c) referência 3.	170
Figura 71. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades referências no 45º dia de simulação (a) referência 1, (b) referência 2 e (c) referência 3.	171

Figura 72. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades referências no 90º dia de simulação (a) referência 1, (b) referência 2 e (c) referência 3.	172
Figura 73. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades NPK, no 1º dia de simulação (a) NPK 1, (b) NPK 2 e (c) NPK 3.	174
Figura 74. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades NPK no 45º dia de simulação (a) NPK 1, (b) NPK 2 e (c) NPK 3.	175
Figura 75. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades NPK no 90º dia de simulação (a) NPK 1, (b) NPK 2 e (c) NPK 3.	177
Figura 76. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades OSMOCOTE no 1º dia de simulação (a) OSMOCOTE 1, (b) OSMOCOTE 2 e (c) OSMOCOTE 3.	178
Figura 77. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades OSMOCOTE no 45º dia de simulação (a) OSMOCOTE 1, (b) OSMOCOTE 2 e (c) OSMOCOTE 3.	179
Figura 78. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades OSMOCOTE no 1º dia de simulação (a) OSMOCOTE 1, (b) OSMOCOTE 2 e (c) OSMOCOTE 3.	180

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características dos hidrocarbonetos encontrados no petróleo. ..	77
Tabela 2. Principais razões de biomarcadores utilizados como parâmetros de origem.	86
Tabela 3. Sínteses dos principais processos de intemperismo do óleo no mar.....	90
Tabela 4. Tabela com tempo de experimento, data de coleta e análises realizadas...	116
Tabela 5. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ para amostras de óleo do Poço P128 da Bacia do Recôncavo e de amostras de óleo exudadas no manguezal do Rio São Paulo.....	133
Tabela 6. Razões de biomarcadores indicadores de origem para amostras de óleo do Poço P128 da Bacia do Recôncavo e de amostras de óleo exudadas no manguezal do Rio São Paulo	134
Tabela 7. Composição do sedimento em relação ao tamanho dos grãos.	139
Tabela 8. Distribuição do tamanho dos grãos (%) das amostras de substrato coletadas ao longo do processo de biorremediação.	140
Tabela 9. Tabela com valores de média, mediana e desvio padrão dos valores para temperatura.....	142
Tabela 10. Tabela com valores de média, mediana e desvio padrão dos valores para pH.....	144
Tabela 11. Valores de média, mediana e desvio padrão dos valores para E_H	146
Tabela 12. Valores de média, mediana e desvio padrão dos valores para Salinidade.	148
Tabela 13. Valores de média, mediana e desvio padrão dos valores para O.D.....	149
Tabela 14. Valores de média, mediana e desvio padrão dos teores do íon fósforo...	152
Tabela 15. Valores de média, mediana e desvio padrão dos teores do íon amônia. .	153
Tabela 16. Valores de média, mediana e desvio padrão dos teores do íon nitrato....	155
Tabela 17. Valores de média, mediana e desvio padrão dos teores de carbono orgânico Total.	157

LISTA DE ABREVIATURAS

BTS	Baía de Todos os Santos
RLAM	Refinaria Landolfo Alves de Mataripe
HTP	Hidrocarboneto Totais de Petróleo
HPA	Hidrocarboneto Policíclicos Aromáticos
O.D.	Oxigênio dissolvido
pH	Potencial Hidrogeniônico
POP	Poluentes Orgânicos Persistentes
E _H	Potencial redox
LEPETRO	Laboratório de Estudos do Petróleo
GPS	Sistema de Posicionamento Global
TEMADRE	Terminal Almirante Alves Câmara
REPAR	Refinaria Presidente Getúlio Vargas
CENPES	Centro de Pesquisa da Petrobras
LENEP	Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo
NEA	Núcleo de Estudos Ambientais
IGEO	Instituto de Geociências
UCM	<i>Unresolved Complex Mixture</i>
O.G	Óleos e graxas

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO.....	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELA	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV

CAPITULO I – INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

I. 1. INTRODUÇÃO	20
I. 2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	25
I. 2.1 LOCALIZAÇÃO E SITUAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....	25
I. 2.2 CARACTERÍSTICAS DA REGIÃO DE ESTUDO	28
I. 2.2.1 Aspectos Geológicos e Geomorfológicos.....	28
I. 2.2.2 Sedimento	29
I. 2.2.3 Hidrologia e drenagem	31
I. 2.2.4 Clima	32
I. 2.2.5 Flora	33
I. 2.3 HISTÓRICO DO PETRÓLEO NA REGIÃO DE ESTUDO E OS PROBLEMAS ADVINDOS	34
I. 3. OBJETIVOS.....	38
I. 3.1 OBJETIVO GERAL.....	38
I. 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38

CAPITULO II – BIORREMEDIAÇÃO

II. 1. BIORREMEDIAÇÃO: TECNOLOGIA UTILIZADA PARA RECUPERAR AMBIENTES CONTAMINADOS POR PETRÓLEO	40
II. 1.1 BIORREMEDIAÇÃO.....	41
II. 1.2 TIPOS E ESTRATÉGIAS PARA BIORREMEDIAÇÃO “IN SITU”	44
II. 1.2.1 Biorremediação intrínseca (Atenuação Natural)	44
II. 1.2.2 Bioventilação.....	45
II. 1.2.3 Fitorremediação	46
II. 1.2.4 Bioaugmentação	48
II. 1.2.4.1 Ação dos Microorganismos degradadores de hidrocarbonetos	50
II. 1.2.5 Bioestimulação	54
II. 1.2.5.1 Importância dos nutrientes.....	57
1.2.6 Avaliação do processo de Biorremediação em laboratório	59

CAPITULO III – MANGUEZAL

III. 1. MANGUEZAL: ORIGEM, CARACTERÍSTICAS, IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E SUAS REAÇÕES DIANTE DO PETRÓLEO	64
III. 1.1 ORIGEM E CARACTERÍSTICAS DOS MANGUEZAIS	64
III. 1.2 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DOS MANGUEZAIS.....	68

III. 1.3 REAÇÕES DO MANGUEZAL DIANTE DO PETRÓLEO.....	71
---	----

CAPITULO IV – COMPOSIÇÃO DO PETRÓLEO

IV. 1. COMPOSIÇÃO DO PETRÓLEO	76
IV. 1.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	76
IV. 1.1.1 Hidrocarbonetos alifáticos	78
IV. 1.1.2. Hidrocarbonetos Aromáticos	79
IV. 1.1.3. NSO.....	80
IV. 1.1.4 Biomarcadores	82
IV. 1.1.4.1 Biomarcadores e origem	85
IV. 1.2 ALTERAÇÕES FÍSICAS E QUÍMICAS DO PETRÓLEO NO MEIO AMBIENTE.....	86
IV. 1.3 CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO	90

CAPITULO V – ESTADO DA ARTE

V. 1. ESTADO DA ARTE	95
V. 1.1 HISTÓRICO DA BIORREMEDIAÇÃO NO MUNDO	95
V. 1.2 HISTÓRICO DA BIORREMEDIAÇÃO NO BRASIL	100

CAPITULO VI - MATERIAIS E MÉTODOS

VI. 1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	109
VI. 1.1 ÁREA DE AMOSTRAGEM	109
VI. 1.2 AMOSTRAGEM	110
VI. 1.3 METODOLOGIA DE MONTAGEM DO EXPERIMENTO	112
VI. 1.4 METODOLOGIAS DE SIMULAÇÃO	114
VI. 1.5 METODOLOGIA DE RETIRADA DE AMOSTRAS	116
VI. 1.6 MONITORAMENTO DAS UNIDADES DE SIMULAÇÃO	118
VI. 1.7 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	119
VI. 1.7.1. Processamento das amostras de Sedimentos	120
VI. 1.7.2. Análises granulométricas	120
VI. 1.7.3 Determinação de nutrientes	121
VI. 1.7.4 Determinação de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP).....	124
VI.1.7.5 Determinação de isótopos ¹³C	125
VI.1.7.6 Determinação dos biomarcadores.....	126

CAPITULO VII – RESULTADOS E DISCUSSÕES

VII. 1. RESULTADOS E DISCUSSÕES	129
VII. 1.1 AVALIAÇÃO DA ORIGEM DO CONTAMINANTE	129
VII. 1.1.1 Análises Cromatográficas	129
VII. 1.1.2 Análises isotópicas	132
VII. 1.1.3 Análises de Biomarcadores.....	133
VII. 1.2 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO	138
VII. 1.2.1 Avaliação granulométrica	138
VII. 1.2.1. Avaliação dos parâmetros físico-químicos não-conservativos .	141
VII. 1.2.1.1 Temperatura	141

VII. 1.2.1.2 pH.....	143
VII. 1.2.1.3 Potencial Redox	145
VII. 1.2.1.4 Salinidade	146
VII. 1.2.1.5 Oxigênio Dissolvido (O.D.)	148
VII. 1.2.2 Avaliação geoquímica.....	150
VII. 1.2.2.1 Fósforo, nitrato, amônia e carbono orgânico	150
VII. 1.2.2.2 Análises cromatográficas.....	157

CAPITULO VIII – CONSIDERAÇÕES FINAIS

VIII. 1. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	183
VIII. 2. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	185
VIII. 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	186
ANEXO A.....	214
ANEXO B.....	217
ANEXO C.....	220
ANEXO D.....	223

CAPÍTULO I

Introdução Geral e Objetivos

Apresentação do Trabalho

Este trabalho está disposto em capítulos, com a seguinte ordem: **Capítulo I** – Introdução geral; **Capítulo II** – Biorremediação; **Capítulo III** – Manguezal; **Capítulo IV** – Composição do petróleo; **Capítulo V** - Estado da Arte; **Capítulo VI**- Materiais e Métodos; **Capítulo VII** – Resultados e Discussões; **Capítulo VIII**- Considerações Finais e Referências Bibliográficas. Cada Capítulo apresenta as seguintes subdivisões:

Capítulo I - Nesse capítulo é apresentada a introdução geral à pesquisa contendo Objetivos - Gerais e Específicos; Caracterização da área de estudo - Histórico do petróleo na região de estudo; Aspectos fisiográficos da região, Área, Localização e situação da área de estudo.

Capítulo II – Neste capítulo foi abordado sobre o tema Biorremediação: Tecnologia utilizada para recuperar ambientes contaminados por petróleo; tipos e estratégias para o processo, Importância dos nutrientes, Ação dos Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos e avaliação do processo de Biorremediação em laboratório.

Capítulo III - Manguezal: Origem, características, importância ecológica e suas reações diante do petróleo.

Capítulo IV - Neste capítulo é abordada a composição química do petróleo, contaminação por petróleo e as alterações físicas e químicas do petróleo no meio ambiente.

Capítulo V – Nesse capítulo foi abordado o Estado da Arte com o histórico do uso da biorremediação no mundo e no Brasil.

Capítulo VI - Foram demonstrados os materiais e métodos adotados: Área de amostragem, Amostragem, Metodologia de montagem do experimento, Metodologias de Simulação, Metodologia de retirada de amostras, Monitoramento das unidades de simulação, Procedimentos analíticos (Processamento dos sedimentos, determinação granulométrica, de nutrientes, de hidrocarbonetos totais do petróleo, isotópica ^{13}C e biomarcadores).

Capítulo VII - Neste capítulo são feitas as análises e discussões dos resultados da granulometria, parâmetros físico-químico, nutrientes, hidrocarbonetos totais do petróleo, biomarcadores, análises isotópicas.

Capítulo VIII - Este capítulo tem como objetivo apresentar as considerações finais do trabalho e sugestões para trabalhos futuros. Também são apresentadas todas as referências utilizadas para a construção deste trabalho.

I. 1. INTRODUÇÃO

A Baía de Todos os Santos (BTS) apresenta aproximadamente 1200km² de área e 462Km de extensão costeira continental. Configura-se como uma reentrância na costa, com estreitamento principal entre a Cidade do Salvador e a Ilha de Itaparica (CRA, 2001; VEIGA, 2003). Possui um contorno litorâneo de 300Km, sendo na realidade um pequeno golfo composto por três baías. Suas margens possuem uma das maiores reservas de petróleo em terras continentais do Brasil.

A BTS representa hoje, uma das grandes áreas antropizadas, em decorrência do tipo de ocupação exercida ao longo de quatro séculos. Esse processo se intensificou na década de cinquenta, com a implantação do Complexo Petrolífero, seguido da instalação do Centro Industrial de Aratu. Esse desenvolvimento industrial, principalmente pelas atividades petrolíferas, vem provocando a destruição dos ecossistemas naturais, contribuindo para a degradação do solo, das águas superficiais, comprometendo, portanto, a qualidade de suas águas e sedimentos (CRA, 2001).

Os sedimentos têm a capacidade de fixar e liberar contaminantes e atuam ora como depósitos progressivos, ora como fontes sistemáticas ou eventuais de compostos orgânicos e metálicos. A liberação dessas substâncias contaminantes fica sujeita as eventuais perturbações naturais (p.ex. diagênese precoce, difusão, ressuspensão de sedimentos pelo vento ou tormentas) e antrópicas (como as atividades de dragagem) (FRONZA, 2006).

Quando soterrados nos sedimentos os contaminantes podem sofrer modificações químicas e biológicas que os disponibilizam a biota (flora e fauna de um ecossistema) aumentando os seus efeitos nocivos. O processo de liberação induzido pela ressuspensão é um dos mais relevantes, pois provoca episódios negativos crônicos de grande efeito ecológico local (FRONZA, 2006).

Na BTS, os ecossistemas que se destacam pela sua importância ecológica incluem a Mata Atlântica, os manguezais e os recifes de coral. A importância desses ecossistemas reside tanto na diversidade biológica contida nos mesmos, como na elevada produtividade biológica desses ambientes. A produtividade biológica tem um papel fundamental no sustento das comunidades humanas, principalmente pela

produção de grandes quantidades de peixes e mariscos nas áreas de manguezal, bem como na manutenção da biota aquática (CRA, 2001).

Os manguezais por se desenvolverem em ambientes de transição entre o continente e o oceano e com uma intensa pressão de ocupação humana, sofrem conseqüências ambientais de impactos antropogênicos mais graves que outros ambientes (KENNISH, 1992; WEBER, 1992).

Na região norte da BTS os manguezais encontram-se distribuídos em diversas zonas a exemplo da Região da Baía de Aratu, do Estuário do rio São Paulo e do Estuário do rio Subaé. Este trecho de costa apresenta diversos tipos de atividades de caráter predominantemente industrial. Os manguezais da BTS são intensamente explorados nas atividades de mariscagem, com a coleta de crustáceos e moluscos comestíveis, que alimentam as populações residentes nas imediações dessas áreas (CRA, 2001).

O manguezal do estuário do rio São Paulo objeto deste estudo situa-se na área de influência dos Municípios de Candeias e São Francisco do Conde. Na sua bacia de drenagem se desenvolvem diversos tipos de atividades vinculadas principalmente às atividades de exploração, refino e armazenamento de petróleo. Na Bacia do rio São Paulo existem diversos poços de petróleo, com registro histórico de incidentes do tipo “*blow-out*” (explosão de poços) que levou a diminuição de grandes áreas de manguezais bem como a contaminação dos remanescentes com óleo cru (petróleo) (CRA, 2001; SANTOS, 2002).

Segundo Veiga (2003), na segunda metade do século XX inúmeros acidentes ambientais envolvendo derrames de óleo ocorreram na região norte da Baía de Todos os Santos, atingindo os manguezais da localidade.

Com a finalidade de avaliar possíveis impactos gerados pelas atividades petrolíferas ao longo de décadas, desde 1993 vem sendo desenvolvidos trabalhos de pesquisa na região norte da BTS que vêm mostrando sensíveis alterações nas suas condições ambientais. Assim podem ser destacados os trabalhos realizados por:

Tavares, (1996), Nascimento (1996), Peso-Aguiar & Almeida (1996), que quantificaram concentrações e verificaram a distribuição espacial de metais pesados e hidrocarbonetos presentes nos sedimentos e na fauna bem como o efeito desses na biota.

Machado (1996) estudou o grau de contaminação quanto à presença de hidrocarbonetos em sedimentos de meso e infralitoral dos ecossistemas ao norte da Baía de Todos os Santos.

Martins (2001) avaliou a ocorrência de impactos ambientais crônicos na região norte da BTS em decorrência da presença do complexo petrolífero, relacionando níveis de hidrocarbonetos em sedimentos e as respostas induzidas pela toxicidade em moluscos.

Silva (2002) avaliou o grau de contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA's) em sedimento de mesolitoral da BTS e suas possíveis fontes;

Veiga (2003) avaliou a origem e os níveis de contaminação de sedimentos superficiais de manguezais da porção norte da BTS, principalmente em regiões de produção de petróleo.

Mais recentemente Celino *et al.* (2007), avaliaram as fontes de matéria orgânica e o grau de contaminação por hidrocarbonetos totais na parte norte da BTS.

Segundo Veiga (2003), “depois de cinquenta anos de convívio com derrames e vazamentos de óleo e derivados, a região é apontada pela literatura especializada como uma área contaminada por hidrocarbonetos de petróleo, com um passivo ambiental que deve ser resgatado pela sociedade, em especial a científica, pelo bem das futuras gerações.” Devido ao aumento dos riscos ambientais na região da BTS várias discussões foram realizadas com intuito de desenvolver pesquisas com o propósito de reverter tal situação.

Com isso diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de minimizar os efeitos causados por esses acidentes ao longo desses anos. A biorremediação tem sido reconhecida como um dos métodos menos invasivos e tem se mostrado uma ferramenta eficaz para o tratamento de derrames de petróleo sendo uma modalidade promissora para a minimização ou até extinção das concentrações desses compostos nessa região.

Um dos Projetos em desenvolvimento é o Intitulado “Processos de Biorremediação de áreas de Manguezal sob Influência de Atividades Petrolíferas desenvolvidos por pesquisadores do Instituto de Geociências da UFBA, no âmbito do Projeto Cooperativo PROAMB da Rede de Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas (RECUPETRO). Este projeto tem como um dos objetivos principais desenvolver testes de biorremediação em níveis laboratorial e de bancada

com vistas a promover processos de recuperação de áreas de manguezais afetadas por derramamentos de petróleo e/ou seus derivados, para aplicação “*in situ*” (a nível piloto) e permitir em projetos futuros, a melhor técnica de biorremediação, avaliada no experimento em bancada. Na literatura não existem estudos com a temática biorremediação para regiões da BTS, principalmente para a parte norte desta Baía.

Uma das metas a serem atingidas pelo Projeto Biorremediação em áreas de manguezais, com o propósito de se realizar experimentos de simulação dos derrames de óleos em sedimentos de manguezal, foi a implantação de um laboratório “*in situ*”, ou seja, nas proximidades do estuário do rio São Paulo, o qual foi intitulado de “Laboratório de Simulação de Processos de Biorremediação”. Esse Laboratório se constitui numa das unidades Laboratoriais do Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO)/NEAIGEO/UFBA. A área estabelecida para construção do laboratório foi escolhida em função: de sua proximidade com a área comprometida ambientalmente por processos de exudação de óleo, onde serão realizados os testes; e de conter uma antiga base de poço de perfuração da Petrobras facilitando o acesso à área (Figura 1).



Figura 1. (a) Antiga base de poço onde foi construído o Laboratório de Simulação de Processos de Biorremediação; (b) vista frontal; (c) vista lateral evidenciando o Laboratório, construído e cercado e (d) vista interna evidenciando as bancadas.

No seu interior existem bancadas (Figura 2a), onde ficam apoiados aquários (unidades de simulação) cada um contendo 8 tubos de ensaio (provetas) (Figura 2b), 2 barras de madeiras para o sustento das provetas (Figura 2c) e bombas de aquário usadas para oxigenação da água (Figura 2d).



Figura 2. (a) Bancadas com aquários (unidades de simulação); (b) tubos de ensaio (provetas); (c) barras de madeira e (d) bombas de aquário.

Em um experimento realizado “*in situ*” há possibilidade de se avaliar a evolução da degradação do petróleo considerando todas as variáveis ambientais, pois o composto sofre mudanças na sua constituição após ser liberado para o ambiente. Os principais processos responsáveis por essa mudança são volatilização, dissolução e degradação biológica. Cada processo influencia em maior e menor grau alguns constituintes químicos ou grupo de constituintes, e as taxas de transformação são funções das condições ambientais (DEHAINI, 2001 *apud* OLIVEIRA, 2007).

A primeira técnica testada no âmbito desse projeto foi à utilização de processos de bioestímulo utilizando dois tipos de fertilizantes: NPK e OSMOCOTE. Pesquisas indicam que o bioestímulo tem potencial para servir como alternativa

bastante efetiva para remediação de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo devido ao seu baixo custo e evidente aceleração na degradação desses compostos quando comparados a outras técnicas.

I. 2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

I. 2.1 LOCALIZAÇÃO E SITUAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A área objeto de estudo é representativa do ecossistema manguezal e está localizada nas cercanias do rio São Paulo próximo estação Pedra Branca, nas coordenadas $12^{\circ} 44' 26,0''$ (S) e $38^{\circ} 31' 53,9''$, o qual deságua na Baía de Todos os Santos (BTS) (Figura 3).

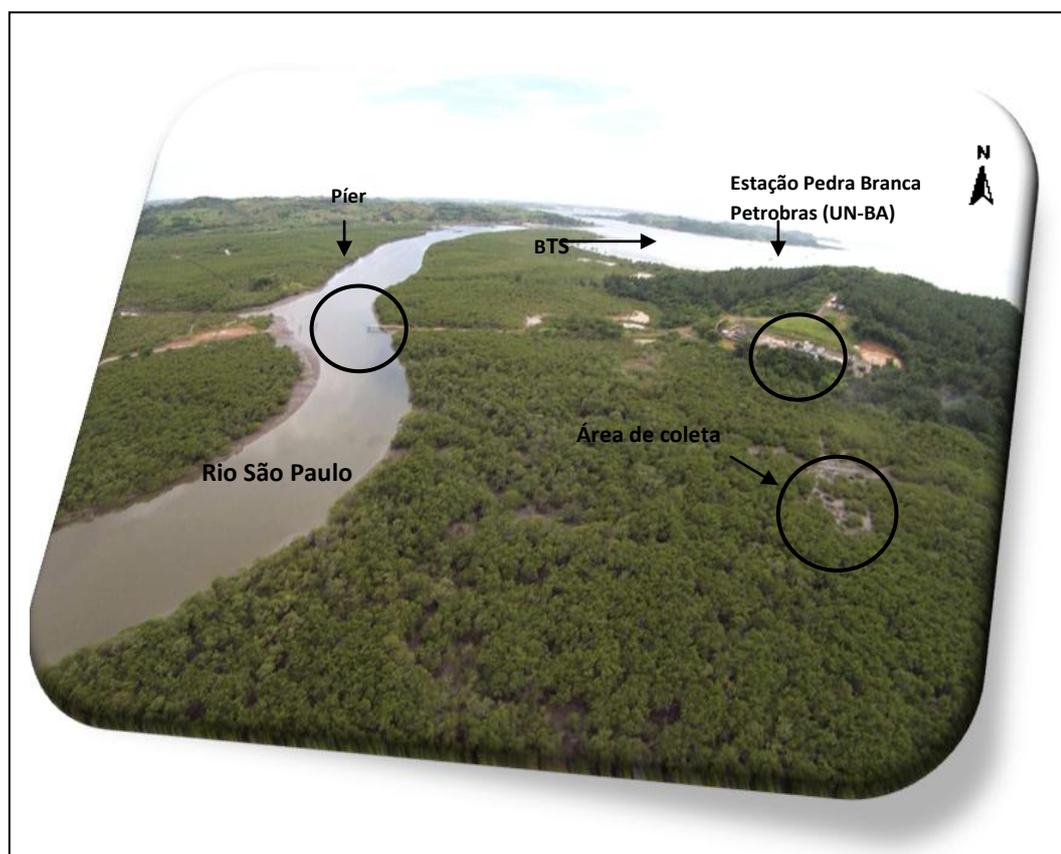


Figura 3. Fotografia aérea da foz do rio São Paulo localizado no município de São Francisco do Conde - BA desaguando na BTS, mostrando em destaque a localização do píer, da estação Pedra Branca e área de coleta. Fonte: modificado de BMA, 2005.

Os limites compreendem os municípios de Madre de Deus, Candeias e São Francisco do Conde. A principal via de acesso a região, a partir de Salvador, é através da BR-324, onde no entroncamento com a BA-522 se toma a direção para Candeias, em seguida segue-se na direção contínua nordeste da BA-522 pela vicinal, chegando à Refinaria Landulfo Alves (RLAM) pega-se à esquerda e segue-se até chegar à área de estudo que se encontra sinalizada por placa indicativa (Figura 4) e fica localizada mais especificamente nas proximidades da Estação de Produção da UN-BA (Petrobras) denominada “*Estação Pedra Branca*”, com uma área de aproximadamente 10km² a NW de Salvador (Figura 5). A RLAM que está instalada na região desde a década de 1950, é responsável por diversas atividades ligadas à indústria petrolífera (campo de produção, refinaria, porto).



Figura 4. Foto da placa de sinalização da área de estudo.

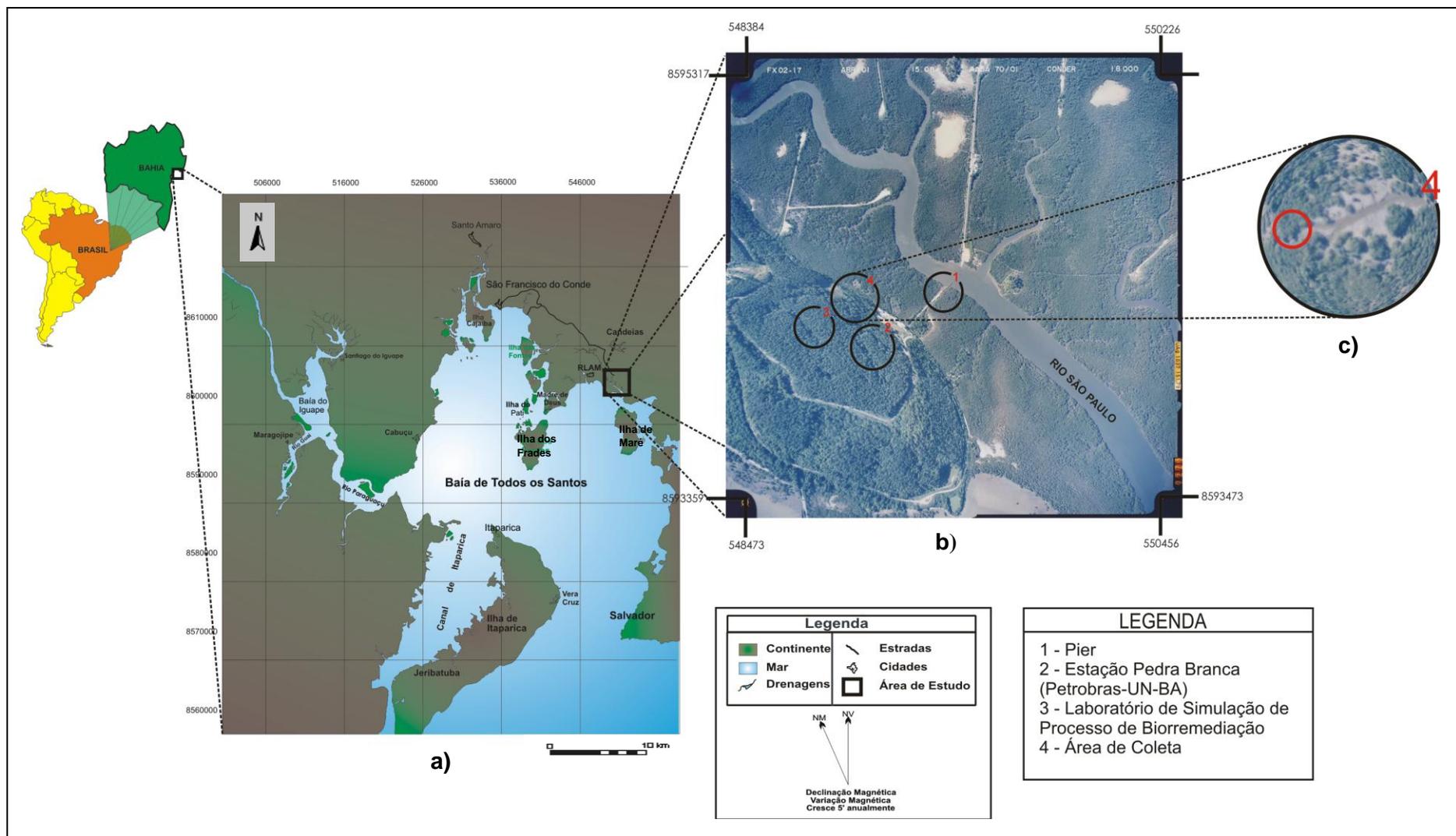


Figura 5. Mapa de situação e localização da área de estudo. a) Mapa de situação da BTS; b) Fotografia aérea da área e em destaque c) Local de coleta. Fonte: Modificado da folha da Baía de Todos os Santos: SD-24-X-A-IV (BAHIA, 2004).

I. 2.2 CARACTERÍSTICAS FISIAGRÁFICAS DA REGIÃO DE ESTUDO

A Baía de Todos os Santos é considerada a maior e mais importante baía navegável da costa tropical do Brasil localizada em uma reentrância costeira, inserida na microrregião do Recôncavo Baiano, entre as coordenadas 12° 39' 4" S – 13° S de latitude e 38° 30' W – 38° 43' 30" W de longitude (LEÃO & DOMINGUEZ, 2000).

I. 2.2.1 Aspectos Geológicos e Geomorfológicos

A origem da Baía de Todos os Santos está relacionada com a quebra do Gondwana, no Jurássico Inferior/Eocretáceo. Essa Baía é constituída por um sistema de falhas e fraturas que delimitam uma depressão na superfície (LEÃO & DOMINGUEZ, 2000).

A Baía de Todos os Santos pode ser considerada como uma baía de maré, uma categoria especial de estuário formada por processos tectônicos de larga escala, apresentando salinidade que varia de oceânica a salobra. A morfologia é tectonicamente controlada pelas falhas geológicas associadas à Bacia Sedimentar do Recôncavo (LESSA *et al.*, 2000).

A área de estudo está inserida na Bacia sedimentar do Recôncavo (limitada pela falha de Salvador, a leste, e de Maragojipe, a oeste), que compõem a porção sul do *rift* intracontinental Recôncavo-Jatobá (SANTOS, 2002) (Figura 6).

Segundo Rosa *et al.*, (2001) unidades litológicas, que compõem essa bacia são essencialmente compostas por seqüências de conglomerados, arenitos e folhelhos. Este pacote sedimentar repousa sobre o Embasamento Pré-Cambriano, composto em sua maior parte de granulitos e migmatitos de Idade Arqueana que, constituem o Cinturão Granulítico Atlântico, e sobre os metassedimentos brasileiros da formação Estância.

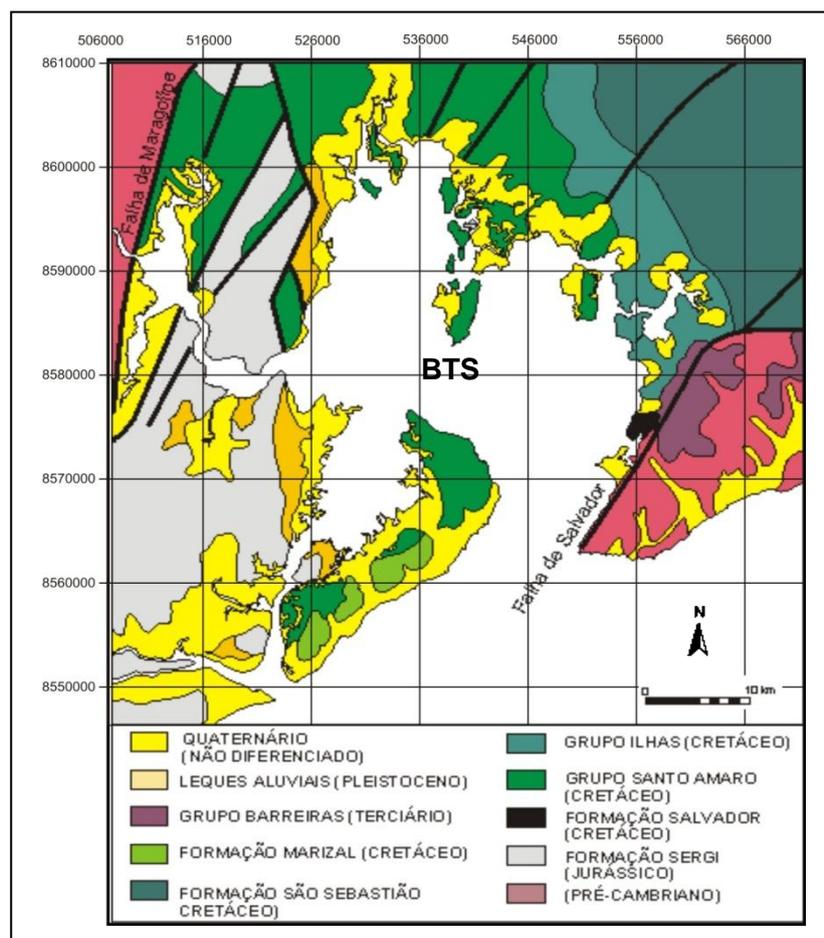


Figura 6. Mapa geológico da Baía de Todos os Santos. Fonte: modificado LESSA *et al.*, 2000.

Na região dos municípios de Madre de Deus, São Francisco do Conde e Candeias primariamente são aflorados sedimentos das Formações Itaparica e Candeias e do Grupo de Ilhas, secundariamente, litotipos da formação São Sebastião, além dos depósitos recentes que constituem as praias, manguezais e pântanos (BAHIA, 1994a).

I. 2.2.2 Sedimento

A textura dos sedimentos superficiais de fundo da BTS apresenta uma distribuição espacial diferenciada variando desde argila a areia muito grossa (LESSA *et al.*, 2000) (Figura 7).

Areias médias a muito grossas são encontradas nas duas entradas da BTS (Canal de Salvador e o Canal de Cacha Pregó), na foz do Rio Paraguaçu, ao longo da margem oeste do Canal de Itaparica e junto à Ilha de Maré, bem como em zonas

esparsas na parte central da BTS. Areias finas a muito finas ocorrem principalmente ao longo do Canal de Itaparica, na porção central da BTS e ao longo da margem oeste da BTS, adentrando pelo Canal do Paraguaçu (CRA, 2001).

Na porção norte predominam os sedimentos argilosos enquanto que ao sul há predominância de areias médias e grossas. Sedimentos carbonáticos e bioclastos ocorrem em diversas áreas, tendo sido alvo da exploração comercial por muitos anos, como matéria prima usada na fabricação de cimento. Franjas estreitas, mais ou menos contínuas, de recifes de corais, bordejam as ilhas da Baía de Todos os Santos (LEITE, 1997; LEÃO & DOMINGUEZ, 2000).

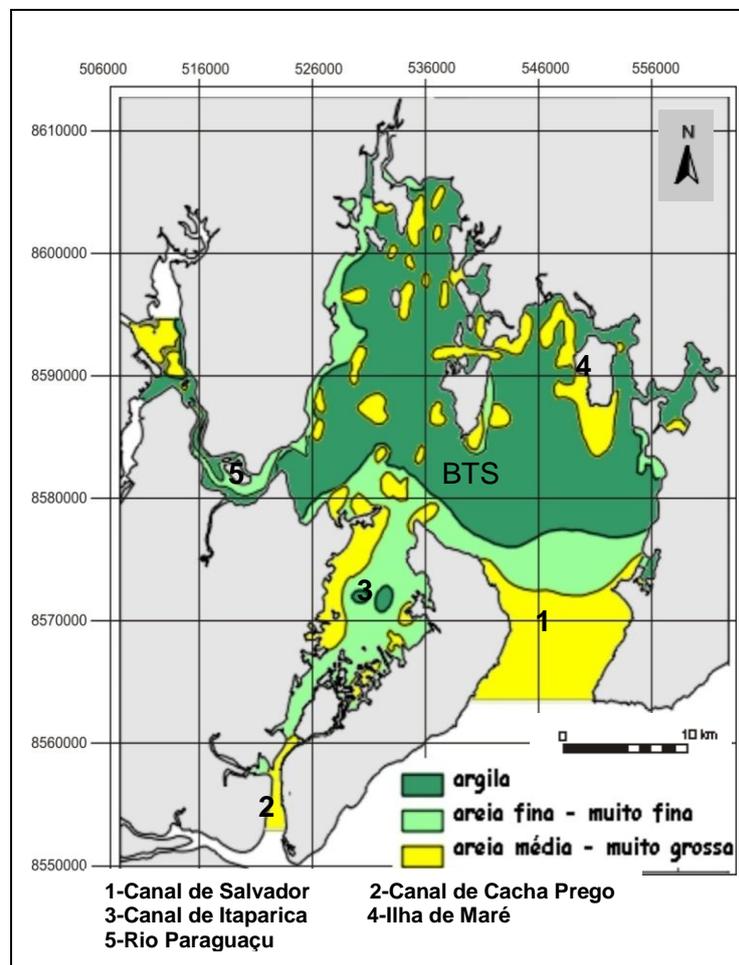


Figura 7. Distribuição de sedimentos, segundo sua textura, na Baía de Todos os Santos. Fonte: modificado de LESSA *et al.*, 2000.

I. 2.2.3 Hidrologia e drenagem

A Região Metropolitana de Salvador (RMS) compreende basicamente dois sistemas aquíferos: (i) o aquífero granular múltiplo, semiconfinado, ou sistema do Recôncavo e (ii) o aquífero freático, consistindo do embasamento cristalino acoplado à Formação Barreiras ou às areias quaternárias. O sistema livre é definido por uma única superfície freática com alimentação natural por infiltração direta de águas pluviais (CAVALCANTI *et al.*, 2001).

A rede de drenagem do recôncavo tem maior influência geológica e geomorfológica da bacia tectônica do que os índices pluviométricos da área. Os cursos fluviais são relativamente curtos com disponibilidade de águas superficiais individualmente modestos, mas, de apreciável volume (BRASIL, 1981).

Os padrões de drenagem não são bem definidos apresentando um modelo dendrítico, mas algumas vezes retangular e paralelo. Os rios apresentam valores baixos de gradiente, possuem fundo chato, amplos e abertos, podendo apresentar vales agudos de formações erosivas (SANTOS, 2005) Esses vales apresentam grande quantidade de sedimentos porosos e permeáveis o que traduz a elevada capacidade de recarga e demonstram a existência de possantes aquíferos devido à presença de rochas pelíticas, redutos com leitos calcíticos e magnesianos (BAHIA, 1994b).

As bacias hidrográficas, afluentes à Baía de Todos os Santos, possuem uma área de captação superior a 60.000Km² e despejam cerca de 95m³s⁻¹ de água doce no seu interior (LESSA *et al.*, 2000). Os rios Jaguaribe, Paraguaçu, Pojuca, Jacuípe e Joanes são os maiores e mais importantes. Dentre os menores rios encontra-se o rio São Paulo, cuja foz está localizada na porção norte da Baía, no município de São Francisco do Conde.

Segundo Bahia (2000):

A bacia hidrográfica do rio São Paulo limita-se ao norte (N) com a bacia do rio Joanes, ao sul (S) com a BTS, a leste (E) com as bacias dos rios Bonessu, Petecada e Jacarenga, e a oeste(w) com as bacias dos rios Paramirim e Mataripe. Apresenta uma área de drenagem de 37 km², vazão média de 0,3m³.s⁻¹, uma extensão total de 17km, sendo que 9km são margeados por manguezais. Deságua na BTS no sentido norte-sul, abrangendo os municípios de São Francisco do Conde e Candeias. O rio São Paulo não é tributário de nenhum outro rio, nem possui grande afluente e está inserido em um sistema de aquífero granular múltiplo, semiconfinado.

I. 2.2.4 Clima

A área de estudo está inserida na Região Metropolitana de Salvador e segundo a classificação climática de KOPPEN (1948) apresenta três tipos climáticos denominados Am, As e Af. Na maior parte da área de estudo o clima é do tipo Af, caracterizado pela constante umidade, sem estação seca definida, e precipitações superiores a 1800mm; os maiores índices são registrados nos meses de março a agosto (SANTOS, 2005) (Figura 8).

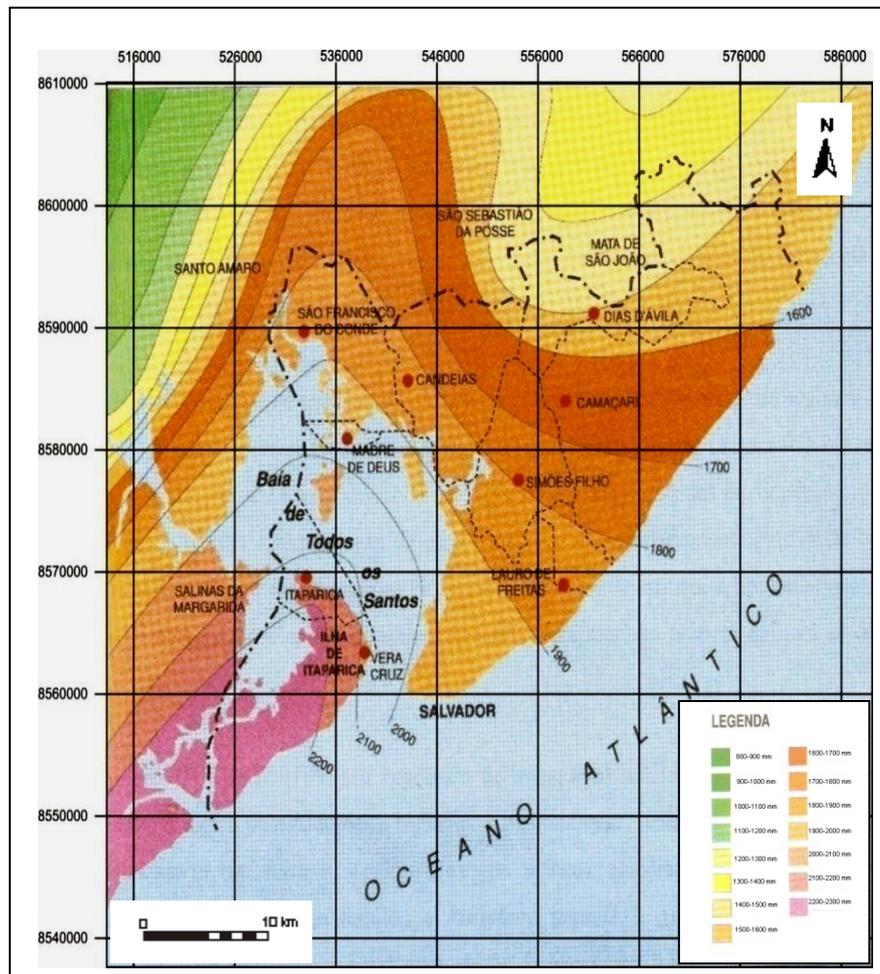


Figura 8. Mapa pluviométrico da região de estudo. Fonte: modificado CONDER, 1994.

Os dados médios de temperatura da área da BTS, considerando as temperaturas médias compensadas, as médias das temperaturas máximas e as médias das temperaturas mínimas são sempre superiores à 18°C, com amplitude térmica inferior à 4°C, indicando o caráter megatérmico do clima da região. Isso

confirma a sua condição tropical, definida pela sua latitude, baixa altitude e proximidade do mar. As menores temperaturas são observadas no mês de julho, com uma média igual a 23,6°C, enquanto que as temperaturas mais elevadas ocorrem em março (26,7°C) (CRA,2001).

Na área da BTS a precipitação pluviométrica média anual atinge cerca de 2.100 mm/ano, variando de aproximadamente 100 mm em janeiro a uma média de cerca de 350 mm em maio. O trimestre mais chuvoso compreende os meses de abril a junho, quando o nível total da precipitação pluviométrica atinge, em média, cerca de 930 mm/ano, ou seja, cerca de 45% da precipitação média anual (CRA, 2001).

I. 2.2.5 Flora

A flora da BTS é reflexo de uma influência combinada de fatores climáticos, relevo, solo e litologia. A região pode ser agrupada em duas zonas: a costeira com formação pioneira e a zona de tabuleiro com a predominância de savanas (BAHIA, 1994b).

Podem ser encontradas no interior dos municípios de Candeias, São Francisco do Conde e Madre de Deus resquícios de mata que deu lugar a atividades de origem antrópicas registrada pela presença de pastagem, culturas cíclicas e permanentes (BAHIA, 1994b).

Segundo Bahia (1994b):

A formação pioneira é pedologicamente instável, em função do constante rejuvenhecimento do solo por processos de sedimentação aluvial e marítimo. Foi subdividida em áreas de influência marinha, formando as restingas, cordões litorâneos e dunas, e áreas de influência flúvio-marinha, formando as restingas, regiões de manguezais na desembocadura dos rios, sob constante influência das marés, geralmente desenvolvendo uma vegetação arbórea exclusiva de ambiente salobro.

A área de estudo apresenta uma flora tipicamente de manguezal representada pelas espécies *Laguncularia racemosa* R. Gaeth (mangue branco), associada a *Avicennia schaueriana* (mangue siriúba) e *Rhizophora mangle* L. (mangue vermelho) (QUEIROZ, 1992) (Figura 9).



Figura 9. Dois tipos de vegetação encontrada nos manguezais da região de estudo: (a) *Avicennia schaueriana* (mangue siriúba), (b) *Rhizophora mangle* L. (mangue vermelho).

Na região do rio São Paulo predomina o tipo de vegetação formada por arbustos, gramíneas e principalmente na região estuarina a vegetação típica de manguezal. Pode ainda ser encontrado o *Piinus sp*, implantado pela Petrobras no processo de reflorestamento (BAHIA, 2002).

I. 2.3 HISTÓRICO DO PETRÓLEO NA REGIÃO DE ESTUDO E OS PROBLEMAS ADVINDOS

A exploração das atividades petrolíferas no território brasileiro começou no ano de 1939 com o poço DNPM-163 localizado no subúrbio ferroviário do Lobato, em Salvador, capital do Estado, mas foi com a chegada da Petrobras ao Recôncavo Baiano que se deu o processo de industrialização do Estado da Bahia (OLIVEIRA, 1997).

O primeiro campo de petróleo submarino no Brasil que começou a produzir ainda nos anos 50, foi o de Dom João, na Baía de Todos os Santos, no Recôncavo Baiano, localizado nas proximidades de São Francisco do Conde, Candeias e Madre Deus com uma área de 30Km² e situado a 40Km de Salvador. Para seu desenvolvimento foram perfurados 634 poços, dos quais 07 ainda estão em produção. Na época este campo era considerado um dos mais importantes por produzir óleo de reservatórios com arenitos da Formação Sergi cuja produção era equivalente a 89 milhões de barris de óleo (VEIGA, 2003; QUEIROZ *et al.*, 2007).

A primeira refinaria moderna de petróleo do Brasil foi inaugurada em 17 de setembro de 1950, sob o nome de Refinaria Nacional de Petróleo S.A., sendo depois batizada de Refinaria Landulpho Alves de Mataripe (RLAM). Localizada às margens da Baía de Todos os Santos e dentro de uma região de manguezal, a 56Km de Salvador, no município de São Francisco do Conde, a RLAM ocupa uma área de $6,4 \times 10^6 \text{m}^2$ (VEIGA, 2003).

Segundo Veiga, 2003:

Provavelmente na época da criação da RLAM, a componente ambiental ainda não era considerada como parte integrante da tomada de decisões pelas empresas, por isso nota-se que a posição geográfica da refinaria não levou em conta a preocupação com as peculiaridades do meio ambiente local. A RLAM está construída num alto topográfico que corresponde à área de recarga do aquífero livre e do rio Mataripe, que deságua no manguezal, constituindo-se, portanto, numa potencial fonte poluidora dessa localidade.

Para a carga e descarga da produção de petróleo e seus derivados foi construído em 1958 o TEMADRE - Terminal Almirante Alves Câmara, unidade operacional da TRANSPETRO, subsidiária da Petrobras, segundo terminal portuário mais importante dessa Empresa localizado na Ponta do Mirim, em Madre Deus, a 65Km de Salvador e 10Km da RLAM. O TEMADRE ocupa cerca de 50% dos 11Km² de solo urbano da Ilha de Madre Deus e movimenta um volume de $1,5 \times 10^9$ litros/mês de petróleo e seus derivados (ANP, 2002).

A existência dos terminais marítimos na ilha de Madre Deus, em especial o TEMADRE, representa um risco constante de acidentes ambientais na região. Além do TEMADRE na Ilha de Madre Deus está em operação uma fábrica de asfalto da Petrobras, localizada nas proximidades da região portuária e às margens de uma zona de manguezal. Nos arredores das instalações são evidentes os sinais de degradação ambiental, podendo ser visivelmente observadas pela erosão das encostas, depósitos de aterros sobre o manguezal e descaracterização da paisagem (VEIGA, 2003).

Ao longo de sua história, a Baía de Todos os Santos passou por diversos ciclos econômicos, desde o ciclo do pau-brasil, cana-de-açúcar, pesca da baleia, do fumo, da farinha-de-mandioca, da indústria têxtil, até chegar ao ciclo do petróleo, da indústria de transformação (CIA) e da indústria petroquímica. Dentre eles, aqueles considerados mais agressivos ao meio ambiente são os ciclos do petróleo e da indústria petroquímica (GERMEN/UFBA-NIMA, 1997).

O levantamento sócio-ambiental realizado por GERMEN/UFBA-NIMA (1997) concluiu que a constante pressão ambiental sofrida pela porção norte da Baía de Todos os Santos, em função do complexo petrolífero instalado, tem obrigado os moradores locais a conviverem com problemas ambientais decorrentes dos constantes vazamentos de petróleo e derivados.

Desde a criação da RLAM, derrames e/ou vazamentos de óleo têm comprometido a qualidade de vida da população, deixando um passivo ambiental que se reflete na contaminação dos elementos naturais, incluindo a biota comestível (TAVARES *et al.*, 1996; MACHADO *et al.*, 1996; PESO-AGUIAR *et al.*, 2000). A convivência com as zonas industrializadas provocou a extinção ou rarefação da vegetação de manguezal onde estas exibem folhagens amareladas, perfuradas ou enrugadas como resultado da exposição ao óleo que, em alguns locais, pode ser visto sobre os troncos e folhas dos vegetais. A fauna marinha que vive no manguezal da região tem apresentado sinais evidentes de contaminação por hidrocarbonetos e metais pesados, ambos relacionados às atividades da indústria petrolífera (TAVARES, 1996; PESO-AGUIAR *et al.*, 2000). Os desmatamentos e as queimadas para produção artesanal de carvão constituem também importantes tensores ambientais colaborando com o aumento da degradação dos ecossistemas localizados na Baía de Todos os Santos.

Depoimentos de pescadores e marisqueiros das comunidades de Coqueiro Grande (às margens da RLAM), Caípe e Madre Deus apontam ainda para a diminuição da quantidade de peixes e mariscos, principais fontes locais de proteína animal e de renda familiar. O gosto de óleo combustível/diesel nos pescados também foi indicado pelos moradores locais, como um problema decorrente dos diversos derrames já vivenciados pela comunidade (VEIGA, 2003).

A descaracterização da paisagem urbana de Madre Deus se faz sentir nas suas vias públicas, que são ocupadas por residências e outros equipamentos urbanos (escolas, creche, igrejas, hospitais, casa comerciais) em íntima convivência com os dutos expostos, configurando-se num importante tensor ambiental (VEIGA, 2003).

Além da evidente degradação dos ecossistemas marinhos, o ar da ilha de Madre Deus, apresenta-se com um inconfundível odor de enxofre e de gás, oriundos das chaminés da RLAM e dos parques de armazenamento de combustível do TEMADRE. Tavares (1997) em suas pesquisas afirma que o ar constitui-se da maior

fonte de *n*-alcanos, principalmente os compostos de baixo peso molecular seja devido às atividades rotineiras ou em consequência de incêndios acidentais, sendo esses compostos adsorvidos por materiais particulados em suspensão e transportados sob esta forma até a Baía de Todos os Santos (VEIGA, 2003).

I. 3. OBJETIVOS

I. 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a degradação dos hidrocarbonetos saturados através da técnica do bioestímulo em sedimento de manguezal, testando a potencialidade de dois fertilizantes (NPK e OSMOCOTE) como agentes aceleradores da biodegradação dos componentes de petróleo sob condições experimentais.

I. 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Monitorar os parâmetros físico-químicos não conservativos – temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido (O.D.), E_H e potencial hidrogeniônico (pH) presentes nos aquários de simulação;
- Analisar de forma qualitativa a eficiência dos fertilizantes agrícolas NPK e OSMOCOTE no processo de bioestimulação utilizados na aceleração da biodegradação de petróleo;
- Avaliar qualitativamente a degradação dos hidrocarbonetos saturados através de técnicas cromatográficas;
- Avaliar quantitativamente a liberação dos nutrientes no sedimento através de análises laboratoriais;
- Avaliar qualitativamente e quantitativamente a fonte contaminante através dos estudos do isótopo C^{13} e biomarcadores.

CAPÍTULO II

Biorremediação

II. 1. BIORREMEDIAÇÃO: TECNOLOGIA UTILIZADA PARA RECUPERAR AMBIENTES CONTAMINADOS POR PETRÓLEO

Enquanto emissões acidentais podem contribuir para apenas uma pequena porcentagem do petróleo liberado no meio ambiente, os grandes derrames acidentais de hidrocarbonetos recebem muita atenção e invocam grande preocupação pública (BALBA *et al.*, 1998).

Quando ocorre um derrame em um ambiente, vários são os processos intempéricos que atuam sobre o óleo alterando suas propriedades físicas e químicas. Esses processos intempéricos (biodegradação, espalhamento, evaporação, dissolução, dispersão, emulsificação, sedimentação e foto-oxidação) que atuam sobre o óleo, podem ocorrer em diferentes velocidades dependendo tanto das propriedades físicas e químicas do óleo como de fatores ambientais (temperatura e energia do ambiente), podendo ser lentos não atendendo às expectativas para a restauração dos sítios contaminados (Figura 10) (ATLAS, 1977; ROSA, 2001).

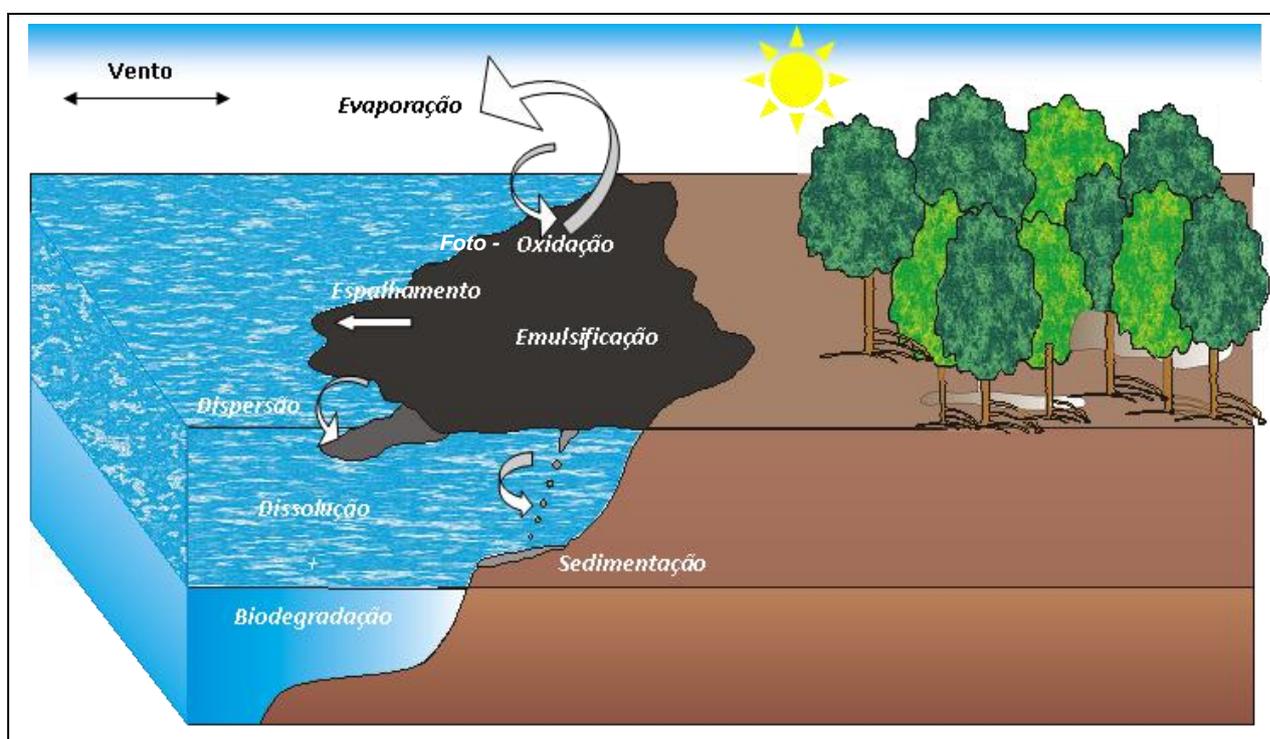


Figura 10. Esquema da atuação dos processos intempéricos no ambiente marinho.

Os acidentes causados por derramamento de petróleo têm o potencial de causar vários efeitos ambientais e econômicos sobre uma grande variedade de recursos naturais e serviços. Estudos nas regiões de manguezal vêm se tornando cada vez mais necessários, visto a importância desse ecossistema no equilíbrio ecológico e devido a este ser alvo de grandes impactos de origem petrogênica causados principalmente por acidentes de indústrias petrolíferas (SANTOS, 2002).

A gravidade de tais efeitos depende da época do ano, do volume da descarga, do tipo e local onde essa descarga ocorre e principalmente das condições ambientais na época de ocorrência (MICHEL & REINHARZ, 1994 *apud* SILVA, 2004a).

Estes incidentes levaram o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas para lidar com a poluição por hidrocarbonetos, tanto no mar como em linhas costeiras. Estes incluem métodos físicos, químicos e biológico sendo objeto de muita discussão e pesquisa nos últimos anos (SOUZA, 2003).

Os processos biológicos estão ganhando mundialmente cada vez mais importância no tratamento de ambientes, especialmente aqueles contaminados com compostos orgânicos. Estes métodos são favorecidos por serem ecologicamente corretos, mais limpos, com custos baixos e de mais fácil aplicação em grande escala, além de não alterar o equilíbrio dos ecossistemas (YEUNG *et al.*, 1997). Atualmente um dos principais processos biológicos utilizados da recuperação de ambientes contaminados por atividades petrolíferas é a Biorremediação.

II. 1.1 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação é definida como o processo pelo qual os resíduos orgânicos são biologicamente degradados em condições controladas para um estado inócuo, estabelecidas pela regulamentação das autoridades. Esta técnica se caracteriza pela aceleração do processo de degradação natural do petróleo onde os microrganismos utilizam como principal fonte de carbono os hidrocarbonetos em seus processos metabólicos (VIDALI, 2001; PRITCHAD & COSTA, 1991; PRINCE, 1993; ATLAS, 1995a & 1995b *apud* COELHO, 2003).

Por definição, a biorremediação é um processo natural onde os

microorganismos degradam os contaminantes ambientais em formas menos tóxicas (VIDALI, 2001). É uma tecnologia emergente que envolve a adição de materiais (por exemplo, nutrientes ou outros fatores de crescimento) em ambientes contaminados para acelerar os processos de biodegradação natural (ZHU *et al.*, 2004a).

O uso da técnica de biorremediação foi descoberta através de pesquisas que investigavam a degradação de hidrocarbonetos no ambiente natural, nas quais foram identificados alguns microrganismos capazes de usar tais hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia (ZOBELL, 1946; ATLAS, 1981). Mas só após a análise dos fatores bióticos e abióticos envolvidos no processo de biodegradação que a técnica passou a ser aplicada na limpeza de ambientes contaminados por óleo (LINDSTROM *et al.*, 1991).

Skladany & Metting (1992) *apud* Metting (1993), afirmam que: “Biorremediação compreende uma variedade de processos de biotratamentos que variam significativamente em seus mecanismos de ação, principalmente os de mineralização, transformação parcial, humificação e alteração do potencial redox”.

A biorremediação é considerada uma técnica de despoluição de ambientes contaminados baseada na aceleração do processo natural de biodegradação de determinadas substâncias no meio ambiente. O processo é dependente de algumas condições ambientais como, temperatura, presença de oxigênio, nutrientes e pH (COELHO, 2005).

O processo normalmente envolve a estimulação de microorganismos presentes no subsolo para degradar os contaminantes no próprio local, embora em alguns casos sejam utilizados microorganismos com capacidades metabólicas específicas (CORSEUIL & WEBER, 1993 *apud* CORSEUIL, 1994). Corseuil (1994) cita também que a meta final para biorremediação é a conversão de resíduos orgânicos em biomassa e subprodutos inócuos do metabolismo microbiano, como o CO₂, CH₄ e sais orgânicos.

A biorremediação é a otimização da biodegradação e esta aceleração pode ser de dois tipos: pela adição de fertilizantes ou pela introdução de microorganismos. O sucesso total em tratamentos de biorremediação depende de inúmeros fatores, tais como: característica do resíduo, presença de condições microbiológicas ótimas, seleção correta da tecnologia de biorremediação, uso de métodos analíticos apropriados para determinar o tipo e a extensão da contaminação. Depende ainda da capacidade de estabelecer e manter as condições que favorecem as taxas de

biodegradação de petróleo no ambiente (ZHU *et al.*, 2004a; HUESEMANN, 1994 *apud* DAL FORNO, 2005).

As técnicas de biorremediação podem ser classificadas como “*ex situ*” ou “*in situ*”. No tratamento “*ex situ*”, o material contaminado é removido para um outro lugar e tratado. As técnicas *in situ* envolvem tratamentos no próprio local contaminado (COELHO, 2005).

As formas de biodegradação “*in situ*” e “*ex situ*” foram revelados muito eficazes como métodos de remediação de contaminantes orgânicos.

Técnicas “*ex situ*” basea-se na possível remoção de compostos voláteis por processos físicos (DOTT, 1995). Para remediação “*ex situ*” de solos contaminados por atividades petrolíferas existem varias técnicas de biorremediação: landfarming, biopilhas e diferentes tipos de biorreatores (BERGER, 2005). As técnicas “*ex situ*” produzem resultados mais rápidos, são mais fáceis de controlar e apresentam uma maior versatilidade para o tratamento de grande número de contaminantes e tipos de solo. Todavia, requerem a remoção do solo contaminado antes da biorremediação acontecer, o que eleva o custo do tratamento (ABBAS, 2003).

Já a biorremediação “*in situ*” visa tratar o solo no local da contaminação utilizando-se de tecnologias que vão desde a introdução de oxigênio e nutrientes até a adição de organismos selecionados para cada tipo de contaminante. Nesta não há remoção de material contaminado, evitando custos e distúrbios ambientais associados com o movimento de solos e águas. Os produtos finais de uma biorremediação efetiva são água e gás carbônico, que não apresentam toxicidade para os organismos vivos.

De acordo com parâmetros como origem dos microrganismos, adição ou não de nutrientes, a biorremediação “*in situ*” pode ser realizada através dos seguintes processos: biorremediação intrínseca, bioventilação, fitorremediação, bioestimulação e bioaumento (ATLAS, 1997 *apud* MARIANO, 2006).

Segundo Berger (2005) o sucesso da biorremediação independe da aplicação da técnica (“*in situ*” ou em “*ex situ*”), mas requer controle do processo. A decisão a favor de umas das medidas depende principalmente das condições econômicas e técnicas e do tempo disponível.

II. 1.2 TIPOS E ESTRATÉGIAS PARA BIORREMEDIAÇÃO “IN SITU”

As técnicas “*in situ*” são aplicadas no próprio local onde ocorreu a contaminação, utilizando microrganismos autóctones, ou seja, do próprio local, com ou sem interferência de tecnologias ativas de remediação (MARIANO, 2006).

II. 1.2.1 Biorremediação intrínseca (Atenuação Natural)

A remediação natural é um processo que se baseia em fatores naturais para remoção ou contenção de contaminantes e recentemente vem ganhado maior aceitação em locais contaminados por derramamentos de derivados de petróleo. A biorremediação natural refere-se aos processos físicos, químicos e biológicos que facilitam o processo de remediação de maneira global (WIEDEMEIR, 1996 *apud* MARIANO, 2006).

Esta não utiliza nenhuma ação de tratamento e está baseada basicamente no monitoramento do deslocamento da pluma. Dados obtidos em pesquisas de campo de vários pesquisadores têm comprovado que a atenuação natural limita o deslocamento dos contaminantes e, portanto, diminui a contaminação ao meio ambiente (CORSEUIL & MARINS, 1998).

Após a contaminação, os contaminantes se dispersarão em forma de pluma e irão deslocar-se. Entretanto, o movimento da pluma pode ser atenuado por processos de diluição, dispersão, adsorção, volatilização e biodegradação (Figura 11).

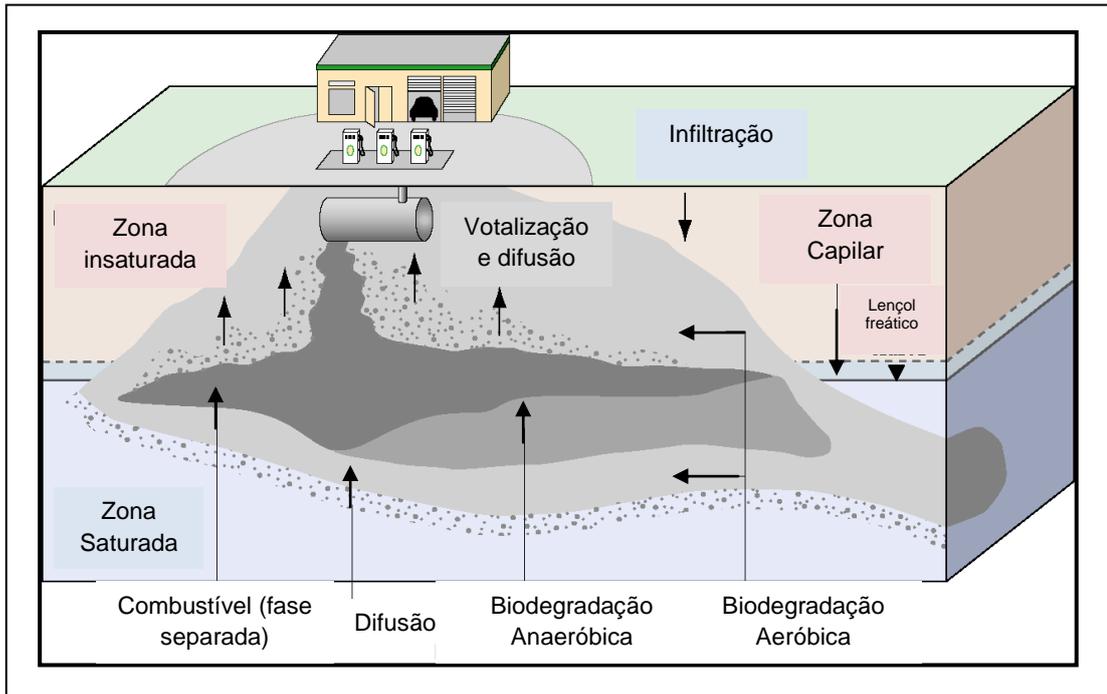


Figura 11. Ilustração conceitual importante a atenuação natural dos processos que afetam o destino hidrocarbonetos de petróleo. Fonte: modificado de BEKINS (2001).

A biodegradação se baseia na capacidade de microrganismos autóctones em degradar contaminantes que tenham sido derramados em subsuperfície sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (BORDEN *et al.*, 1995 *apud* MARIANO, 2006).

É necessário que se determinem as taxas de migração e redução de tamanho da pluma por meio de estudos de campo e de laboratório para saber se o processo natural de atenuação está evitando o deslocamento da pluma até locais de risco, caso contrário, tecnologias que aceleram a transformação dos contaminantes devem ser implantadas (CORSEUIL & MARINS, 1997). O monitoramento da biorremediação intrínseca se faz a partir do acompanhamento de indicadores geoquímicos (p.ex., pH, E_H , O.D., temperatura, aceptores de elétrons).

II. 1.2.2 Bioventilação

A bioventilação é uma tecnologia que aumenta a biodegradação natural dos hidrocarbonetos de petróleo mediante o fornecimento de oxigênio aos

microorganismos presentes no solo. Utiliza baixa vazão de ar, suficiente apenas para manter a atividade microbiana. Na maioria dos casos, o oxigênio é suprido pela injeção direta de ar no solo contaminado, onde ocorre também a biodegradação dos compostos orgânicos voláteis, que se movem lentamente através do solo biologicamente ativado (AZEVEDO, 2006).

A bioventilação tem um histórico em tratamento de degradação aeróbica de contaminantes, como os combustíveis. Na bioventilação aeróbica, solos contaminados com baixas concentrações de oxigênio são tratados através do fornecimento de oxigênio para facilitar a biodegradação microbiana aeróbia. O oxigênio é normalmente introduzido pela injeção de ar em poços que empurra o ar no subsolo (EPA, 2006).

A Bioventilação tem provado ser uma tecnologia útil em muitos casos sob uma variedade de condições, mas como todas as tecnologias tem algumas limitações, dentre ela envolve a habilidade de injetar oxigênio para o solo contaminado (EPA, 2006).

Bioventilação é utilizada principalmente para tratar biodegradação aeróbia de contaminantes, como os compostos orgânicos voláteis e não-clorado SVOCs (por exemplo, hidrocarbonetos de petróleo) (EPA, 2006).

A bioventilação é eficiente no tratamento de qualquer contaminante degradável em meio aeróbico, particularmente é muito efetiva na remediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, sendo mais recomendada para locais onde ocorreu a liberação de compostos com peso molecular médio (diesel).

II. 1.2.3 Fitorremediação

As técnicas biológicas de remediação têm-se destacado na descontaminação de solos e água, incluindo a fitorremediação, ou seja, o uso de plantas para a descontaminação de ambientes impactados por poluentes orgânicos ou inorgânicos (VIANA *et al.*, 2007).

Na fitorremediação, ou seja, no uso de plantas para remover, degradar ou inativar contaminantes no solo, a raiz é de especial interesse. Nessas situações, os contaminantes podem ser absorvidos pela raiz para ser posteriormente

armazenados ou metabolizados pela planta, em um processo conhecido como fitoextração e fitodegradação (USEPA, 2000; MERKL, 2005).

O efeito da fitorremediação no caso do petróleo de solos contaminados, é baseada em uma estimulação de microorganismos degradantes na rizofora, é denominado fitoestimulação ou rizobiodegradação (MERKL, 2005).

As gramíneas são geralmente selecionadas para fitorremediação devido ao seu intenso crescimento e larga ramificação de raízes, as quais oferecem uma superfície estendida para a população microbiana e sua interação (HUTCHINSON *et al.*, 2001; GLICK, 2003). A figura 12 mostra os mecanismos da fitorremediação.

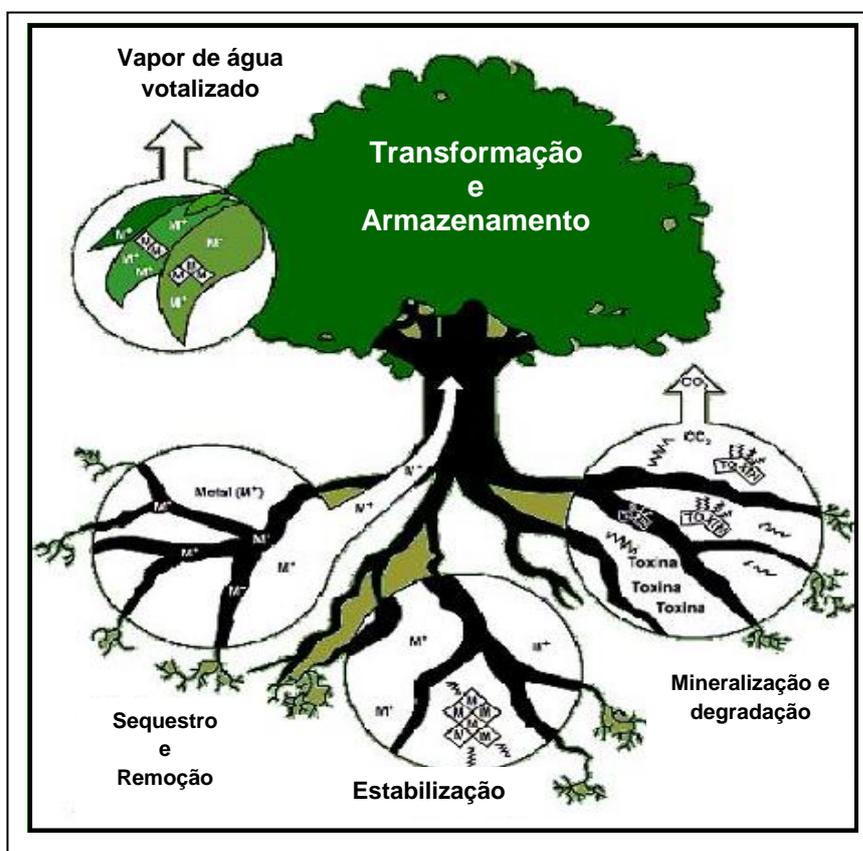


Figura 12. Mecanismos de fitorremediação. Fonte: ANDRADE (2002) *apud* MONTEIRO (2008).

Espécies de plantas são selecionadas para extrair e assimilar ou extrair e quimicamente decompor os contaminantes. Muitos compostos químicos inorgânicos, considerados contaminantes ambientais, são, de fato, nutrientes vitais que podem ser absorvidos por meio do sistema de raízes das plantas para o seu crescimento e desenvolvimento (SANTOS *et al.*, 1999).

A fitorremediação depende da estrutura do solo, textura e teor de matéria orgânica, disponibilidade de água e de oxigênio, temperatura, concentração de nutrientes, radiação solar e dos processos de degradação.

Segundo Santos *et al.* (1999), as tecnologias de fitorremediação podem ser desenvolvidas para diferentes aplicações na remediação do meio ambiente e são classificadas nos seguintes tipos: fitoextração, fitoestabilização, rizofiltração e fitodegradação.

II. 1.2.4 Bioaugmentação

A bioaugmentação ocorre pela adição de microrganismos específicos em regiões impactadas, adaptados em laboratório às condições ambientais. Ao usar essa técnica, faz-se a avaliação dos microrganismos presentes no ambiente, identificando-se os degradadores de óleo. Em seguida, através de biorreatores, estimula-se em laboratório o crescimento microbiano das espécies de interesse e, posteriormente, injeta-se o “pool” de microrganismos no local contaminado com o objetivo de aumentar a população microbiana, responsável pela degradação do óleo (VENOSA *et al.*, 1991 *apud* ROSA, 2003). Mas a aplicação do método na descontaminação de ambientes costeiros não se mostrou suficientemente eficaz, devida atuação de processos intempéricos, correntes marinhas, ventos, ondas, chuvas e competições microbianas, que influênciam diretamente na utilização dessa técnica (ATLAS, 1981).

A adição de culturas mistas de microrganismos alóctones tem como objetivo aumentar a taxa e/ou a extensão da biodegradação, pois, normalmente, a população autóctone não está adaptada, e nem é capaz de degradar toda a gama de substratos presentes em uma mistura complexa como o petróleo (KING *et al.*, 1997 *apud* SOUZA, 2003). Culturas mistas são produzidas com microrganismos coletados de regiões contaminadas, mas para isso tem-se alguns critérios para a escolha destes microrganismos como a habilidade de degradar a maioria dos componentes do petróleo, boa estabilidade genética, elevado grau de atividade enzimática, capacidade de competir com os microrganismos autóctones, manutenção da viabilidade das células durante a estocagem, ausência de patogenicidade e

crescimento rápido no meio ambiente natural. Após o isolamento, os microrganismos são bioaumentados em laboratório e estocados (HOFF, 1992; BAKER & HERSON, 1994 *apud* SOUZA, 2003).

Estudos sugerem que os inóculos microbianos exógenos não são capazes de competir com sucesso com as populações indígenas. Uma abordagem para ultrapassar esta competição tem sido proposta por Rosemberg *et al.* (1992). Eles desenvolveram um produto que combina uréia e formaldeído polimerizado (F-1) com um óleo para selecionar uma cultura degradante capaz de utilizar este fertilizante como fonte de nitrogênio. Assim, as bactérias tinham uma vantagem seletiva sobre a população indígena incapaz de utilizar F-1 como fonte de nutrientes (TAGGER *et al.*, 1983; LEE & LEVY, 1987).

A introdução de microrganismos não indígenas (alóctones) pode ser considerada em locais onde após a contagem das bactérias heterotróficas totais e fungos é identificada uma insuficiência de microrganismos indígenas (autóctones) para a biodegradação do resíduo perigoso em questão, mesmo após a tentativa da bioestimulação (SPILBORGHS, 1997).

A manipulação genética de cepas de microrganismos, visando à oxidação de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos, terpenóides e HPA, também têm sido estudadas, principalmente através da introdução de plasmídeos em bactérias do gênero *Pseudomonas* (NOUR, 1997 *apud* SOUZA, 2003). A introdução de microrganismos geneticamente modificados requer uma avaliação criteriosa dos possíveis danos ambientais, ainda desconhecidos pela comunidade científica (LEAHY & COLWELL, 1990).

Os microrganismos aplicados devem atuar em sinergismo com as espécies autóctones, sem interferir nos processos biogeoquímicos naturais. Leavitt & Brown (1994) fizeram um estudo comparativo entre a bioestimulação e o bioaumento para um caso de tratamento de solo contaminado com óleos crus, empregando, em um caso, microrganismos autóctones e, no outro, cultura comercial com mistura recomendada de nutrientes. Concluíram que, para algumas aplicações, a bioestimulação de microrganismos autóctones é a melhor escolha, considerando o custo e desempenho (MARIANO, 2006).

Parece que na maioria dos ambientes, microrganismos indígenas degradantes são mais do que suficiente para realizar a biodegradação de petróleo, se os níveis de nutrientes e outras condições ambientais adversas não limitá-las.

Pesquisas futuras sobre bioaumento devem centrar-se na investigação de que os ecossistemas podem ser deficientes em microorganismos degradantes e que tipos de óleos ou de componentes importantes as bactérias indígenas podem ser incapazes de degradar.

II. 1.2.4.1 Ação dos Microorganismos degradadores de hidrocarbonetos

Os principais responsáveis pela ciclagem do carbono na natureza são os microorganismos, estes utilizam os hidrocarbonetos como fonte de energia e carbono. O mecanismo de biodegradação (Figura 13) é um processo natural onde microorganismos têm a capacidade de degradar os constituintes do petróleo podendo ocorrer sob condições anaeróbicas e aeróbicas sendo a última mais expressiva. Em muitos ecossistemas é possível encontrar comunidade autóctone de microorganismos capazes de degradar hidrocarbonetos (ROSA, 2001; MARIANO, 2006).

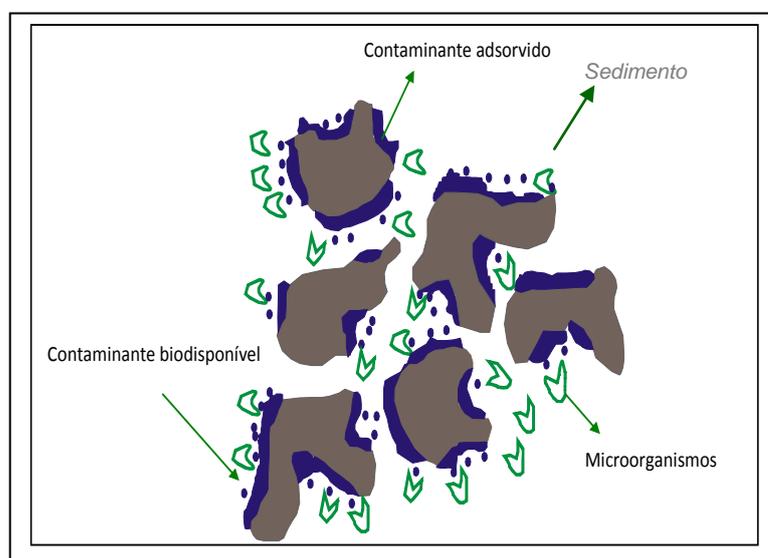


Figura 13. Mecanismo de biodegradação dos contaminantes. Fonte: modificado de FEIJOO *et al.*, 2003.

Para que ocorra essa degradação é preciso obedecer algumas propriedades microbianas e as condições físico-químicas do ambiente baseado no controle de fatores bióticos e abióticos (MORGAN & WATKINSON, 1994; ATLAS, 1995a; KING *et al.*, 1997 *apud* ROSA, 2001).

Os fatores bióticos são referentes às necessidades naturais da flora microbiana. Os fatores abióticos envolvem as propriedades físicas ideais para que o ambiente suporte a microflora e não iniba a produção de enzimas (ROSA, 2001), dentre os quais se destacam:

- Temperatura: que controla o desenvolvimento do organismo e seus processos metabólicos;
- Materiais tóxicos: que afetam diretamente os microrganismos responsáveis pela degradação;
- Exigências Atmosféricas: os gases que alteram o crescimento microbiano são o oxigênio e o dióxido de carbono, considerando que as bactérias apresentam grande variedade de respostas ao oxigênio;
- pH: que pode inibir o desenvolvimento da maioria das bactérias;
- Disponibilidade de água: regula o desenvolvimento e a reprodução das bactérias degradadoras;
- Foto-oxidação: este processo atua nos compostos orgânicos gerando produtos mais polares, tornando-os mais solúveis em água e mais facilmente biodegradados;
- Solubilidade: quanto maior for a solubilidade do contaminante em água, maior será a biodegradação;
- Nutrientes: o desenvolvimento microbiano limita-se à presença de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, os quais auxiliam na síntese da matéria orgânica pela comunidade microbiana.

A habilidade em degradar hidrocarbonetos não é restrita a apenas alguns gêneros de microrganismos, pois vários grupos de bactérias e fungos têm mostrado possuir essa capacidade (KATAOKA, 2001 *apud* MARIANO, 2006).

Leahy & Colwell (1990) citam os seguintes gêneros de bactérias como os mais importantes: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthobacter*, *Bacillus Flavobacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas*. Já Kadri *et al.* (1986), Shamsboom *et al.* (1990), Sorkhoh *et al.* (1990), Al-Hadhrami *et al.* (1995) *apud* Mariano 2006, estudando a distribuição de bactérias que degradam hidrocarbonetos, identificaramas seguintes bacterias: *Acinetobacter sp.*, *Aeromonas sp.*, *Bacillus sp.*,; *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, *Klebsiella cepacia*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella phenylpiruvica*, *Nocardia sp.*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas*

aeruginosa, *Pseudomonas sp.*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Vibrio fisheri* e *Xanthomonas maltophilia*.

Além das bactérias, os fungos representam importante papel na degradação dos hidrocarbonetos no solo. A habilidade dos fungos em utilizar hidrocarbonetos ocorre principalmente em duas ordens: Mucorales e Moniliales. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* possuem muitas espécies que assimilam hidrocarbonetos, contudo esta característica é uma propriedade individual da espécie e não necessariamente uma característica particular do gênero (RISER-ROBERTS, 1992 *apud* MARIANO, 2006).

Fungos de podridão branca da madeira vêm tendo destaque na biodegradação de hidrocarbonetos. Dentre estes, *Phanaerochaete chrysosporium* tem sido usado como organismo modelo na maioria destes estudos. Embora o substrato natural degradado por este fungo seja a lignina, o complexo enzimático por ele secretado pode degradar grande variedade de poluentes recalcitrantes. Esta habilidade tem sido explicada pela similaridade estrutural destes poluentes por porções da estrutura da lignina e a baixa especificidade das ligninases produzidas por *P. chrysosporium* (BRODKORB & LEGGE, 1992 *apud* MARIANO, 2006).

Algumas cianobactérias e algas também possuem a capacidade de utilizar hidrocarbonetos, dentre elas destacando-se os gêneros: *Oscillatoria*, *Microcoleus*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Chlorella*, *Chlamydomonas* e *Ulva* (ATLAS, 1981).

Pode-se afirmar que microrganismos que degradam hidrocarbonetos têm sido isolados de todos os tipos de ambientes nos quais foram pesquisados, parecendo provável que qualquer ambiente possa ter ao menos uma pequena população destes organismos (BAZYLINSKI *et al.*, 1989) e que esta população aumenta após a adição destes compostos no solo (PINHOLT *et al.*, 1979 *apud* MARIANO, 2006).

Assim, a proporção de microrganismo hidrocarbonoclasticos dentro da comunidade microbiana depende do grau de exposição do ambiente ao poluente. De acordo com Riser-Roberts (1992) *apud* Mariano (2006) em ecossistemas não poluídos, estes microrganismos constituem menos de 1% da comunidade microbiana e em ecossistemas poluídos podem chegar a constituir 100% da comunidade. Com isso verifica-se que 10% do total de bactérias isoladas de um efluente de refinaria de petróleo são bactérias hidrocarbonoclasticas e que somente 4% dessas bactérias deverão ser isoladas em uma área não poluída.

Considerando que o petróleo representa uma mistura complexa de substâncias orgânicas, deve-se considerar que para ocorrer sua biodegradação faz-se necessário uma assembléia ou *pool* de microrganismos capazes de degradar todos os compostos contidos no mesmo (COOKSON, 1995).

A tecnologia da biorremediação é baseada em processos nos quais ocorrem reações bioquímicas mediadas por microrganismos. Em geral, um composto orgânico quando é oxidado perde elétrons para um aceptor final de elétrons, que é reduzido (ganha elétrons). O oxigênio comumente atua como aceptor final de elétrons quando presente e a oxidação de compostos orgânicos com a redução do oxigênio molecular são chamados de respiração aeróbia heterotrófica. A biodegradação anaeróbia pode ocorrer pela desnitrificação, redução do ferro, redução do sulfato ou condições metanogênicas (CORDAZZO, 2000).

Nas condições subsuperficiais encontram-se populações de microrganismos, as quais geralmente são formadas por bactérias, fungos, algas e protozoários (GHIORSE & WILSON, 1988 *apud* MARIANO, 2006).

A estrutura química dos poluentes orgânicos tem uma profunda influência na habilidade dos microrganismos metabolizarem estas moléculas, especialmente com respeito às taxas e extensão da biodegradação. Hidrocarbonetos com baixo a médio peso molecular e álcoois são exemplos de compostos facilmente biodegradáveis. Compostos xenobióticos, especialmente hidrocarbonetos halogenados, tendem a ser resistentes à biodegradação. Geralmente, compostos ramificados e polinucleados são mais difíceis para degradar que moléculas monoaromáticas ou com cadeias simples, e aumentando o grau de halogenação da molécula, diminui-se a biodegradabilidade (ALEXANDER, 1965 *apud* ATLAS, 1997).

A comunidade microbiana envolvida na degradação de compostos xenobióticos pode ser dividida em dois grupos: os microrganismos primários e os secundários. Os primários são aqueles capazes de metabolizar o substrato principal fornecido ao sistema, enquanto os secundários não utilizam o substrato principal, porém, os produtos liberados pelos microrganismos primários. Este processo é denominado cometabolismo (GRADY, 1985 *apud* MARIANO, 2006).

A transformação dos hidrocarbonetos pelos microrganismos pode ser facilitada através da produção de enzimas como catalisadores biológicos, ou seja, as enzimas geradas pelos microrganismos controlam as reações bioquímicas, produzindo energia e material necessário à síntese de novas células microbianas

(UNA & GARCIA, 1983; TEZAK *et al.*, 1994). Quando as moléculas orgânicas a serem biodegradadas são maiores que os poros das células dos microrganismos degradadores, os mesmos podem excretar exoenzimas, através da parede celular, as quais irão conduzir a quebra dessa molécula, reduzindo-as de tamanho para que possam atravessar a membrana celular (COOKSON, 1995).

II. 1.2.5 Bioestimulação

A bioestimulação é a aceleração da reprodução microbiana e de suas atividades metabólicas, pela adição de oxigênio, água e nutrientes ao meio ambiente contaminado (ROSA, 2001).

A bioestimulação de populações de microrganismos autóctones com o objetivo de aumentar as taxas de biodegradação é freqüentemente empregada em projetos de biorremediação (ATLAS, 1997). Para se utilizar o processo de bioestimulação, deve-se demonstrar que existe no local contaminado uma população natural de microrganismos capazes de biodegradar os contaminantes presentes e que as condições ambientais são insuficientes para se obter altas taxas de atividade microbiológica dessa população (RAMASWAMI & LUTHY, 1997 *apud* MARIANO, 2006).

Durante a bioestimulação existem fatores limitantes como nutrientes e aceptores de elétrons que estimulam o metabolismo e a velocidade de crescimento dos degradadores o que acelera as taxas de biodegradação em condições ambientais favoráveis. A adição de nutrientes em ambientes contaminados permite a degradação mais rápida e eficaz dos hidrocarbonetos por parte dos microorganismos nativos (VALLEJO *et al.*, 2005).

Segundo Vallejo *et al.* (2005) estudos prévios reportam que a bioestimulação acelera as taxas de biodegradação dos solos contaminados quando os fatores são controlados, como pH, porcentagens de umidade, concentração de HTPs (das frações mais difíceis de degradação), aceptores de elétrons e temperatura. A maioria dos estudos se baseia na adição de nutrientes em forma de fertilizantes de compostos inorgânicos e inorgânicos simples.

A disponibilidade de oxigênio molecular tem um profundo efeito na biodegradação de vários compostos. Limitação de oxigênio é um problema freqüente

na biorremediação “*in situ*” de hidrocarbonetos e outros poluentes que são biodegradados em condições aeróbias (BROWN *et al.*, 1994 *apud* MARIANO, 2006).

Tanto a adição de água como a oxigenação do ambiente contaminado favorece a atuação da biodegradação. Já a aplicação de nutrientes ricos em nitrogênio e fósforo, tem sido amplamente estudada, principalmente quando a concentração dessas substâncias é limitada, como ocorre nos ambientes costeiros localizados em regiões de clima tropical (ROSA, 2001).

Entre os fertilizantes oleofílicos podem ser utilizados uréia parafinada, octilfosfato, octoato férrico, fosfato duplo de amônia e magnésio parafinado, que podem estimular a biodegradação em diferentes ecossistemas aquáticos (ATLAS & BARTHA, 1973; DIBBIE & BARTHA, 1976; HOWORITZ & ATLAS, 1977; OLIVIERI *et al.*, 1976; BERGSTEIN & VESTAL, 1978). Em estudo utilizando fertilizantes de lenta liberação, como o OSMOCOTE (Os. Scotts, Marysville, OH) e Inipol EAP-22 (Ip; ATOFINA Chemicals, Philadelphia, PA), combinado com nutrientes inorgânicos, Ran Xu & Obbard (2003), avaliaram a eficiência desses nutrientes na degradação dos hidrocarbonetos de petróleo presentes nos sedimentos de praia. A degradação dos hidrocarbonetos alifáticos presentes nos óleos tratados com Osmocote no sedimento de praia foi de 96%. A combinação de nutrientes solúveis e Osmocote favoreceu a estímulo do metabolismo dos microrganismos indígenas, bem como manteve o liberação dos nutrientes, aumentando, assim, a biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo presentes no sedimento da praia.

O NPK e OSMOCOTE vêm sendo usados largamente como estimuladores (Figura 14). O NPK, é composto de fosfato de amônia $[(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4]$, sulfato de amônia $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ e cloreto de potássio $[\text{KCl}]$ nas proporções (N:P:K) de 10:10:10. O OSMOCOTE possui a mesma composição, no entanto a diferença está na forma de liberação desses nutrientes; no OSMOCOTE a liberação é mais lenta, pois este é envolvido por uma cápsula protetora que limita a saída dos nutrientes. São fertilizantes de plantas, facilmente encontrados no mercado a preços reduzidos.

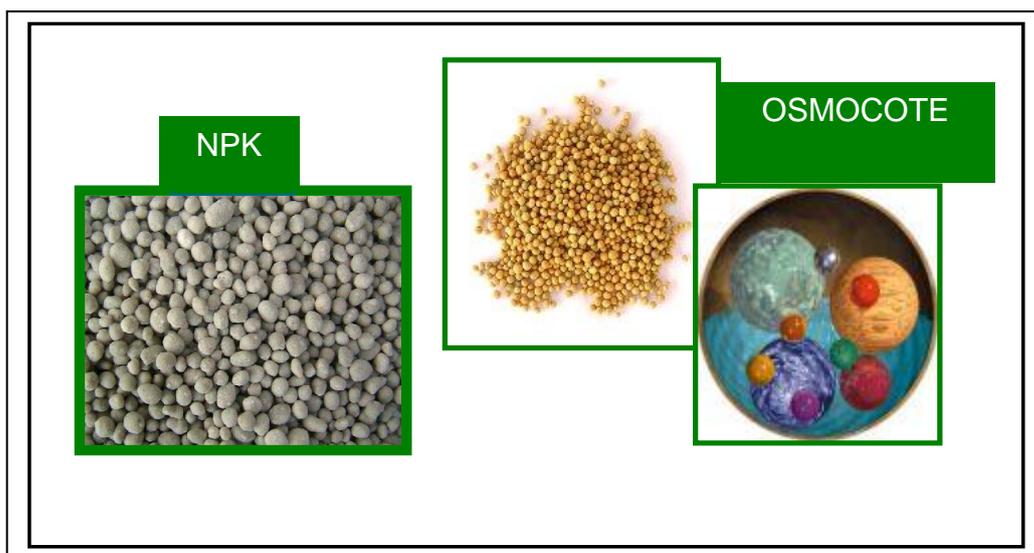


Figura 14. Fertilizantes agrícolas NPK e OSMOCOTE. Fonte: OLIVEIRA, 2008.

Pesquisas utilizando fertilizante do tipo NPK apresentaram resultados positivos, com a remoção de 100% dos *n*-alcanos compreendidos entre o decano e o eicosano, e 40% de remoção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos foi obtido com o uso da combinação de cultura mista + fertilizante, na proporção de C: N de 100:10 (OLIVEIRA, 2001).

Segundo Rosa (2001) em testes laboratoriais o NPK mostrou-se eficiente como agente bioestimulador na limpeza de derrames de óleo, com relação a alguns dos seus componentes. Coelho (2005), também utilizando a técnica de biorremediação com o fertilizante NPK imobilizado, com liberação contínua de nutriente durante todo o experimento, verificou ser eficaz na biodegradação completa de *n*-alcanos e isoprenóides e na biodegradação parcial de compostos policíclicos aromáticos como os metil fenantrenos e metil dibenzotiofenos.

Souza (2003) em seus resultados mostrou que a biorremediação com a utilização de NPK, na proporção de 10% p/v do volume de óleo derramado, contribuiu para retirada de aproximadamente 30% dos alcanos; a evaporação natural retirou, aproximadamente, 60% dos *n*-alcanos menores que *n*-C16, nos quatro primeiros dias da simulação, chegando a 80% após um mês.

Estudos realizados por Xu *et al.* (2004) testando a utilização do fertilizante OSMOCOTE que tem liberação lenta aumentou drasticamente as atividades metabólicas dos microrganismos e acelerou a biodegradação dos hidrocarbonetos em solos contaminados por atividades petrolíferas.

Estudos sobre a utilidade e eficácia de diferentes formulações de adubo de

liberação lenta também foram avaliados (LEE & TREMBLAY, 1993). Eles demonstraram que os efeitos dos fatores ambientais controlarem a entrega de nutrientes das várias formulações em análise (por exemplo, enxofre-uréia revestida), foram à chave do sucesso para biorremediação. Outro estudo de campo realizado por Lee *et al.* (1995a) comparou o desempenho de nutrientes inorgânicos com espinha de peixe (fertilizante orgânico). Esses resultados mostraram que o adubo orgânico teve o maior efeito sobre o crescimento e a atividade microbiana, enquanto os nutrientes inorgânicos foram muito mais eficazes na degradação do óleo cru.

Todos estes resultados sugerem que o sucesso da biorremediação é função das propriedades do petróleo, a natureza dos produtos de biorremediação e das características dos ambientes contaminados. Estudos recentes têm mostrado que a taxa de biodegradação do petróleo depende das concentrações de nutrientes na água intersticial dos sedimentos, o que poderia fornecer orientações importantes para aplicações de nutrientes (BRAGG *et al.*, 1994, VENOSA *et al.*, 1996). Outra preocupação importante com o uso de fertilizantes em áreas contaminadas é com produção de metabólicos tóxicos como subprodutos.

Pesquisas futuras sobre bioestimulação provavelmente deve centrar-se na determinação da concentração intersticial ideal de nutrientes e as melhores estratégias para manter essa concentração para diversos ambientes, sempre que a degradação é limitada pela disponibilidade de nutrientes. Além da demonstração da eficácia da degradação do óleo, também é necessário demonstrar que a biorremediação não produz quaisquer efeitos indesejáveis ambientais e ecológicos.

II. 1.2.5.1 Importância dos nutrientes

O petróleo, constituído principalmente de hidrocarbonetos, pode servir como a principal fonte de energia para o desenvolvimento de microrganismos facilitando a degradação desses compostos no meio ambiente. Entretanto, devido ao aumento do suprimento do carbono há necessidade da presença de outras fontes de nutrientes, entre eles, o nitrogênio e o fósforo (macronutrientes), o enxofre, o ferro, o magnésio, o cálcio e o sódio (micronutrientes) (DIAS, 2007).

Os microrganismos necessitam dos macronutrientes para sintetizar

componentes celulares, como o nitrogênio para aminoácidos e enzimas, o fósforo para o ATP e o DNA. Os microrganismos também necessitam de: micronutrientes para realizar certas atividades enzimáticas; enxofre para algumas proteínas e coenzimas; cálcio para estabilizar a parede celular e magnésio para estabilizar os ribossomos (PAUL & CLARK, 1989; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996).

Estes nutrientes além de serem importantes para a produção celular, seu suplemento aumenta a eficácia da degradação dos hidrocarbonetos de petróleo (WALWORTH & REYNOLDS, 1995; ZHOU & CRAWFORD, 1995; TING *et al.*, 1999). Alguns autores relatam que os principais nutrientes necessários que limitam a degradação microbiana de hidrocarbonetos do petróleo são o N e P (ZHOU & CRAWFORD, 1995; TING *et al.*, 1999). Tais substâncias são usadas na síntese de fosfolipídios e ácidos nucleicos, bem como nas reações que envolvem a troca de energia. A quantidade de N e de P requeridos para converter 100% do petróleo em carbono/biomassa pode ser calculada pela relação C: N e C: P encontrada no material celular (DIBBLE & BARTHA, 1979).

Em teoria, aproximadamente é necessário 150g de nitrogênio e 30mg de fósforo para conversão de 1g de hidrocarbonetos e materiais celulares (ROSEMBERG & RON, 1996). Venosa *et al.* (1996) constatou que a manutenção de uma concentração de nitrogênio limiar de 1-2mg N / L na água intersticial dos poros resultaria em máxima biodegradação de hidrocarbonetos.

Outro nutriente limitante na taxa de biodegradação é o ferro. Este é essencial aos microrganismos, pois é requerido para diversas funções celulares. Apesar de ser um dos metais mais abundantes na Terra, apresenta baixa solubilidade em ambientes aeróbios e no pH fisiológico da célula. Além disso, quando em soluções, são formados complexos de hidróxidos férricos insolúveis, limitando a quantidade de ferro solúvel. Como conseqüência, o ferro encontra-se em baixa biodisponibilidade no ambiente, e geralmente não atende a demanda celular dos microrganismos (CRICHTON, 1991).

A presença dos nutrientes necessários é de fundamental importância em qualidade e quantidade suficientes. A disponibilidade desses elementos varia em diferentes ambientes: em ambientes marinhos são encontrados baixos níveis de nitrogênio e fósforo na água do mar; nos rios são encontrados baixos níveis de nutrientes em suas cabeceiras, mas podem ser enriquecido depois de receberem dejetos industriais e domésticos; já em lagos de água doce as concentrações de

nutrientes exibem variações sazonais (COONEY, 1984; FLOODGATE, 1984).

Caso a quantidade de nutrientes seja insuficiente, esses devem ser introduzidos em processos de biorremediação com o objetivo de corrigir a relação C-N-P responsável pela eficácia da degradação do óleo no meio ambiente (NYER, 1992 *apud* DEL'ARCO, 1999).

Sob condições onde a deficiência de nutrientes limita a biodegradação dos hidrocarbonetos, os efeitos benéficos da fertilização com esses nutrientes têm sido demonstrados (PRITCHARD & COSTA, 1991).

No solo, o ajuste no balanço C/N/P pode ser facilmente efetuado pela adição de fertilizantes. Entretanto, em ambiente aquático, o ajuste de balanço oferece maior problema, pois deve ser efetuado de forma a não ser dissipado da interface óleo-água. Duas estratégias têm sido utilizadas para sanar o problema: o encapsulamento do fertilizante numa matriz que permita a flutuação e liberação lenta ou o uso de compostos oleofílicos que permaneçam na interface (ATLAS & BARTHA, 1973). As formas de fósforo mais utilizadas são os sais de ortofosfato e polifostato. Em relação ao nitrogênio, as formas mais utilizadas são os sais de amônio (cloreto de amônio), pois, essa forma é a mais utilizada no metabolismo microbiano (CASARINI & SPILBORGHS, 1992).

II.1.2.6 Avaliação do processo de Biorremediação em laboratório

O monitoramento do processo de biorremediação consiste na análise de vários parâmetros, incluem a contagem de microrganismos heterotróficos totais e contagem de microrganismos degradadores de um ou de vários substratos específicos (Análises Microbianas), controle dos parâmetros físico-químicos e a determinação das taxas de degradação (Análises Geoquímicas) (MARIANO, 2006).

Experimentos laboratoriais que mais se aproximam das condições reais do ambiente são provavelmente os mais capazes de produzir resultados relevantes (BERTRAND *et al.*, 1983). Em muitos casos, isto envolve o uso de amostras coletadas no campo que contenham populações microbianas autóctones. Em tais experimentos é importante incluir controles que possam diferenciar fatores abióticos como a evaporação e a fotodegradação das taxas de biodegradação. Os

experimentos não excluem a necessidade de demonstrações em campo, contudo são críticos para se estabelecer a credibilidade científica de uma determinada estratégia de biorremediação (ATLAS, 1997 *apud* MARIANO, 2006).

Efetua-se o monitoramento da biodegradação através de análises geoquímicas dos óleos biodegradados ao longo da simulação, comparando os resultados com os parâmetros do óleo derramado. Considerando-se o petróleo uma mistura complexa de substâncias que variam de alcanos simples a compostos polares, faz-se necessário a utilização de técnicas de análises químicas sofisticadas, capazes de separar, identificar e quantificar cada composto contido no mesmo (ROQUES *et al.*, 1994; BENCE *et al.*, 1996 *apud* ROSA, 2001).

Indubitavelmente, a medida mais direta da eficiência da biodegradação é o monitoramento da taxa de consumo dos poluentes. A caracterização dos componentes individuais de uma classe específica de hidrocarbonetos exige o uso da cromatografia líquida de alta precisão (CLAE) ou cromatografia gasosa (CG) acoplada a um detector (p.ex., o espectrômetro de massa (CG-EM)) (FERRARI, 1996 *apud* MARIANO, 2006). Segundo Blackburn *et al.* (1993) *apud* Mariano (2006), a combinação das técnicas CG/EM é o método mais eficaz para a quantificação de um resíduo oleoso, pois, combina a resolução do ponto de ebulição com informações sobre o tipo de molécula dos compostos. Outro detector muito utilizado na determinação dos BTEX e PAHs é o detector de ionização por chama (FID) (CETESB, 2003).

Assim, a avaliação da biodegradação é efetuada pelo uso das técnicas de cromatografia líquida à média pressão, cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CG/EM). A análise da biodegradação depende da distribuição inicial das classes de hidrocarbonetos em termos de saturados, aromáticos e NSO (MCMILLEN *et al.*, 1993 *apud* ROSA, 2001).

Assim, a quantificação dessas frações ao longo da simulação, efetuada pela cromatografia líquida, torna-se importante na avaliação da razão da biodegradação. Igualmente, efetua-se a avaliação da biodegradação do óleo total através da análise dos cromatogramas obtidos pela cromatografia gasosa (CG). Nessa análise são utilizados índices, que representam a razão de compostos facilmente degradáveis sobre compostos mais resistentes à biodegradação (ROSA, 2001).

Faz-se o monitoramento da biodegradação dos hidrocarbonetos saturados

pela medida das razões de *n*-C17/pristano e *n*-C18/fitano, considerando que os hidrocarbonetos lineares *n*-C17 e *n*-C18 são mais facilmente biodegradados que os isoprenóides correspondentes, pristano e fitano (DEL'ARCO, 1999 *apud* ROSA, 2001).

Efetua-se o monitoramento do aumento da razão da biodegradação através da abundância relativa dos biomarcadores, devido a alta estabilidade química desses compostos, frente à atividade microbiana. Assim, a biodegradação dos esteranos ocorre após o consumo completo dos isoprenóides, podendo ocorrer antes ou depois dos hopanos, dependendo de vários fatores como condições ambientais, tipo de biodegradação e população microbiana (ROSA, 2001).

Deve-se considerar, ainda, que a fração mais tóxica do óleo refere-se aos compostos mais recalcitrantes. Assim, a eficiência da aplicação da técnica de biorremediação não deve estar associada somente à perda dos hidrocarbonetos alcanos (normais, ramificados ou cíclicos), mas às reduções nas abundâncias relativas dos compostos aromáticos contidos no mesmo (MEARNS, 1997 *apud* ROSA, 2001).

Os parâmetros tipicamente medidos em testes laboratoriais da eficiência da biodegradação incluem a contagem de microrganismos heterotróficos totais, contagem de microrganismos degradadores de um ou de vários substratos específicos, medidas da taxa de respiração microbiana (consumo de oxigênio e/ou produção de dióxido de carbono) e a determinação das taxas de degradação (desaparecimento de poluentes individualmente e/ou na totalidade) (KATAOKA, 2001 *apud* MARIANO, 2006).

A presença de grande população de microrganismos heterotróficos totais não apresenta necessariamente correlação direta com a biodegradação, porém, a quantificação da fração da comunidade que degrada o resíduo de interesse tem sido utilizada como um dos métodos mais comuns para o monitoramento de poluição ambiental com hidrocarbonetos (KATAOKA, 2001 *apud* MARIANO, 2006). A contagem microbiana pode ser determinada por várias técnicas, baseadas na contagem celular direta ou na pesagem da mesma, e pela avaliação da atividade celular (PELCZER *et al.*, 1980 *apud* ROSA, 2003).

O efeito tóxico da aplicação de fertilizantes é um dos parâmetros importantes a serem avaliados na aplicação das técnicas de biorremediação, pois o excesso desses compostos pode comprometer a biodegradação pelo desenvolvimento do

processo de eutrofização que desencadeia o crescimento dos organismos produtores.

Desta forma, torna-se imprescindível monitorar os teores dos nutrientes no meio ambiente contaminado por óleo, principalmente durante a aplicação de fertilizantes no processo de biorremediação (MITCHELL *et al.*, 1993 *apud* ROSA, 2003).

O efeito tóxico de uma contaminação depende do tipo e quantidade dos contaminantes, do grau de confinamento do ambiente e da comunidade marinha encontrada no local afetado (NIPPER, 2000; MICHEL, 2000 *apud* ROSA, 2003). A redução da toxicidade dos compostos está entre os fatores mais importante para que a técnica de biorremediação seja eficiente (LEE *et al.*, 1998 *apud* ROSA, 2003). Os testes de toxicidade envolvem a exposição da amostra líquida a pequenos organismos, medindo os efeitos tóxicos nas bactérias luminescentes, microcrustáceos, macro-invertebrados e/ou peixes (WELLS *et al.*, 1997 *apud* ROSA, 2003).

O monitoramento da remediação biológica "*in situ*" exige o conhecimento detalhado de vários processos especialmente dos processos de biodegradação. Em muitos casos, as informações obtidas através do tradicional caracterização técnicas são insuficientes. Com isso atualmente a análise isotópica natural vem se tornando um poderoso método capaz de fornecer informações exclusivas sobre muitos processos que ocorrem em solos e águas. Além disso, ele pode ser um instrumento muito útil para caracterizar poluentes.

A análise isotópica pode ser vista como uma dimensão extra para as tradicionais análises químicas. A assinatura isotópica caracteriza muitos poluentes e as mudanças na sua composição durante processos (biológicos, químicos, físicos) específicos podem render informações exclusivas sobre a origem de poluentes. Especialmente para a atenuação natural, estudo de análise isotópica pode fornecer informações essenciais. A composição isotópica da água pode produzir informações em sua "origem". Além disso, uma série de outras aplicações existentes, tais como a caracterização de poluentes (origem, idade etc.), identificar processos geoquímicos, etc. podem ser estudados através das análises isotópicas.

CAPÍTULO III

Manguezal

III. 1. MANGUEZAL: ORIGEM, CARACTERÍSTICAS, IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E SUAS REAÇÕES DIANTE DO PETRÓLEO

Mundialmente os manguezais cobrem uma área aproximada de 240 000km² ao longo da Zona Costeira, sendo que entre 10.000 e 25.000Km² de áreas cobertas por manguezal estão situadas no território brasileiro (NOVELLI, 1995; LACERDA *et al.*, 1995; LUGO *et al.*, 1990; NOVELLI *et al.*, 2000).

III. 1.1 ORIGEM E CARACTERÍSTICAS DOS MANGUEZAIS

Ecologicamente, os manguezais são definidos como um conjunto de vegetais que habitam a zona costeira entre-marés. Uma comunidade de mangue é composta de espécies de plantas cujas adaptações especiais lhes permitem sobreviver a condições diversas de estresse impostas pelo ambiente costeiro, por isso é considerado um ecossistema complexo (HOFF, 2002; VALENTIM-NETO, 2004).

O termo manguezal refere-se a espécies de árvores tolerantes ao sal ou arbustos que crescem em costas protegidas e nos estuários em regiões tropicais e algumas sub-regiões tropicais. Há cerca de 60 espécies que ocorrem exclusivamente neste *habitat*, e muitas espécies não-exclusivas. Os manguezais podem ocorrer nas margens dos rios, ou em deltas, como extensas florestas. Em qualquer área de manguezais pode haver zonas ou mosaicos de diferentes comunidades biológicas, dependendo de muitos fatores. Estes incluem a altura da superfície do sedimento em relação à corrente de água, salinidade e suprimento de nutrientes que por sua vez são influenciadas por entradas de água doce vindos de uma bacia hidrográfica.

O manguezal é um ecossistema que ligam os ambientes marinhos, terrestre e de água doce, característico de regiões tropicais e subtropicais, apresentando temperatura acima de 20°C (NASCIMENTO, 2006). Trata-se de um ecossistema de alta eficiência, proporcionando um ambiente favorável para o crescimento e sobrevivência dos estágios iniciais do ciclo de vida de animais marinhos (KRUEGER, 2004).

Segundo Raphael Hypolito (2004):

Manguezais são ambientes costeiros situados na faixa de maré, onde habitam várias espécies de peixes, crustáceos e aves, além de vegetações características. É um local que possui comunidades costeiras tropicais dominadas por espécies vegetais, arbóreas ou arbustivas que conseguem crescer em solos com alto teor de sal. De modo geral, o manguezal ocupa todas as regiões de costas protegidas, sendo ausente somente nas praias rochosas e arenosas abertas.

A formação do manguezal está diretamente relacionada com a existência de variáveis ambientais específicas como clima, substrato e salinidade. Esses fatores possibilitam o desenvolvimento da fauna e flora característicos, bem como determina a distribuição e grau de desenvolvimento do ecossistema (ALMEIDA, 2001).

A salinidade é determinada principalmente pela hidrologia local, onde a entrada de água salgada é proveniente das marés periódicas e da água doce é proveniente dos rios, chuvas, águas subterrâneas e de escoamento. Assim, a salinidade pode variar amplamente dentro das florestas de mangue, tanto ao longo do tempo como ao longo do espaço. Os manguezais têm evoluído diferentes mecanismos para tolerar altas salinidades, dentre elas: exclusão de sal, secreção de sal, e tolerância de altas concentrações de sal nos tecidos da planta (HOFF, 2002).

A maioria dos manguezais tem desenvolvido todos os três mecanismos, embora em graus diferentes. Algumas espécies excluem sal ao extrair água do sedimento, e outras possuem órgãos especiais que secretam o sal. Outro mecanismo para eliminar o excesso de sal nos manguezais é a queda de folhas da vegetação que se desenvolve nesse ecossistema (KATHIRESAN & BINGHAM, 2001).

A capacidade de tolerar a constantes inundações, variando assim como a salinidade ao longo do tempo e do espaço é uma característica importante, exclusiva de manguezais. Espécies de mangue muitas vezes apresentam uma distribuição distinta entre este gradiente, que é a base para a classificação de manguezais por baixo, médio e superior zonas entre-marés. A menor zona intertidal representa uma área inundada por média-alta marés e é inundada mais de 45 vezes por mês. A zona média intertidal é inundada normalmente por marés altas, 20-45 vezes por mês e a zona intertidal superior representa áreas inundadas menos de 20 vezes por mês (ROBERTSON ALONGIE, 1992 *apud* HOFF, 2002).

A inundação é uma condição que pode diminuir o oxigênio do solo necessário para metabolizar substâncias tóxicas, afetando os tecidos das raízes. Os

manguezais desenvolveram adaptações morfológicas especiais para lidar com esta falta de oxigênio. Primeiro, os manguezais têm sistemas de raízes superficiais para evitar a falta de oxigênio em solos mais profundos. Em segundo lugar, acima do tecido, encontram-se órgãos (pneumatóforos) que transportam o oxigênio da atmosfera para o sistema radicular (HOFF, 2002).

Apesar das duras condições em que os manguezais se desenvolvem, eles podem formar comunidades altamente diversificadas e produtivas.

Muitos animais encontrados dentro de manguezais são semi-aquáticos ou derivados de ambientes terrestres (HOFF, 2002). A fauna do manguezal é constituída principalmente por peixes, moluscos e crustáceos, porém diversos animais usufruem deste ambiente, desde formas microscópicas até répteis, aves e mamíferos (CARVALHAL, 2006) (Figura 15).

As águas calmas são ideais para reprodução, sendo berçários para peixes e camarões, enquanto as raízes aéreas dos troncos das árvores e a lama superficial geralmente apóiam uma fauna variada de ostras, moluscos, crustáceos, caranguejos e outros invertebrados. A parte superior do mangue é um ambiente essencialmente terrestre com uma fauna de aves, mamíferos e insetos (IPIECA, 1993).



Figura 15. Caranguejo *Uca* sp. Fonte: NTG, 2002.

Numerosas espécies de insetos são encontradas em florestas de mangue, alguns desempenham papéis críticos como polinizadores de mangue, herbívoros, predadores, e como fonte de alimento para outros animais. Anfíbios e répteis, tais como sapos, cobras, lagartos e crocodilos também habitam as florestas de mangue. As aves também utilizam os manguezais para o refúgio, nidificação e alimentação. A

maioria destas aves (Figura 16) não depende completamente dos manguezais, utilizam estes habitats apenas durante uma parte dos seus ciclos sazonais, ou durante estágios particulares da maré. Mamíferos também podem viver em florestas de mangue incluir guaxinins, selvagem suínos, roedores, veados, macacos e morcegos. Tartarugas, peixes-boi, golfinhos e botos, também podem ser visitantes ocasionais dos manguezais (HOFF, 2002).

Alguns animais sésseis permanecem a vida toda no manguezal, como é o caso dos sururus, taiobas, mariscos em geral e ostras. Estes organismos sésseis, como as plantas, também desenvolveram adaptações para suportar as variações diárias ambientais, principalmente a resistência à dessecação e aumento da salinidade (CARVALHAL, 2006).



Figura 16. Registro fotográfico de uma espécie de ave no manguezal da Praia do Cação, Madre de Deus, BA. Fonte: LIMA, 2006.

Peixes como sardinhas, garoupas, tainhas, entre outros, também frequentam o manguezal para reprodução e alimentação. Existem espécies que passam toda a sua vida no estuário e outras que apenas completam seu ciclo reprodutivo ou de crescimento. A maioria dos peixes de interesse comercial depende de alguma forma do manguezal para sua sobrevivência (CARVALHAL, 2006).

Além da rica diversidade faunística encontrada nos manguezais a caracterização estrutural da vegetação constitui valiosa ferramenta no que concerne à resposta desse ecossistema às condições ambientais existentes, bem como aos processos de alteração do meio ambiente, auxiliando, assim, nos estudos e ações que objetivam a conservação desse ecossistema. Dessa forma, a estrutura vegetal dos bosques de mangue é uma resposta direta às condições locais. Tal fato fica

evidenciado quando comparamos o desenvolvimento estrutural de espécies de mangue ao longo de gradientes latitudinais, de salinidade, em locais com diferentes níveis de aporte de nutrientes (SOARES, 1999). Raízes dos manguezais normalmente crescem nos sedimentos anaeróbios e recebem oxigênio através de aeração de tecido que comunica ao ar através de pequenos poros (lenticelas).

As florestas brasileiras de mangue são constituídas principalmente por quatro gêneros de plantas lenhosas: Mangue vermelho, gênero *Rhizophora*; Siriúba, gênero *Avicennia*; Mangue branco, gênero *Laguncularia* (Figura 17); e Mangue botão, gênero *Conocarpus*.



Figura 17. Detalhe da *Avicennia schaueriana* ainda no estágio de crescimento. Fonte: MAIA *et al.*, 2005.

Existem ainda, grupos de plantas associadas ao manguezal que ocorrem principalmente nas regiões marginais ou de borda interior. Estas espécies não são exclusivas do ecossistema manguezal, porém são tolerantes a diferentes teores de salinidade. Outros grupos vegetais, como algas, líquens, orquídeas e bromélias (gravatás), ocorrem como epífitas nas árvores de mangue (CARVALHAL, 2006).

III. 1.2 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DOS MANGUEZAIS

Embora os cientistas tenham colocado um valor elevado na função ecológica dos ecossistemas de manguezais, só recentemente a comunidade mais ampla veio reconhecer o papel que manguezais desempenham no ambiente. Ao avaliar a

importância dos ecossistemas de manguezal a partir de uma perspectiva científica, é necessário tentar identificar e medir esses valores. Notavelmente, esses valores podem ser divididos em valores ecológicos e econômicos.

Os valores ambientais e econômicos do mangue são bem conhecidos em todo o mundo. Esse berço oferece um potencial para reflorestamento, aquicultura, agricultura e mesmo eco-turismo. Além disso, diversos mangues ao redor do mundo são mantidos para a produção de carvão, estabilização da área costeira, produtos pesqueiros (peixes, moluscos, crustáceos), produção de algas para a indústria alimentícia e química. O uso humano da região está ligado aos benefícios e serviços da área, modificados continuamente pela economia e cultura locais (LACERDA, 1999).

São ambientes estabilizadores e protetores das linhas de costa contra erosão e assoreamento. Constituem um patrimônio energético de áreas estuarinas e costeiras, além de serem uma importante fonte de alimento e renda para as populações ribeirinhas. São locais de reprodução de um grande número de espécies de interesse econômico, como peixes, vegetais úteis para extração de madeira, tanino, celulose e remédios. Possuem ainda a característica de estarem geralmente estabelecidos em zonas que apresentam cursos d'água navegáveis (SCHAEFFER–NOVELLI 1995 *apud* ARAÚJO, 2000).

Segundo Valentim – Neto (2004):

Os manguezais possuem alta produtividade primária, eficientes reciclagem de nutrientes biológicos e uma troca permanente com ecossistemas terrestres e marinhos apesar de não ter condições de reter esses nutrientes. Eles se constituem em um tipo de floresta tropical e subtropical marítima encontrada em áreas intertidais, particularmente dentro e ao redor de estuários salobros ou salinos, e solos alagados. Essas florestas, tipicamente recebem consideráveis aporte de nutrientes e influxos de sedimento de áreas interiores. Devido às características especiais do ecossistema manguezal, que o torna extremamente vulnerável, alterações abruptas em alguns dos seus parâmetros ambientais poderão levá-los à completa degradação.

Os manguezais desempenham importante papel como exportador de matéria orgânica para os estuários, contribuindo para a produtividade primária na zona costeira. Com relação à pesca, os manguezais produzem mais de 95% do alimento que o homem captura no mar. Por essa razão, a sua manutenção é vital para a subsistência das comunidades pesqueiras que vivem em seu entorno. Pelo menos 2/3 das espécies de peixes explorada economicamente dependem desse ecossistema para a sua existência (LEMOS, 2004).

O manguezal é um local muito nutritivo, onde a matéria orgânica é decomposta pelos microorganismos e disponibilizada na forma de nutrientes para o meio. Também é um local abrigado, de pouco movimento hídrico, se comparado a um costão rochoso. Sendo assim, tornou-se um local propício ao desenvolvimento e abrigo de organismos jovens (CARVALHAL, 2006).

Além da produção da matéria orgânica, a estrutura das raízes de mangue, formando emaranhados, oferece proteção para espécies da fauna marinha, durante os primeiros estágios de vida, contra seus predadores, formando um refúgio para diversas espécies animais ameaçadas de extinção, principalmente aves marinhas que neles encontram uma das poucas áreas costeiras em que a atividade humana é reduzida (LEMOS, 2004).

Os manguezais também têm grande potencial para usos medicinais, além de conter substâncias tóxicas que têm sido utilizadas pelas suas propriedades antifúngicas, antibacterianas e pesticidas (BANDARANAYAKE, 1998).

Além dos recursos naturais de utilização direta, como a fauna e flora, os manguezais produzem vários serviços indiretos, muitas vezes não percebidos pelo público (LEMOS, 2004). As áreas de manguezais são, portanto, de extrema importância para as populações, uma vez que delas provém boa parte das proteínas (mariscos e peixes), tão essenciais para subsistência (HYPOLITO, 2004).

Como se pode notar o manguezal tem muito a oferecer, porém, o seu potencial deve ser utilizado de maneira racional. A destruição dos manguezais gera grandes prejuízos, inclusive para economia, direta ou indiretamente, uma vez que são perdidas importantes frações ecológicas desempenhadas por esses ecossistemas (LEMOS, 2004).

O manguezal funciona ainda como filtro biológico, retendo poluentes que poderiam estar contaminando as águas, garantindo sua qualidade (MACHADO *et al.*, 2004), é fonte de nutrientes para as águas oligotróficas do oceano (SCHAEFFER- NOVELLI, 1995; LARCEDA, 2005), e tem um papel muito importante na estabilidade geomorfológica da zona costeira (LACERDA, 2005; MONTEIRO, 2005).

III. 1.3 REAÇÕES DO MANGUEZAL DIANTE DO PETRÓLEO

Devido à grande importância econômica dos manguezais, estes ambientes são degradados diariamente pela ação e ocupação do homem. Essa ocupação desordenada deve-se principalmente ao fato desses locais apresentarem condições favoráveis à instalação de empreendimentos os quais normalmente visam atender interesses particulares (IPIECA, 1993).

Os manguezais são particularmente susceptíveis à poluição por óleo, quando localizados em regiões ativas de exploração, produção, transporte e outras atividades petrolíferas (BURNS *et al.*, 1993). Observações de eventos de vazamento ao redor do mundo têm demonstrado que os manguezais tendem a sofrer os efeitos letais e subletais quando expostos ao petróleo. Um dos desafios enfrentados ao lidar com os impactos do petróleo é o fato de que o "óleo" é uma mistura complexa de muitos tipos de compostos químicos dificultando assim a minimização dos efeitos sob o ecossistema (IPIECA, 1993).

Derrames de petróleo que entram em sistemas intertidais estuarinos e marinhos podem produzir uma série de efeitos deletérios, com isso muitos estudos de contaminação de óleo têm sido conduzidos em manguezais com a finalidade de se entender melhor como esse ecossistema responde a presença do óleo. Quando o óleo derramado entra em sistemas de mangue, encharca os sedimentos e/ou revestimentos expostos como troncos, raízes de suporte causando mortalidade dos manguezais, diminuindo a produtividade e provocando irregularidades no crescimento. No entanto, os efeitos do óleo vão muito além do simples problemas de sobrevivência e crescimento (PROFFITT, 1997; HOFF, 2002).

Além das características físicas do ambiente, outros fatores condicionam a resposta dos manguezais à introdução do petróleo. Dentre elas pode-se citar o tipo e volume de óleo, padrão de deposição do poluente e sua persistência no sedimento, água e biota (NOVELLI, 1995; RODRIGUES, 1997; VANNUCCI, 1999). Segundo Rodrigues (1997), quanto mais abrigado for o ambiente maior será o tempo de permanência do óleo no manguezal e, conseqüentemente, maiores os danos ao ecossistema.

O grau de "efeitos" depende: do tipo e o grau de "degradação" do óleo derramado; das espécies de plantas afetadas; da frequência de derrames; dos

efeitos sinérgicos possíveis influenciados por fatores de estresse, tais como alta salinidade, das condições locais (por exemplo, ponto no ciclo das marés, os níveis de precipitação e co-ocorrência de tempestades e derrames de petróleo); e do tipo de biota (por exemplo, tocas do caranguejo podem facilitar a penetração do óleo no sedimento) (PROFFITT, 1997).

O petróleo pode produzir mutações nos manguezais e a taxa de mutações nos genes que produzem cloroplastos pode ser direta, de forma linear, proporcional à concentração do solo por hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (PAH) derivado do petróleo. Compreender os efeitos da contaminação do óleo sobre a microflora de sedimentos de manguezais é fundamental para compreender verdadeiramente as conseqüências em longo prazo de petróleo nestes sistemas (PROFFITT, 1997).

Em particular, óleos brutos de petróleo e óleos combustíveis pesados podem ser depositados na Zona costeira como uma camada pegajosa que pode perturbar ou impedir completamente os processos biológicos normais de intercâmbio com o ambiente. Mesmo que o petróleo seja um produto não tóxico, quando este fisicamente abrange plantas e animais, pode asfixiar, ou interferir nas funções fisiológicas normais (IPIECA, 1993).

As assembléias de plantas e animais que estão ligados à parte subaquática que vive próxima a raízes são especialmente vulneráveis. Óleos brutos pesados e produtos refinados podem revestir as raízes de suporte e pneumatóforos, reduzindo à capacidade da árvore de trocar gases. Estes óleos pesados terão persistência em longo prazo, especialmente com pesadas acumulações. Esta persistência pode causar perda de folhas e, possivelmente, morte de muitas árvores. Esses poluentes que reduzem a sobrevivência ou crescimento de mudas de mangue podem ter também um impacto sobre a taxa de regeneração ou a composição de espécies (IPIECA, 1993).

Outros efeitos podem ser observados quando o óleo penetrar nos sedimentos, como a morte de caranguejos e vermes, moluscos, além de provocar a podridão das árvores, levando à perda de habitat para os organismos que vivem nos galhos e copas das árvores, e no sistema radicular.

Zheng *et al.* (2002) relata que um derrame de óleo na presença da vegetação de manguezal produz uma redução na velocidade das correntes de maré o que contribui para aumentar a taxa de sedimentação dos hidrocarbonetos nos

substratos desse ecossistema. As maiores concentrações de hidrocarbonetos estão diretamente relacionadas à predominância da taxa de deposição de material particulado em suspensão sobre a taxa de mobilização e transporte dos mesmos. Segundo Ke *et al.* (2002) a ação das marés tem sido apontada como eficiente na remoção de volumes significativos de óleo do manguezal e o óleo que recobre a superfície das folhas é facilmente removido, lavado ou diluído pelas marés.

Sinais óbvios do stress em manguezais começam freqüentemente duas semanas após um eventual derramamento, e estes podem variar desde desfolhação à morte das árvores. No derramamento 1999 aeronaval da estação das estradas de Roosevelt (Puerto Rico) do combustível de jato JP-5, um exame inicial da avaliação de danos conduzido no mês concluiu que 46% de árvores, apresentaram-se com folhas amareladas e progressiva desfolhação (HOFF, 2002).

Já um estudo de monitoramento conduzido na Austrália após um derramamento em 1992 encontrou consistentes respostas dos manguezais à presença do petróleo como mancha nas folhas, seguida de morte das mesmas e desfolhação por completo (WARDROP *et al.*, 1996). No derramamento ocorrido em 1986 na localidade de Minas da Bahía (Panamá), o monitoramento de cientistas sobre os efeitos do óleo em manguezais pôde demonstrar uma faixa de árvores inoperantes onde o óleo foi derramado. Após um ano e meio foram encontrados ao longo de 27 quilômetros da costa, manguezais totalmente inoperantes (BURNS *et al.*, 1993).

No Brasil em março de 1975, um acidente rompeu o casco do navio-tanque iraquiano Tarik Ibn Ziyad no canal central de navegação da baía de Guanabara derramando 5 milhões de litros de óleo. A mancha atingiu várias praias, tanto no interior da baía quanto na costa oceânica, das cidades do Rio de Janeiro e Niterói. O óleo provocou incêndios em áreas de manguezal, no entorno da baía, afetando seriamente a biota da zona de entremarés (CRAPEZ *et al.*, 2002).

Outro acidente grave ocorrido na Baía de Guanabara foi em Janeiro de 2000 na região da Refinaria Duque de Caxias. Um derrame de óleo de cerca de 1.300.000 litros de óleo combustível marinho MF380, caracterizado como mistura de diesel e óleo combustível pesado, resultou num enorme impacto sobre as áreas de manguezal ao fundo da Baía de Guanabara e nas áreas mais internas desta. A mancha de óleo se estendeu por uma faixa superior a 50 quilômetros quadrados, atingindo o manguezal da Área de Proteção Ambiental (APA) de Guapimirim, praias

banhadas pela Baía de Guanabara, inúmeras espécies da fauna e flora, além de provocar graves prejuízos de ordem social e econômica a população local (MICHEL, 2000; BAYARDINO, 2004).

Vários são os efeitos do petróleo sob os manguezais, mas ao longo do tempo vários fatores, reduzem a toxicidade do óleo. A quantidade de petróleo no solo é reduzida pelas chuvas e marés. Além disso, o clima também tem uma interferência direta, provocando a evaporação das frações mais voláteis e provocando alterações químicas, como oxidação, tornando o óleo residual menos tóxico. Esses processos podem ser mais lentos se a degradação do óleo for inibida por causa das condições anaeróbicas do solo.

CAPÍTULO IV
Composição do Petróleo

IV. 1. COMPOSIÇÃO DO PETRÓLEO

O petróleo é um combustível fóssil resultante da transformação e decomposição de matéria orgânica de vegetais e microrganismos, que foram se acumulando ao longo de milhões de anos em bacias sedimentares (UNICAMP, 2001).

IV. 1.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A composição química e a natureza física do petróleo podem variar em função das características: matéria orgânica original, grau de evolução térmica da rocha geradora, estado de biodegradação do óleo e fracionamento sofrido durante a migração até a rocha reservatório, entre outras (IARC, 1989). Geralmente, na composição do petróleo predomina a fração dos hidrocarbonetos alifáticos (saturados e insaturados), seguida de compostos aromáticos e NSO (compostos polares) (Figura 18).

O petróleo é constituído por uma complexa mistura incluindo, nitrogênio (0% a 0,5%), enxofre (0% a 6%), oxigênio (0% a 3,5%), alguns metais em concentrações traço (principalmente níquel e vanádio) e os hidrocarbonetos (50% a 98%), sendo os hidrocarbonetos, o nitrogênio, o enxofre e o oxigênio os principais compostos (API, 1999).

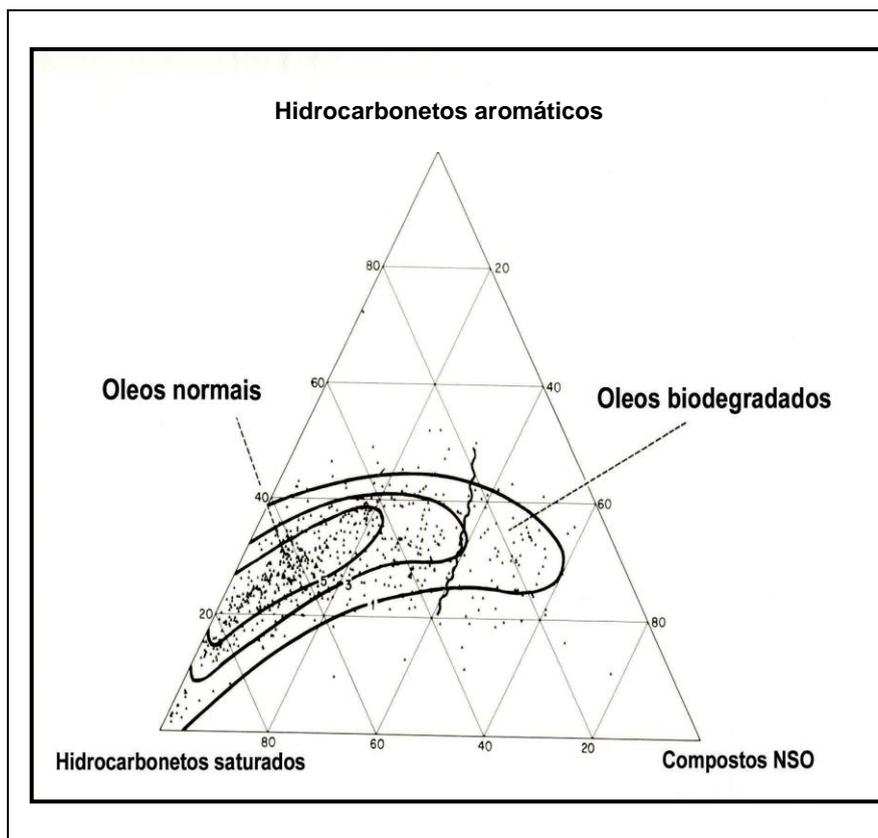


Figura 18. Diagrama ternário mostrando a composição, em função das percentagens de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO, de 636 diferentes tipos de óleo. Fonte: TISSOT & WELTE, 1984 *apud* SOUZA, 2003.

Os hidrocarbonetos são utilizados como indicadores de poluição por serem os compostos mais abundantes. São compostos formados por carbono e hidrogênio (82 a 87% em carbono e 11 a 15% em hidrogênio) de composição e estruturas moleculares diferentes (Tabela 1).

Tabela 1. Principais características dos hidrocarbonetos encontrados no petróleo.

Grupos de hidrocarbonetos	Exemplos		Toxicidade	Grau de degradação	Valores médios nos óleos(% em peso)
Alcanos	Parafinas ou alifáticos saturados	Cadeia simples e ramificada	Baixa	Facilmente	33,6
Alcenos	olefinas	Cadeia aberta	-	-	-
Cicloalcanos	Naftas	Cadeia fechada	Variável	Resistentes	31,9
Aromáticos	Benzenos	Cadeia benzênica	Alta	Lenta	34,5

Fonte: adaptado de SILVA, 2004b; SOUZA, 2003.

IV. 1.1.1 Hidrocarbonetos alifáticos

Os hidrocarbonetos alifáticos podem ser saturados e insaturados (Figura 19). As principais famílias dos hidrocarbonetos saturados estudadas são os *n*-alcanos, alguns isoprenóides (pristano e fitano), terpanóides (hopanos) e derivados de esteróides (esteranos) (KASSIM & SIMONEIT, 2001).

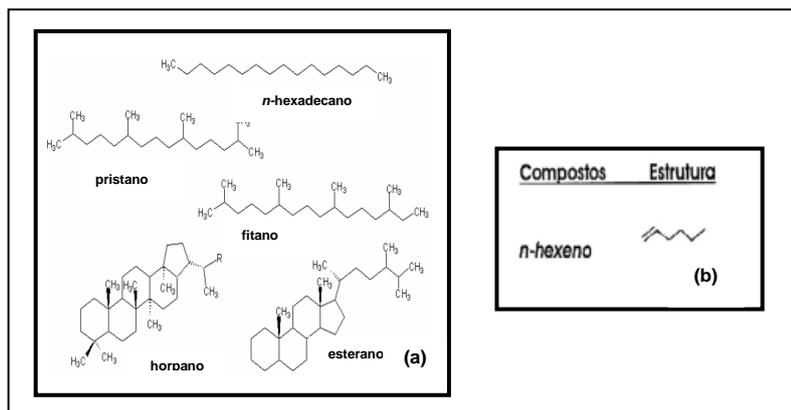


Figura 19. Estruturas químicas de alguns hidrocarbonetos. (a) saturados e (b) insaturados *n*-hexeno. Fonte: GAMA, 2008; SOUZA, 2003.

Os alcanos são hidrocarbonetos de cadeia aberta e saturada que apresentam somente ligação simples entre os átomos de carbono, também são conhecidos como parafinas normais. O termo parafinas vem do latim *parum* = pequena + *affinis* = afinidade, e significa pouco reativas. O menor dos alcanos é o metano. Algumas das propriedades físicas dos alcanos é que a temperatura ambiente (25⁰C) até quatro átomos de carbono em cadeia linear estão na forma de gases, o *n*-alcanos de C5 até C17 são líquidos e os *n*-alcanos com mais de 18 átomos de carbono são sólidos (BENTO, 2005).

Já os isoprenóides são hidrocarbonetos parafínicos que apresentam ramificação em um ou mais átomos de carbono. Esse grupo apresenta uma grande importância nos estudos geoquímicos. Os isoprenóides mais abundantes no petróleo são o pristano (2, 6, 10, 14 tetrametil pentadecano–C₁₉) e o fitano (2, 6, 10, 14 tetrametil hexadecano –C₂₀), juntos somam mais que 55% de todos os isoprenóides acíclicos (TISSOT & WELTE, 1984; HUNT, 1995).

A concentração de hidrocarbonetos saturados no petróleo depende da natureza e do tipo da matéria orgânica, do ambiente deposicional e a maturação. As concentrações dos *n*-alcanos podem aumentar durante a catagênese da matéria

orgânica das rochas geradoras conforme o decorrer do processo de evolução térmica. Óleos que apresentam pouca quantidade de *n*-alcanos, principalmente os mais leves podem ter sofrido processo de biodegradação ou evaporação.

Quando comparados aos *n*-alcanos os hidrocarbonetos insaturados (alcenos) contêm um número menor de hidrogênio por átomos de carbono, possuem ligações duplas ou triplas entre seus átomos de carbono e são quimicamente instáveis; no petróleo são encontrados na forma de *n*-hexeno, *n*-hepteno e *n*-octeno (TISSOT & WELTE, 1978).

IV. 1.1.2. Hidrocarbonetos Aromáticos

Os hidrocarbonetos aromáticos são compostos orgânicos que possuem alternadamente ligações carbono-carbono simples e dupla em uma estrutura cíclica com seis átomos de carbono (WAPLES, 1981). O composto mais simples desta classe é o benzeno que aparentemente é apenas um composto insaturado cíclico contendo várias duplas ligações, mas na verdade é notavelmente estável e quimicamente bastante diferente dos compostos insaturados. A ligação química do benzeno gera um aumento na densidade do elétron entre os átomos interligados e esta densidade é mais favorável à dupla ligação do que a simples (BARKER, 1979; WAPLES, 1981).

O anel benzênico pode ligar-se a outros anéis aromáticos formando anéis aromáticos polinucleares, juntar-se a anéis saturados formando compostos cicloaromáticos ou pode também ligar-se a cadeias lineares formando alquilaromáticos. Os compostos aromáticos possuem baixo conteúdo de hidrogênio e isto é comprovado quando se compara benzeno com a parafina normal cíclica de carbonos (BARKER, 1979).

Os hidrocarbonetos aromáticos possuem um ou mais anéis benzênicos (também chamados de anéis aromáticos), que são constituídos por ligações duplas e simples que se alternam em anéis com seis átomos de carbono (benzenóides) (Figura 20).

Uma das principais características dos compostos aromáticos está relacionada à sua elevada estabilidade química, quando comparada a de outros

compostos insaturados, que está associada à habilidade dos elétrons que participam das ligações ocuparem uma extensa região do anel (ATKINS, 2000).

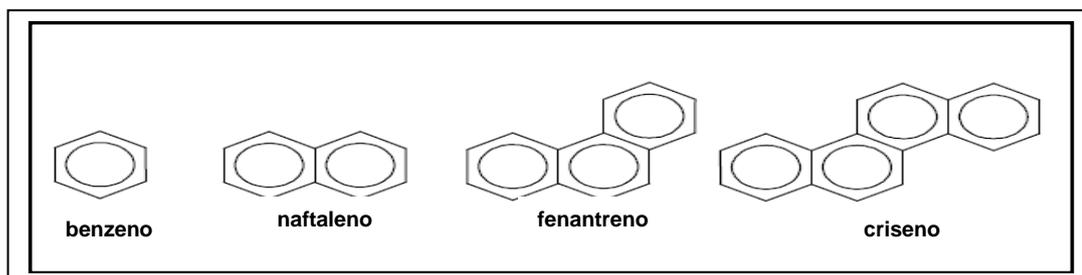


Figura 20. Estruturas químicas de alguns hidrocarbonetos aromáticos benzenóides. Fonte: GAMA, 2008.

A biodegradação (processo natural onde microorganismos se utilizam, no caso, de hidrocarbonetos de petróleo como fonte de alimento, transformando-os em subprodutos que conseqüentemente serão degradados a carbono e água) destes hidrocarbonetos é lenta e está associada a efeitos crônicos e carcinogênicos.

Os hidrocarbonetos com dois ou mais anéis aromáticos são denominados de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA), também classificados como Poluentes Orgânicos Persistentes (POP). Constituem os principais produtos da combustão incompleta da matéria orgânica, sendo potencialmente perigosos e amplamente distribuídos pelo meio ambiente na forma de misturas complexas. Alguns HPAs são mutagênicos ou carcinogênicos, com atividade dependente de sua forma molecular.

IV. 1.1.3. NSO

Quando o esqueleto básico da molécula de um composto de petróleo é formado de um hidrocarboneto contendo heteroátomos como: enxofre, nitrogênio e oxigênio; são conhecidos como a fração de não-hidrocarbonetos (NSO). Estes compostos estão presentes nas frações de asfaltenos e resinas. Dentre esses compostos podemos citar os Tióis (mercaptans), Sulfetos orgânicos, Tiofeno e seus derivados. Esses compostos contêm enxofre em suas moléculas com número de átomos de carbono inferior a 25 (Figura 21). O enxofre é o terceiro átomo mais abundante no petróleo e sua concentração média é de 0,6% (TISSOT & WELTE, 1984; HUNT, 1996).

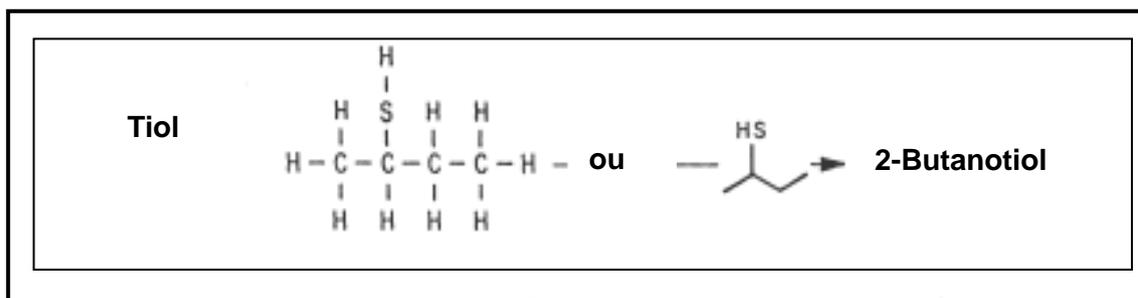


Figura 21. Estrutura química de um hidrocarboneto contendo enxofre na sua molécula. Fonte: TISSOT & WELTE, 1984 *apud* SOUZA, 2003.

A principal participação dos compostos nitrogenados é encontrada nas frações com elevado peso molecular e ponto de ebulição tendo uma concentração menos que 0,2% no total de compostos contidos no petróleo (Figura 22). Os fenóis, cetonas, ésteres e ácidos graxos saturados são os principais compostos que contêm oxigênio como heteroátomo (TISSOT & WELTE, 1984; HUNT, 1996).

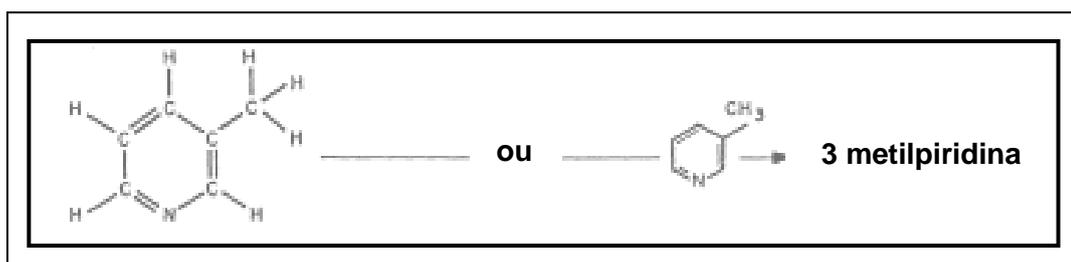


Figura 22. Estrutura química de um hidrocarboneto contendo nitrogênio na sua molécula. Fonte: TISSOT & WELTE, 1984 *apud* SOUZA, 2003.

A principal diferença entre os asfaltenos e as resinas baseia-se na solubilidade em *n*-hexano. As resinas são solúveis enquanto que os asfaltenos são insolúveis e precipitam. Entretanto, ambos são solúveis em benzeno e clorofórmio. Por possuírem propriedades semelhantes, as resinas e os asfaltenos freqüentemente ocorrem associados, formando partículas coloidais (TISSOT & WELTE, 1984; HUNT, 1996).

As partículas dos asfaltenos existentes no petróleo estão parcialmente dissolvidas na forma micelar, dependendo da polaridade do óleo e da presença de outros componentes. O colóide é formado quando grandes partículas de asfalteno ficam estabilizadas em solução por adsorção de resinas em sua superfície fazendo com que as partículas de asfaltenos se afastem, superando as forças de Van der

Waals existentes entre elas, impedindo assim a formação de agregados (PRIYANTO & MANSOORI, 2001).

Conhecer a forma pela qual os heteroátomos estão ligados e distribuídos nas moléculas de asfalteno e de resinas é de grande importância para a exploração e produção de petróleo. Esses elementos são responsáveis por interações inter e intramoleculares que podem afetar algumas das propriedades dos asfaltenos, das resinas e do próprio petróleo (SPEIGHT, 1991).

Na composição química dos NSO também podem ser encontradas substâncias que possuem carbonos ligados a metais (C-metal) em pequenas quantidades (ALLINGER *et al.*, 1976), e entre eles predominam o níquel e o vanádio. Outros metais como ferro, zinco, cobre, chumbo, arsênio, molibdênio, cobalto, manganês e cromo também são encontrados, porém em menores concentrações (TISSOT & WELTE, 1978).

IV. 1.1.4 Biomarcadores

Aumentando a complexidade molecular do petróleo encontram-se na sua composição, compostos não mais lineares e sim anelares, estes são denominados de biomarcadores.

Os biomarcadores ou fósseis geoquímicos ou ainda marcadores biológicos são compostos que ocorrem como misturas complexas em sedimentos e petróleos. Esses compostos possuem relação direta com aqueles que ocorrem em organismos vivos, o que permitem inferir com respeito às suas origens (BORIN, 2003).

Estes compostos orgânicos podem estar presentes em materiais geológicos (petróleos, rochas sedimentares e carvões), cujas estruturas sofreram pouca ou nenhuma alteração em relação às estruturas das substâncias biológicas (PHILP, 1985).

A análise dos biomarcadores pode fornecer informações sobre: reconstituição do ambiente deposicional; avaliação do grau de biodegradação, tanto em reservatórios como em ambientes contaminados por óleo; caracterização da migração do óleo ao longo do reservatório; avaliação do grau de maturação do óleo; identificação de contaminações de ambientes naturais por hidrocarbonetos

(CONNAN, 1981; MACKENZIE, 1984; PHILP & LEWIS, 1987; PETERS & MOLDOWAN, 1993).

Os principais tipos de biomarcadores são: terpanos, triterpanos pentacíclicos ou hopanos e esteranos regulares e rearranjados ou diasteranos (PETERS & MOLDOWAN, 1993).

Os esteranos e os hopano são constituídos de anéis condensados de 5 a 6 átomos de carbono (PETERS & MALDOWAN, 1993). O triterpanos (hopanos) e esteranos (C_{30}) diferem na estrutura, mas ambos são derivados de seis unidades de isopreno, enquanto tetraterpanos (C_{40}) contêm 8 unidades.

A classe dos terpanos inclui os terpanos tricíclicos e tetracíclicos, os quais se constituem importantes traçadores geoquímicos, pois ocorrem na maioria dos óleos brutos. Os terpanos tricíclicos ocorrem entre $C_{19}H_{34}$ e $C_{30}H_{56}$, enquanto a série dos tetracíclicos é menor, com apenas os membros C_{24} - C_{27} comumente observados (PHILP, 1985). Os terpanos são compostos orgânicos cuja cadeia molecular constitui-se de múltiplos de isoprenos, classificados segundo a unidade terpânica básica ($C_{10}H_{20}$) como: monoterpano (C_{10}), sesquiterpano (C_{15}), diterpano (C_{20}), triterpano (C_{30}), tetraterpano (C_{40}) e politerpanos ($>C_{40}$). Os triterpanos podem ainda conter de três a seis anéis naftênicos, sendo conhecidos como: triterpanos tricíclicos (3 anéis); triterpanos tetracíclicos (4 anéis); triterpanos pentacíclicos ou hopanos (5 anéis); e gamacerano (6 anéis) (PETERS & MOLDOWAN, 1993).

Os esteranos são comuns em sedimentos marinhos tipicamente entre C_{27} - C_{29} (SIMONEIT, 1978) (Figura 23a).

Os esteranos e outros hidrocarbonetos esteroídes (esterenos, diasterenos, e diasteranos) são derivados de esteróis, ou cetonas esteroidais, sendo originados de vegetais terrestres superiores e algas. São derivados diageneticamente dos esteróis em organismos eucariotes, principalmente plâncton e, em menor extensão, em vegetais superiores (SEIFERT & MOLDOWAN, 1986; VOLKMAN, 1986; DE LEEUW & BASS, 1986). Estes biomarcadores são menos resistentes à degradação bacteriana frente aos hopanos (PETERS & MOLDOWAN, 1993; PETERS *et al.*, 1996).

Juntamente aos esteranos regulares, esteranos rearranjados ou diesteranos, também ocorrem em combustíveis fósseis, sendo estes últimos muito mais resistentes à degradação que os primeiros (ABOUL-KASSIM & SIMONEIT, 1996; PHILP, 1985). As classes dos terpanos ocorrem na maioria dos óleos brutos e inclui

os terpanos tricíclicos e tetracíclicos, os quais se constituem importantes traçadores geoquímicos (Figura 23b). Diasteranos são produtos de um rearranjo molecular dos diasterenos correspondentes. Primeiro ocorre à conversão dos esteróides a diasterenos durante a diagênese por meio de reações catalisadas por sítios ácidos presentes em argilas. Por último, os diasterenos são reduzidos a diasteranos de isomeria $13\beta,17\alpha(H)20S$ e $20R$ e $13\alpha,17\beta(H)20S$ e $20R$ (PETERS & MOLDOWAN, 1993).

Os biomarcadores de petróleo mais largamente utilizados em estudos geoquímicos orgânicos são os hopanos, estes possuem mais de 150 derivados individuais já isolados de vários tipos de material orgânico sedimentar (OURISSON *et al.*, 1979) (Figura 23c).

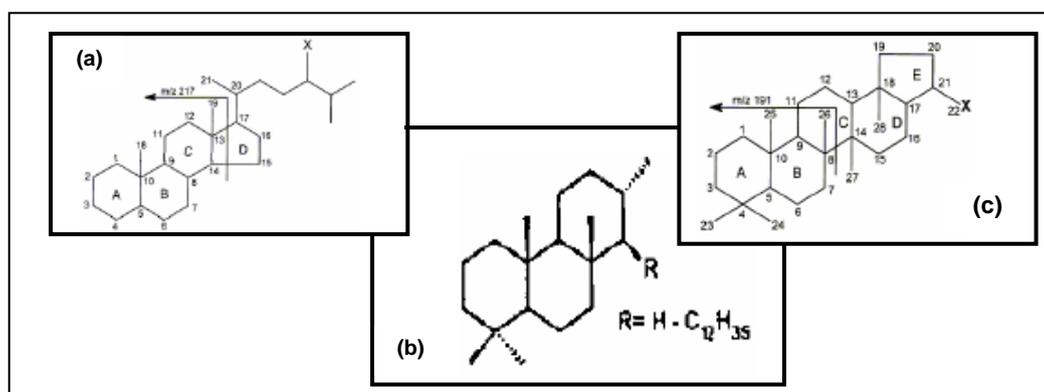


Figura 23. Estrutura química de biomarcadores de petróleo. (a)esteranos, (b) terpanos e (c) hopanos. Fonte: BARBOSA, 2005.

Os hopanos são compostos por três séries estereoisômeras, conhecidas por: $17\beta(H), 21\beta(H)$ – hopanos, $17\beta(H), 21\alpha(H)$ – hopanos, $17\alpha(H), 21\beta(H)$ – hopanos. Compostos da série $\beta\alpha$ são também chamados de moretanos. A notação α e β indica a posição do átomo de hidrogênio, ligado ao carbono 17 ou 21 do ciclo, em relação ao plano que contém os ciclos, acima (α) ou abaixo (β). Hopanos com a configuração $17\alpha(H), 21\beta(H)$ variando de 27 a 35 átomos de carbono são característicos do petróleo devido à sua grande estabilidade termodinâmica, quando comparados com as outras séries epiméricas ($\beta\beta$ e $\beta\alpha$). A série $\beta\beta$ ($22R$), conhecida como configuração biológica, geralmente não é encontrada no petróleo em função de sua instabilidade térmica (BAUER *et al.*, 1983, *apud* PETERS & MALDOWAN, 1993). A configuração $17\alpha(H), 21\beta(H)$ de hopanos é encontrada no petróleo e em sedimentos antigos mais estáveis termodinamicamente.

IV. 1.1.4.1 Biomarcadores e origem

Nos últimos anos os biomarcadores vêm sendo bastante utilizados para caracterização de ambientes deposicionais, sendo possível através destes distinguir rochas geradoras de diferentes ambientes (CABRAL, 2006).

Segundo Regato (2008):

Óleos ligados aos ambientes deposicionais lacustres e marinhos deltáicos tendem a ter distribuições com predomínio dos componentes de cadeia longa (C₂₂-C₃₅) com preferência ímpar sobre par, indicando um maior aporte de lipídeos de cadeia longa das plantas superiores (ceras de folhas) e algas de água doce (*Botryococcus Braunii*). Em contraste, um ambiente marinho tende a gerar óleos com distribuição de *n*-alcanos ímpares e/ou pares de baixa massa molecular (ao redor de C17), refletindo um aporte de fitoplânctons marinho (BRASELL *et al.*, 1978; TISSOT & WELTE, 1984).

As razões de biomarcadores, quando comparadas com outros parâmetros, são bastante úteis na descrição da rocha geradora mesmo quando somente as amostras de óleo estão disponíveis (PETERS *et al.*, 2005).

Os parâmetros moleculares mais usados na caracterização de ambientes deposicionais são relacionados na Tabela 2:

Tabela 2. Principais razões de biomarcadores utilizados como parâmetros de origem.

Razões	Importância
Razão Hopano/Esteranos	Reflete a maior contribuição de organismos procarióticos (bactérias) ou organismos eucarióticos (algas e plantas superiores).
Correlação entre Esteranos Regulares C ₂₇ -C ₂₈ -C ₂₉	Fornecer informações importantes dos Paleoambientes.
Razão Diasteranos/Esteranos	Utilizada principalmente para distinção entre petróleos de origem carbonática e de origem siliciclástica.
Razão Terpanos Tricíclicos/ 17 α (H),21 β (H)-hopano	Proposta como parâmetro de correlação.
Razão Terpano Tetracíclico/17 α (H),21 β (H)-hopano	Bastante utilizada na caracterização de ambientes deposicionais.
Razão Ts/Tm	-
Razão C ₃₄ /C ₃₅ $\alpha\beta$ hopanos	Relacionado com o ambiente de deposição.
Índice de Gamacerano (Gam/17 α (H),21 β (H)-hopano)	Indicador de salinidade dos ambientes deposicionais e indicador da eficiência da estratificação da coluna d'água.
Razão dos Poliprenóides Tetracíclicos (TPP's)	Permitem uma melhor diferenciação entre os ambientes lacustres e marinhos.

Fonte: adaptado de CABRAL, 2006.

IV. 1.2 ALTERAÇÕES FÍSICAS E QUÍMICAS DO PETRÓLEO NO MEIO AMBIENTE

Quando um derrame de petróleo ocorre no mar, o óleo está sujeito a processos de intemperismo (alterações nas características iniciais do hidrocarboneto), que podem ocorrer simultaneamente, mas a diferentes velocidades (Figura 24). A velocidade e a extensão desses processos dependem das propriedades físicas e químicas do óleo original e de condições ambientais: temperatura, velocidade e direção dos ventos e das correntes marinhas (SOUZA, 2003).

O comportamento de óleos nos ecossistemas depende da composição química do petróleo e da atuação de processos como evaporação, emulsificação, dissolução, foto-oxidação (Figura 10) e de interações entre óleo, sedimentos e água e tem como objetivo reduzir a concentração de diferentes grupos de compostos,

modificando as características químicas e físicas do petróleo (JORDAN & PAYNE, 1980).

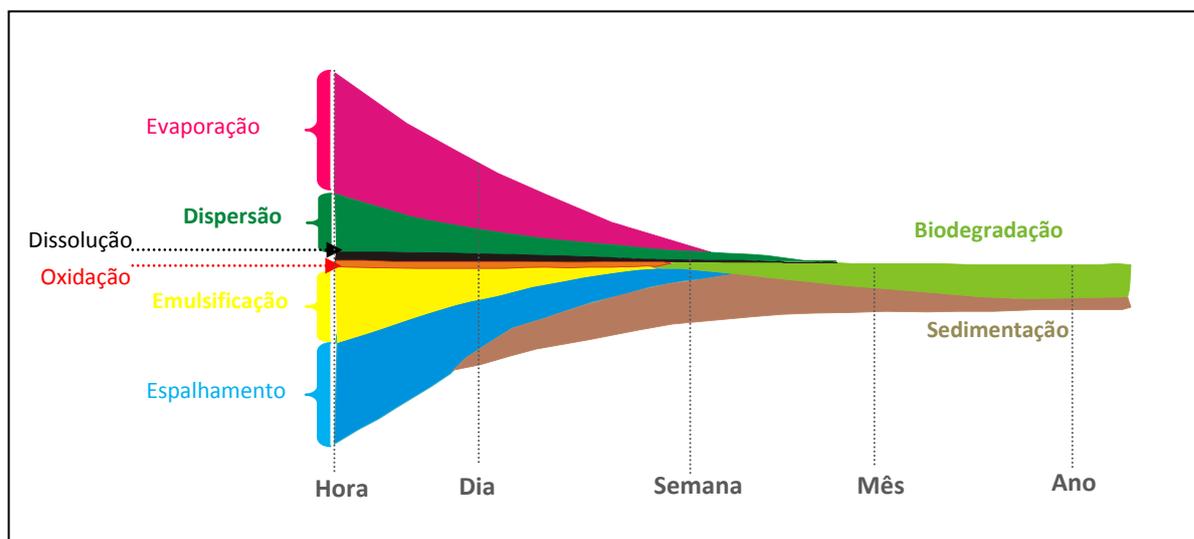


Figura 24. Importância relativa dos processos de intemperismo do óleo. Fonte: modificado ITOFF, 2002.

O **espalhamento** e estiramento da mancha de óleo sobre a superfície do mar é facilitada pela tensão superficial que existe entre a superfície da água e o óleo, devido a suas características hidrofóbicas. Os mecanismos de espalhamento e estiramento da mancha dependem, principalmente, da viscosidade do petróleo. O espalhamento é responsável por tornar as bordas das manchas de óleo mais espessas, enquanto que o estiramento alonga e alinha as manchas na direção do vento e das correntes marinhas (FINGAS, 1998a).

Um processo importante é a **evaporação**, responsável pelas perdas significativas de volume de óleos leves e médios derramados no mar e pelas mudanças ocorridas no óleo durante um derrame. Dependendo de sua composição em poucos dias um petróleo leve pode perder até 75% de seu volume e os médios até 40%. Um aliado importante a esse fator nos ambientes tropicais são as temperaturas elevadas fazendo com que a perda por evaporação dos componentes voláteis do petróleo seja mais rápida tendo como resultado a diminuição dos efeitos tóxicos sobre a microflora local (FINGAS, 1998b).

O terceiro fator mais importante é a **dispersão natural** do petróleo no mar que é caracterizada pelo movimento de gotas de óleo, com tamanhos que variam de 1 a 50 microns, na coluna d'água, intensificado pela turbulência das ondas. Estudos

mostraram que a dispersão ocorre preferencialmente com os componentes da fração de hidrocarbonetos saturados e que a presença de quantidades significativas de asfaltenos retarda esse processo, pois os compostos polares do petróleo estabilizam a emulsão óleo-água (FINGAS, 1998a). A dispersão do óleo em pequenas gotas favorece o seu contato inicial com os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos naturalmente presentes no mar, através do mecanismo de adesão favorecendo o processo de biodegradação.

Já o processo de **dissolução** ocorre somente em uma pequena porção do óleo, mas é considerado um parâmetro importante na avaliação ecotoxicológica de um derrame, pois envolve a solubilização parcial dos compostos aromáticos de baixos pesos moleculares, extremamente tóxicos (com potencial carcinogênico e neurotóxico) (WANG *et al.*, 1995; WANG & FINGAS, 1998).

A **emulsificação**, mistura de líquidos não miscíveis, acontece através do equilíbrio de cargas elétricas existentes entre a superfície das pequenas gotas de óleo e as moléculas de água ao seu redor. Ela causa um aumento no volume do poluente, quando comparado com o volume do óleo derramado inicialmente, em função da quantidade de água que é incorporada ao óleo durante a emulsificação. Os valores de viscosidade da emulsão óleo - água também são maiores que os do óleo original. A formação do chamado *mousse* diminui a disponibilidade do óleo ao processo de evaporação e de biodegradação, conduzido por microrganismos naturalmente presentes no mar (FINGAS *et al.*, 1995; FINGAS *et al.*, 1996; FINGAS *et al.*, 1998).

A **foto-oxidação** é uma reação de oxidação catalisada pela radiação ultravioleta do sol. Mas nem todos os componentes do petróleo são sensíveis à radiação ultravioleta, o que pode ser confirmado em uma pesquisa realizada por Garret *et al.* (1998). Nessa pesquisa foi avaliada a sensibilidade dos diferentes componentes de óleos leves à radiação ultravioleta produzida por uma fonte artificial, ao longo de 48 horas de exposição. Os resultados analíticos mostraram que os compostos saturados não sofreram alterações significativas durante o teste e que os mais atingidos pela radiação foram principalmente, os fenantrenos, dibenzotiofenos e crisenos alquilados. O aumento dessa sensibilidade estava diretamente relacionado ao número de substituições de radicais alquilas nas moléculas.

A **sedimentação** é iniciada após o aumento da densidade do petróleo, como resultado da ação dos outros processos de intemperismo. Os compostos saturados são predominantes na maioria dos óleos, e são mais suscetíveis à evaporação e à dispersão. Os compostos aromáticos de baixo peso molecular são parcialmente solúveis em água, mas evaporam rapidamente após um derrame, enquanto os aromáticos de elevado peso molecular não apresentam o mesmo comportamento. As resinas e os asfaltenos possuem propriedades similares, sendo ambos os grupos estáveis aos processos de evaporação, dispersão e biodegradação (FINGAS, 1998a). A ingestão do óleo por zooplactons e sua posterior excreção associada às pelotas fecais também é um dos mecanismos pelos quais se processa a sedimentação do petróleo

O processo de **biodegradação** é controlado, em parte, pela disponibilidade do óleo no meio líquido, o que faz da sedimentação um mecanismo que pode favorecer o ataque microbiano ao petróleo (BRAGG & OWENS, 1994; OWENS *et al.*, 1994).

A **biodegradação** é um dos processos mais importantes envolvidos no intemperismo e na eventual remoção de petróleo do ambiente, particularmente para os componentes não voláteis do petróleo (ZHU *et al.*, 2001). Quando esses ambientes são expostos a derrames acidentais, ocorre o fenômeno de adaptação ou aclimatação de certas populações de bactérias, que passam a reconhecer os componentes do óleo como fonte de carbono, iniciando o processo de degradação (CRAPEZ *et al.*, 2002).

Na natureza, a biodegradação do óleo normalmente envolve bactérias de diferentes gêneros e espécies, cada uma especializada em degradar uma ou várias frações do óleo derramado. A degradação do petróleo envolve uma reação seqüencial e progressiva, no qual certos microorganismos fazem o primeiro ataque aos constituintes de petróleo, produzindo compostos intermediários que serão utilizados por um grupo diferente de organismos e assim, sucessivamente (KARRICK, 1997). A biodegradação depende de fatores tais como temperatura e disponibilidade de nutrientes em contato óleo-água (ASIF *et al.*, 2009).

Na maioria dos estudos, aumentar a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo específica depende da população microbiana presente. A composição da população microbiana é afetada pelas condições ambientais e pela composição dos hidrocarbonetos (BENTO *et al.*, 2005).

A Tabela 3 mostra uma síntese dos principais processos de intemperismo, suas conseqüências, escala de tempo e fatores que influenciam em cada um dos processos.

Tabela 3. Sínteses dos principais processos de intemperismo do óleo no mar.

Processo	Conseqüências principais	Escala de tempo	Fatores de influência
Espalhamento	Determinante da área da mancha.	Primeiros momentos do derrame (minutos a poucas horas)	Gravidade, inércia, viscosidade e tensão superficial.
Evaporação	Perda de massa da mancha e aumento da viscosidade e densidade.	Primeiras horas	Área e espessura da mancha e coeficiente de transferência de massa.
Dispersão	Dispersão do óleo na superfície da coluna d'água.	Horas a dias	Condições marítimas e meteorológicas.
Dissolução	Perda de massa. Importante sob o ponto de vista toxicológico.	Rapidamente após o derrame (até 15 minutos)	Presença de hidrocarbonetos solúveis.
Emulsificação	Aumento da viscosidade e volume da mancha, próxima ao valor da densidade da água.	Horas a dias	Turbulência, temperatura e composição do óleo.
Oxidação	Aumento do conteúdo de frações persistentes. Influencia a emulsificação.	Detectável após uma semana ou mais	Incidência de luz solar.
Sedimentação	Remoção do óleo da coluna d'água.	Horas a dias	Aumento da densidade devido ao intemperismo do óleo.
Biodegradação	Destino final de grande parte do óleo dissolvido, disperso na coluna d'água e sedimentado.	Semanas a meses. Pode continuar por anos.	Composição da biota, concentração de nutrientes e oxigênio.

Fonte: adaptado de SOUZA, 2003.

IV. 1.3 CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO

Os óleos podem atingir o meio ambiente por fontes naturais, como infiltração natural de petróleo do fundo do mar para a coluna d'água sobrejacente, ou por fontes antropogênicas, através de liberações de óleo cru e produtos refinados nos processos de exploração e produção, de grandes derramamentos que ocorrem em acidentes durante o transporte e nas atividades de rotina e liberações relacionadas com as atividades de consumo. Atualmente, as fontes antropogênicas são as que mais contribuem para a contaminação do meio ambiente por hidrocarbonetos (NRC, 2003; NEVES, 2006).

Os hidrocarbonetos presentes nos ecossistemas aquáticos são originados de várias fontes, as quais podem ser agrupadas nas seguintes categorias (UNEP/IOC/IAEA, 1992; CLARK, 2001):

- 1) aportes de petróleo e produtos derivados;
- 2) aportes de efluentes domésticos e industriais;
- 3) hidrocarbonetos liberados como resultado da combustão parcial de combustíveis;
- 4) hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) originados da queima de florestas e pastagens;
- 5) biossíntese de hidrocarbonetos por organismos marinhos e terrestres;
- 6) transformação diagenética de produtos naturais não-hidrocarbonetos para hidrocarbonetos.

A contaminação de solos e do ambiente hídrico por petróleo, geralmente se dá por perdas ou rompimentos de dutos, ou por acidentes ocorridos no seu transporte. O transporte do petróleo é realizado através de oleodutos terrestres e marinhos e de navios tanque, podendo resultar, inevitavelmente, em acidentes com vazamentos de óleo para o meio ambiente. Os vazamentos podem ocorrer também nas operações de exploração e produção do petróleo (*upstream*), ou no refino e distribuição de seus derivados (*downstream*) (SOUZA, 2003; BENTO, 2005).

Apesar das principais atividades de transporte e transferência de óleo ocorrerem no mar, portos e rios, os acidentes não estão limitados a essas áreas. Em qualquer lugar em que o petróleo esteja sendo explorado, produzido, estocado, refinado e transportado, existe o perigo potencial de derrames acidentais que podem vir a causar danos à fauna e flora, e ainda alterar o meio ambiente, principalmente os ecossistemas marinhos (SOUZA, 2003).

Muitos derrames no mar, envolvendo pequenos volumes de óleo, ocorrem como resultado da lavagem de tanques de navios petroleiros e do descarregamento de água de lastro contaminada por óleo (SOUZA, 2003). A maior parte do óleo que chega aos oceanos é proveniente de eventos menos agudos, como descargas rotineiras de navios, poluição atmosférica e óleo lubrificante descartado em águas pluviais. Entretanto, são os derramamentos provenientes de dutos e navios que recebem maior apelo para seu combate, devido à grande visibilidade e pelas conseqüências trágicas que a poluição aguda pode provocar sobre os ecossistemas atingidos (SOUZA FILHO, 2006).

Os derramamentos consistem em uma das principais causas da poluição accidental por óleo, principalmente no Brasil, onde a maior parte do petróleo e derivados é transportada por petroleiros (SILVA, 2004a).

Por serem constituintes de diferentes grupos de compostos orgânicos, os hidrocarbonetos apresentam um grande potencial como indicadores dos níveis e origens do material natural e antropogênico no ambiente (BÍCEGO, 1988; BOULOUBASSI & SALIOT, 1993a; FIGUEIREDO, 1999; MEDEIROS, 2000; NISHIGIMA *et al.*, 2001; MEDEIROS & BÍCEGO, 2004a; MEDEIROS & BÍCEGO, 2004b; MEDEIROS *et al.*, 2005).

Nos sedimentos aquáticos, os hidrocarbonetos são freqüentemente encontrados na forma de misturas complexas originárias de múltiplas fontes, cuja distinção é possível através do estudo combinado de hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e através da análise de moléculas específicas, denominadas marcadores geoquímicos (BOULOUBASSI & SALIOT, 1993b; PETERS & MOLDOWAN, 1993; MEDEIROS, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2005).

Os compostos mais úteis na investigação das fontes antropogênicos são os *n*-alcanos, alcanos isoprenóides e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) seguido dos biomarcadores de petróleo (terpanos, hopanos e esteranos) (VOLKMAN *et al.*, 1992; PETERS & MOLDOWAN, 1993; READMAN *et al.*, 2002). Os alquil-benzenos lineares (LABs) também são uma classe de hidrocarbonetos que podem ser usados como indicadores de contaminação por efluentes domésticos (esgotos) (TAKADA *et al.*, 1992; MEDEIROS, 2000; MEDEIROS *et al.*, 2005).

A poluição pode atingir drástica e rapidamente o ambiente marinho, com morte instantânea do plâncton, ou ainda pela bioacumulação, que é o fenômeno através do qual os organismos vivos acabam retendo dentro de si algumas substâncias tóxicas que vão se acumulando também nos demais seres da cadeia alimentar até chegar ao homem, sendo um processo lento de intoxicação e muitas vezes letal (GEO BRASIL, 2002).

Nos acidentes com derramamento de petróleo a primeira providência é identificar a fonte poluidora e controlar o vazamento. Isto pode ser feito através da estabilização do navio tanque, pela interrupção do fluxo de óleo no oleoduto danificado, ou o reparo imediato do poço, devendo-se a seguir ser acionado o plano de contingência e selecionadas as melhores tecnologias aplicáveis à situação (NORDVIK *et al.*, 1995 *apud* SOUZA, 2003).

A identificação da fonte dos óleos derramados se torna cada vez mais difícil com o passar do tempo, devido a alterações na composição do petróleo causada pela exposição à luz, ar, água e microorganismos. Devido aos grandes incidentes por derrame de hidrocarbonetos e outros tipos de poluição, o desenvolvimento de sistemas eficazes e métodos analíticos são necessário para caracterizar estes derramamentos e identificar as principais fontes. Tais métodos são também de uma importância fundamental para a melhor resposta aos derrames de petróleo, uma vez que estes métodos iriam ajudar a monitorar hidrocarbonetos derramados e quantificar o grau de degradação do óleo (BARAKAT *et al.*, 2002).

CAPÍTULO V

Estado da Arte

V. 1. ESTADO DA ARTE

O histórico do desenvolvimento das técnicas de biorremediação usadas em limpeza de derrames acidentais de óleo demonstra que a biorremediação é uma tecnologia que se estabelece através da interação dos segmentos científicos, tecnológicos e das agências de controle ambiental (SOUZA, 2003). A biorremediação recebeu maior atenção, principalmente depois do acidente com *Exxon Valdez*, navio petroleiro que liberou em 24 de Março de 1989 cerca de 35.500t de petróleo bruto nas águas de Prince William Sound, Alasca (PWS) (BRADDOCK *et al.*, 1995).

V. 1.1 HISTÓRICO DA BIORREMEDIAÇÃO NO MUNDO

Desde a década de 1940 que os processos de biorremediação vêm sendo estudados por microbiologistas, mas foi no final dos anos 80 que se tornou mais conhecida. Segundo Hoff (1993), o histórico da biorremediação se divide em três períodos:

Período de investigação (Antes de 1989) - Esse período foi marcado por pesquisas acadêmicas, embora algumas publicações sobre uso da biorremediação nesta época já tivessem sido documentadas.

Vários estudos foram desenvolvidos para descrever a degradação do óleo no ambiente marinho após o derrame ocorrido em 1978, nas costas da Bretanha, França causado pelo petroleiro *Amoco Cadiz*, que liberou cerca de 290 milhões de litros de óleo no mar. Os pesquisadores concluíram que a biodegradação era um importante vetor do processo conhecido como intemperismo do óleo promovendo alterações nos seus componentes. Observaram também, que houve uma fase de adaptação rápida dos microrganismos autóctones logo após o derrame, e que ela estava relacionada às exposições frequentes da microflora local à água de lastro de navios tanque (HOFF, 1993; ATLAS, 1995a).

Em Julho de 1979 na tentativa de minimizar o impacto ambiental causado pelo *blow out* do poço exploratório *Ixtoc-I*, localizado sob 48 metros de lâmina d'água da Baía de Campeche, Golfo do México foram usados dispersantes químicos e barreiras flutuantes com o objetivo de evitar que a mancha de óleo atingisse a costa. Esperava-se que a degradação do óleo ocorresse de forma rápida, considerando que no Golfo do México a população microbiana também está adaptada à presença de petróleo. Entretanto, grande parte do óleo formou uma emulsão ("mousse de chocolate"), restringindo o acesso dos 20 microrganismos à parte interna da massa de petróleo emulsionada (ATLAS, 1995b), Estudos mostraram que a dissipação do óleo foi controlada a partir do conhecimento das propriedades físicas do óleo (tamanho das gotas e densidade), e pelas correntes marinhas (BOEHM & FIEST, 1982).

Durante a década de 1980 inúmeros produtos comerciais foram desenvolvidos para serem utilizados como agentes de biorremediação. Alguns destes produtos utilizados foram principalmente nutrientes, mas a maioria foi obtida a partir da crescente indústria biotecnológica e inclui vários tipos de microrganismos, mas neste período não se tem conhecimento da aplicação da técnica em derrames de óleo no mar (HOFF, 1993). As pesquisas sobre biorremediação continuaram evoluindo, mas a técnica era usada somente no tratamento de solos contaminados por óleos provenientes de vazamentos de tanques de reserva.

Várias outras possíveis razões para o fracasso de inóculos na degradação de contaminantes na natureza foram resumidos por Goldstein *et al.* (1985), que incluem: a concentração do contaminante pode ser demasiada baixa para suportar o crescimento das espécies inoculadas; o ambiente natural pode conter substâncias que inibem o crescimento ou a atividade do inóculo; o crescimento da taxa das espécies inoculadas pode ser limitada pela predação, como protozoários; as espécies adicionadas podem utilizar outros substratos na natureza em vez de os contaminantes de interesse; e os microrganismos semeados podem ser incapazes de se mover através dos poros do sedimento dos contaminantes.

Período de atenção (1989 – 1991) – Neste período a técnica de biorremediação recebeu grande atenção, principalmente depois do acidente causado pelo petroleiro *Exxon Valdez* na baía de Prince William, Alasca.

Só em março de 1989 que foram criados protocolos para o uso dos testes de biorremediação, após o derrame de 40 milhões de litros de óleo do *Exxon Valdez*, contaminando mais de 500km de costa (PRITCHARD & COSTA, 1991). Os testes recomendaram o uso dos agentes de reforço de biorremediação, Inipol (Inipol EAP 22 fabricado pela Elf Aquitaine da França) e Customblen (Customblen 28-8-0-fabricado pela Sierra Chemicals da Califórnia) e apresentaram resultados positivos formando uma base para que a nova tecnologia passasse a ser usada em maior extensão na limpeza da costa onde foram tratadas mais de 70 milhas da costa de Prince William Sound com estes agentes (PRITCHARD & COSTA, 1991; HOFF, 1993).

Ainda em 1989, estudos de laboratório e em escala piloto mostraram que a bioestimulação é uma abordagem promissora no aumento da biodegradação de petróleo. A eficácia de vários tipos de nutrientes e as estratégias de distribuição ainda requer demonstração de campo. Sveum & Ladousse (1989) investigaram o desempenho de Inipol EAP 22 em diferentes tipos de sedimentos. Os resultados mostraram que o adubo oleofílico tem sucesso na biodegradação de petróleo em sedimentos de granulação grossa, mas não em sedimentos finos.

Em janeiro de 1990, o derrame produzido pelo rompimento de um oleoduto da refinaria de Exxon Bayway em Linden, Nova Jersey, EUA, contaminou uma praia da Prall's Island. A maior parte do óleo foi removida por meios mecânicos e depois se iniciou um experimento de biorremediação com o uso do fertilizante Customblen. Foi verificada a biodegradação do óleo, provavelmente em função da lixiviação dos nutrientes e dos níveis elevados de microrganismos degradadores presentes naturalmente nos sedimentos, em função de exposições crônicas da microflora ao petróleo (HOFF, 1992).

Também em 1990 ocorreu uma explosão durante a transferência de óleo do navio tanque *Mega Borg*, próximo a Galveston, Texas. O óleo foi derramado continuamente durante os nove dias seguintes. A *Texas Water Commission* recebeu autorização para aplicar sobre a mancha microrganismos produzidos especificamente para biorremediação, cujo nome comercial é Alpha BioSea. Os resultados das análises cromatográficas não foram conclusivos, pois mostraram uma grande variabilidade entre as amostras coletadas, comprovando a dificuldade de se conseguir amostras representativas em mar aberto (HOFF, 1992; ATLAS, 1995a).

O *blowout* de um poço localizado em *offshore* de Seal Beach, Califórnia, EUA,

ocorrido em novembro de 1990, derramou 1.500 litros de óleo no mar, contaminando os pântanos da Reserva Nacional de Vida Selvagem de Seal Beach. O tratamento foi feito com microrganismos produzidos para aplicação em estações de tratamento de esgotos. As amostras coletadas foram analisadas pela *EPA*, e os resultados novamente não foram promissores, indicando que a população de microrganismos não foi capaz de acelerar a biodegradação do óleo (HOFF, 1992).

Em 1991, durante a Guerra do Golfo Árabe, foram lançados no golfo milhões de litros de óleo. Foram utilizando alguns testes em laboratório com microrganismos exógenos ao meio e na maioria dos casos os resultados não foram positivos (FAYAD *et al.*, 1992). Uma observação interessante foi feita com relação à adição de nutrientes, pois esses aceleravam a degradação dos *n*-alcanos, mas atrasavam a dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (FAYAD & OVERTON, 1995). Apesar dos resultados positivos, a biorremediação não foi usada em larga escala na limpeza dos óleos derramados durante a guerra.

Outro estudo envolveu a adição periódica de água, grânulos de fertilizantes solúveis (nitrato de amônio e superfosfato triplo), na tentativa de aumentar a biodegradação do óleo cru em uma praia arenosa e em um pântano de sal do Canadá (LEE & LEVY, 1991). O óleo utilizado foi do tipo bruto em dois níveis diferentes (0,3 e 3,0%), e foram testadas duas concentrações de NH_4NO_3 (0,34 e 1,36g/L de sedimentos). Os resultados da praia arenosa mostraram que, no nível mais elevado de contaminação, a degradação do óleo foi mais eficiente nas parcelas adubadas quando comparadas com as parcelas não-fertilizadas e os resultados no pântano de sal foram exatamente o oposto. A adição de fertilizantes foi significativa no nível de contaminação até 0,3%, mas não ocorreu aumento na degradação com um nível de contaminação a 3%, o que foi atribuído à penetração de óleo na zona anaeróbia onde a taxa de degradação diminuiu significativamente.

Período da criação (1992 – presente) – Durante este tempo as técnicas de biorremediação têm alcançado certo nível de aceitação, mas o nível de interesse e atenção tem diminuído consideravelmente.

Venosa *et al.* (1992) realizaram um teste de campo em Prince William Sound, Alasca, após o derramamento do *Exxon Valdez* para investigar a eficácia de dois produtos microbianos comerciais. Este teste de campo não conseguiu demonstrar a

biodegradação de petróleo aprimorada por esses produtos justificada pelos teores de oxigênio dissolvido que pode ter sido limitante, impedindo assim a biodegradação efetiva.

Assim, a partir de 1993 foram criados os primeiros protocolos de testes, desenvolvidos pela *EPA*, para avaliar a eficiência de um determinado produto em degradar um óleo padrão, sua toxicidade a organismos marinhos e conduzidos testes de campo em pequena escala. Esses protocolos estão auxiliando os órgãos ambientais nas tomadas de decisões sobre o melhor produto ou metodologia de biorremediação a ser aplicada em derrames de óleo de ocorrência mais recente (HOFF, 1993).

Lee *et al.* (1995b), realizou um estudo de campo, utilizando adubos diferentes para investigar o efeito da biorremediação sobre a toxicidade em sedimentos de praia. Os resultados indicaram que a toxicidade de sedimentos não foi significativamente afetada pela adição de um adubo inorgânico à base de nitrato e fósforo. No entanto, os pesquisadores observaram uma desaceleração da diminuição da toxicidade quando o fertilizante orgânico foi aplicado repetidamente, o que foi atribuído à degradação rápida dos fertilizantes e na produção de amônia excedendo os limites de toxicidade.

Em janeiro de 1997, aproximadamente 5 milhões de litros de óleo pesado foram derramados no Mar do Japão. Esse acidente foi causado pelo naufrágio do navio tanque russo *Nakhodka*, contaminando 1.200km de costa. Com o objetivo de biorremediar, foram conduzidos experimentos utilizando culturas comerciais de microrganismos, cuja marca registrada é Terra Zyme, produzidos pela Oppenheimer Biotechnology, Inc. Os resultados dos testes *in vitro* demonstraram que os microrganismos contribuíram para biodegradação de 35% do óleo (HOZUMI *et al.*, 2000). Foi verificado que sua aplicação causou um impacto fraco sobre a taxa de fertilização de ovos de ouriços do mar, e praticamente nenhum impacto sobre espécies de peixes típicas da região, sendo seu uso liberado para testes de campo (TSUTSUMI *et al.*, 2000a). Os resultados mostraram que a taxa de biodegradação conseguida nos testes de campo foi semelhante àquela dos testes *in vitro*, confirmando a qualidade do produto Terra Zyme, aprovado pela *EPA* em fevereiro de 1999, como agente microbiológico de biorremediação (TSUTSUMI *et al.*, 2000b).

Já estudos realizados em uma zona úmida por Simon *et al.* (1999), em San Jacinto, Texas, mostraram que a adição de agentes de bioaumento não aumentaram

a biodegradação de um óleo bruto Árabe. Contudo, a adição de nutrientes não demonstrou qualquer efeito significativo em seu estudo, sugerindo que outros fatores, tais como oxigênio, estava limitando a degradação do óleo.

Desde março de 2001, após o naufrágio do petroleiro "Erika" onde foram derramados de 20 á 30 mil toneladas de hidrocarbonetos ao longo da costa atlântica da França, amostras de óleo foram coletadas a fim de se avaliar a taxa de degradação natural. Entre os diversos parâmetros, o controle do destino do óleo no meio ambiente é monitorado e a biodegradação por microorganismos é conhecida por desempenhar um importante papel. Para investigar a eficiência dos microorganismos sobre o óleo, tapetes microbianos foram mantidos em suspensões contendo o poluente. Estudos ajudaram a compreender que a diversidade das comunidades bacterianas sofreu adaptação sobre "Erika" e em função disso foi detectada baixa taxa de degradação (BORDENAVE *et al.*, 2004).

V. 1.2 HISTÓRICO DA BIORREMEDIAÇÃO NO BRASIL

No Brasil, a técnica de biorremediação ainda é pouco utilizada, porém, pode ser promissora e eficiente se utilizada em áreas contaminadas. Segundo Souza (2003) & Rosa (2001), as pesquisas sobre as aplicações da técnica de biorremediação em áreas impactadas por atividades petrolíferas vêm sendo desenvolvidas por universidades, isoladamente, ou muitas vezes com parcerias com empresas petrolíferas, a exemplo da Petrobras.

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Cunha & Leite (1997), em seus estudos tiveram como objetivo a otimização de condições ambientais para acelerar o processo de biodegradação de gasolina em microcosmos constituídos de solos bioaumentados com *Pseudomonas putida* (ATCC 12633), obtida de uma coleção de cepas.

A otimização dessas condições envolveu a aplicação, nos microcosmos contaminados, de diferentes concentrações de duas fontes de nitrogênio - nitrato de amônia e sulfato de amônia, uma de fósforo - fosfato de potássio, e uma fonte de oxigênio-peróxido de hidrogênio. As melhores taxas de degradação dos componentes (tolueno, etilbenzeno, *n*-nonano e *n*-tridecano) foram alcançadas nos experimentos em que se utilizaram nitrato de amônio e peróxido de hidrogênio, nas concentrações de 30µmol/g de solo e 0,1mM, respectivamente. A aplicação de fosfato de potássio não gerou resultados significativos, provavelmente devido à pré - existência de uma concentração ótima desse componente no solo.

Ururahy (1998), apresentou o resultado de sua pesquisa sobre a biodegradação de resíduo oleoso, proveniente de refinaria de petróleo. Nesse trabalho foram conduzidos experimentos em que foi utilizado um biorreator mecanicamente aerado e agitado e um consórcio microbiano contendo bactérias e leveduras, isolado do próprio resíduo e bioenriquecido ao longo do processo. Os resultados, após 42 dias, demonstraram um consumo de 68% de óleos e graxas, 97% de *n*-parafinas e 76% de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

O trabalho de Borges (2001), teve como objetivo principal o tratamento de um solo argiloso contaminado por petróleo e água produzida, proveniente de vazamentos ocorridos em tubulações deterioradas pelo tempo. A porcentagem de remoção de óleos e graxas foi de 88%. Nos ensaios anaeróbicos as melhores condições também apontaram para os níveis mais elevados de concentração dos produtos usados, e do maior intervalo de tempo, com remoção de 64,5% de O e G.

Já as pesquisas de Oliveira (2001), objetivaram a biorremediação de um solo arenoso proveniente da Baía de Guanabara, RJ, contaminado com petróleo árabe (leve). As variáveis do processo incluíram a adição de um consórcio misto de microrganismos, adição de fertilizante tipo NPK ou meio mineral definido e a correção ou não do pH do solo a 7,0. Os melhores resultados com a remoção de 100% dos *n*-alcanos compreendidos entre o decano e o eicosano e 40% de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, foram obtidos com o uso da combinação de cultura mista + fertilizante, na proporção de C:N de 100:10.

Recentemente Monteiro (2008), verificou o potencial da fitorremediação no rejeito de dragagem contaminado por metais pesados e hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA's) proveniente do Canal do Fundão, na Baía de Guanabara, RJ. Os resultados mostraram que a técnica para a remoção dos HPA's revelou

eficiência, ressaltando os mecanismos de rizodegradação e extração. Mas conclui que o consórcio ou a combinação das técnicas de fitorremediação e biorremediação, bem como a prática de rotação (sucessão) do cultivo de espécies vegetais no material em questão, poderia ser uma alternativa para otimizar o processo de remediação e melhoria da qualidade do rejeito para o estabelecimento das espécies vegetais menos tolerantes às condições adversas do material.

Universidade Federal Fluminense

O Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha é pioneiro na identificação e no isolamento de bactérias hidrocarbonoclasticas, presentes nas águas e nos sedimentos das baías da Ilha Grande e da Guanabara, no estado do Rio de Janeiro. As baías são ambientes que estão sob constantes ameaças de acidentes com derrame de petróleo devido à intensa movimentação de embarcações em seu interior (CRAPEZ *et al.*, 2000 *apud* CRAPEZ *et al.*, 2002).

Crapez *et al* (2000), também são responsáveis por pesquisas sobre as respostas da microbiota das praias da Boa Viagem, do Forte do Rio Branco e da área da Estação Hidroviária de Niterói (RJ), aos efeitos agudos e crônicos da exposição a hidrocarbonetos aromáticos do petróleo. Os resultados revelaram que aumentando a frequência de entrada de benzeno, tolueno e xileno no sistema, as bactérias tornam-se capazes de degradar quantidades crescentes desses poluentes.

Universidade Estadual do Norte Fluminense

Rosa (2001), simulou, em laboratório, o derrame de petróleo em sedimentos costeiros com o objetivo de testar a eficiência da técnica de biorremediação, com a aplicação de nutrientes como fosfato de amônio e fertilizante do tipo NPK. Os resultados das análises geoquímicas realizadas nas amostras de óleo biodegradado, ao final de 30 dias de tratamento, revelaram a remoção completa dos *n*-alcanos e a degradação parcial dos isoprenóides, especialmente naquelas amostras coletadas a 5 cm da superfície, quando comparadas àquelas coletadas em superfície.

Souza (2003), desenvolveu métodos de biorremediação aplicados em

derrames de petróleo em água do mar através de testes laboratoriais em Macaé. Foi usado um óleo leve e testados nutrientes tais como: melação, fosfato de amônia, fertilizante NPK e ainda microrganismos bioaumentados. Com o objetivo de aumentar o contato entre as gotas de óleo e os microrganismos foram testados um surfactante e um biosurfactante. A eficiência da biorremediação foi medida em função dos resultados obtidos dos monitoramentos: geoquímico, microbiológico e ecotoxicológico. Os resultados mostraram que a biorremediação com a utilização de NPK, na proporção de 10% p/v do volume de óleo derramado, contribuiu para retirada de aproximadamente 30% dos alcanos; a evaporação natural retirou, aproximadamente, 60% dos *n*-alcanos menores que *n*-C₁₆, nos quatro primeiros dias da simulação, chegando a 80% após um mês. O uso concomitante do fertilizante NPK com surfactante, microrganismos bioaumentados, e com biosurfactante não acrescentou melhorias significativas à biorremediação e a utilização de melação não foi eficiente na aceleração do processo de biodegradação dos componentes do óleo.

Coelho (2005), com o objetivo de avaliar eficiência do uso de suportes para fixação do fertilizante agrícola NPK, funcionando, desta forma, como um nutriente do tipo *slow release*, a fim de obter melhor dissolução na água do mar durante o processo de biorremediação. Assim seria otimizado o tempo de tratamento e a quantidade de fertilizante utilizada na aceleração da biodegradação dos principais componentes do petróleo. A autora concluiu que a técnica de biorremediação utilizando o fertilizante NPK imobilizado, favorável à liberação contínua de nutriente durante todo o experimento, foi eficaz na biodegradação completa de *n*-alcanos e isoprenóides e na biodegradação parcial de compostos policíclicos aromáticos como os metil fenantrenos e metil dibenzotiofenos.

Nascimento (2006), avaliou a aplicabilidade da técnica de biorremediação, com a utilização de nutriente na forma de fertilizante solúvel NPK, sobre derrames de petróleo simulados em amostras de substrato de manguezal, coletadas de uma região ainda não contaminada na foz do Rio das Ostras. A biorremediação foi capaz de eliminar, aproximadamente, 94% da massa de óleo derramada, ao final de 56 dias de experimento.

Universidade Federal do Paraná e a refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR)/Petrobras

Pesquisadores da Universidade Federal do Paraná desenvolveram microrganismos especializados para biorremediação de solos contaminados, com utilização tanto em áreas industriais como em áreas urbanas. O produto é constituído por microrganismos acondicionados em meio argiloso, sob baixos teores de umidade, o que facilita seu manuseio e aplicação. Eles podem ser usados também em *landfarmings*, contendo resíduos de refinaria, no tratamento de resíduos oleosos de atividades petrolíferas e petroquímicas, ou em solos contaminados por derivados de petróleo em geral, como os de postos de gasolina. Esses microrganismos foram usados na recuperação de solos contaminados pelo derrame de petróleo resultante do rompimento de um oleoduto da REPAR, ocorrido em 16 de julho de 2000 no rio Barigüi, afluente do rio Iguaçu.

Para avaliação da biodegradabilidade do óleo derramado no solo foram executados experimentos de laboratório com a finalidade de se obter resultados sobre a toxicidade e sobre a eficiência dos microrganismos degradadores presentes no sistema de *landfarming* da REPAR. Em função dos resultados positivos, foi realizada a inoculação, com os microrganismos da REPAR, de uma área piloto de 700 m² (subárea 1) classificada, por Carvalho *et al.* (2001) como nível médio de contaminação. A eficiência foi avaliada pelo decréscimo da concentração dos hidrocarbonetos totais do petróleo, medido por gravimetria, fornecendo uma taxa de biodegradação de 84,7%, ao final de 1 mês e através da respirometria.

Esses resultados confirmaram a elevada eficiência dos microrganismos produzidos pela REPAR em degradar o petróleo presente na subárea 1, sendo seu uso expandido para as outras 11 subáreas afetadas, com o objetivo de acelerar o processo de biodegradação e a devolução dessas áreas ao meio ambiente, diminuindo assim os impactos decorrentes da permanência de contaminantes nas regiões de floresta e banhado, atingidas pelo derrame (CARVALHO *et al.*, 2001).

Universidade Estadual Paulista

Na Universidade Estadual Paulista (Campus de Rio Claro), através do

Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente foi desenvolvida um estudo com objetivo de se avaliar o potencial de biorremediação em solos e em águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. A partir de amostras de solo e água subterrânea coletadas em diferentes postos de combustíveis, avaliou-se a biorremediação natural da água subterrânea em local onde ocorreu vazamento de óleo diesel, mediante o monitoramento de indicadores geoquímicos durante 2 anos. Diferentes técnicas de biorremediação (bioestimulação com a adição de nutrientes e de um surfactante e bioaumento (injeção de microrganismos) foram comparadas quando aplicadas de forma isolada e em conjunto a solos contaminados com óleo diesel e comparou-se a capacidade de diferentes microrganismos em biodegradar óleo diesel comercial e intemperizado. Avaliou-se a eficiência da utilização da vinhaça e a capacidade de diferentes culturas de bactérias (MARIANO, 2006).

Os experimentos respirométricos demonstraram a importância do balanceamento nutricional e que nenhum ganho em termos de aumento de eficiência de biodegradação foi obtido com a técnica do bioaumento. O uso da vinhaça em processos de biorremediação mostrou-se ineficiente nas condições estudadas. Os resultados com os experimentos de biodegradabilidade demonstram a importância de se considerar o efeito de intemperização dos poluentes na determinação acurada de taxas de biodegradação. Finalmente, não foi possível, nas condições estudadas, constatar a produção de biosurfactantes utilizando-se óleo diesel intemperizado como matéria prima (MARIANO, 2006).

Universidade Estadual de Campinas

Com a utilização de um consórcio microbiano formado por bactérias de ocorrência natural, especialmente selecionadas, Dias (2007), juntamente com o Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos, teve como objetivo acelerar os processos de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, removendo os compostos tóxicos e de difícil degradação. Tendo bons resultados na remoção dos compostos do petróleo principalmente nos teores de HPAS (91%).

Universidade Federal da Bahia/REDE RECUPETRO

Uma das principais iniciativas governamentais no Brasil é a RECUPETRO (Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas), com a coordenação do Núcleo de Estudos Ambientais da Universidade Federal da Bahia (UFBA). A RECUPETRO reúne 04 Projetos Cooperativos de Pesquisa do Setor de Petróleo e Gás Natural nas Regiões Norte e Nordeste, financiados pelo CT-Petro, CNPq e pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Os trabalhos desenvolvidos pela Rede RECUPETRO são voltados para o entendimento dos aspectos, diagnósticos e prognósticos de ambientes impactados por atividades petrolíferas e aplicação dos processos de remediação.

A Rede formada nas regiões Norte e Nordeste é oportuna, porque essas são regiões grandes produtoras de petróleo e onde ocorrem desastres ecológicos com certa frequência. Na Bahia, há vários derramamentos de óleo nas regiões de produção de petróleo, como em São Francisco do Conde, onde cada um dos grupos desenvolve trabalhos específicos, como por exemplo, pesquisas com microorganismos para a limpeza de óleo derramado na natureza.

Um dos estudos realizados no âmbito RECUPETRO, foi o realizado por Santana (2008), coordenado pelo Núcleo de Estudos Ambientais (UFBA), onde foi testado, a nível “piloto”, o processo de bioestímulo em sedimento de manguezal do Estuário do rio São Paulo, que deságua na BTS. Os resultados não foram positivos quanto à eficiência dos fertilizantes testados como estimuladores da degradação, mas proporcionou uma maior preocupação e atenção na parte metodológica para trabalhos futuros.

Outro estudo está sendo realizado pela Universidade Federal do Ceará (UFC), através do Padetec (Parque de Desenvolvimento Tecnológico), que coordena os estudos sobre polímeros naturais, de quitina e quitosana, para a remoção de óleo do mar, através da produção de fibras da carapaça de crustáceo para a absorção do petróleo despejado no meio ambiente.

O Padetec em suas pesquisas avançou no conhecimento sobre as propriedades físico-químicas na matriz da quitosana (fibras), e nos requisitos necessários para imobilizar microorganismos nessa matriz. Os resultados geraram

avanços para a área de imobilização de bactérias, quando ficou demonstrada que é possível imobilizar células em quitosana pura.

Outra pesquisa importante está sendo desenvolvida na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e tem como objetivo isolar microorganismos para digerir o óleo absorvido por fibras, onde estes ficam imobilizados nas fibras, não se espalhando no meio ambiente.

Considerações Finais

Apesar dos estudos que vem sendo realizado mundialmente e nacionalmente apresentarem bons resultados na redução dos teores de hidrocarbonetos, as pesquisas direcionadas aos processos de biorremediação não têm apresentado resultados satisfatórios na degradação do óleo total. Existem frações que não são degradadas em determinadas pesquisas, como por exemplo, os biomarcadores (hidrocarbonetos cíclicos saturados), ou hidrocarbonetos aromáticos, e de uma forma constante a não degradação da fração das resinas e asfaltenos. Com isso vários autores têm proposto a utilização de culturas mistas para fins de biorremediação (RAMBELOARISOA *et al.*, 1984; CHHATRE *et al.*, 1996; TANODEBRAH *et al.*, 1999; VENOSA *et al.*, 1999). Acredita-se que com a utilização de um consórcio microbiano, especialmente selecionado, haverá uma aceleração nos processos de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, removendo os compostos tóxicos e de difícil degradação. Atualmente no Brasil a utilização de consórcios microbianos vem se tornando a técnica mais promissora na remoção total dos componentes do petróleo em áreas impactadas por atividades petrolíferas.

CAPÍTULO VI
Materiais e Métodos

VI. 1. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia aplicada para o desenvolvimento deste trabalho foi baseada na técnica de biorremediação “in situ” de substratos de manguezais afetados por atividades petrolíferas, através do processo de bioestimulação com adição de nutrientes (fertilizantes NPK e OSMOCOTE). A simulação foi desenvolvida no Laboratório de Simulação de Processos de Biorremediação em São Francisco do Conde, BA, e a pesquisa foi a nível de bancada, tendo como suporte para as partes analíticas: o LEPETRO (Laboratório de Estudos do Petróleo) vinculado ao Deptº de Geoquímica do Instituto de Geociências/Universidade Federal da Bahia (UFBA); o Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo-LENEP da Universidade Federal do Norte Fluminense (UENF) e o Laboratório de Geoquímica do CENPES (Petrobras).

VI. 1.1 ÁREA DE AMOSTRAGEM

O local de coleta das amostras de substrato do manguezal foi numa área contaminada da floresta de manguezal do estuário do rio São Paulo (Figura 25). A área de estudo foi selecionada com base em testes pilotos realizados e de forma que se obtivesse a melhor representatividade possível da área contaminada, tendo como suporte para determinação: equipamentos de GPS (Sistema de Posicionamento Global); mapas topográficos para localização da área na escala de 1:25.000; e tábuas de marés. Após escolhida a área de estudo, foram realizadas reuniões a fim de se planejar todo o desenvolvimento da pesquisa, desde a coleta, montagem e monitoramento da simulação. Em seguida os materiais a serem utilizados foram separados, os equipamentos foram calibrados e os recipientes foram descontaminados e etiquetados.

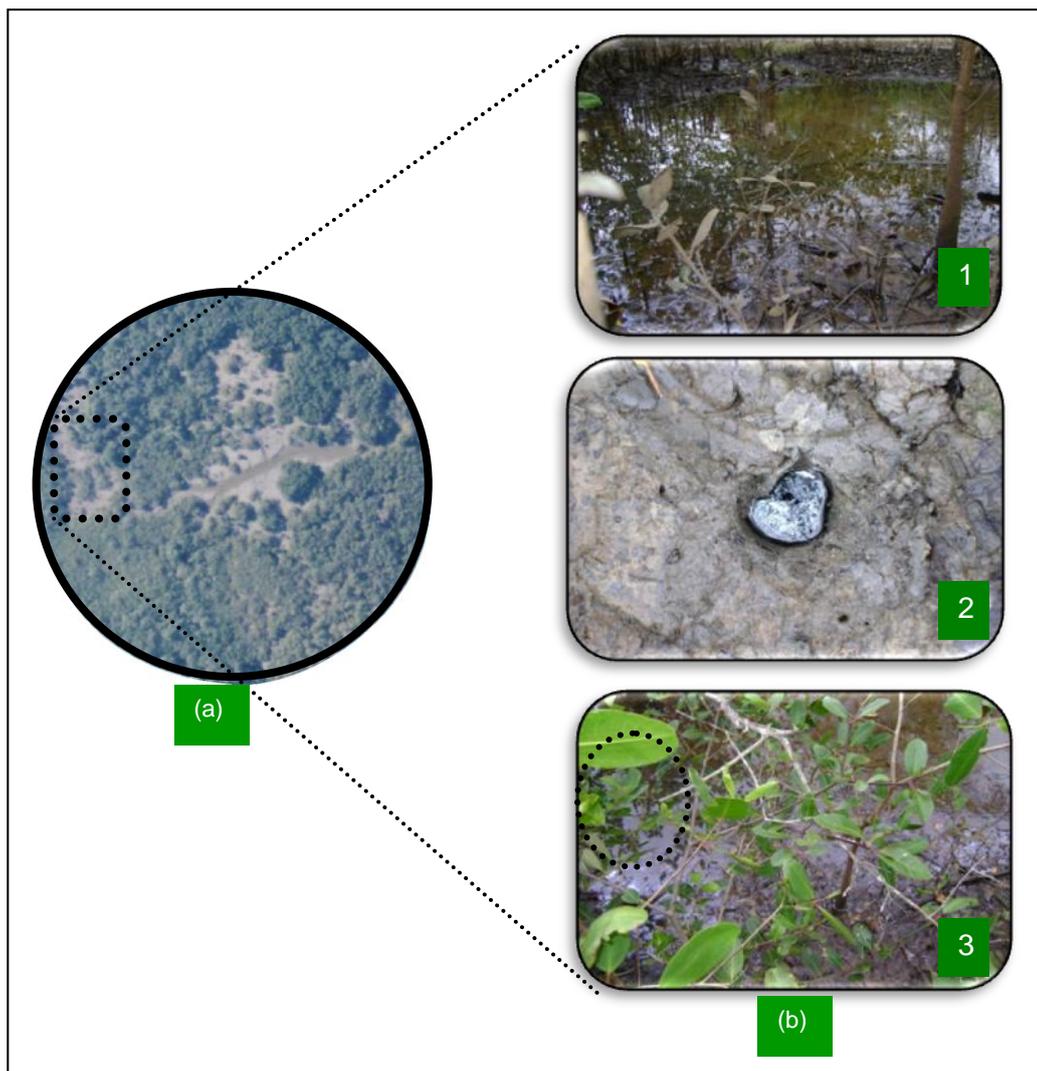


Figura 25. (a) Área contaminada da floresta de manguezal do estuário do rio São Paulo, São Francisco do Conde/BA, (b) locais de amostragem: (1) Zona alagadiça; (2) exudação de óleo; (3) manchas de óleo.

VI. 1.2 AMOSTRAGEM

A coleta do sedimento foi realizada no dia 04 de setembro de 2008 em locais de deposição lamosa, na parte do manguezal mais próxima às zonas marginais, em locais geralmente inundáveis. Foram coletados 76 testemunhos de sedimento com auxílio de um testemunhador, que consta de um tubo de aço inoxidável de 10cm de diâmetro e capacidade para coletar testemunhos de até 30cm. Em seguida 72 testemunhos de sedimento foram homogêneos em um recipiente metálico com a finalidade de evitar erros analíticos. Após ser homogêneo, o sedimento foi dividido em três porções: 1º porção foi mantida a composição natural do sedimento (referência); 2º porção foi adicionada o fertilizante NPK (0,5g para cada kg de

sedimento); e a 3ª porção foi adicionado o fertilizante OSMOCOTE (0,5g para cada kg de sedimento). Os outros quatro testemunhos de sedimento foram colocados em recipientes metálicos tipo “quentinhas”, e acondicionados a temperaturas baixas em caixa térmica, para realização das análises isotópicas (^{13}C) e de biomarcadores (Figura 26).

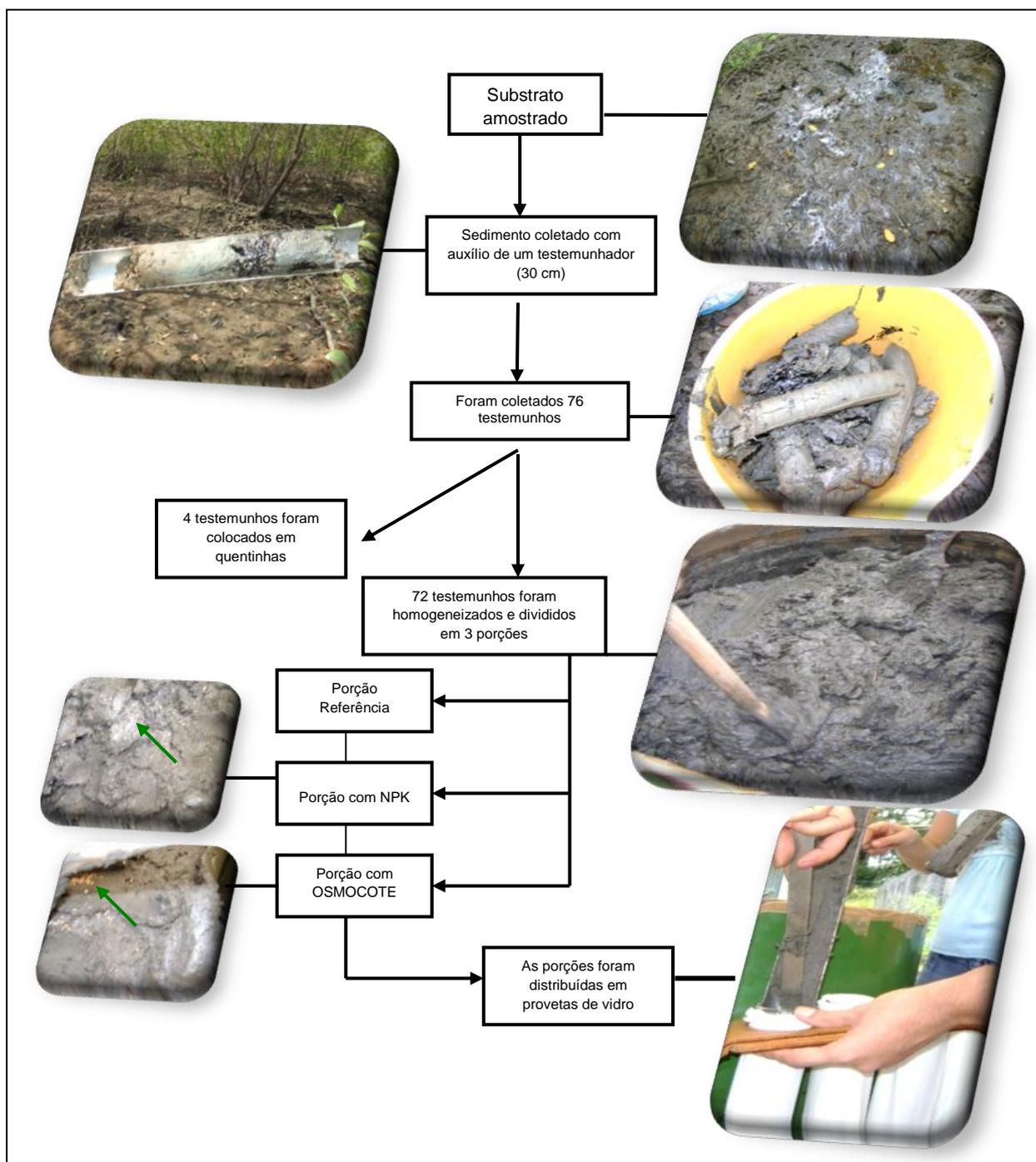


Figura 26. Esquema mostrando a coleta e tratamento dos testemunhos utilizados na simulação de biorremediação no manguezal do estuário do rio São Paulo.

O NPK é um fertilizante solúvel em água, composto por fosfato monoamônico ($(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, sulfato de amônia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cloreto de potássio (KCl) e farelo de algodão. O OSMOCOTE também é um fertilizante solúvel, possui a mesma composição se diferenciando por ser do tipo *slow release* (liberação lenta), onde os nutrientes inorgânicos ficam revestidos com materiais hidrofóbicos como parafina ou vegetal.

VI. 1.3 METODOLOGIA DE MONTAGEM DO EXPERIMENTO

Após a coleta do sedimento procedeu-se à montagem do experimento em três etapas: 1º etapa-preparação das provetas de vidro; 2º etapa-preparação dos aquários; e 3º etapa- montagem das bancadas para simulação.

Primeira etapa (Preparação das provetas) – Nessa etapa as provetas de vidro foram revestidas com sacos de algodão e estes foram presos com braçadeiras de nylon na parte inferior (Figura 27a) e elástico na parte superior da proveta (Figura 27b). Foram necessários 72 provetas (Figura 27c) para a montagem do experimento, que posteriormente foram colocadas em suportes de madeira como pode ser visto na Figura 27d.

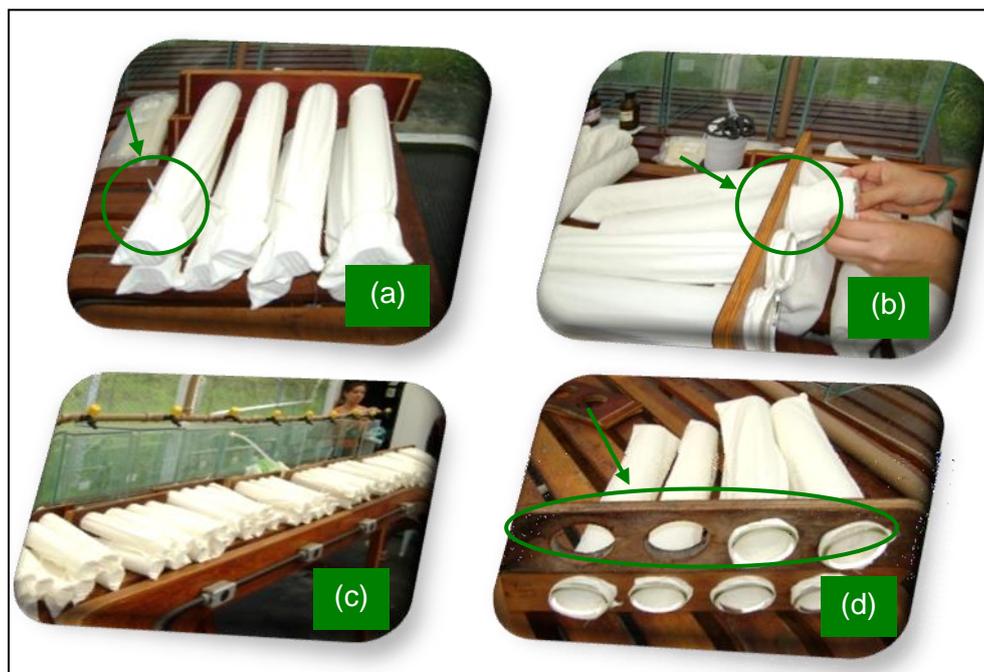


Figura 27. Primeira etapa da montagem do experimento.

Segunda etapa (Preparação das unidades de simulação) – Foram montadas nove Unidades de Simulação:

- Unidade 1, 2 e 3 constituíram-se das amostras referências (Controle) (Figura 28a);
- Unidade 4, 5 e 6 constituíram-se das amostras que continham NPK (Biorremediação 1) (Figura 28b);
- Unidade 7, 8 e 9 constituíram-se das amostras que continham OSMOCOTE (Biorremediação 2) (Figura 28c).

Nas unidades referências foi avaliado a ação do intemperismo natural do petróleo, e nas unidades de biorremediação 1 e 2, foi verificado a aceleração da biodegradação do petróleo como resultado da aplicação de nutriente NPK e OSMOCOTE, respectivamente.



Figura 28. Segunda etapa da montagem do experimento. Unidades de simulação e suas identificações (a) Unidades referências, (b) unidades de biorremediação 1 e (c) unidades de biorremediação 2.

As unidades de simulação (Figura 29) consistiam em cubas de vidro contendo 50 cm de altura, 30cm de largura e 40cm de comprimento, cada uma contendo: 08

(oito) provetas de vidros; suporte de madeira para as provetas; uma torneira na parte inferior para drenar a água e bomba para aeração.

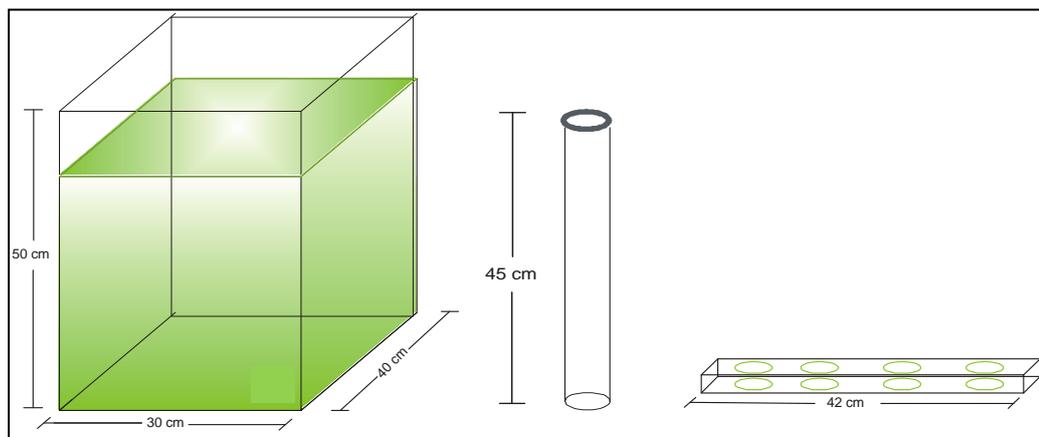


Figura 29. Figura esquemática mostrando as dimensões do aquário, da proveta e do suporte de madeira para as provetas.

Terceira etapa (Montagem das bancadas) – As unidades de simulação (cubas de vidro) foram colocadas na bancada de simulação, e nelas foram instaladas as bombas de oxigenação (Figura 30a), sendo duas para cada aquário. Após a inserção do sedimento nas devidas unidades (Figura 30b), em seguida foi ligado o sistema de torneiras (Figura 30c).



Figura 30. Terceira etapa da montagem do experimento. Montagem das bancadas: (a) bombas instaladas (b) provetas sendo colocadas no aquário (c) sistema de torneiras ligadas.

VI. 1.4 METODOLOGIAS DE SIMULAÇÃO

A água para simular a maré foi bombeada diretamente do estuário do rio São Paulo e armazenada em um tanque de 1000L (Figura 31a) e foi renovada todos os dias de simulação.

Um dia de simulação consistiu nas seguintes etapas: ligar o sistema de torneira com uma pequena vazão a fim de simular a subida da maré (Figura 31b) proveniente do tanque de armazenamento de água; após atingir o limite do aquário (22 litros) todas as bombas de oxigenação foram ligadas (Figura 31c) e contadas duas horas de simulação; depois os parâmetros físico-químicos (salinidade, OD, pH, E_H e temperatura) eram mensurados (Figura 31d); por fim os aquários eram esvaziados, também com uma pequena vazão para simular a descida da maré (Figura 31e). Os aquários não foram esvaziados totalmente com o intuito de deixar o sedimento sempre em contato com a água (Figura 31f).



Figura 31. Etapas de um dia de Simulação. (a) Tanque de armazenamento de água, (b) sistema de torneira com uma pequena vazão, (c) aquário mostrando bolhas de ar, (d) parâmetros sendo mensurados, (e) aquários esvaziados com uma pequena vazão e (f) limite de água deixado nas unidades de simulação.

VI. 1.5 METODOLOGIA DE RETIRADA DE AMOSTRAS

A retirada das amostras de sedimento das unidades de simulação foi realizada com intervalo de 1, 2, 8, 15, 30, 45, 60, 90 dias e foram determinados, para esta pesquisa, os seguintes parâmetros: Hidrocarbonetos Saturados, amônia, nitrato, fósforo, carbono orgânico e granulometria (Tabela 4).

Tabela 4. Tabela com tempo de experimento, data de coleta e análises realizadas.

Tempo de experimento (dias)	Datas de coleta	Análises (sedimento)
1	05/09/2008	Hidrocarbonetos Saturados, amônia, nitrato, fósforo, carbono orgânico e granulometria.
2	06/09/2008	Hidrocarbonetos Saturados, amônia, nitrato, fósforo, carbono orgânico.
8	11/09/2008	Hidrocarbonetos Saturados, amônia, nitrato, fósforo, carbono orgânico.
15	18/09/2008	Hidrocarbonetos Saturados, amônia, nitrato, fósforo, carbono orgânico.
30	01/10/2008	Hidrocarbonetos Saturados, amônia, nitrato, fósforo, carbono orgânico.
45	16/10/2008	Hidrocarbonetos Saturados, amônia, nitrato, fósforo, carbono orgânico e granulometria.
60	06/11/2008	Hidrocarbonetos Saturados, amônia, nitrato, fósforo, carbono orgânico.
90	04/12/2008	Hidrocarbonetos Saturados, amônia, nitrato, fósforo, carbono orgânico e granulometria.

As amostras coletadas durante o período de experimento foram retiradas após 2 horas de simulação (Figura 32b e c). Posteriormente cada amostra foi homogeneizada individualmente (Figura 32d) em um recipiente de inox, sendo que para cada triplicata de aquário existia um recipiente diferente com a finalidade de evitar mistura entre as amostras dos aquários referência, NPK e OSMOCOTE (Figura 32e). Entre uma amostra e outra da mesma triplicata os recipientes foram lavados com água do próprio manguezal (Figura 31f).



Figura 32. Procedimento de retirada das amostras das unidades de simulação. (a) Provetas com amostras, (b) e (c) proveta retirada do aquário, (d) amostras sendo homogeneizadas, (e) recipientes individuais para cada triplicata de aquário e (f) lavagem da bandeja entre a homogeneização das amostras.

As amostras para análise de Hidrocarbonetos Saturados, amônia, nitrato, fósforo, carbono orgânico e granulometria foram coletadas em recipientes de vidro

(Figura 33). Todas as amostras foram acondicionadas a temperatura baixa em caixas térmicas.



Figura 33. Coleta de amostras de sedimento para análise Hidrocarbonetos Saturados, amônia, nitrato, fósforo, carbono orgânico e granulometria.

VI. 1.6 MONITORAMENTO DAS UNIDADES DE SIMULAÇÃO

Durante os três meses de simulação as unidades foram monitoradas diariamente. Os parâmetros físico-químicos não conservativos (pH, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido) foram mensurados quando a água chegava ao aquário e após 2 horas de simulação com auxílio dos seguintes equipamentos: Refratômetro Hand Refractometer ATAGO modelo S/Mill-E; Condutivímetro Handylab 1, com precisão de $0,05\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$; pH-metro Handylab LF1, com precisão de 0,01 unidade de pH e/ou mVe; Oxímetro WTW OXI 3151, marca SCHOTT-GERATE, precisão de $0,01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 34).



Figura 34. Equipamentos utilizados para mensurar os parâmetros físico-químicos. (a)refratômetro, (b) pH-metro, (c) condutivímetro e (d) oxímetro.

VI. 1.7 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Para avaliar o efeito da degradação natural, biorremediação com utilização dos fertilizantes NPK e OSMOCOTE na fração dos Hidrocarbonetos Saturados e avaliação da origem da contaminação, foi realizado um estudo geoquímico das amostras coletadas no Laboratório de Simulação e amostras coletadas no manguezal do estuário do Rio São Paulo. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Estudos de Petróleo (LEPETRO) do Núcleo de Estudos Ambientais (NEA/IGEO/UFBA) para processamento das amostras do sedimento, análises granulométricas, determinação dos nutrientes e extração dos Hidrocarbonetos Saturados. A determinação da razão isotópica ^{13}C e dos biomarcadores para avaliar a origem da contaminação foi realizada no Laboratório de Geoquímica do CENPES (Petrobras) e a determinação dos Hidrocarbonetos Saturados para avaliar a eficácia do processo de biorremediação foi realizada no Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo-LENEP da Universidade Federal do Norte Fluminense (UENF).

Nos itens seguintes serão descritos os procedimentos realizados nas amostras coletadas no Laboratório de Simulação e no manguezal do estuário do rio São Paulo.

VI. 1.7.1. Processamento das amostras de Sedimentos

Após a coleta, as amostras de sedimentos foram liofilizadas em um Liofilizador L101 da marca LIOTOP (Figura 35) com a finalidade de retirar toda umidade. Em seguida a amostra foi macerada, desagregada e peneirada em malha de 2mm.



Figura 35. Aparelho Liofilizador L101 utilizado para retirar a umidade das amostras.

VI. 1.7.2. Análises granulométricas

A granulometria das amostras de sedimento foi avaliada com a finalidade de quantificar os teores de argila, silte e areia. Para caracterização do tamanho granulométrico das amostras, utilizou-se um analisador de partículas com difração a

Laser Modelo Cilas 1064, sendo a classificação feita segundo Folk & Ward (1957). O método consistiu em pré-tratamento da amostra com peróxido de hidrogênio para degradar a matéria orgânica. Após essa etapa, adicionou-se hexametáfosfato de sódio e agitou-se por 24hs, para evitar floculação. Como resultado obteve-se a porcentagem das frações granulométricas. Estes dados foram convertidos em informações gráficas e numéricas utilizando um programa livre de análises granulométricas GRADSTAT, desenvolvido por Simon Blott (London University).

VI. 1.7.3 Determinação de nutrientes

Foram realizadas análises de carbono orgânico total, nitrato, amônia e fósforo assimilável. As determinações de nitrogênio total, nitrato e amônia foram realizadas segundo o Método de Kjeldahl por via úmida (EMBRAPA, 1999).

Nitrato e Amônia

O procedimento utilizado para determinação de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) trocáveis envolve destilação por arraste de vapores contendo MgO e liga de Devarda como forma de nitrogênio mineral. O NH_4^+ é convertido em amônia (NH_3) que é arrastada por vapores condensada e depositada em solução avermelhada de ácido bórico. O uso da liga de Devarda tem por finalidade reduzir o nitrato a amônio. A quantificação do N nas formas de amônio e nitrato se dá indiretamente por titulação (H_2SO_4 $0,005\text{mol L}^{-1}$), via restituição do ácido bórico utilizado na formação de borato de amônio, composto que confere a cor verde-azulada.

Para extração do nitrato e amônia das amostras pesou-se, aproximadamente, 10g de amostra do sedimento em erlenmeyer de 125mL, adicionou-se 100mL de solução de cloreto de potássio 1mol L^{-1} e agitou-se por 1 h em agitador mecânico. Após, deixou-se em repouso por 1h.

Para determinação de amônio pipetou-se 30mL do sobrenadante límpido, adicionou-se em tubos de digestão com 0,2g de óxido de magnésio e procedeu-se à

destilação em destilador de arraste de vapores. Coletou-se o condensado em um erlenmeyer de 125mL contendo 5mL de solução indicadora de ácido bórico 2% (m/v). Em seguida titulou-se com solução de H_2SO_4 $0,005\text{mol L}^{-1}$ até o aparecimento de uma coloração rosa ou lilás.

Para a determinação de nitrato utilizou-se a mesma alíquota de 30mL em tubos de digestão com 0,2g de liga de Devarda. Procedeu-se a destilação por arraste de vapores em um novo erlenmeyer com 5mL de ácido bórico 2% (m/v). Em seguida titulou-se com solução de H_2SO_4 $0,005\text{mol L}^{-1}$ até o aparecimento de uma coloração rosa ou lilás.

Carbono Orgânico Total (COT)

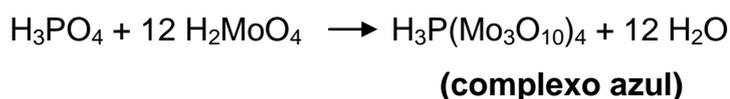
O Carbono Orgânico contido na amostra de sedimento foi determinado pelo método de Walkey-Black (1947), adaptado e modificado por Jackson (1958). Este método diferencia material húmus proveniente de diferentes fontes de carbono orgânico na forma de grafite e carvão. O Dicromato de Potássio oxida a matéria orgânica presente no solo ou sedimento (Material Químico Orgânico e Material Biológico) e gera íons cromo III de cor verde, sendo o excesso de dicromato titulado com sulfato ferroso amoniacal. A oxidação da maioria dos compostos orgânicos é de 95 a 100 % do valor teórico.

Para determinação, num erlenmeyer de vidro de 500mL, adicionou-se, aproximadamente 0,5g de amostra, 10mL de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1,0 N e 20mL da mistura $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{Ag}_2\text{SO}_4$. Agitou-se por 1 minuto para garantir a completa mistura entre o reagente e sedimento. Após 30 minutos, adicionou-se 200mL de água destilada, 10mL de H_3PO_4 85%, aproximadamente 0,2g de NaF e 0,5mL de indicador difenilamina. A titulação foi feita com sulfato ferroso amoniacal $0,5\text{mol L}^{-1}$ até o aparecimento de uma coloração verde brilhante.

Fósforo assimilável

O método consiste na determinação de ortofosfatos (HPO_4^- , H_2PO_4^- , H_3PO_4 , PO_4^{-3}), utilizando a Espectrofotometria de Absorção Molecular na região do visível. O molibdato de amônio e o antimônio tartarato de potássio reagem em meio ácido com o ortofosfato para formar um ácido heteropoli - fosfomolibdico que é reduzido pelo ácido ascórbico formando o complexo azul de molibdênio intensamente colorido. A absorbância do complexo é medida espectrofotometricamente a 880nm e é proporcional à concentração de fosfato presente na amostra.

A equação química da reação está descrita abaixo:



Os quatro átomos de O são substituídos por quatro grupos Mo_3O_{10} . Portanto só os ortofosfatos podem formar $\text{H}_3\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4$. Para as outras formas de P serem “reativas”, devem ser previamente hidrolisadas em ortofosfatos antes da reação.

Para a determinação pesou-se em um tubo de ensaio graduado aproximadamente 0,4g de amostra de sedimento, adicionou-se 10mL de HCL 1mol L^{-1} e agitou-se por 16h em mesa agitadora. Centrifugou-se a amostra por 15min em 3000 RPM. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 1mL, adicionou-se 0,8mL de solução ácida de molibdato + tartarato, 10,00mL de água deionizada e 0,2mL de ácido ascórbico 25mg L^{-1} e misturou-se. Após 10min de reação fez-se determinação do complexo azul de molibdênio utilizando-se um espectrofotômetro de absorção molecular de marca VARIAN CARY 50 PROBE com comprimento de onda de 880nm, usando água como branco. A precisão do método de fósforo assimilável foi calculada através da reprodutibilidade, sendo as amostras feitas em triplicatas.

VI. 1.7.4 Determinação de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP)

Os Hidrocarbonetos Alifáticos foram determinados segundo método USEPA 8015B. Para a extração, as amostras liofilizadas e desagregadas em gral de ágata. Para realizar a extração pesou-se 10g de sedimento e em um sistema *Soxhlet* (Figura 36) procedeu-se a extração com 150mL de uma mistura de solventes n-hexano e acetona (1:1v/v) por 4hs. Decorrido esse tempo colocou-se o volume do extrato para evaporar em capela e posteriormente pesou-se 0,004g, aproximadamente, desse extrato final (sem solvente) que posteriormente foi misturado com alumina. Transferiu-se a mistura para coluna *clean up* onde as frações dos alifáticos (F1) foram eluídas com hexano (30mL). Depois de evaporadas pesaram-se os béqueres em balança analítica e anotaram-se as massas.



Figura 36. Sistema *Soxhlet* utilizado para extração dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) no sedimento.

Para quantificar os *n*-alcanos lineares e ramificados, inicialmente preparou-se uma solução de padrão cromatográfico α -androstano de concentração 0,02mg/ mL. Para o preparo do padrão pesou-se uma massa de, aproximadamente, 0,0027g de α -androstano, que foi transferida para balão volumétrico de 5 mL com auxílio do solvente *n*-hexano.

Diluiu-se a fração de saturados em 1mL da solução de padrão interno e após a homogeneização retirou-se uma alíquota de 1 μ L para ser injetada manualmente no cromatógrafo em fase gasosa Hewlett Packard, modelo 6890 com detector de ionização em chama (FID) com ar sintético, H₂ e N₂ como gases de chama, coluna capilar de sílica fundida (HP-5, 30m x 0,32mm x 0,25 μ m), fluxo do gás de arraste (H₂): 2,2mL/ min, temperatura do injetor 280°C, temperatura do detector 340°C, com temperatura inicial de 40°C e temperatura final de 320°C com taxa de 2,5°C/ min, tempo de corrida de 130 minutos.

VI. 1.7.5 Determinação de isótopos ¹³C

A razão isotópica de carbono é expressa na notação $\delta^{13}\text{C}$ em partes por mil, usando como referência um padrão secundário ajustado ao padrão internacional PDB (carbonatos dos *belemites* da Formação *Pee Dee* do Estado da Carolina do Sul, Estados Unidos). Ela é definida pela relação $\delta^{13}\text{C} = [(^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ a} - ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ p}) / ^{13}\text{C}/^{12}\text{C} \text{ p}] \times 10^3$, onde a e p referem-se à amostra e ao padrão, respectivamente. Portanto os valores medidos representam o desvio em relação ao padrão internacional.

Para extração da fração total do óleo, foi pesado 10g de sedimento em um sistema *Soxhlet* e procedeu-se a extração com 150mL de uma mistura de solventes *n*-hexano e acetona (1:1v/v) por 4hs. Decorrido esse tempo o volume do extrato foi colocado para evaporar em capela.

Para determinação da composição isotópica do carbono foi pesado em uma cápsula de estanho uma alíquota de 0,7mg de óleo. A amostra foi transformada em CO₂ por combustão a 900°C *on line* em um analisador elementar contendo dois fornos. O primeiro forno realizou a combustão do óleo por oxidação liberando CO₂, água e compostos nitrogenados que foram encaminhados para o segundo forno,

onde por redução a 600°C, os compostos nitrogenados foram reduzidos a N₂. A mistura N₂, H₂O e CO₂ passou por um retentor de umidade contendo perclorato de magnésio que retém a água. O CO₂ e o N₂ foram separados em uma coluna cromatográfica do tipo empacotada em isoterma de 50°C, e o CO₂ foi injetado em um espectrômetro de massas FININGAN MAT 252 onde foram determinadas as concentrações de ¹³C e ¹²C (Figura 37).



Figura 37. Espectrômetro de massas modelo MAT 252 *Thermo Finnigan* para análise da composição isotópica do carbono em extratos orgânicos ou óleos. Laboratório de análises isotópicas, CENPES/Petrobras. Fonte: PEDRO, 2007.

VI. 1.7.6 Determinação dos biomarcadores

Para determinação dos Biomarcadores as amostras foram analisadas em CG/EM através do modo de monitoramento seletivo de íons (MSI). Para a análise por MSI, foram selecionadas os seguintes íons: m/z 217 para os α -esteranos, m/z 218 para os α - esteranos e m/z 191 para terpanos, m/z 177, 259 e 231, e m/z 66 para os padrões internos (n -alcanos perdeuterados). As condições cromatográficas utilizadas para as análises foram: temperatura 70°C a 170°C com taxa de

aquecimento $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$, de 170°C a 310°C com aquecimento de $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e isoterma de 310°C durante 10 minutos. Por fim realizou-se injeção automática de $1\mu\text{L}$ da amostra, com impacto de elétrons a 70 eV, utilizando hélio como gás de carreador, a uma pressão constante de 10 psi.

CAPÍTULO VII

Resultados e Discussões

VII. 1. RESULTADOS E DISCUSSÕES

VII. 1.1 AVALIAÇÃO DA ORIGEM DO CONTAMINANTE

A contaminação por petróleo pode atingir o meio ambiente por fontes naturais ou por fontes antropogênicas, e são estas últimas as de grande preocupação atualmente. É através de liberações de óleo cru e produtos refinados, derramamentos que ocorrem em acidentes e nas atividades de rotina que pode comprometer a atividade natural de um ecossistema (NRC, 2003; NEVES, 2006). Para identificar a origem de óleos em um derramamento por acidente, são utilizados varias técnicas como análises cromatográficas, isotópicas e biomarcadores.

VII. 1.1.1 Análises Cromatográficas

O perfil de um óleo constitui sua impressão digital, representa a sua composição química, e muitos parâmetros são sugeridos como suporte para interpretação do estado desse óleo, entre eles pode destacar a biodegradação, a maturação térmica e a origem da matéria orgânica (REBOUÇAS *et al.*, 2008). Para investigação da origem de exudações encontradas no manguezal do rio São Paulo foi analisado uma amostra de óleo do poço P128, pertencente ao Campo de Candeias, produzido pela UN-BA, Petrobras. Este poço fica localizado próximo ao manguezal. Também foram avaliadas quatro amostras de sedimento, sendo que a amostra 1, 2 e 3 foram coletadas em locais distintos do manguezal contaminado e a amostra 4 foi uma mistura das amostras 1, 2 e 3. As amostras apresentaram as seguintes características:

- Amostra de óleo do Poço P128: com 60,26% de compostos saturados, 13,68% compostos aromáticos e 26,06% de compostos “NSO” (Compostos polares: Resinas + Asfaltenos);

- Amostra 1: com 49,80% de compostos saturados, 17,38% compostos aromáticos e 32,81% de compostos “NSO” (Compostos polares: Resinas + Asfaltenos) (Figura 38a);
- Amostra 2: com 26,78% de compostos saturados, 12,52% compostos aromáticos e 60,70 % de compostos “NSO” (Compostos polares: Resinas + Asfaltenos) (Figura 38b);
- Amostra 3: com 42,12% de compostos saturados, 17,24% compostos aromáticos e 40,64 % de compostos “NSO” (Compostos polares: Resinas + Asfaltenos) (Figura 38c);
- Amostra 4: com 29,15% de compostos saturados, 12,75% compostos aromáticos e 58,10% de compostos “NSO” (Compostos polares: Resinas + Asfaltenos) (Figura 38d).

As amostras evidenciaram um alto grau de biodegradação do óleo com ausência ou baixa presença das *n*-parafinas e dos isoprenóides pristano e fitano, além de área sob a elevação da linha de base do cromatograma (hump), representando uma mistura complexa de compostos não resolvidos (UCM) (Figura 38). A amostra 1 pode parecer mais preservada em relação às outras, mas a presença das parafinas normais pode ser devido a uma possível segunda contaminação, tornando-se uma mistura de óleos.

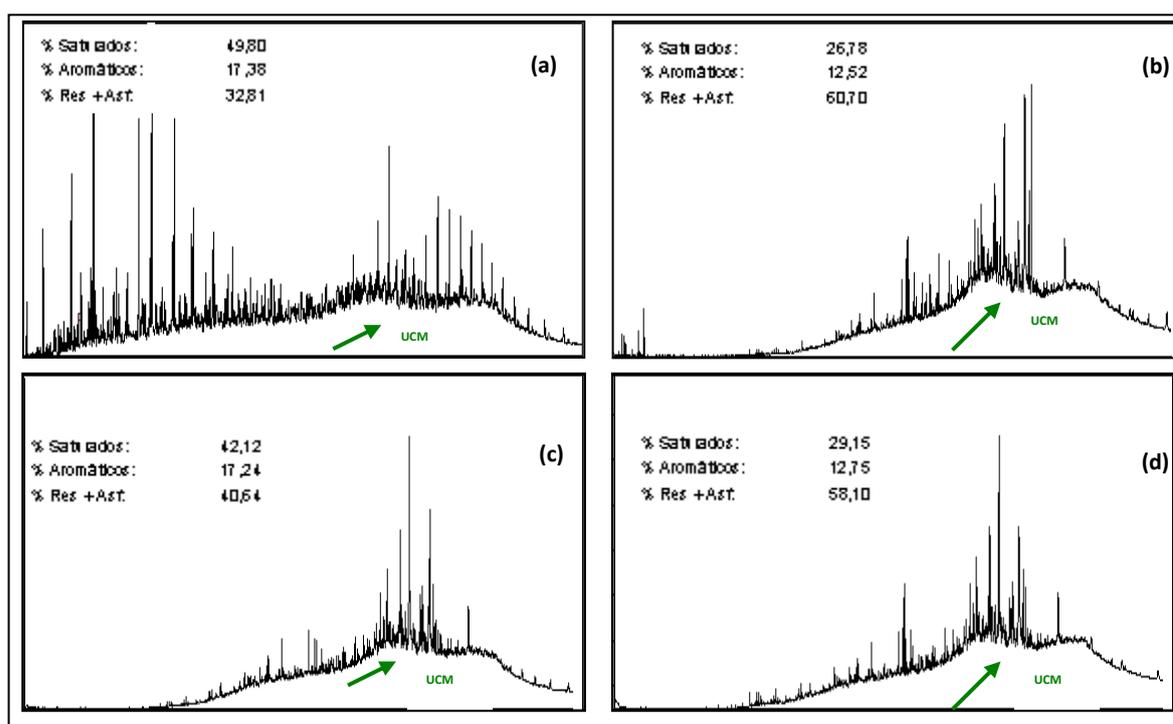


Figura 38. Cromatograma do óleo total, razões baseadas em alturas da amostra 1 (a), 2 (b), 3 (c) e 4 (d), % Saturados, Aromáticos e NSOs.

A ação dos microorganismos sobre os hidrocarbonetos segue a seqüência: alcanos normais, isoparafinas, cicloalcanos e hidrocarbonetos aromáticos com enriquecimento relativo dos NSO. Os óleos da Bacia do Recôncavo (Formação Candeias) são classificados como parafínicos onde os saturados variam entre 50% à 88% e 2,8% à 35% para os compostos NSO, sendo considerados óleos leves (GANGLIANONE & TRINDADE, 1988). Isso pode ser confirmado com os resultados da análise da amostra do óleo do Poço P128 que apresentou 60,26% de compostos saturados e 26,06% de compostos NSO.

Os resultados mostraram valores para os hidrocarbonetos saturados variando entre 26,78% à 49,80% confirmando que o óleo se encontra biodegradado com um enriquecimento de NSO que variou entre 32,81% à 60,70%. A média entre as amostras confirma o enriquecimento de NSO, óleo em alto grau de biodegradação (Figura 39).

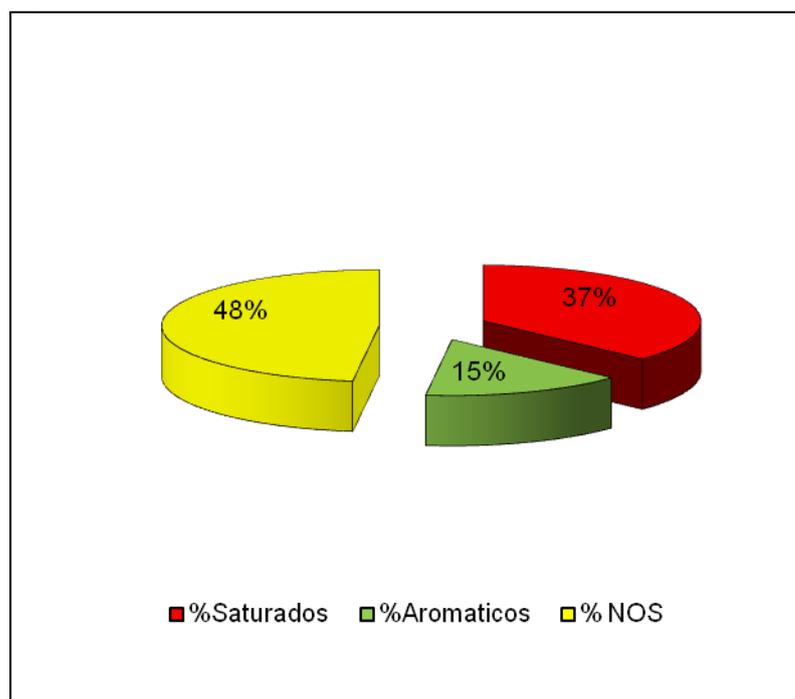


Figura 39. Diagrama esquemático representando as percentagens médias dos hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NOS das amostras 1, 2, 3 e 4 analisadas.

Como os microorganismos consomem compostos leves (*n*-alcanos) durante progressiva biodegradação, o óleo residual torna-se enriquecido em compostos NSO (por exemplo, asfaltenos) (ASIF *et al.*, 2009). No gráfico da Figura 40 se pode observar a proporção entre saturados, aromáticos e NSOs, mostrando que há um enriquecimento evidente de NSO nas amostras 2 e 4. As amostras 1 e 3 também

apresentam um progressivo enriquecimento de NSO apesar de ser menor, quando comparado a amostra do óleo do Poço P128 (Figura 40). Em comparação com amostra do óleo do Poço P128, a amostra que se encontra mais preservada é a Amostra 1.

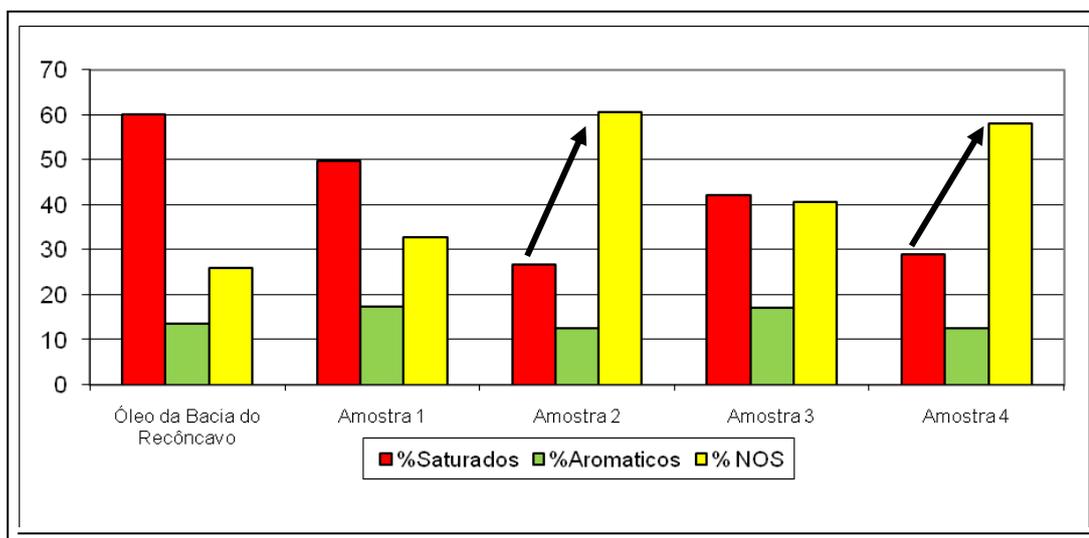


Figura 40. Gráfico representando as percentagens dos hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO. A seta dá destaque ao enriquecimento dos compostos NSO.

Através da análise dos cromatogramas não foi possível confirmar a origem do óleo derramado por já se encontrar em um estágio avançado de biodegradação. Mas outras análises foram feitas a fim de atingir um dos objetivos do trabalho, como a identificação de certos biomarcadores e análise isotópica de carbono, que segundo Araújo (2007) através destas também é possível caracterizar o ambiente deposicional da rocha geradora do petróleo que teria originado as amostras em estudo. Foram determinados os parâmetros para identificação da origem que melhor caracterizam o óleo encontrado no sedimento do manguezal do rio São Paulo.

VII. 1.1.2 Análises isotópicas

Resultados de análises isotópicas podem fornecer subsídios importantes para compreensão e interpretação de problemas referentes à origem, geração, migração e alteração do petróleo (SILVA & AZEVEDO, 2009). Óleos que apresentam valores de $\delta^{13}\text{C}$ menor que -28‰ são considerados de ambiente lacustre/doce e são do tipo

parafínico. Essas características são típicas de óleos da Bacia do Recôncavo (GANGLIANONE & TRINDADE, 1988). As análises dos isótopos estáveis de carbono revelaram para as quatro amostras, valores de $\delta^{13}\text{C}$ variando entre -30,79‰ à -30,52‰ (Tabela 5).

Tabela 5. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ para amostras de óleo do Poço P128 da Bacia do Recôncavo e de amostras de óleo exudado no manguezal do rio São Paulo.

	Valores de delta ^{13}C
Óleo do Poço P128	-31,31
Amostra 1	-30,79
Amostra 2	-30,63
Amostra 3	-30,52
Amostra 4	-30,53

Estes dados caracterizam os óleos como tendo uma origem a partir de rochas com “input” de matéria orgânica continental. Segundo um estudo de caracterização geoquímica dos óleos da Bacia do Recôncavo realizado por Ganglianone e Trindade (1988) os valores para $\delta^{13}\text{C}$ variam entre -28,1‰ à -32,1‰, sendo que os óleos acumulados na Formação Candeias, Pojuca e Itaparica são isotopicamente mais negativos. Os óleos analisados nas amostras apresentaram valores isotópicos semelhante aos encontrados na Formação Candeias, Pojuca e Itaparica mostrando alguma identidade com esses óleos. A amostra do óleo do Poço P128 (Formação Candeias) apresentou valor para $\delta^{13}\text{C}$ de -31,31‰, caracterizando-se como do tipo lacustre/doce.

VII. 1.1.3 Análises de Biomarcadores

Outra análise bastante utilizada para identificar e confirmar a origem de óleos é a identificação de biomarcadores. São “fósseis moleculares”, ou seja, compostos complexos originados de organismos que viveram em um determinado ambiente e seus restos foram depositados junto aos sedimentos que posteriormente vieram a formar uma rocha potencialmente geradora (EGLINTON & CALVIN, 1967).

A razão hopanos/esteranos reflete a proporção entre o aporte de algas e vegetais superiores (representadas pelos esteranos) e a contribuição de biomassa bacteriana (PETERS & MOLDOWAN, 1993). Os valores mais baixos (menores que 4) indicam deposição de matéria orgânica marinha com maior contribuição de organismos planctônicos e/ou algas, já valores mais elevados (maiores que 7) indicam deposição de matéria orgânica terrestre e/ou microbialmente retrabalhada (óleos lacustres) (PETERS & MOLDOWAN, 1993). Todas as amostra apresentaram valores para razão hopanos/esteranos maiores que 7, indicando ambientes com deposição de matéria orgânica terrestre e indicação de presença de óleos lacustres (Tabela 6).

Tabela 6. Razões de biomarcadores indicadores de origem para amostras de óleo do Poço P128 da Bacia do Recôncavo e de amostras de óleo exudado no manguezal do rio São Paulo

Amostra	Óleo P128	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
P/F	1,46	1,32	-	-	-
P/nC₁₇	0,37	3,54	-	-	-
F/nC₁₈	0,27	2,33	-	-	-
TS/(TS+TM)	0,559	0,5476	0,5978	0,5432	0,5602
HOP/STER	23,9093	25,9458	24,9278	28,4427	28,7398
H₃₅/H₃₄	0,5613	0,5695	0,345	0,4883	0,4326
H₂₉/H₃₀	0,3798	0,3978	0,5067	0,4006	0,4263
GAM/H₃₀	0,3419	0,3634	0,5466	0,3429	0,377
% 27 Esteranos	34,484	33,9169	18,7686	30,1124	24,42
% 28 Esteranos	27,7044	29,1371	32,7991	30,6123	31,2956
% 29 Esteranos	37,8116	36,9459	48,4323	39,2752	44,2844
TPP	0,9782	0,9792	0,9882	0,9786	0,9864

Legenda: P=Pistano; F=Fitano; H= Hopano; GAM: Gamacerano; STER=Esterano; TPP= Razão dos Poliprenóides Tetracíclicos

Em geral, os fragmetogramas m/z 191 e m/z 217 apresentam características semelhantes (Figura 42 e 43). Em comparação com as características geoquímicas do petróleo produzido na Bacia do Recôncavo, apresentadas por Veiga (2003). Na análise do óleo do Poço P128 pode-se observar que há semelhanças em relação a presença do gamacerano, H₂₉, H₃₀ e outros compostos, além da similaridade encontrada quanto ao perfil dos cromatogramas e a distribuição dos compostos (Figura 41, 42 e 43).

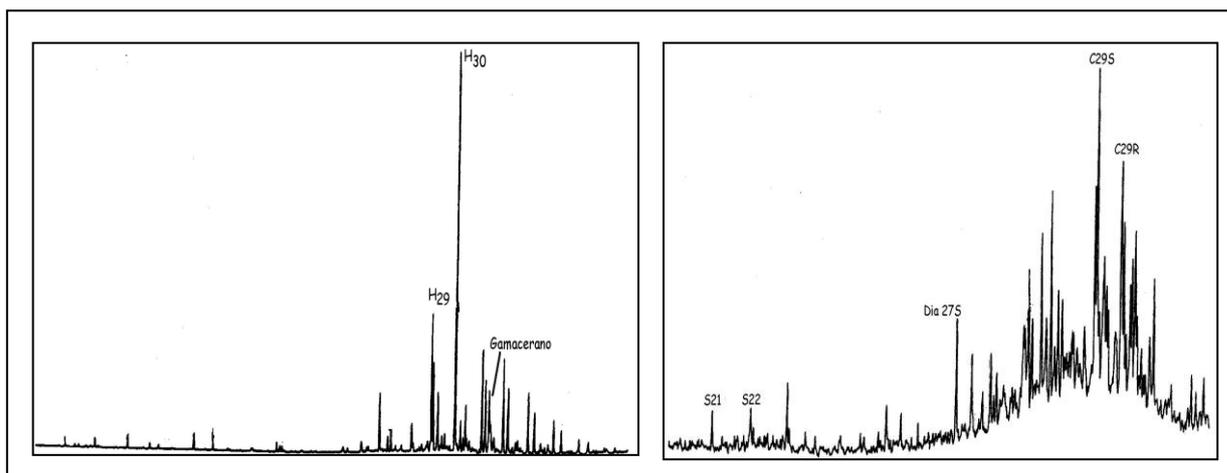


Figura 41. Perfis m/z 191 e m/z 217 do petróleo produzido na Bacia do Recôncavo: Fonte: VEIGA, 2003.

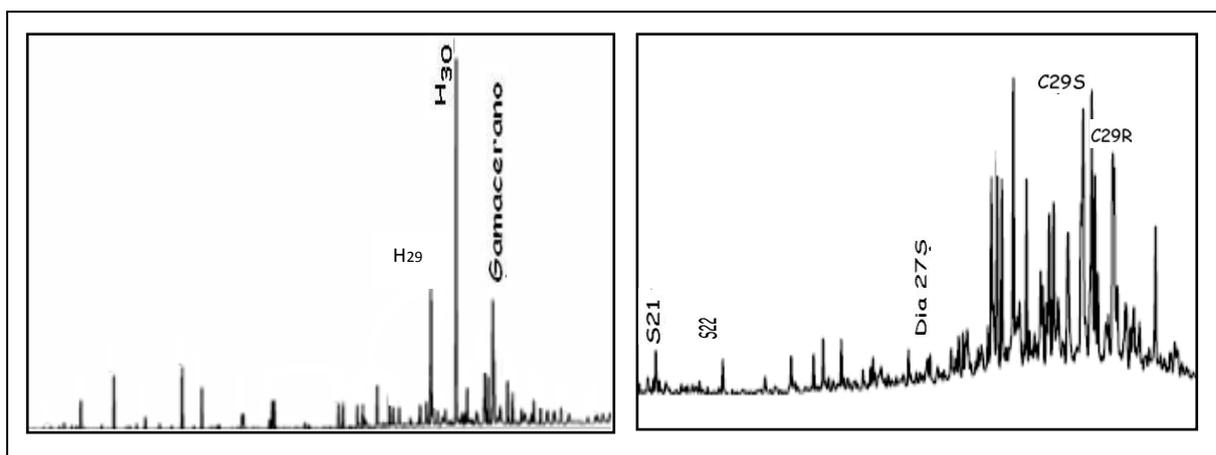


Figura 42. Fragmetogramas de biomarcadores saturados cíclicos (m/z 191 e m/z 217) de amostra de óleo da Bacia do Recôncavo do Poço P128.

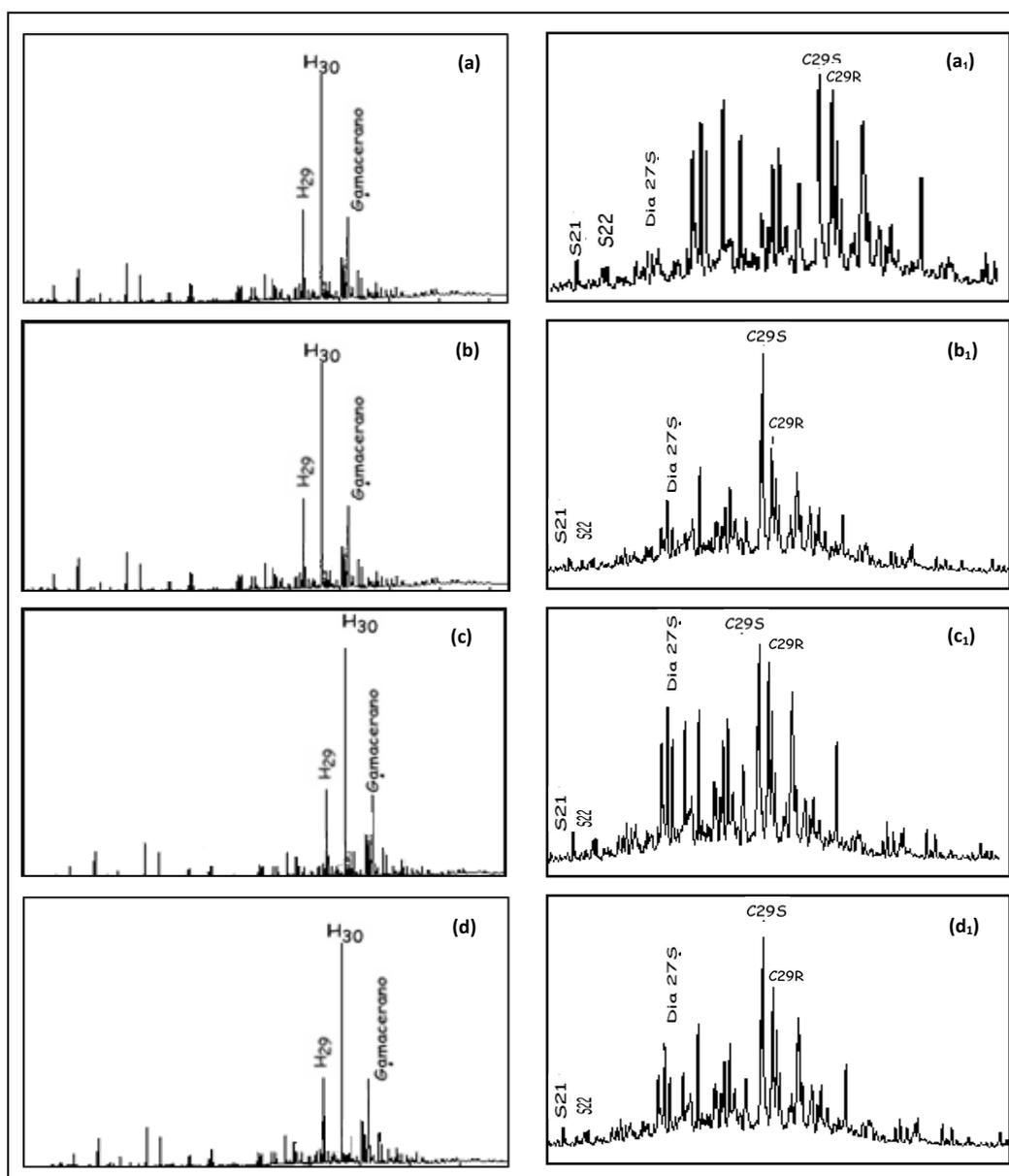


Figura 43. Fragmentogramas de biomarcadores saturados cíclicos (m/z 191 e m/z 217) (a e a₁) Amostra 1, (b e b₁) Amostra 2, (c e c₁), Amostra 3 e (d e d₁) Amostra 4.

Alguns parâmetros geoquímicos são muito utilizados como ferramentas de correlação, condições paleoambientais e origem deposicional no estudo de uma determinada rocha fonte. Dentre eles destacam-se as razões Pristano/Fitano, Ts/(Ts+ Tm) e Hopano/Esterano, distribuição dos C₂₇, C₂₈ e C₂₉ esteranos regulares, dentre outras.

A relação pristano/fitano em betumes e óleos, obtida através do perfil da cromatografia gasosa, tem sido utilizada para avaliar as condições óxido-redutoras do ambiente deposicional (DIDYK *et al.*, 1978). As relações pristano/fitano menores do que 1,0 indicam condições anóxicas em ambientes marinhos carbonáticos e/ou

hipersalinos. Somente na amostra 1 foi detectada a presença de fitano e pristano tendo sua razão valor equivalente a 1,32 indicando condições óxicas em ambientes lacustres/doce (Tabela 6). Nas demais amostras não foram detectadas fitano e pristano, provavelmente devido ao alto nível de degradação em que se apresenta o óleo encontrado no sedimento do manguezal em estudo.

Em todas as amostras foram observadas as razões: hopanos / esteranos > 5 , $H_{29}/H_{30} < 1$, ausência de 25 NorHopano e presença de tricíclicos terpanos (Tabela 6). Em conjunto são indicativas de óleo de origem de ambiente lacustre com rocha geradora siliciclástica de idade pré-aptiana, características semelhantes ao óleo produzido na Bacia do Recôncavo (VEIGA, 2003).

As amostras apresentaram valores baixos para a razão H_{35}/H_{34} variando entre 0,5695 e 0,345. Elevados valores para essa razão H_{35}/H_{34} são características de ambientes marinhos, com baixo potencial redutor, e valores baixos para esta razão caracterizam ambientes lacustres (ARAÚJO, 2007).

Com o propósito de avaliar o grau de correlação de origem entre as amostras analisadas, foi realizada uma análise comparativa dos valores da distribuição dos C_{27} , C_{28} e C_{29} esteranos regulares (valores que indicam paleoambiente deposicional). Segundo HUANG & MEINSCHEIN (1979), a predominância dos C_{29} esteranos indicariam contribuição terrestre, dos C_{27} esteranos indicariam maior contribuição de fitoplâncton marinho e dos C_{28} esteranos, quando em maior proporção, indicariam maior contribuição de algas lacustres. As amostras apresentaram valores com maior proporção para C_{29} (Tabela 6) indicando contribuição do tipo terrestre, de acordo com o diagrama ternário (Figura 44), foi observada uma contribuição de aporte de matéria orgânica de origem terrestre e de estuário confirmando o tipo de ambiente estudado, que se trata de manguezal onde ocorre uma troca constante entre diferentes ambientes.

O ambiente do tipo lacustre/doce também é caracterizado por apresentar valores para TPP maior que 0,4 o que pode ser observado em todas as amostras (Tabela 6). As amostras avaliadas apresentaram um valor alto de TPP sugerindo origem em ambiente lacustre característico de óleos da Bacia do Recôncavo. De uma maneira geral, os parâmetros característicos de origem expostos neste trabalho refletem um domínio de origem lacustre para estas amostras avaliadas, sugerido principalmente por valores altos para razão hopano/estero característicos encontradas em óleos da Bacia do Recôncavo. Com esses estudos não foi possível

identificar a origem real das exudações, porém os resultados indicam uma tendência que sugere uma mesma origem que a do óleo da Bacia do Recôncavo, isto é, os folhelhos geradores da Formação Candeias.

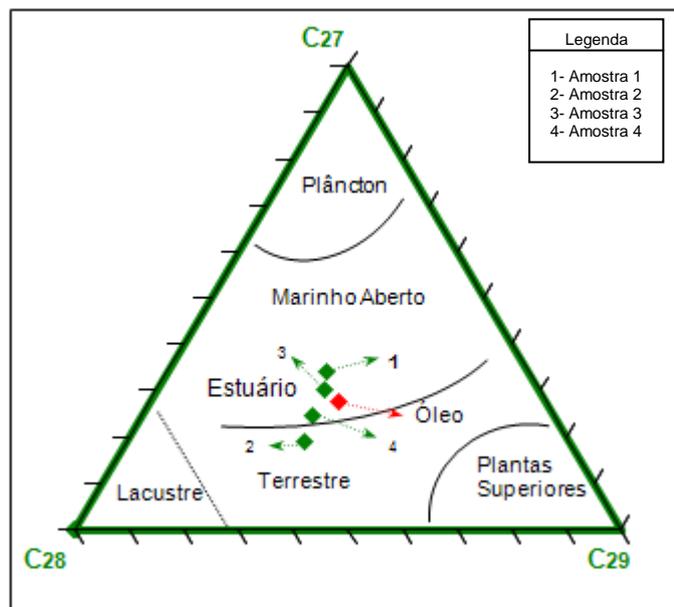


Figura 44. Diagrama triangular mostrando a interpretação dos ambientes através da distribuição dos esteranos, adaptado do original de HUANG & MEINSCHEN (1979). Fonte: ARAUJO, 2007.

VII. 1.2 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO

VII. 1.2.1 Avaliação granulométrica

Análise de tamanho de grão fornece pistas importantes para a proveniência dos sedimentos, a história dos transportes e condições de deposição, além de ser um importante parâmetro para controlar os processos de intemperização, condição que contribui para o processo de degradação de contaminantes (por exemplo, FOLK & WARD, 1957; FRIEDMAN, 1979; BUI *et al.*, 1990).

A análise dos resultados da granulometria é apresentada na forma de valores em porcentagem de areia, silte e argila (Tabela 7).

Tabela 7. Composição do sedimento em relação ao tamanho dos grãos.

Composição do sedimento (%)	
Areia fina:	3,5%
Areia muito fina:	56,4%
Silte muito grosso:	23,2%
Silte grosso:	8,1%
Silte médio:	5,5%
Silte Fino:	2,5%
Silte muito fino:	0,4%
Argila:	0,3%

Observa-se que a granulometria da amostra apresenta características com uma predominância de areia muito fina do tipo polimodal e moderadamente selecionada. Quanto a textura a amostra foi classificada como areia lamosa. Segundo Readman *et al.*, 1984 e Kowalska *et al.*, 1994, quanto mais fina a granulometria, maior a capacidade de retenção de matéria orgânica e, conseqüentemente, dos contaminantes. De acordo com Lacerda (1998), os sedimentos de granulação fina, predominando os tamanhos silte e argila (lama) favorecem os processos geoquímicos, os quais estão intimamente relacionados a este pacote sedimentar formado por grãos predominantemente finos.

Com base nos dados apresentados na Tabela 10 efetuou-se a classificação granulométrica dos sedimentos, com emprego do diagrama textural de Shepard (1954), conforme mostrado na Figura 45.

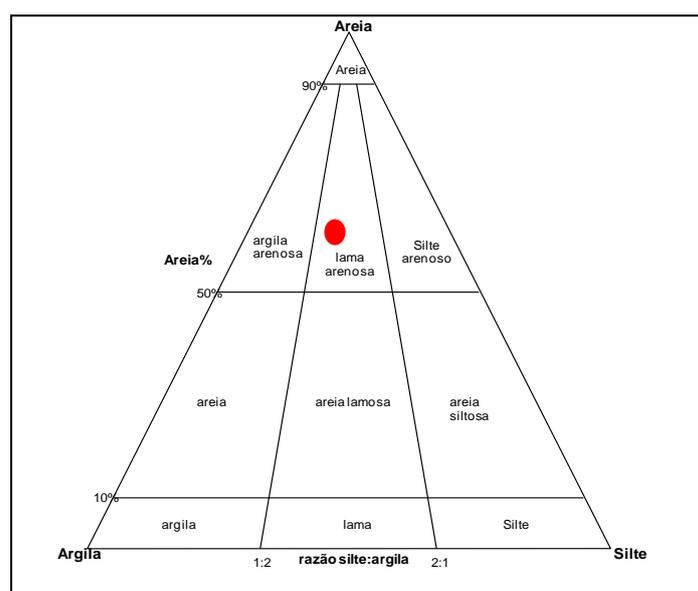


Figura 45. Diagrama triangular de classificação granulométrica (Shepard, 1954) do substrato sedimentar do manguezal do estuário do rio São Paulo utilizado no processo de biorremediação.

No gráfico abaixo se pode observar a composição do substrato em escala phi. A escala phi desenvolvida por Krumbein (1936) converte as classes de tamanho de Wentworth (1922) em intervalos aritméticos. As partículas que apresentam de 2 à 4 phi são classificadas como do tipo areia fina à muito fina. No gráfico abaixo se pode observar que a maior quantidade das partículas se encontra no intervalo entre $\approx 3,0$ à $\approx 4,3$ confirmando sua classificação (areia muito fina) (Figura 46).

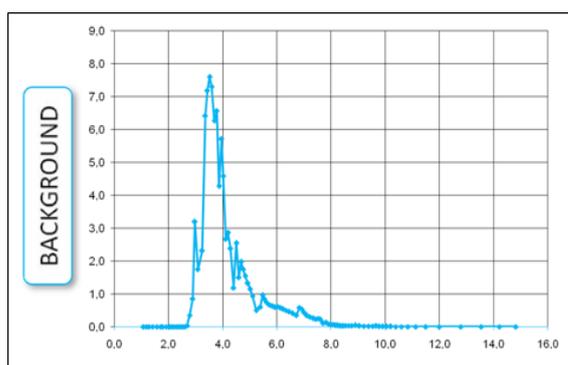


Figura 46. Gráfico da composição do sedimento do manguezal do estuário do rio São Paulo em escala phi.

Ao longo do experimento as amostras coletadas nos intervalos 1, 45 e 90 dias se mantiveram sem alteração na composição do sedimento estudado (Tabela 8). Como as amostras apresentaram a mesma classificação granulométrica, considera-se que esse fator não produza, para fins deste trabalho, influência na taxa de degradação dos hidrocarbonetos ao longo do experimento.

Tabela 8. Composição do sedimento (%) das amostras de substrato coletadas ao longo do processo de biorremediação.

Amostras	Areia fina	Areia muito fina	Silte muito grosso	Silte grosso	Silte médio	Silte fino	Silte muito fino	Argila
Referência (Tempo Zero)	3,07%	53,48%	25,2 %	9,0%	5,8%	2,8%	0,6%	0,2%
Referência (45 Dias)	3,9%	56,8%	22,3%	8,9%	5,1%	2,1%	0,4%	0,3%
Referência (90 Dias)	3,9%	56,8%	22,3%	8,9%	5,1%	2,1%	0,4%	0,3%
NPK (Tempo Zero)	3,4%	56,8%	22,5%	8,8%	5,7%	2,6%	0,2%	0,0%
NPK (45 Dias)	4,0%	57,9%	22,7%	7,7%	4,9%	2,4%	0,4%	0,1%
NPK (90 Dias)	0,3%	43,0%	33,3%	11,8%	7,2%	3,6%	0,6%	0,3%
OSMOCOTE (Tempo Zero)	3,8%	54,5%	23,2%	9,3%	6,1%	2,7%	0,3%	0,1%
OSMOCOTE (45 Dias)	4,0%	56,6%	23,1%	7,9%	5,2%	2,6%	0,5%	0,2%
OSMOCOTE (90 Dias)	4,3%	58,0%	22,6%	7,4%	4,9%	2,3%	0,3%	0,2%

VII. 1.2.1. Avaliação dos parâmetros físico-químicos não-conservativos

As transformações microbianas, os caminhos dos produtos de biodegradação e a persistência dos compostos dependem principalmente dos fatores físico-químicos do ambiente onde os microorganismos se encontram, provocando grande impacto na população (SUTHERSAN, 1998).

As características físico-químicas, relativas aos mecanismos de transporte e interação sedimento-contaminante, são também determinantes para a biodegradabilidade. Essas condições determinam a acessibilidade dos compostos pelos microorganismos.

Durante o processo de bioestimulação foram controlados os seguintes parâmetros: temperatura, pH, O.D., E_H e salinidade.

VII. 1.2.1.1 Temperatura

Durante o processo de bioestimulação os valores para temperatura da água variaram entre 24,4 e 30,7°C (Anexo A.1). O gráfico da Figura 47 permite analisar as variações de temperatura da água do canal de maré e das unidades de simulação (três aquários para cada simulação), ocorridas durante o 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia. A temperatura da água do canal de maré se apresentou mais baixa que as das unidades de experimento (após duas horas de simulação) isso pode ser justificado pelo fato do Laboratório de Simulação ter uma temperatura maior do que a do ecossistema natural, em função de ser um ambiente artificial. Segundo Santana (2008) a alta temperatura pode ser reflexo do tipo de telha (transparente) utilizada na cobertura do laboratório de simulação, a qual permite a entrada da energia solar com grande intensidade tornando o ambiente semelhante a uma estufa. Mas conforme Koning (2002), são as temperaturas mais altas, a princípio, as mais vantajosas, já que a solubilidade dos contaminantes e a biodisponibilidade dos compostos orgânicos aumentam, facilitando o processo de degradação.

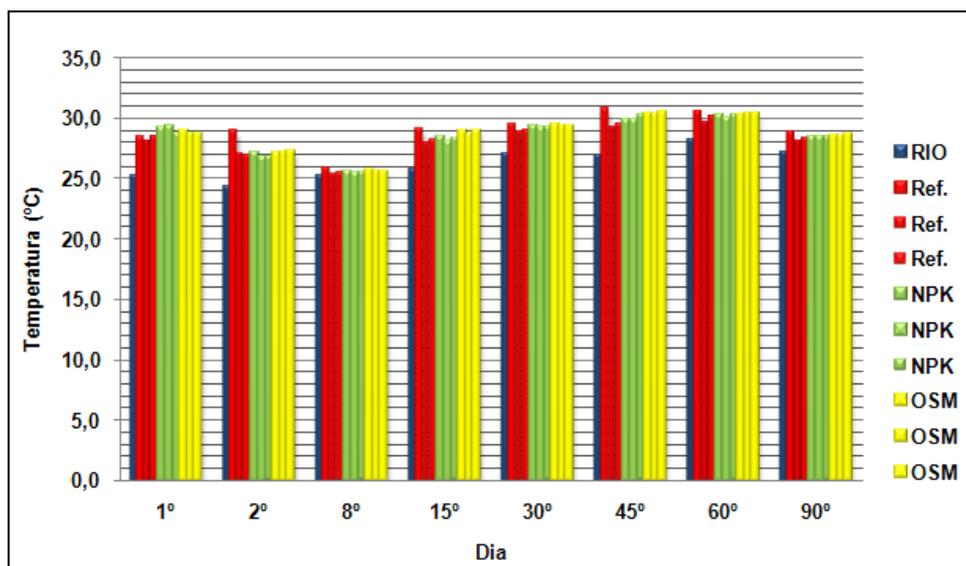


Figura 47. Gráfico com variação da temperatura nas unidades de simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.

Na Tabela 9 podemos observar à média, mediana e desvio padrão da temperatura. No canal de maré a temperatura apresentou uma media de 26,26°C com um desvio padrão de 1,22, já as unidades de simulação apresentaram uma media entre 28,9 e 28,1°C, com desvio padrão variando entre 1,27 e 1,53.

Tabela 9. Tabela com valores de média, mediana e desvio padrão dos valores para temperatura.

Temperatura (°C)			
Simulação	Média	Mediana	Desvio Padrão
RIO	26,26	26,03	1,22
Ref.	28,90	28,85	1,40
Ref.	28,10	28,15	1,27
Ref.	28,34	28,37	1,37
NPK	28,46	28,43	1,45
NPK	28,28	28,34	1,48
NPK	28,52	28,51	1,53
OSM	28,59	28,69	1,48
OSM	28,45	28,48	1,48
OSM	28,60	28,60	1,50

Os resultados para temperatura mostraram valores dentro do limite ideal para o desenvolvimento dos microrganismos necessários para o aumento da biodegradação durante todos os dias monitorados (1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia). Contudo os efeitos da temperatura podem ser limitados por outros fatores, tais

como a qualidade dos hidrocarbonetos e a composição das comunidades microbianas (ATLAS, 1981). Segundo Bento (2005) a temperatura é capaz de influenciar tanto nas propriedades físicas e químicas dos constituintes do petróleo contidas no sedimento, quanto na atividade biológica dos microrganismos. Atlas & Bartha (1972) constataram que baixas temperaturas retardam as taxas de volatilização de hidrocarbonetos com baixo peso molecular, tóxicos para os microorganismos. Contudo, Coulon (2005) confirma que a biorremediação de hidrocarbonetos é possível a temperaturas baixas (4°C), mas são as altas temperaturas que proporcionam os melhores resultados.

Autores confirmam que o metabolismo microbiano aumenta com o aumento da temperatura e que a atividade enzimática apresenta um melhor metabolismo para os hidrocarbonetos a uma temperatura máxima de 30-40°C (BOSSERT & BARTHA, 1984; LEAHY & COLWELL, 1990).

VII. 1.2.1.2 pH

Os valores de pH apresentam-se compatíveis para águas marinhas, variando entre 7,05 e 8,01 (Anexo A.2). O gráfico da Figura 48 permite analisar as variações de pH da água do canal de maré e das unidades de simulação (três aquários para cada simulação), ocorridas durante o 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia. A maior parte dos microorganismos tolera valores de pH na faixa de 5 a 9 e preferencialmente funcionam na faixa de 6,5 a 7,5. Quando altas concentrações de compostos orgânicos estão presentes no subsolo com baixa alcalinidade é necessário o controle do pH para que a biodegradação se efetue.

Cavalho (2007) e Celino *et al.* (2007), em estudos realizados no Norte da Baía de Todos os Santos, obtiveram valores próximos, aos encontrados neste trabalho, com médias de 7,6 e 7,0 respectivamente. Testes com processo de bioestímulo realizados por Santana (2008) mostraram valores semelhantes também, variando entre de 7,0 e 8,0.

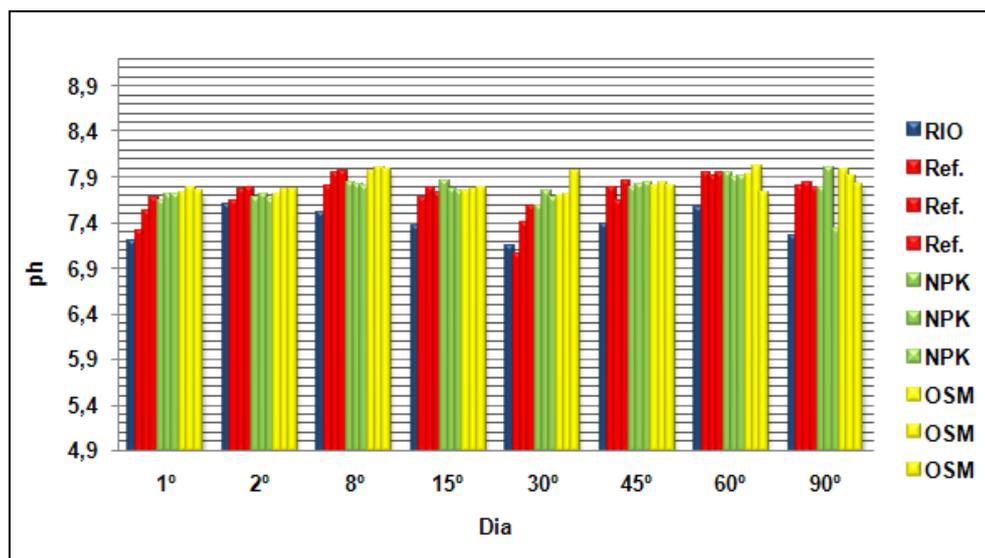


Figura 48. Gráfico com variação do pH nas unidades de Simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.

A média do pH foi de 7,4 na água do canal de maré(rio) com um desvio padrão de 0,15 e 7,62 a 7,84 nas unidades de simulação. Nas unidades de simulação o desvio padrão variou entre 0,09 e 0,26 (Tabela 10).

Tabela 10. Tabela com valores de média, mediana e desvio padrão dos valores para pH

pH			
Simulação	Média	Mediana	Desvio Padrão
RIO	7,37	7,37	0,15
Ref.	7,62	7,67	0,26
Ref.	7,72	7,75	0,17
Ref.	7,78	7,78	0,12
NPK	7,75	7,78	0,11
NPK	7,80	7,80	0,09
NPK	7,70	7,70	0,16
OSM	7,81	7,80	0,10
OSM	7,84	7,83	0,10
OSM	7,82	7,80	0,09

Durante a simulação verificou-se que o pH manteve-se dentro da amplitude definida na caracterização inicial (1º dia de simulação), indicando a capacidade de tamponamento para patamares mais alcalinos (ESTEVES, 1998). Segundo Vallejo *et al.* (2005) o pH tem a capacidade de inibir o crescimento dos heterótrofos e

degradadores reduzindo as taxa de degradação dos hidrocarbonetos. A maioria dos microrganismos desenvolve-se melhor com pH 7,0, por isso a importância do ajuste e a manutenção deste parâmetro durante o processo de biorremediação. Hoffasnm & Viedt (1998) reportam que na literatura um pH entre 5,5 e 8,5 é dado como ótimo para a biodegradação de HTP em solos.

Já experimentos realizados por Bartha & Dibble (1979), mostraram que valores de pH em torno de 7,8 se aproximam dos valores ideais para biodegradação de hidrocarbonetos, justificado pelo aumento na taxa de emissões de CO₂, uma vez que alguns hidrocarbonetos são convertidos em material celular e outros em CO₂.

Os resultados de pH mostraram-se adequados para o desenvolvimento de microrganismos responsáveis pela biodegradação dos contaminantes, não comprometendo portanto o processo de biorremediação.

VII. 1.2.1.3 Potencial Redox (E_H)

O potencial redox (E_H) dos sedimentos mede o seu estado de oxidação controlando a direção do equilíbrio químico e conseqüentemente a redução ou oxidação do contaminante. Este, por sua vez controla os compostos que o contaminante pode formar e a relativa solubilidade destes no meio ambiente (HAZEN, 2010).

Os valores de E_H mostraram que os sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo apresentam condições fortemente redutoras, variando entre -52 e 40 mV (Anexo A.3). Alguns resultados mostraram condições oxidantes, isso pode estar relacionado com erros no manuseio do equipamento, já que ambiente de manguezal é potencialmente redutor. O potencial redox é condição limitante para aceleração do processo de biodegradação. Segundo ERD (1998), valores positivos de E_H indicam condições ótimas para a biodegradação de compostos orgânicos.

No entanto, as concentrações oxidantes ou redutores em especial irão afetar a atividade metabólica microbiana influenciando a sua atividade enzimática podendo dificultar ou acelerar o processo de biodegradação (SUTHERSAN, 1999).

A média dos valores de E_H variou para os aquários de simulação entre -14,4mV e -32,4mV. Já a média dos valores de E_H para amostras da água do rio se

comportou oxidante (4,25). Um declínio do potencial redox (E_H) de valores positivos para negativos reflete mudança de oxidantes (favoráveis aos microrganismos aeróbios) para redutoras (melhores condições aos processos anaeróbios, que são mais lentos que os aeróbios) (QUEIROZ S *et al.*, 2007). Os parâmetros estatísticos de E_H apresentados na Tabela 11 confirmam condições fortemente redutoras para a água dos aquários de simulação. Isto é um fator que influencia a taxa de degradação do óleo, pois quanto mais oxidante mais rápido é a degradação desse óleo.

Tabela 11. Valores de média, mediana e desvio padrão dos valores para E_H .

E_H (mV)			
Simulação	Média	Mediana	Desvio Padrão
RIO	4,25	-5	21,40
Ref.	-14,37	-21	19,65
Ref.	-23	-23	10,80
Ref.	-29,37	-31	8,82
NPK	-28	-29	8,48
NPK	-30,87	-30,87	9,22
NPK	-24,87	-24,87	7,46
OSM	-24	-25	21,46
OSM	-32,37	-32,37	7,70
OSM	-32,12	-32	6,31

VII. 1.2.1.4 Salinidade

A presença de sais pode retardar ou inibir a biodegradação. É desconhecida a biodegradação em ambiente hipersalinos (NASCIMENTO, 2006) e segundo Borresen & Rike (2007) a alta concentração de sal inibe a degradação microbiana dos hidrocarbonetos. Existem microrganismos que se adaptam a condições de alta salinidade, sendo fundamental a acessibilidade dos contaminantes para os microrganismos.

A Figura 49 permite analisar as variações de salinidade da água do canal de maré e dos aquários, ocorridas durante os 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dias. Os valores para salinidade variaram entre 41 e 30 (Anexo A.4). A salinidade durante todo o experimento se comportou de forma adequada para o desenvolvimento dos microrganismos típicos do manguezal do estuário do rio São Paulo quando

comparados com valores ideais de ambientes de água salina (superior a 30) (CONAMA, 2005).

A água do canal teve maiores valores em relação ao encontrados nas unidades de simulação. Sendo que durante o experimento os maiores valores foram encontrados no 60º dia de experimento tanto para a água do canal como para as unidades de simulação, podendo estar relacionado diretamente com o aumento da temperatura ou ao ciclo de maré, que irá determinar uma maior ou menor entrada de água salina no estuário.

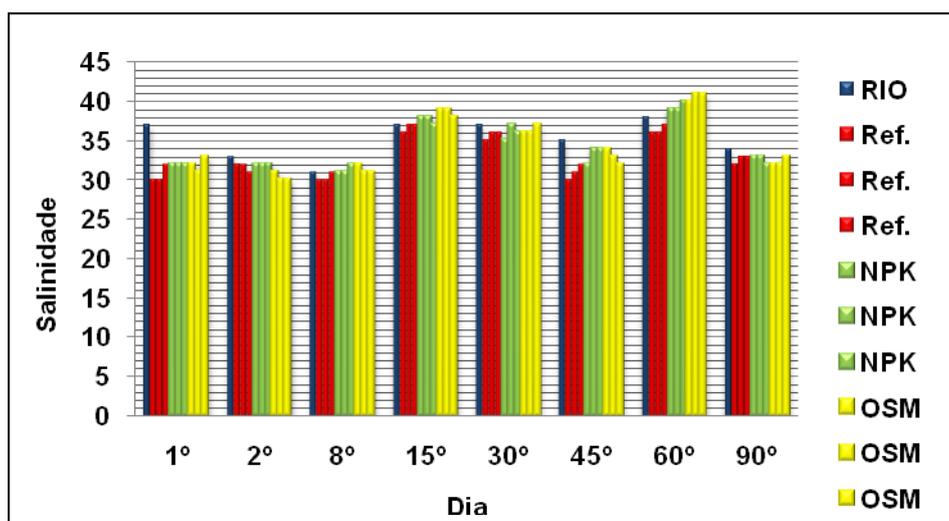


Figura 49. Gráfico com variação da Salinidade nas unidades de Simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.

A média de salinidade no canal de maré ficou em torno de 35,3 (Tabela 12), bem próximo aos valores encontrados por Carvalho (2007), que variaram em torno de 36,6, por Celino *et al.* (2007) que obteve uma média de 34,7 e por Santana (2008) encontrando uma média de 35,8. O aumento da salinidade nas unidades de simulação com NPK e OSMOCOTE em comparação com as unidades referências pode estar relacionado com o uso de sais nutrientes, tais como amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-).

Tabela 12. Valores de média, mediana e desvio padrão dos valores para Salinidade.

Salinidade			
Simulação	Média	Mediana	Desvio Padrão
RIO	35,3	35,3	2,1
Ref.	32,6	32	2,4
Ref.	33,1	33	2,5
Ref.	33,6	33	2,3
NPK	34	33	2,7
NPK	34,5	34	2,7
NPK	34,4	34	2,7
OSM	34,5	34	3,1
OSM	34,1	33	3,6
OSM	34,4	33	3,4

VII. 1.2.1.5 Oxigênio Dissolvido (O.D.)

A falta de oxigênio nas reações de biorremediação é um fator impeditivo (CHAYABUTRA & JU, 2000) e é o fator decisivo para iniciar e sustentar a biodegradação (NASCIMENTO, 2006). O O.D. ao longo do experimento variou entre 4,8 e 8,4mg/L (Anexo A.5).

Na Figura 50 pode se observar a variação do O.D.mg/L no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia. Segundo o Conama (2005) para águas com salinidade superior a 30 o O.D. deve ser superior a 6mg/l. A taxa de O.D ideal para biodegradação está em torno de 8,0mg/L. Os valores em todas as unidades de simulação se encontraram abaixo desse valor ideal para biodegradação, mas se encontrou bem próximo e dentro do limite necessário para desenvolvimento de microorganismos típicos de manguezal.

Santana (2008) em seus testes utilizou uma e duas bombas de aeração nas unidades de simulação e concluiu que não afetou as concentrações de O.D., inferindo que esses resultados podem estar relacionados aos valores de temperatura. Já que o aumento da temperatura reduz a solubilidade do oxigênio na água, no entanto provoca um aumento na intensidade dos processos biológicos, o que acelera o metabolismo dos organismos, acarretando conseqüentemente um

maior consumo de oxigênio (CARMOUZE, 1994; ESTEVES, 1998; RICKLEFS, 2001).

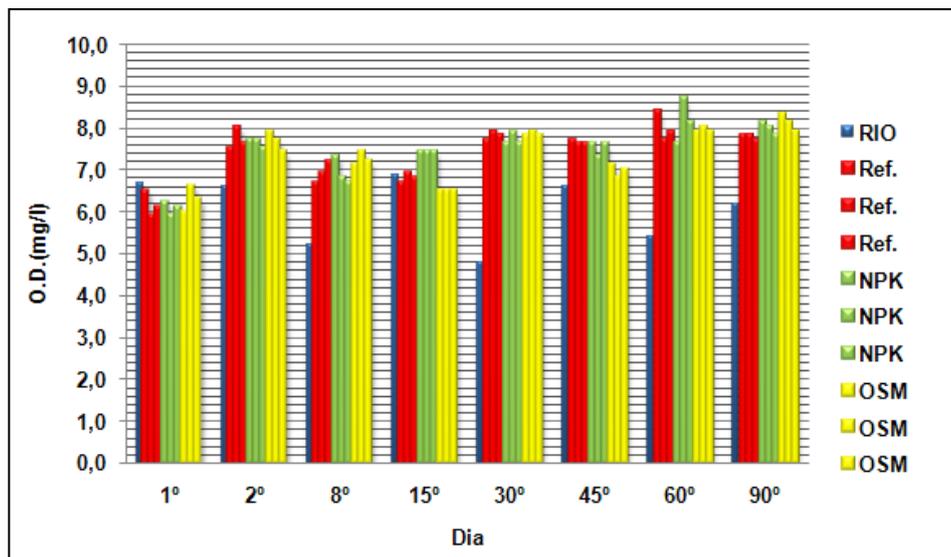


Figura 50. Gráfico com variação do O.D. nas unidades de simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.

A média do O.D. na água do canal se encontrou em torno de 6,1mg/L com um desvio padrão de 0,71 (Tabela 13). Os menores valores de O.D. se encontraram nas amostras da água do canal e não tiveram variação significativa entre os aquários de simulação durante o experimento, variando entre 7,3 á 7,5mg/L bem próximo aos valores encontrados por Santana (2008), com uma média de 7,5mg/L.

Tabela 13. Valores de média, mediana e desvio padrão dos valores para O.D.

O.D. (mg/L)			
Simulação	Média	Mediana	Desvio Padrão
RIO	6,05	6,20	0,71
Ref.	7,38	7,50	0,59
Ref.	7,34	7,60	0,64
Ref.	7,34	7,60	0,55
NPK	7,44	7,60	0,49
NPK	7,46	7,46	0,74
NPK	7,35	7,50	0,57
OSM	7,33	7,33	0,70
OSM	7,38	7,40	0,58
OSM	7,25	7,25	0,55

CHAYABUTRA & JU (2000) concluíram que sob condições microaeróbicas a taxa de desnitrificação decresce com a redução da concentração do oxigênio dissolvido, implicando que as reações que requerem oxigênio são limitantes para a continuidade da biodegradação. A disponibilidade de oxigênio é crucial para a biorremediação rápida, a biodegradação de hidrocarbonetos é essencialmente um processo aeróbio sendo a limitação de oxigênio um problema potencial em um ambiente (ZHU *et al.*, 2004b).

VII. 1.2.2 Avaliação geoquímica

VII. 1.2.2.1 Fósforo, nitrato, amônia e carbono orgânico

Nesse experimento foram feitas simulações com dois tipos de fertilizantes, NPK e OSMOCOTE (Figura 14), os quais são compostos de nitrogênio, fósforo e potássio, na proporção 100:10: 1. A diferença entre os fertilizantes está na forma de liberação de seus nutrientes. O NPK libera os nutrientes mais rapidamente, sendo facilmente solubilizado, e o OSMOCOTE, por ser envolvido por uma cápsula, libera aos poucos esses nutrientes.

Os nutrientes monitorados durante o experimento foram os teores dos íons de fósforo, amônio e nitrato, em amostras de sedimento extraídas das provetas de todas as unidades de simulação, durante os intervalos de 1, 2, 8, 15, 30, 45, 60, 90 dias. Os resultados dos nutrientes: amônia, fósforo e nitrato se comportaram de forma semelhante durante todo o experimento. As concentrações para as unidades referência variaram entre 18,02 e 37,50mg kg⁻¹ (Anexo B.1). Na Figura 51 pode-se observar que os teores de fósforo nas unidades referências se comportaram de forma semelhante e quando comparado a amostra *background* os teores se mantiveram praticamente estáveis durante todo o experimento, tendo uma diminuição no 90º dia. Já nas unidades de simulação que foram adicionados NPK as concentrações variaram entre 89,37 e 224,92mg kg⁻¹ (Anexo B.1).

Os teores de fósforo nas unidades com NPK, durante todo o experimento foram mais elevados do que àquelas das demais unidades de simulação sendo que apresentou uma queda no 60º e 90º dia de experimento. Este fato pode ser justificado uma vez que o NPK é bastante solúvel e à medida que a maré era simulada é possível que esses nutrientes fossem utilizados pelos microrganismos como fonte energia para seu metabolismo. Segundo Vallejo *et al.*(2005) são encontrados valores baixos de fósforo ao longo do experimento pelo fato dos microrganismos o consumirem rapidamente no início da biodegradação. Isso não foi observado neste experimento. Os valores de fósforo se mantiveram em níveis altos durante toda a experiência, podendo ser inferido pelo estágio de degradação do óleo, onde não foi possível detectar os hidrocarbonetos de baixo peso molecular, os primeiros a serem degradados.

As unidades com OSMOCOTE só apresentaram valores mais elevados a partir do 15º dia, mas quando comparados aos aquários com NPK os teores de fósforo são menores, e este fato pode ser justificado pelo tipo de liberação (lenta) típica deste fertilizante. Os teores de fósforo nessas unidades variaram entre 34,34 e 193,03mg kg⁻¹ (Anexo B.1).

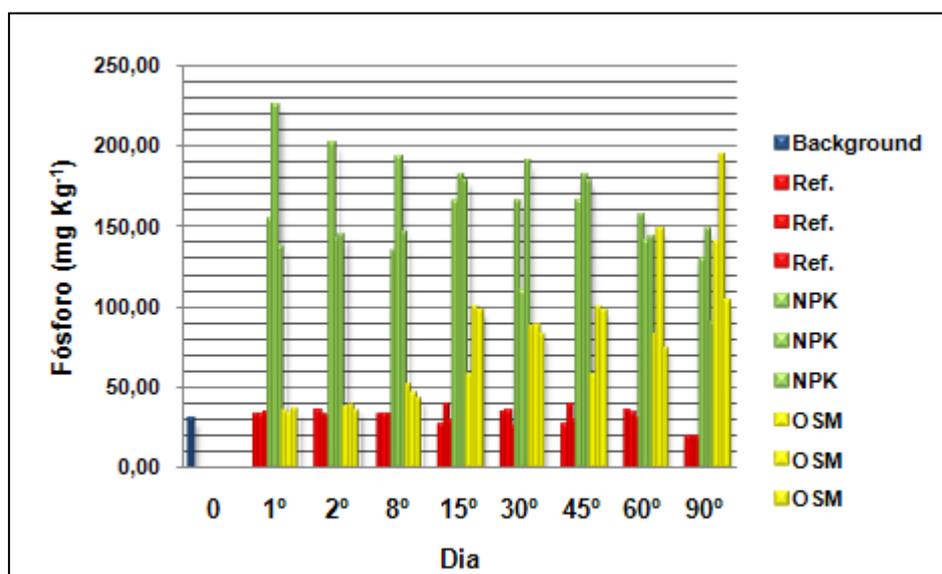


Figura 51. Gráfico com variação dos teores de fósforo nas unidades de simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.

A média dos teores de fósforo na amostra background foi de 29,03mg kg⁻¹, bem próximo daqueles valores encontrados nas unidades de simulação referências.

Os valores obtidos para média, mediana e desvio padrão para todas as unidades de simulação se encontram na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de média, mediana e desvio padrão dos teores do íon fósforo.

Fósforo (mg kg⁻¹)			
Simulação	Média	Mediana	Desvio padrão
Backg.	29,03	28,46	1,44
Ref.	29,15	31,30	5,12
Ref.	31,84	31,88	5,30
Ref.	27,76	27,76	4,13
NPK	158,54	158,54	19,43
NPK	164,54	164,54	32,44
NPK	150,05	144,91	27,99
OSM	67,45	56,27	30,39
OSM	92,85	92,85	49,47
OSM	70,30	72,99	25,70

As concentrações para os valores de amônia das unidades de simulação referências variaram entre 2,28 e 31,41 mg N-NH₄⁺kg⁻¹ (Anexo B.2). Na Figura 52 pode-se observar que os teores de amônia nas unidades referências sofreram aumento quando comparado a amostra *background*, sendo que a partir do 45º dia de experimento sofreram redução. O aumento nos teores de nutrientes favorece o crescimento da população microbiana responsável pela biodegradação do óleo contido no ambiente. Os teores de amônia nas unidades com NPK obtiveram valores mais altos nos 08 primeiros dias de experimento, diminuindo sensivelmente a partir do 15º dia de experimento. As concentrações variaram entre 7,98 e 338,06 mg N-NH₄⁺kg⁻¹ (Anexo B.2). O consumo da amônia pode estar relacionado com a incorporação na biomassa microbiana no processo de biodegradação (VALLEJO *et al.*, 2005). Já para as unidades com OSMOCOTE os valores variaram entre 8,20 e 60,78 mg N-NH₄⁺kg⁻¹ (Anexo B.2). Nas unidades de simulação com OSMOCOTE os teores de amônia aumentaram gradativamente durante todo o experimento, quando comparado aos aquários com NPK. Nos 08 primeiros dias os teores de amônia foram maiores nas unidades de simulação com NPK, enquanto que a partir 15º os teores de amônia foram maiores nas unidades de simulação com OSMOCOTE (Figura 52).

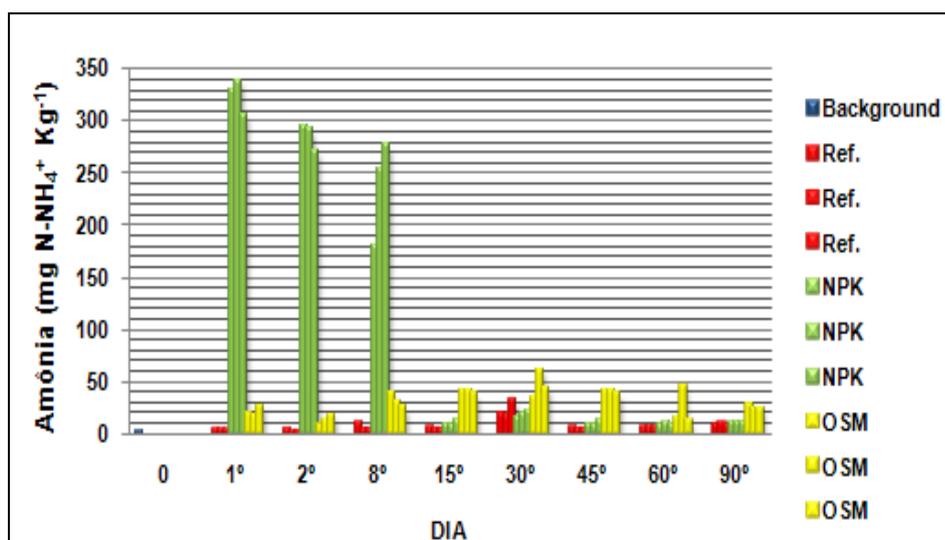


Figura 52. Gráfico com variação dos teores de amônia nas unidades de simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.

A média dos teores de amônia na amostra *background* foi de 2,36mg N-NH₄⁺kg⁻¹. Nas unidades de simulação variaram entre 6,50 á 117,20mg N-NH₄⁺kg⁻¹. Os valores obtidos para média, mediana e desvio padrão se encontram na tabela abaixo, para todas as unidades de simulação (Tabela 15).

Tabela 15. Valores de média, mediana e desvio padrão dos teores do íon amônia.

Amônia (mg N-NH ₄ ⁺ kg ⁻¹)			
Simulação	Média	Mediana	Desvio padrão
Backg.	2,36	2,25	0,54
Ref.	7,80	5,85	4,23
Ref.	6,50	5,04	4,03
Ref.	8,40	5,00	8,44
NPK	106,91	15,76	126,08
NPK	117,20	18,48	134,41
NPK	114,84	21,78	127,42
OSM	28,16	28,16	11,36
OSM	34,33	34,33	14,13
OSM	28,44	26,69	9,86

Os teores para os íons nitrato nas unidades referências variaram ao longo do experimento entre 1,66 á 32,19mg N-NH₃kg⁻¹ (Anexo B.3). Na Figura 53 pode-se observar que os teores de nitrato nas unidades referências sofreram aumento quando comparados a amostra *background*, sendo que a partir 15º dia de

experimento sofreram redução. Os teores de nitrato nas unidades onde foi adicionado NPK obtiveram valores mais altos nos 08 primeiros dias de experimento decaindo a partir 15º dia de experimento, variando entre 8,51 e 281,36mg N-NH³.kg⁻¹ (Anexo B.3). Essa queda pode estar relacionada com a solubilização do nitrato que é maior nesse tipo de fertilizante e em consequência disso é assimilado mais rapidamente pelos microrganismos degradadores (VALLEJO *et al.*, 2005).

Nas unidades com OSMOCOTE os teores aumentaram gradativamente durante todo o experimento, mas quando comparados com as unidades com NPK os teores de amônia nos primeiros 08 dias foram bem maiores, enquanto que a partir do 15º dia os teores de nitrato são maiores nas unidades com OSMOCOTE, variando entre 9,64 á 62,59mg N-NH₃.kg⁻¹ (Anexo B.3). A baixa concentração do nitrato em relação às concentrações de amônia sugere que esta é a fonte principal de nitrogênio neste experimento (VALLEJO *et al.*, 2005).

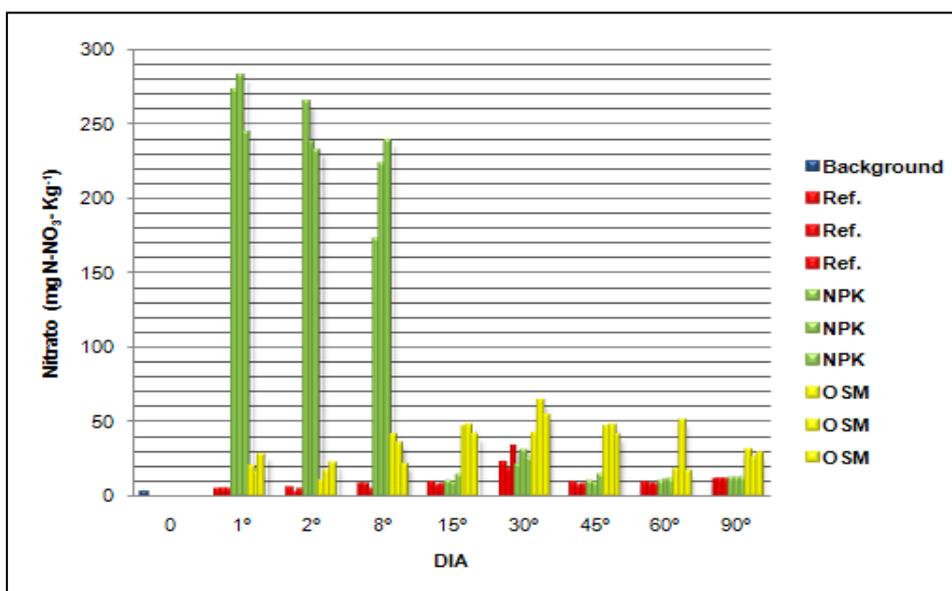


Figura 53. Gráfico com variação dos teores de nitrato nas unidades de simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.

Os valores para média, mediana e desvio padrão se encontram na Tabela 16.

Tabela 16. Valores de média, mediana e desvio padrão dos teores do íon nitrato.

Nitrato (mg N-NH³.kg⁻¹)			
Simulação	Média	Mediana	Desvio padrão
Backg.	2,01	2,07	0,18
Ref.	9,00	7,96	4,70
Ref.	7,31	6,56	4,25
Ref.	9,22	6,58	8,49
NPK	95,97	19,94	108,21
NPK	101,19	29,88	109,86
NPK	98,22	24,39	104,68
OSM	31,04	31,04	12,36
OSM	37,08	37,08	15,23
OSM	30,65	28,18	11,15

Os resultados encontrados corroboram a idéia de alguns autores de que em sistemas abertos pode haver deficiência nos teores de nutrientes o que pode resultar na inibição do processo de biodegradação (LINDSTROM *et al.*, 1991; FURNAS, 1992 *apud* HOFF, 1993; BRAGG, 1992 *apud* RYTKONEN *et al.*, 1997). Por isso a necessidade da adição dos nutrientes, o que pode aumentar a velocidade da degradação. O fósforo foi o único nutriente que continuou ao longo de todo o experimento sendo liberado uniformemente tanto nas unidades com NPK como nas unidades com OSMOCOTE (Figura 51). Os nutrientes em certos ambientes costeiros são escassos e a ausência principalmente de fósforo biodisponível pode provocar a redução da população microbiana, dificultando assim o processo de degradação do óleo (LEAHY & COLWELL, 1990; PRINCE, 1993).

Dibble & Bartha (1972) indicam que concentrações de nitrogênio e fósforo severamente limitam a extensão da degradação de hidrocarbonetos e que a adição de nitrogênio e fósforo pode ser usada para estimular degradação microbiana de hidrocarboneto.

O gráfico da Figura 54 mostra a média das triplicatas das unidades de simulação e a média das amostras *backgrounds* (manguezal) coletadas do dia da montagem do experimento. A Figura confirma que o fósforo foi o nutriente que manteve sua liberação durante o experimento, já os teores de amônia e nitrato tiveram os maiores valores nos primeiros 8 dias nas unidades com NPK, decaindo a partir do 15^o dia de simulação. Nos aquários com OSMOCOTE os teores de

amônia, fósforo e nitrato aumentaram após os 8 dias de experimento. No entanto, os teores de nitrato e amônia decaem no 60º e 90º dia, enquanto que o fósforo continua aumentando.

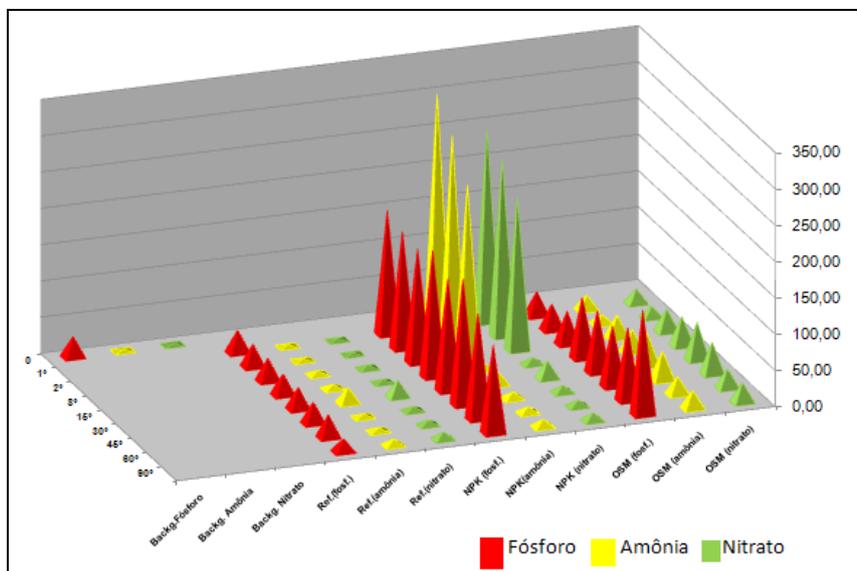


Figura 54. Gráfico com a média dos teores de fósforo, amônia e nitrato nas unidades de simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.

Os teores de carbono orgânico variaram entre 3, 63 e 5,89% (Anexo B.4). Os maiores valores foram encontrados no 30º e 90º dia de experimento nos aquários com NPK. Nas unidades referência os teores não tiveram variação significativa, o mesmo acontecendo com os aquários com OSMOCOTE (Figura 55).

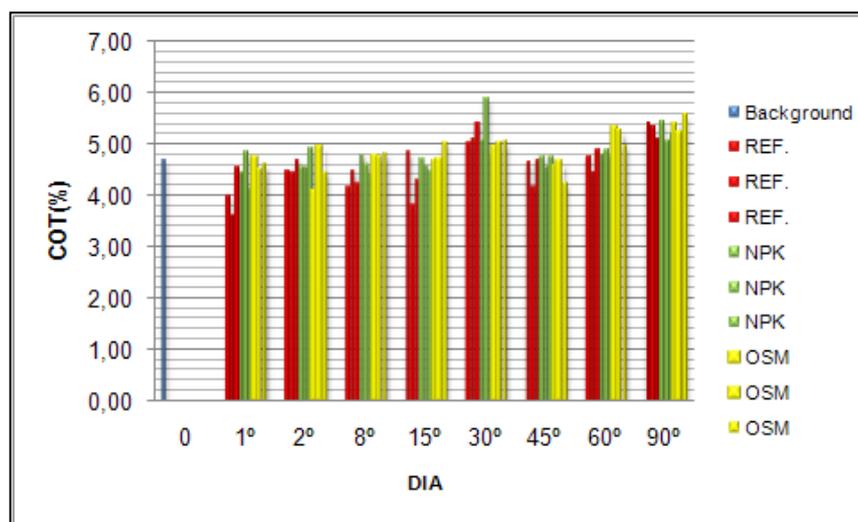


Figura 55. Gráfico com a variação dos teores de Carbono Orgânico (COT) nas unidades de simulação no 1º, 2º, 8º, 15º, 30º, 45º, 60º e 90º dia.

O carbono orgânico (C.O.) constitui o elemento fundamental da matéria orgânica (M.O.) dos solos, uma vez que essa M.O. é composta por cerca de 60% de C.O., enquanto os demais elementos perfazem o restante. Quando uma molécula do óleo chega ao solo, ela pode sofrer os processos de degradação e sorção, e os resultados destes dois processos podem ser: a absorção da molécula pelas plantas, a lixiviação da molécula para camadas subsuperficiais do solo.

Bento (2005), em seus experimentos, observou que nos solos contaminados a concentração de matéria orgânica era mais alta, em relação ao solo não contaminado. Na amostra considerada *background* no presente experimento, os teores de carbono orgânico já se encontram altos devido ao sedimento utilizado no experimento se encontrar previamente contaminado, além de ser amostra representativa de ecossistema manguezal, naturalmente rico em carbono orgânico.

Comparando os valores das médias das unidades de simulação entre si, verifica-se que o teor de carbono orgânico do experimento não mostrou diferenças significativas entre os tratamentos, tendo uma variação de 4,43 á 4,88% (Tabela 17).

Tabela 17. Valores de média, mediana e desvio padrão dos teores de carbono orgânico Total.

COT (%)			
Simulação	Média	Mediana	Desvio padrão
Backg.	4,70	4,70	0,04
Ref.	4,67	4,71	0,45
Ref.	4,43	4,46	0,58
Ref.	4,74	4,70	0,39
NPK	4,82	4,77	0,32
NPK	4,88	4,74	0,45
NPK	4,69	4,76	0,33
OSM	4,79	4,74	0,42
OSM	4,85	4,81	0,27
OSM	4,85	4,90	0,41

VII. 1.2.2.2 Análises Cromatográficas

O óleo é composto por frações de hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos e compostos NSO. Os hidrocarbonetos saturados são estruturas mais simples e são compostos de *n*-alcanos (estrutura molecular com cadeia simples,

mais leve ao mais pesada); isoprenóides (estrutura molecular mais complexa com cadeia linear e ramificada); cicloalcanos (estrutura mais complexa entre os saturados, com cadeias cíclicas e anéis difícil de serem biodegradados) (Figura 56).

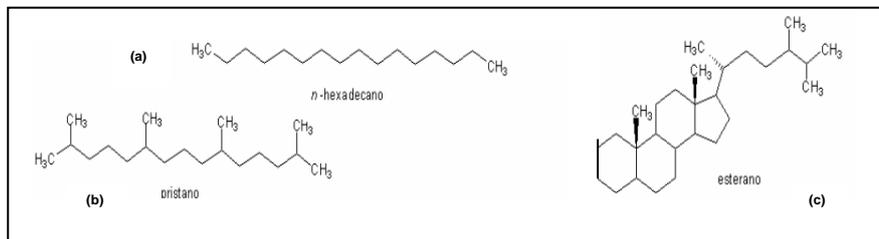


Figura 56. Estruturas químicas de hidrocarbonetos saturados (a) *n*-alcanos, (b) isoprenóides e (c) cicloalcanos. Fonte: GAMA, 2008; SOUZA, 2003.

Os hidrocarbonetos Aromáticos se constituem de pelo menos um anel benzênico (Figura 57) na sua estrutura molecular, sendo a fração mais difícil de ser biodegradado. Através da literatura especializada entende-se que os hidrocarbonetos saturados são biodegradados por uma população microbiana diferente da que degrada os saturados.

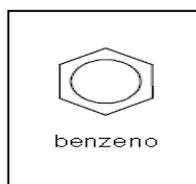


Figura 57. Estrutura química de hidrocarbonetos aromáticos com apenas um anel benzênico. Fonte: GAMA, 2008.

Os compostos NSO possuem uma estrutura molecular mais complexa e mais difícil de ser biodegradada, sendo altamente recalcitrantes (Figura 58).

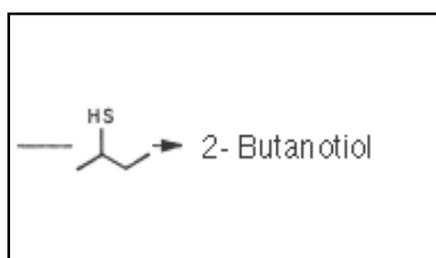


Figura 58. Estruturas químicas de compostos NSO. Fonte: TISSOT & WELTE, 1984 *apud* SOUZA, 2003.

A contaminação ocorrida no substrato do manguezal do estuário do rio São Paulo (Estação Pedra Branca), foi provavelmente através da operação de poços

localizados nas suas proximidades. A primeira tentativa de amenizar a contaminação do substrato consistiu na retirada manualmente do óleo que se encontrava em superfície. Mas hoje, ainda sim, perceber-se a presença de óleo acumulado em várias partes do manguezal, principalmente em buracos (tocas) feitas por caranguejos (Figura 59). Sendo assim, percebe-se que a contaminação por óleo ou derivados, está fortemente presente no substrato do manguezal.

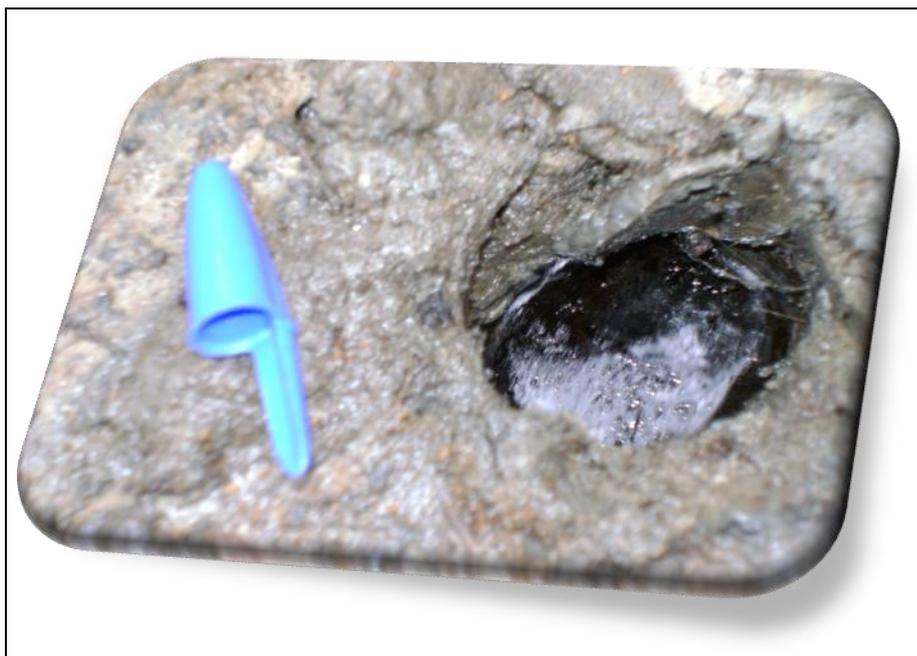


Figura 59. Acúmulo de óleo ou seus derivados em tocas de caranguejo no manguezal do estuário do rio São Paulo.

Cromatografia Líquida

Background

A amostra utilizada como *background* é produto da homogeneização de todas as amostras coletadas e representa uma amostra supostamente padrão desse substrato contaminado. Os resultados para cromatografia líquida dessa amostra *background* coletada no início do experimento apresentou 60% de hidrocarbonetos saturados, 27% de hidrocarbonetos aromáticos e 13% de compostos NOS (Figura 60). Os maiores teores de hidrocarbonetos saturados mostram que o óleo encontrado no substrato utilizado no experimento não se encontrava em alto estágio de biodegradação.

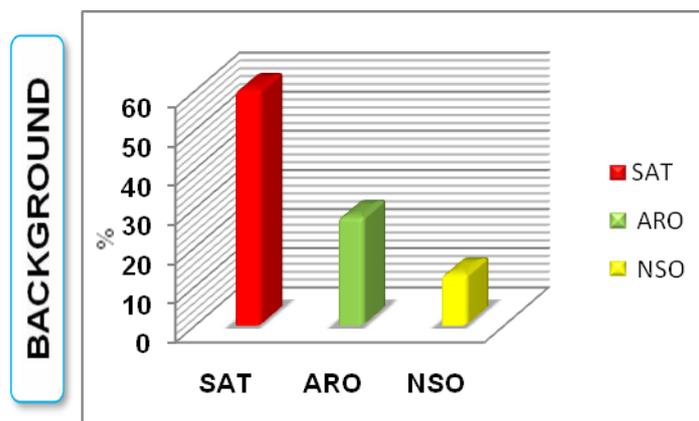


Figura 60. Gráfico esquemático representando em percentagens os teores de hidrocarbonetos saturados (SAT), aromáticos (ARO) e compostos NSO da amostra *background* utilizado no experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Segundo Tissot & Welte (1984) óleos biodegradados apresentam uma diminuição nos valores dos hidrocarbonetos saturados e conseqüentemente aumento dos compostos NSO. Óleos do tipo parafínicos como o encontrado no substrato deste manguezal apresentam uma variação de 50% à 88% de hidrocarbonetos saturados e 2,8% à 35% para os compostos NSO (GANGLIANONE & TRINDADE, 1988). Provavelmente com o processo de biodegradação essas variações se invertem, classificando o contaminante como biodegradado (Figura 61).

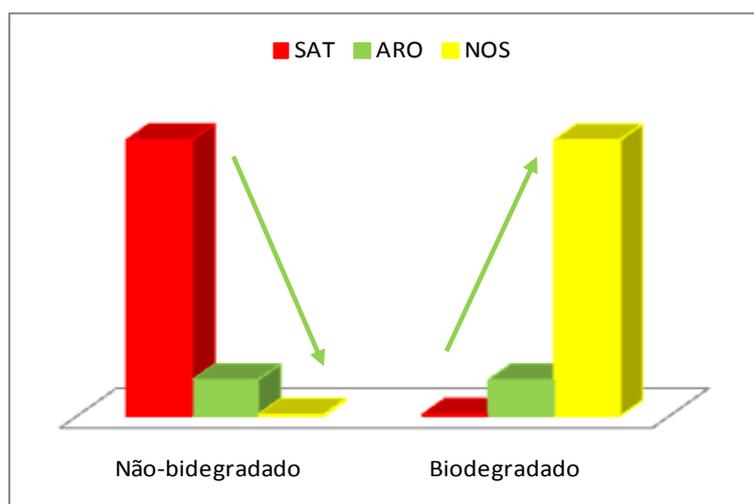


Figura 61. Figura ilustrativa do aumento dos compostos NSO e conseqüente diminuição dos hidrocarbonetos saturados, comportamento sofrido por um óleo em processo de biodegradação.

As Figuras 62, 64 e 66 apresentaram os resultados para análises de cromatografia líquida das amostras coletadas ao longo experimento.

Unidade de Simulação Referência

Os resultados das análises dos extratos de óleo extraídos das unidades de simulação referência, na sua grande maioria mostram que houve uma redução na concentração relativa da fração dos hidrocarbonetos saturados, seguida de uma redução relativa, menos expressiva, dos aromáticos, compensada pelo aumento relativo na fração dos compostos polares (NSO). Os resultados encontrados no presente trabalho comprovam a ordem da escala de biodegradação proposta por alguns autores, como McMillen *et al.* (1993), em que os saturados são os hidrocarbonetos mais suscetíveis à degradação microbiana, enquanto que os NSO são os mais persistentes.

Comparando as amostras das unidades referências (1, 2 e 3) coletadas ao longo do experimento, pode se observar um evidente enriquecimento dos compostos NSO e conseqüentemente redução do hidrocarbonetos saturados, principalmente quando comparamos os teores encontrados no 1º e 90º dia. A amostra referência 1 ao final do experimento reduziu significativamente os teores de hidrocarbonetos saturados de 33% para 2%, mas em todas as amostras analisadas pôde se observar altos teores de compostos NOS ao final do experimento (Figura 62).

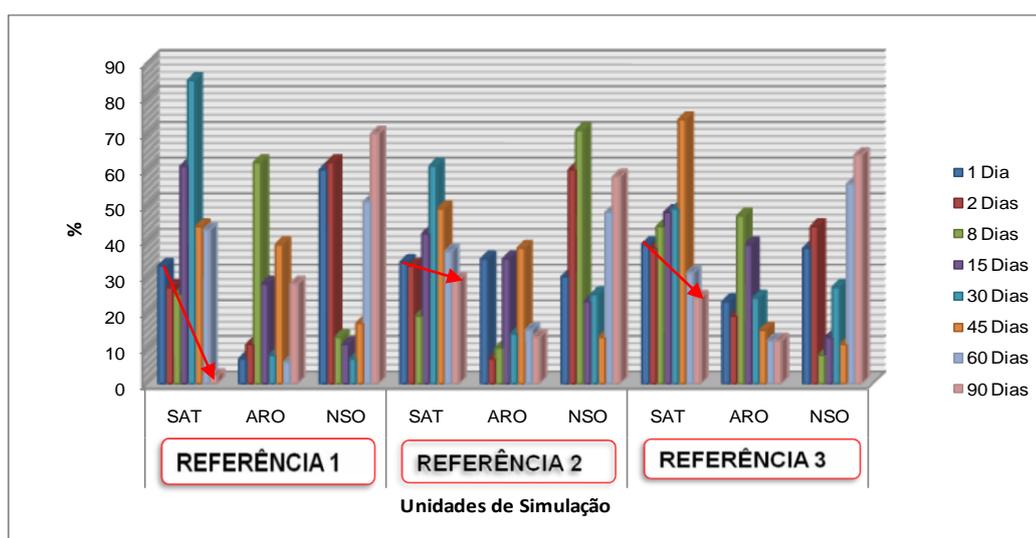


Figura 62. Gráfico representando em porcentagens os teores de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO nas unidades de simulação Referência (1, 2 e 3) ao longo do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo. Setas destacando a redução dos hidrocarbonetos saturados.

Algumas amostras coletadas no 8º, 15º, 30º, 45º e 60º dia apresentaram um aumento na porcentagem de hidrocarbonetos saturados, o que pode ser justificado pela heterogeneidade entre as amostras, inferindo que a homogeneização feita no substrato foi inadequada. Sendo assim, foi possível mostrar que mesmo homogeneizando o sedimento é possível encontrar valores diferenciados entre as amostras, dificultando o controle do processo de biorremediação. Essa heterogeneidade pode ser comprovada quando se compara os valores encontrados na amostra *background* com os das amostras referências do 1º dia do experimento, que teoricamente deveriam apresentar os mesmos teores, já que o objetivo de se homogeneizar o substrato coletado era de se obter uma amostra padrão (Figura 63).

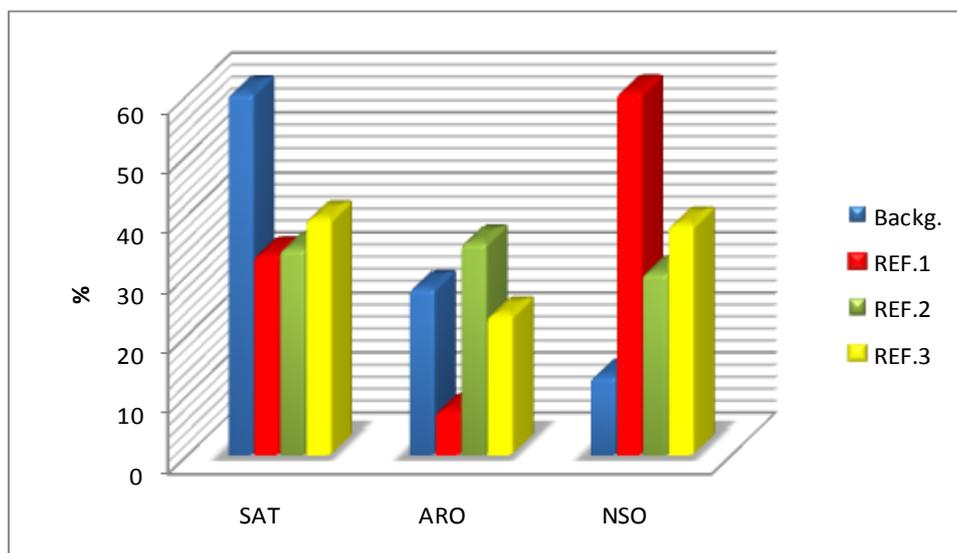


Figura 63. Gráfico comparando as porcentagens os teores de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO das unidades de simulação Referência (1, 2 e 3) no 1º dia de experimento e a amostra *background* do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Segundo Lee & Trembley (1993) a diluição dos contaminantes no substrato prejudica a biorremediação, tornando assim o processo de biorremediação inadequado.

Dessa forma, conclui-se que a homogeneização foi um ponto negativo neste experimento, além de não ter sido representativa como se esperava, conseqüentemente pode ter dificultado o processo de biodegradação do contaminante, já que com a homogeneização, o óleo se dilui no substrato mais rapidamente.

Ao longo do experimento as percentagens variaram entre 2% à 85% para hidrocarbonetos saturados, 2% à 62% para hidrocarbonetos aromáticos e 2% à 95% para compostos NSO (Anexo C.1).

Resultados do experimento realizado por Rosa (2003) em processos de biorremediação em água do mar também mostraram que em todas as amostras houve uma redução na concentração da fração dos hidrocarbonetos saturados, seguida de uma redução menos expressiva dos aromáticos, e conseqüentemente aumento na fração dos compostos polares (NSO).

Unidade de Simulação NPK

As análises dos extratos da unidade de simulação que utilizou o NPK como fertilizante estimulante mostraram também uma redução, após 90 dias, dos hidrocarbonetos saturados. A amostra NPK 3 reduziu os níveis de hidrocarbonetos saturados a 3% com um aumento dos compostos NSO em 95% (Figura 64). A redução preferencial dos hidrocarbonetos saturados pela comunidade microbiana já foi prevista por vários autores através de simulações laboratoriais e da análise de derrames de óleo em ambientes costeiros (WANG & BARTHA, 1990; WOLFE *et al.*, 1994; BLENKINSOPP *et al.*, 1997).

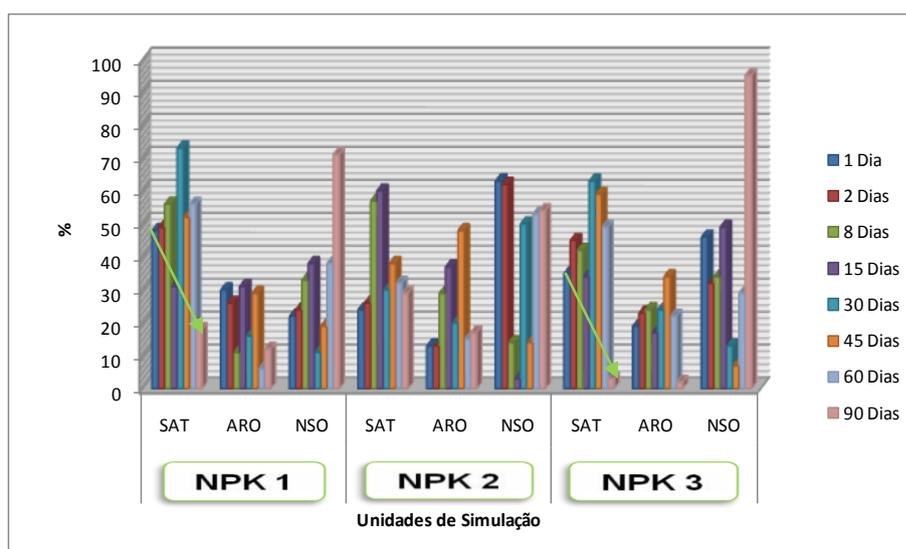


Figura 64. Gráfico representando em percentagens os teores de hidrocarbonetos saturados (SAT), aromáticos (ARO) e compostos NSO nas amostras das unidades de simulação com NPK (1, 2 e 3) do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo. Setas destacando a redução dos hidrocarbonetos saturados.

As unidades de simulação com NPK apresentaram uma redução mais expressiva dos hidrocarbonetos saturados, ao final do experimento, se mostrando mais eficiente quando comparada as unidades referência (Figura 65). Rosa (2003) menciona que a adição de nutrientes através do processo de bioestímulo se faz necessária para que os microrganismos acelerem o processo de biodegradação natural do óleo. Essa aceleração está diretamente relacionada com o aumento da população de microrganismos, presente no ambiente contaminado, que utilizam os hidrocarbonetos como fonte de energia. Igualmente, a redução dos teores de hidrocarbonetos aromáticos foram maiores nas unidades com NPK, quando comparadas as unidades referências.

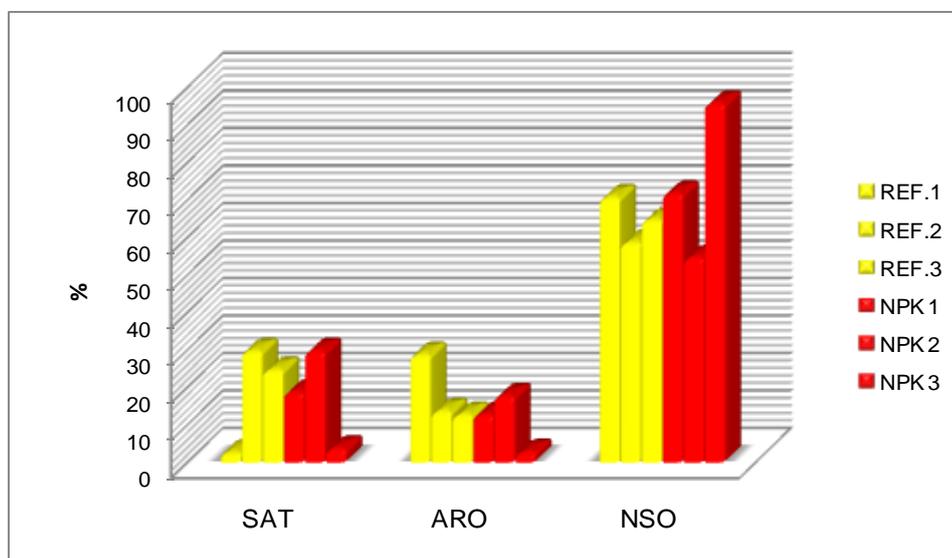


Figura 65. Gráfico comparando as porcentagens os teores de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO das unidades de simulação Referência (1, 2 e 3) e NPK (1, 2 e 3) no 90º dia de experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Amostras coletadas no 8º, 15º, 30º, 45º e 60º dia também apresentaram um aumento na porcentagem de hidrocarbonetos saturados, podendo ser justificado pelo mesmo motivo dado para os resultados das unidades referências.

Ao longo do experimento, as porcentagens variaram entre 3% e 73% para hidrocarbonetos saturados; entre 2% e 48% para hidrocarbonetos aromáticos; e entre 6% e 95% para compostos NOS (Anexo C.2).

Unidade de Simulação OSMOCOTE

As amostras da unidade de simulação, nas quais foi adicionado ao substrato o fertilizante OSMOCOTE, mostraram a mesma tendência de degradação dos hidrocarbonetos, com um aumento dos compostos NOS (Figura 66).

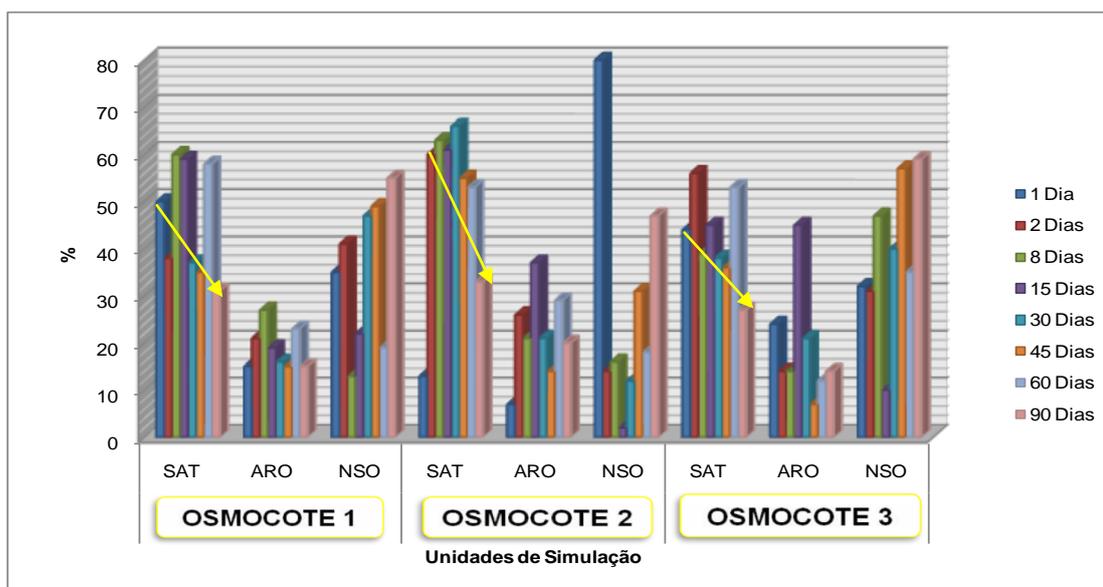


Figura 66. Gráfico representando em porcentagens os teores de hidrocarbonetos saturados (SAT), aromáticos (ARO) e compostos NSO nas amostras coletadas das unidades de simulação com OSMOCOTE (1, 2 e 3) ao longo do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Em comparação com os resultados já apresentados nas outras unidades de simulação, a unidade que contém o OSMOCOTE teve similar tendência da unidade referência, mostrando menor eficiência deste em comparação com o fertilizante NPK. Isso pode estar atribuído ao fato do OSMOCOTE, por ser envolvido por uma cápsula, liberar lentamente os nutrientes, necessitando de um tempo maior para atingir os níveis ideais para acelerar a biodegradação. Ao contrário do NPK, que por ser do tipo solúvel, se dilui facilmente, chegando a níveis ideais para acelerar o processo mais rapidamente. Sendo assim, faz-se necessário o controle dos teores de fósforo, amônia e nitrato em um intervalo de tempo menor para que se saiba exatamente em qual intervalo as unidades tratadas com NPK e OSMOCOTE atinge os níveis ideais necessários para acelerar o processo de degradação, e se realmente atingiu esse nível (Figura 67).

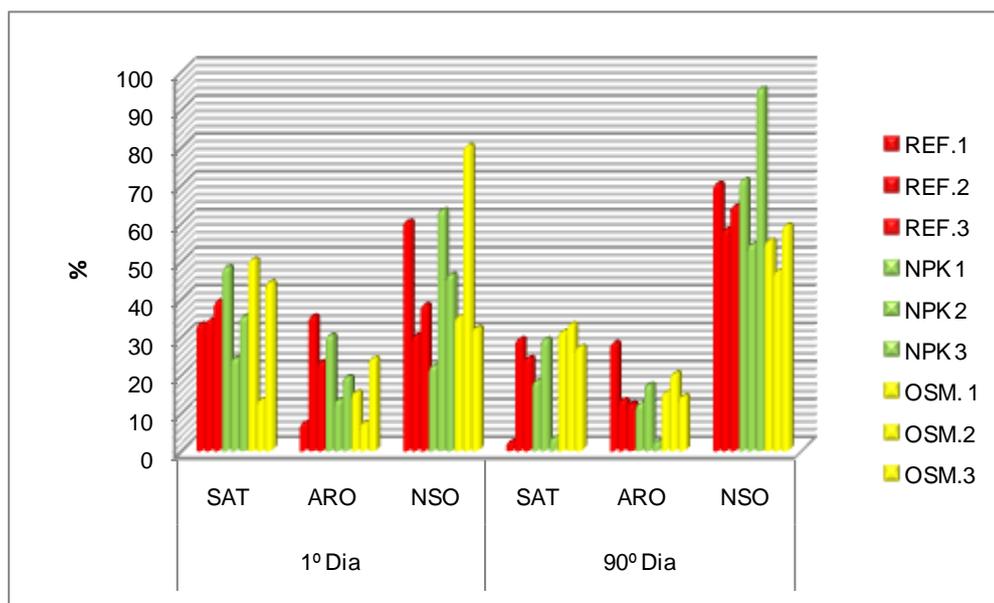


Figura 67. Gráfico comparando as porcentagens os teores de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO das unidades de simulação Referência (1, 2 e 3), NPK (1, 2 e 3) e OSMOCOTE no 1º e 90º dia de experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

As porcentagens ao longo do experimento variaram entre 13% e 66% para hidrocarbonetos saturados; entre 7% e 45% para hidrocarbonetos aromáticos; e entre 2% e 80% para compostos NSO (Anexo C.3).

Embora a utilização de fertilizantes com liberação lenta ter sido apontada por alguns autores (Olivieri *et al.*, 1976; Lee *et al.*, 1993) como uma possibilidade de prover contínua fonte de nutrientes para áreas contaminadas e ter demonstrado algumas melhorias na biodegradação do óleo, o maior problema está no longo período necessário para atingir a concentração de nutrientes, necessária para que a biodegradação possa ocorrer. Isso pode ser comprovada neste experimento onde os teores de nutrientes foram aumentando gradativamente e lentamente ao longo do experimento.

Unidade de simulação NPK e OSMOCOTE

As diferenças encontradas nos resultados analíticos mostram que nas amostras dos óleos extraídas das unidades de simulação, a degradação dos hidrocarbonetos saturados foi mais eficiente nas unidades com NPK, havendo uma maior redução relativa da porcentagem dos hidrocarbonetos saturados e o aumento da concentração relativa dos compostos polares (NSO) (Figura 68).

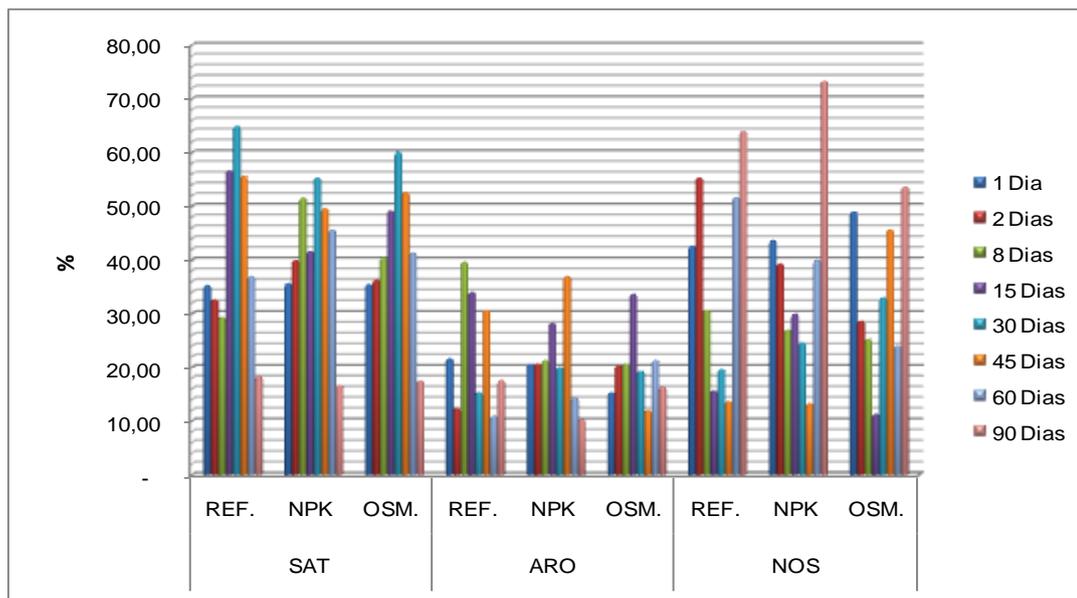


Figura 68. Gráfico com a média dos teores de hidrocarbonetos saturados (SAT), aromáticos (ARO) e compostos NSO das triplicatas (REF 1,2 e 3; NPK 1, 2 e 3; OSM.1, 2 e 3) ao longo do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Cromatografia Gasosa

Os cromatogramas das amostras coletadas no 1^o, 45^o e 90^o dia das unidades de simulação referências (1, 2, e 3), NPK (1, 2, e 3) e OSMOCOTE (1, 2 e 3) podem ser verificadas nas Figuras 67- 75 e os cromatogramas dos demais dias (2^o, 8^o, 15^o, 30^o 60^o) encontram-se em anexo (Anexo D. 1-D.8).

O processo de biodegradação provoca mudanças consideráveis na composição química, e por conseqüência nas propriedades físicas dos óleos derramados. A extensão e a taxa com que esses processos ocorrem, variam para cada tipo de óleo ou derivado, e são controladas também por condições ambientais (SOUZA, 2003).

Um dos parâmetros mais usados para o monitoramento da biodegradação de hidrocarbonetos saturados é a distribuição dos *n*-alcanos. Esses compostos são representados normalmente pelos maiores picos registrados num cromatograma. Entretanto, quando o óleo se encontra em processo de biodegradação ocorre uma redução desses compostos (*n*-alcanos), alterando o perfil cromatográfico.

A Figura 69 mostra o cromatograma do extrato orgânico da amostra do substrato, considerada *background*.

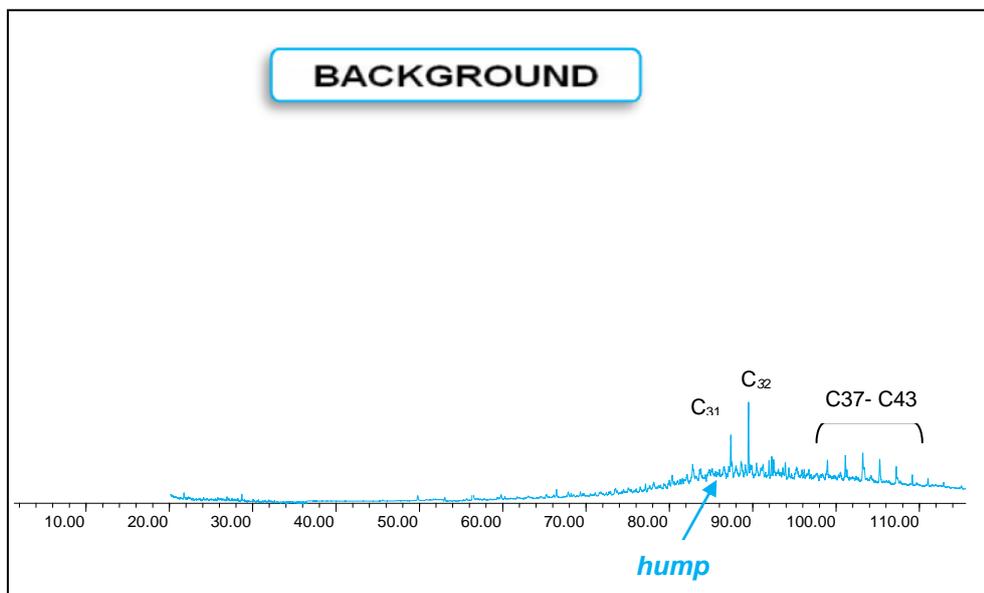


Figura 69. Cromatograma dos Hidrocarbonetos Saturados da amostra *background* do substrato do manguezal do estuário do rio São Paulo.

O perfil cromatográfico exibido é portanto do contaminante, onde se pode observar a ausência dos *n*-alcanos de baixo peso molecular, que devem ter sido evaporados, possivelmente logo após o derrame. Os demais *n*-alcanos, de maior peso molecular, além do processo de evaporação, devem ter sido também degradados pela biorremediação natural. Wang & Fingas (1994); Fingas (1996) afirmam que nos primeiros dias de um derrame a evaporação é responsável pela retirada de 40 a 70% dos hidrocarbonetos voláteis, para óleos médios e leves, o que também foi verificado por Souza (2003) em seu experimento com água de mar. Uma das principais mudanças ocorridas na composição química de óleos e seus derivados são perdas significativas dos *n*-alcanos de baixo peso molecular

Nota-se, pelo cromatograma da Figura 66, que alguns picos estão ainda mostrando uma série homóloga dos *n*-alcanos de mais alto peso molecular, porém com valores bastante baixos de abundância relativa, dada pelas alturas dos picos. O cromatograma apresenta uma linha com um “hump” (que representa uma mistura complexa de componentes do óleo não resolvidos pela cromatografia), o qual é característico de um óleo biodegradado; e a presença de alguns picos possíveis de hidrocarbonetos cíclicos, embora os da série homóloga sejam mais fáceis de identificar, como *n*-alcanos de mais alto peso molecular (C₃₁, C₃₂, C37- C43). A ausência dos *n*-alcanos e a elevação da linha de base são parâmetros que

comprovam que o óleo encontrado no substrato já se encontra em estágio de degradação.

A presença predominante da UCM (mistura complexa dos componentes do óleo não resolvidos pela cromatografia gasosa), em relação aos *n*-alcanos, está associada à redução completa destes, decorrente da atuação do processo de biodegradação (ROSA, 2001). Quando os níveis de intemperismo atingem de 20 a 25%, esses compostos não são mais detectados nas análises por cromatografia gasosa (WANG *et al.*, 1995; WANG & FINGAS, 1998).

Unidades de simulação Referência

As amostras de referência 1, 2 e 3 identificadas no 1º dia do experimento (Figura 70a, b e c), apresentam *fingerprints* (perfil cromatográfico) similares da amostra padrão do substrato. Este mesmo *fingerprint* se repete praticamente em todas as amostras de referência coletadas durante o experimento (Anexo D.1 e D.2). Em todos estes cromatogramas pode-se observar a ausência dos *n*-alcanos de baixo peso molecular e isoprenóides.

Nascimento (2006), em seu experimento simulando derrame de óleo no manguezal do Rio das Ostras, Rio de Janeiro em amostras de sedimento, verificou que após 56 dias de experimento não era mais possível identificar os *n*-alcanos nas unidades de simulação controle, onde se observou a degradação natural. Isso pode confirmar a ausência dos *n*-alcanos e isoprenóides nos primeiros dias de experimento, já que para o ensaio foi utilizado um substrato que já se encontrava contaminado há algum tempo e que provavelmente deve ter sofrido a ação dos processos intempéricos, principalmente evaporação.

Nos cromatogramas das unidades de simulação referências coletadas no 1º dia de experimento pode-se observar uma elevação na linha de base (UCM) com presença de *n*-alcanos de mais alto peso molecular (C₃₁, C₃₂, C₃₇- C₄₃), assim como o encontrado no perfil cromatográfico do substrato *background* apesar de apresentar picos maiores. Essas diferenças confirmam a heterogeneidade entre as amostras.

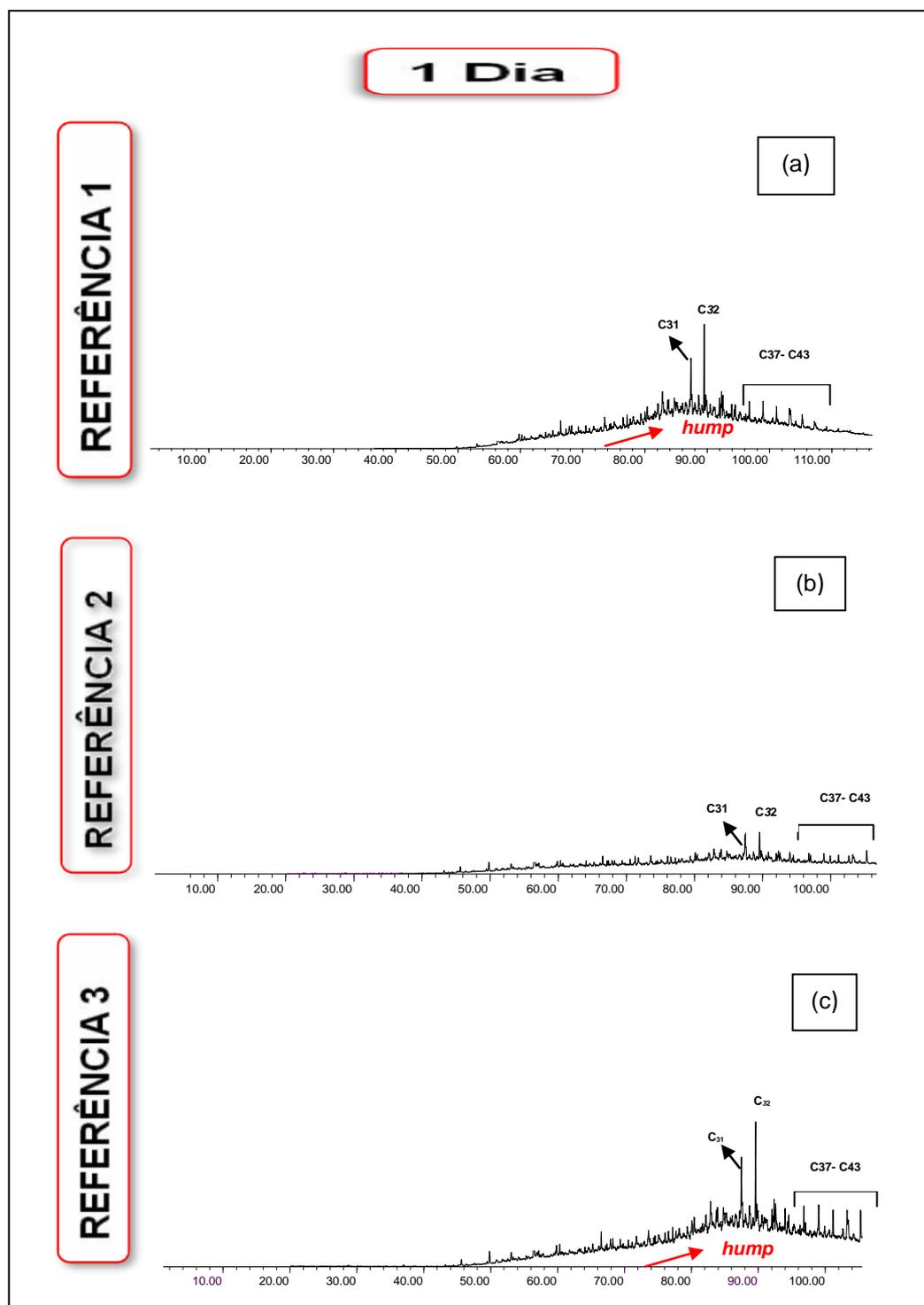


Figura 70. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades referências no 1º dia de simulação (a) referência 1, (b) referência 2 e (c) referência 3 do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Nas amostras do quadragésimo quinto dia do experimento se observa a redução dos picos do C_{31} , C_{32} e C_{37} - C_{43} , provavelmente devido a níveis muito baixos desses contaminantes (Figura 71a, b e c). Os teores de nutrientes (nitrato e amônia) também se apresentam em níveis baixos nesse dia, isso provavelmente pelo consumo da população microbiana, aumentando assim a taxa de degradação. Em contrapartida os níveis de fósforo se encontraram em níveis elevados durante todo o experimento.

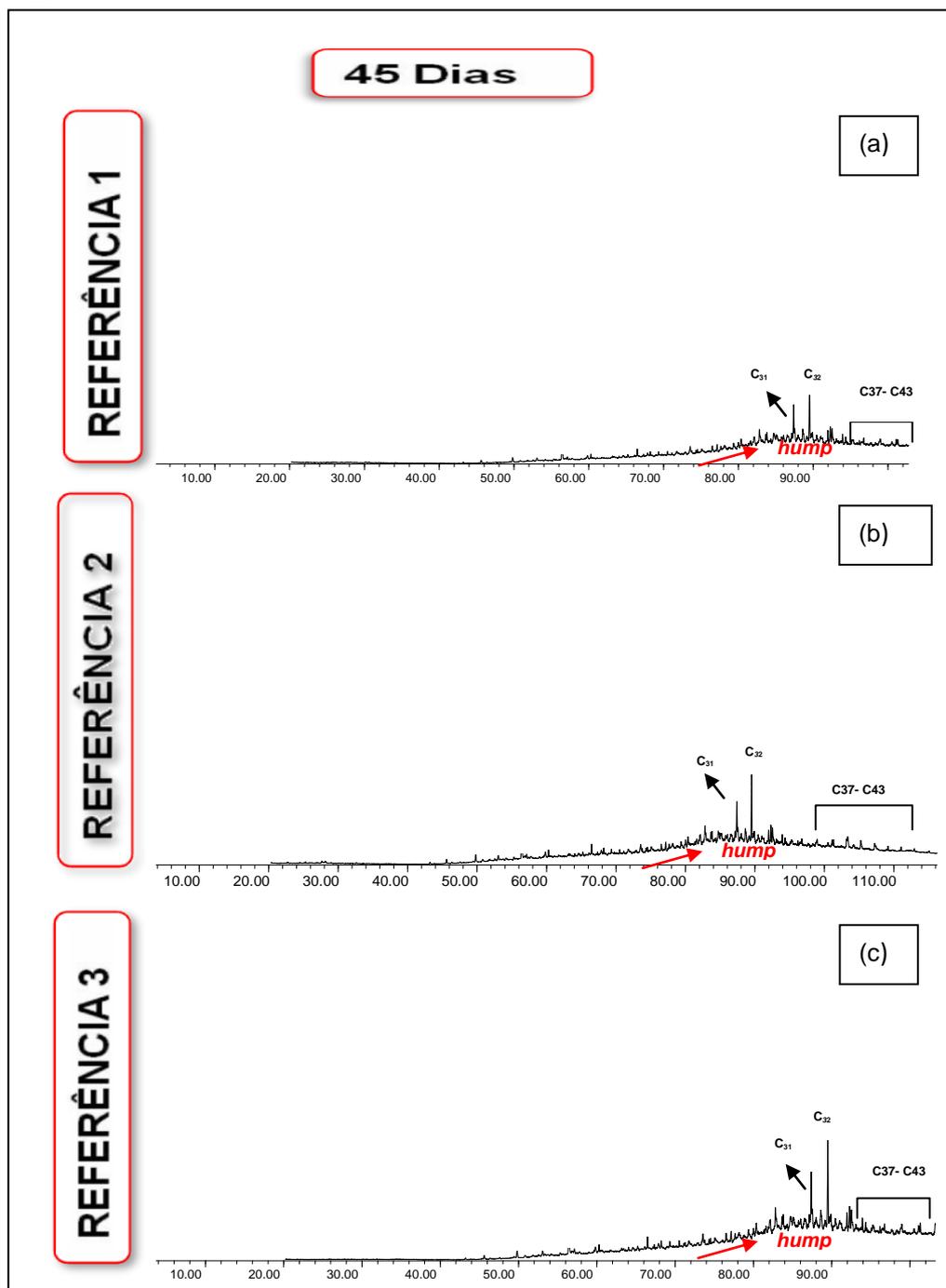


Figura 71. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades referências no 45º dia de simulação (a) referência 1, (b) referência 2 e (c) referência 3 do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Como pode ser observado na Figura 72a, b e c, referente ao nonagésimo dia do experimento, as amostras apresentaram além da redução dos picos a ausência de alguns *n*-alcanos de alto peso molecular identificados nos primeiros dias do experimento.

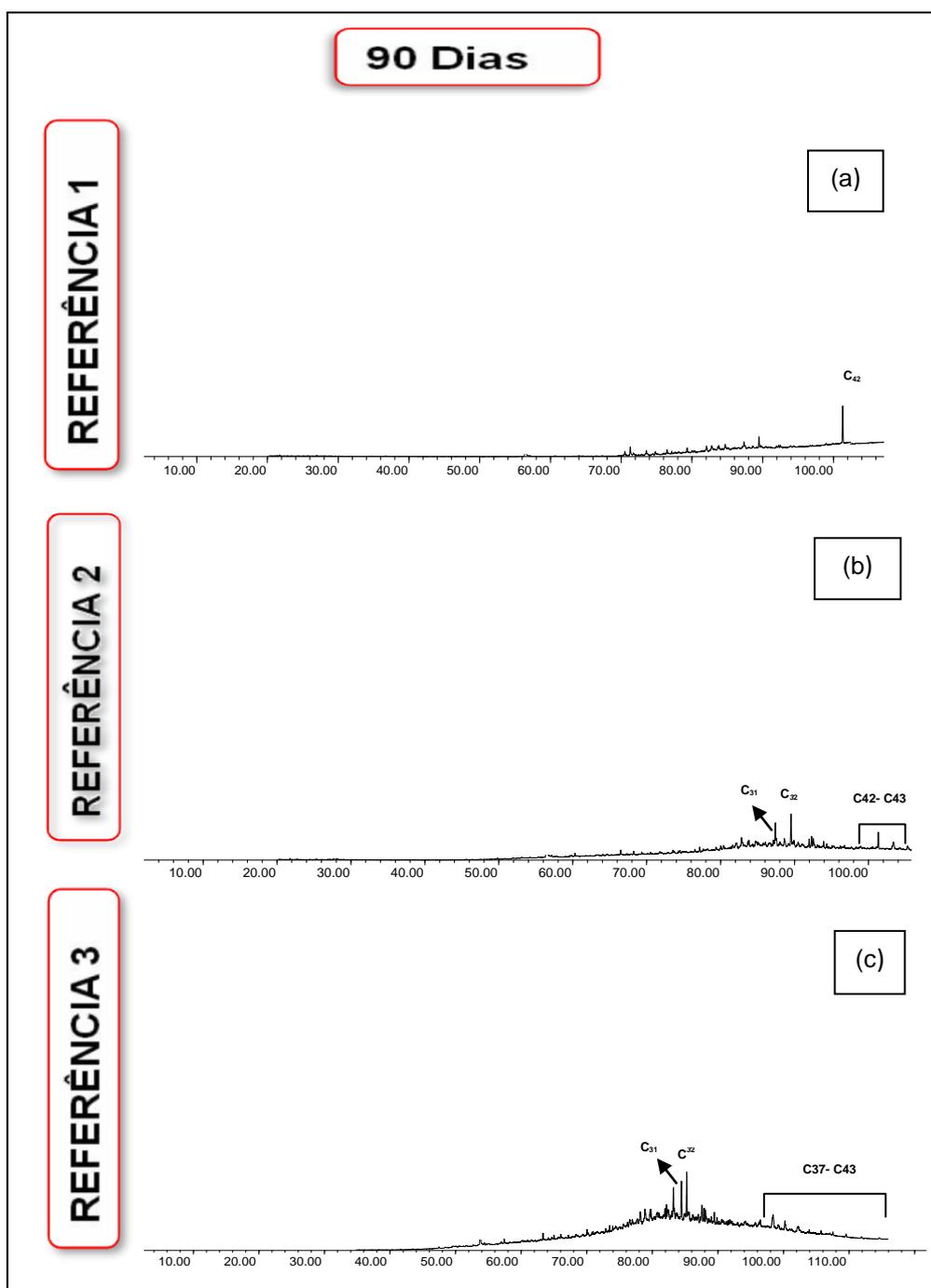


Figura 72. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades referências no 90º dia de simulação (a) referência 1, (b) referência 2 e (c) referência 3 do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Os resultados das unidades referência, no geral, sugerem a ocorrência de biodegradação natural. Porém a biodegradação natural é considerada como um processo lento. Desta forma, a biorremediação que é a aceleração da biodegradação, pode dar uma resposta mais rápida e necessária ao meio ambiente. Sendo assim em casos de grandes derrames, a atenuação natural, não seria adequada, já que o tempo necessário para que ocorresse a biodegradação do óleo seria bem maior, trazendo grandes prejuízos ao ecossistema atingido.

Unidades de Simulação NPK

Os perfis cromatográficos do primeiro dia de experimento, para as amostras das unidades com NPK (Figura 73a, b e c), apresentam pequenas variações.

Estes perfis são bem parecidos com os encontrados nas unidades referências, com ausência dos *n*-alcanos de baixo peso molecular e presença de *n*-alcanos de alto peso molecular (C_{31} , C_{32} e C_{37} - C_{43}), confirmando que o óleo extraído do substrato já se encontra em processo de biodegradação.

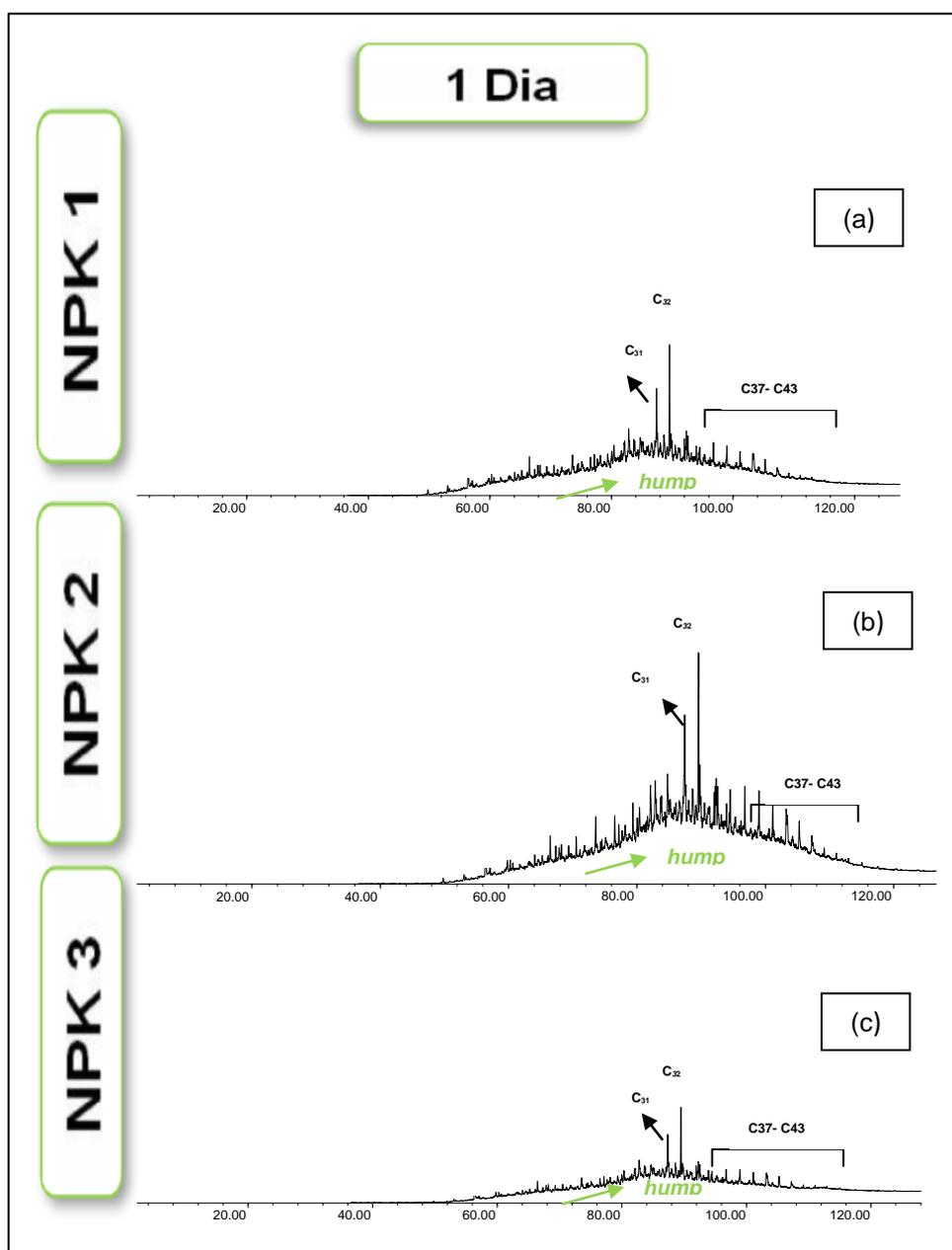


Figura 73. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades NPK, no 1º dia de simulação (a) NPK 1, (b) NPK 2 e (c) NPK 3 do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Os cromatogramas do quadragésimo quinto dia de experimento apresentam, para as amostras das unidades com NPK (Figura 74a, b e c), uma redução relativa das alturas dos picos ou ausência de alguns *n*-alcanos de alto peso molecular identificado no primeiro dia de experimento.

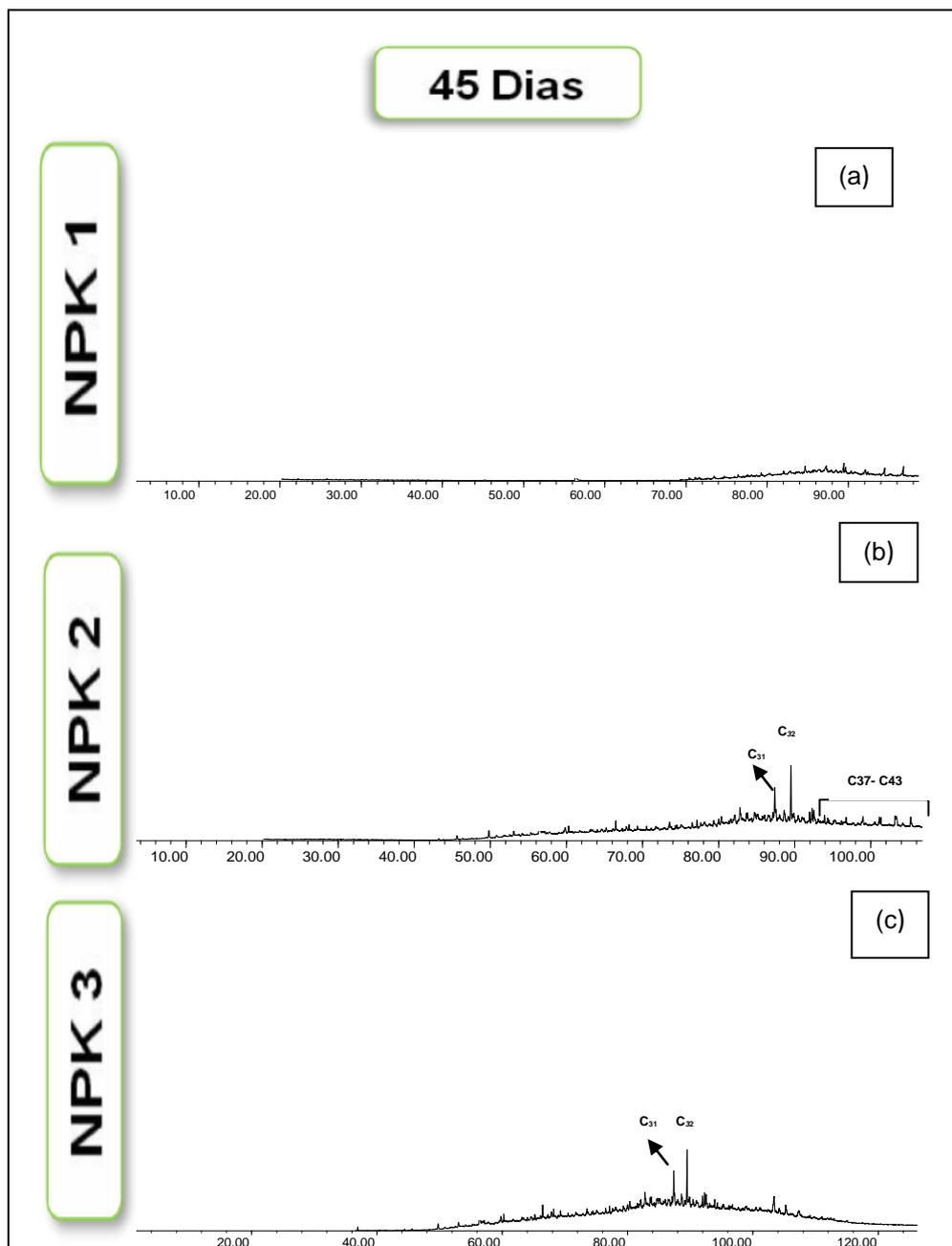


Figura 74. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades NPK no 45º dia de simulação (a) NPK 1, (b) NPK 2 e (c) NPK 3 do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Estudos realizados por Souza (2003) e Rosa e Trigüis (2006) mostraram que a biorremediação com a utilização do fertilizante NPK se apresentou eficiente na degradação completa de alcanos normais e ramificados em água do mar. Alguns autores relatam que a taxa de biodegradação são similares em água e sedimento. Nascimento (2006), observou que por volta do 7º dia de experimento já não era possível identificar a presença dos *n*-alcanos e isoprenóides.

O consumo dos nutrientes (nitrato e amônia) no 45º dia de experimento foi aumentado consideravelmente, justificando a diminuição dos picos dos *n*-alcanos de alto peso molecular, ao contrário dos teores de fósforo que se mantiveram elevados durante todo o experimento. Nascimento (2006), também verificou o acúmulo do íon fosfato ao longo 21 dias de experimento decaindo nos últimos dias de experimento (56 dias).

Nos cromatogramas do nonagésimo dia de experimento, para as amostras das unidades com NPK (Figura 75a, b e c), pode-se observar além da redução dos picos a ausência de *n*-alcanos alto peso molecular, em relação ao 1º e 45º dia.

Estudos realizados por Atlas & Bartha (1972) revelaram que a adição individual do nitrato ou fosfato causou pouca melhora no estágio de biodegradação, mas quando adicionado em conjunto, eles aumentaram a biodegradação de petróleo e de mineralização de 70% e 42%, respectivamente.

A diminuição na degradação dos hidrocarbonetos no 90º dia pode estar relacionada com a deficiência dos nutrientes já que se observou uma redução das concentrações dos nutrientes nesse dia.

Bergstein & Vestal (1978), concluíram que a utilização de fertilizantes solúveis constitui em uma ferramenta útil para aumentar a biodegradação de petróleo bruto e que sem adição de nitrogênio e fósforo a biodegradação de hidrocarbonetos é limitada. Com a utilização de fertilizantes observa-se um aumento rápido no número de bactérias seguido por um rápido desaparecimento de *n*-alcanos e isoprenóides.

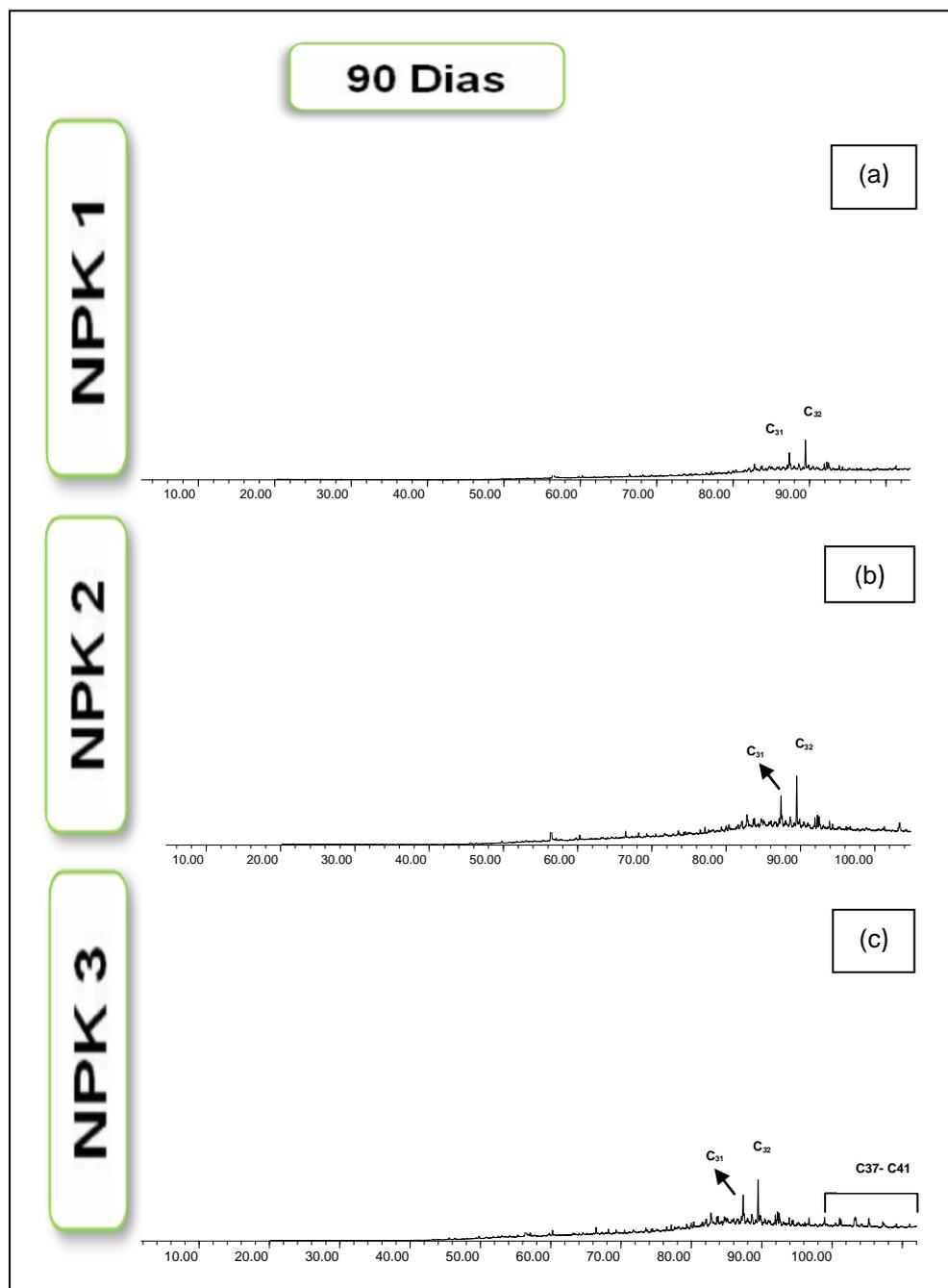


Figura 75. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades NPK no 90º dia de simulação (a) NPK 1, (b) NPK 2 e (c) NPK 3 do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Unidades de simulação OSMOCOTE

As unidades de simulação em que se adicionou OSMOCOTE, estes apresentaram uma variação no perfil cromatográfico um pouco diferenciado daqueles observados no material referência e nas unidades com NPK, desde o primeiro dia do experimento (Figura 76a, b e c). Pode ser observado que o óleo

extraído se encontra em um estágio diferenciado com uma menor elevação da linha de base, mas com ausência de *n*-alcanos de baixo peso molecular. Estudos realizados por Xu *et al.*, (2004) testando a utilização do fertilizante OSMOCOTE, apresentaram um aumento drástico nas atividades metabólicas dos microrganismos, acelerando a biodegradação dos hidrocarbonetos.

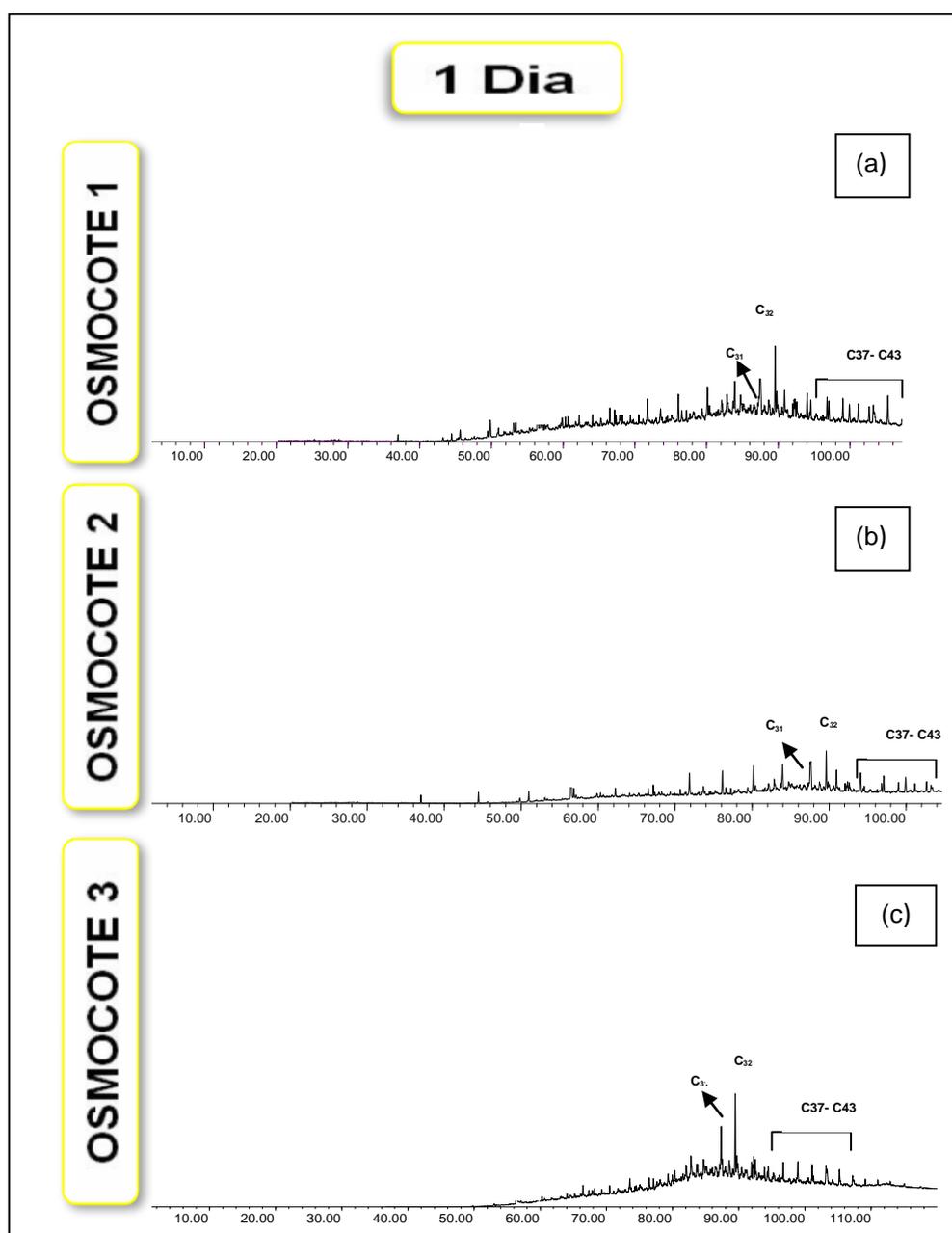


Figura 76. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades OSMOCOTE no 1º dia de simulação (a) OSMOCOTE 1, (b) OSMOCOTE 2 e (c) OSMOCOTE 3 do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Os cromatogramas do quadragésimo quinto dia das amostras das unidades com OSMOCOTE (Figura 77a, b e c), não apresentam mudanças significativas em

seus perfis. Não se pode observar redução significativa nos picos. Os resultados dos teores de nitrato, amônia e fosfato podem confirmar o baixo nível de degradação, já que se observou acúmulo desses nutrientes a partir do 15º Dia.

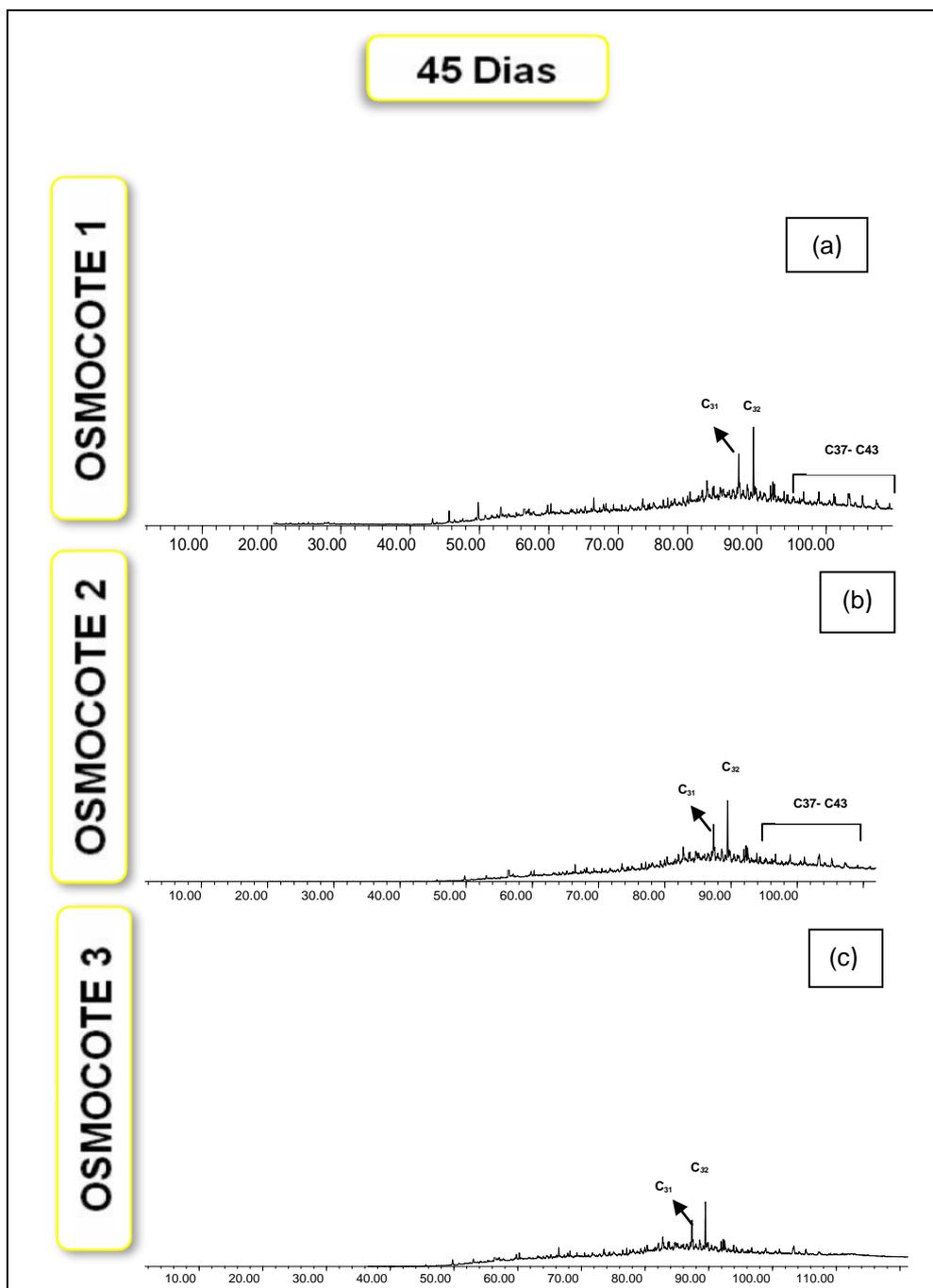


Figura 77. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades OSMOCOTE no 45º dia de simulação (a) OSMOCOTE 1, (b) OSMOCOTE 2 e (c) OSMOCOTE 3 do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Olivieri *et al.* (1976), em seus estudos com aplicação de fertilizantes de liberação lenta contendo parafina apoiado de magnésio e fosfato de amônio como o

ingrediente ativo para estimular a biodegradação de petróleo, relataram que a biodegradação do petróleo na água do mar foi consideravelmente reforçada por adição do fertilizante. Após 21 dias, 63% do petróleo tinham desaparecido quando o fertilizante foi adicionado, em comparação com 40% em uma área controle. No entanto, no presente experimento, no nonagésimo dia pôde-se observar um perfil cromatográfico (Figura 78a, b e c) similar ao do 45º dia, sugerindo-se que o OSMOCOTE não aumentou significativamente a taxa de degradação, comprovada também pelos resultados da cromatografia Líquida.

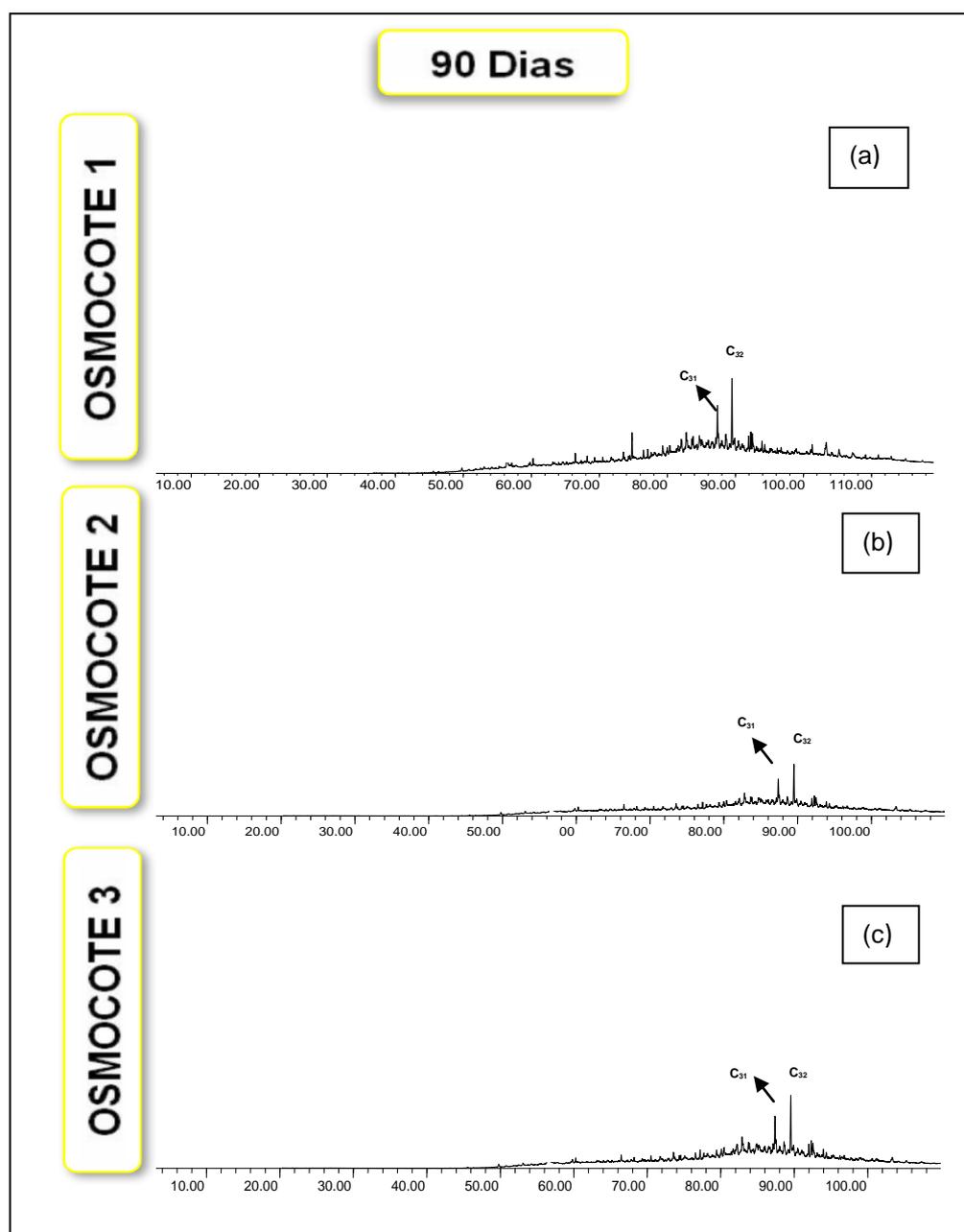


Figura 78. Cromatogramas dos hidrocarbonetos saturados das amostras extraídas das unidades OSMOCOTE no 1º dia de simulação (a) OSMOCOTE 1, (b) OSMOCOTE 2 e (c) OSMOCOTE 3 do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Nesse período os níveis de nutrientes também se encontraram elevados quando comparados aos outros dias de experimento, provavelmente pela não utilização desses nutrientes pela comunidade microbiana.

Em comparação com o fertilizante NPK, o OSMOCOTE se mostrou menos eficiente, do que nas apresentadas pelas unidades referências. Até os resultados obtidos nas unidades referência se mostraram mais eficientes. Isso talvez possa ser explicado pela disponibilidade dos nutrientes, já que o OSMOCOTE libera aos poucos os nutrientes, ou talvez tempo tenha sido insuficiente para se comprovar a eficiência do fertilizante.

Ao longo de todo experimento o NPK se mostrou mais eficiente na redução dos teores de hidrocarbonetos. Comparando os cromatogramas do 90º dia (Figura 72, 75 e 78), pode-se observar a eficiência desse fertilizante tanto em relação ao OSMOCOTE como em relação às amostras das unidades referências.

O experimento de processos de biorremediação em substrato de manguezal afetado por óleo, utilizando fertilizantes do tipo NPK e OSMOCOTE, indicou que o NPK foi mais eficiente ao longo de todo processo.

CAPÍTULO VIII

Considerações Finais

VIII. 1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Buscando conhecer a eficiência dos fertilizantes NPK e OSMOCOTE como estimulantes na aceleração da degradação dos hidrocarbonetos saturados em sedimento de manguezal impactado por atividades petrolíferas, esta pesquisa baseada em estudos já realizados internacionalmente, atingiu o objetivo inicialmente proposto.

Os resultados para identificação da origem do contaminante exudado no sedimento do manguezal do estuário do rio São Paulo demonstraram características semelhantes às encontradas em óleos da Bacia do Recôncavo (óleo parafínicos). Porém, com estes estudos não foi possível identificar a origem real das exudações, sendo possível somente sugerir semelhança com óleos da Bacia do Recôncavo.

O sedimento utilizado no experimento apresentou características com predominância de areia muito fina, do tipo polimodal e moderadamente selecionada, com textura classificada como areia lamosa. Ao longo do experimento, as amostras coletadas nos intervalos de 1, 45 e 90 dias se mantiveram sem alteração na distribuição dos teores das partículas que compõe o sedimento estudado.

O monitoramento dos parâmetros físico-químicos mostrou condições favoráveis para o processo de biorremediação durante todo o experimento, evidenciando que esses não foram fatores limitantes para o processo de biorremediação no presente trabalho.

Os resultados da avaliação dos compostos inorgânicos mostraram que o fósforo foi o único nutriente que continuou sendo liberado uniformemente ao longo de todo o experimento, tanto nas unidades com NPK como nas unidades com OSMOCOTE, atribuído ao consumo desse nutriente ocorrer nos primeiros dias de biodegradação dos hidrocarbonetos, o que não ocorreu no presente trabalho devido ao estágio de degradação que óleo se encontrava. Já os resultados para os íons amônia e nitrato mostraram altos teores nos primeiros 08 dias, sendo consumido a partir do 15º dia de experimento nas unidades que continham NPK, podendo ser atribuído a solubilidade desse fertilizante. Nas unidades com OSMOCOTE os resultados mostraram um aumento crescente a partir do 15º dia de experimento,

confirmando a sua liberação lenta. Os teores de amônia foram bem maiores que os de nitrato, sugerindo que esta é a fonte principal de nitrogênio neste experimento. Os resultados também apontam um desequilíbrio das concentrações de nutrientes sugerindo um maior controle destes.

Através da cromatografia líquida, observou-se uma redução relativa na fração dos hidrocarbonetos saturados e um enriquecimento relativo em compostos polares (NSO), em todas as unidades de simulação, com redução do percentual de hidrocarbonetos saturados em até 3%. Comparando todas as unidades de simulação (referência, NPK e OSMOCOTE), a unidade que contém o OSMOCOTE teve similar tendência das unidades referência, mas quando comparado as unidades com NPK, mostrou-se menos eficiente.

A análise por cromatografia gasosa das amostras de óleo extraída das unidades de simulação com NPK mostraram que a atuação da biodegradação nessas amostras foi mais significativa do que nas amostras extraídas das unidades de simulação com OSMOCOTE. Considera-se que ao final da simulação houve a degradação quase completa dos *n*-alcanos de alto peso molecular nas unidades com NPK, enquanto que nas unidades com OSMOCOTE não se observou diferenças significativas no perfil cromatográfico ao longo do experimento, podendo ser atribuída a velocidade com que os nutrientes são solubilizados.

Os resultados encontrados para os testes de comparação entre os fertilizantes NPK e OSMOCOTE indicaram que há eficiência do NPK na aceleração do processo de biodegradação, podendo ser indicativo de futuras utilizações no âmbito da biorremediação em áreas impactadas por atividades petrolíferas.

Os resultados apontam para um desequilíbrio nos nutrientes, pela falta de entendimento nas concentrações dos mesmos, com a utilização do NPK e do OSMOCOTE.

VIII. 2. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir das análises dos resultados obtidos e em função da complexidade com o controle do processo de biorremediação em ambiente de manguezal, recomenda-se para futuras pesquisas:

- Um melhor controle sobre os nutrientes, com a finalidade de poder caracterizá-los mais adequadamente.
- Estudar a necessidade de reposição dos nutrientes ao longo do experimento.
- Utilizar-se do estudo de outros compostos (biomarcadores, hidrocarbonetos aromáticos), para confirmação da eficiência dos fertilizantes.
- Desenvolver estudos envolvendo o controle da solubilidade de nutrientes, utilizando, por exemplo, suportes constituídos de polímeros naturais biodegradáveis, como a quitosana, extraída da carapaça de crustáceos, que já vem sendo produzida no Brasil.
- Avaliar a atuação de outros agentes biorremediadores, que venham a melhorar a eficiência do processo de biodegradação.
- Realizar um melhor delineamento amostral.
- Testar o processo de bioestímulo juntamente com outros processos de biorremediação, como o bioaumento.
- Realizar maiores investigações sobre a microbiota do material, como também a atividade microbiana aliada aos estudos de degradação.
- Desenvolver pesquisas com intuito de obter a degradação dos componentes do petróleo (Saturados, Aromáticos e NSO) na sua totalidade.
- Avaliar o efeito da biorremediação, em especial o bioestímulo, “*in situ*” numa área restrita, depois da devida autorização dos órgãos ambientais competentes.
- Reavaliar o tipo de amostragem que deve ser efetuada em substrato de manguezal contaminado, principalmente com desvios de teores na vertical e horizontal.

VIII. 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ABBAS, Marilda Z. M.. **A biorremediação como ferramenta para a minimização de problemas ambientais: Relatório do curso de especialização em Gerenciamento Ambiental.** Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2003. 18p

ABOUL-KASSIM, Tarek A. T.; SIMONEIT, Bernd R. T.. Lipid geochemistry of surficial sediments from the coastal environment of Egypt I. Aliphatic hydrocarbons: characterization and sources. **Marine Chemistry, USA**, v. 54, p.135-158, set. 1996.

ALLINGER, N. *et al.* **Organic Chemistry 54.** McGraw-Hill Inc, 2nd ed. worth Publishers, New York, 1976. 550p

ALMEIDA, Tatiana da Cruz. **Ecosistemas de Manguezal: Aspectos Gerais e principais Estressores, Salvador - BA.** 2001. 65f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Católica do Salvador, Salvador, 2001.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE (API). **Fate of spilled oil in marine waters: Where does it go? What does it do? How do dispersants affect it?.** In: API Publication Number 4691, USA, 1999.

ANP (2002) – Anuário estatístico brasileiro do petróleo e do gás natural – 135p.

ARAÚJO, Flavia C. D.. **Caracterização Geoquímica de óleos das Bacias Camamu-Almada e Jequitinhonha, Bahia.** 2007. 182f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2007.

ARAUJO, Flavia Cristina. **Caracterização geoquímica de óleos das Bacias Camamu-Almada e Jequitinhonha, Bahia.** 2007. 182 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

ARAUJO, B. R. N. **Diagnostico Geoambiental de Zonas de Manguezal do Estuário do Rio Itanhem, Município de Alcobaca-Região extremo Sul do Estado da Bahia.** 2000. 185 f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica), Universidade da Bahia, Salvador-BA, 2000.

ASIF, M.; FAZEELAT, T.; GRICE, K.. Petroleum Geochemistry of Potwar Basin, Pakistan: oil-oil correlation by saturated and aromatic hydrocarbons distributions. **Organic Geochemistry** **40**, Austrália, p. 301-311, Mar 2009.

ATKINS, P. W.. **Moléculas**. São Paulo: EDUSP, 200 p., 2000.

ATLAS, R. M.; RAYMOND, R. L.. Stimulated petroleum biodegradation. **Critical Reviews In Microbiology**, Louisville, v. 5, n. 4, p.371-386, 1977.

ATLAS, R. M.. Bioremediation. **Chemical & Engineering News**, 3 : p. 32- 42, 1995a.

ATLAS, R. M.. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, 31 (4), p.178-182, 1995b.

ATLAS, R. M.. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, Louisville, v. 45, n. 1, p.180-209, mar. 1981.

ATLAS R.M.; BARTHA R.. Abundance, distribution and oil biodegradation potential of microorganisms in Raritan Bay. **Environ. Pollution** **4**. p.291–300, 1973.

ATLAS R.M, BARTHA R. Degradation and mineralization of petroleum in sea water: limitation by nitrogen and phosphorous. **Biotechnol Bioeng** **14**(3), p.309–318, May 1972.

AZEVEDO, V. L. C.. **Tecnologias para remediação de solos Contaminados por derivados de petróleo. Estudo de caso: as tecnologias da biopilha e Dessorção térmica para remediação de solos Contaminados por óleo combustível**. 2006. 49 f. Monografia (3) - Curso de Especialização em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais No Processo Produtivo, Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

BAHIA. Centro de Estatística e Informações, Companhia de Desenvolvimento da Região Metropolitana de Salvador (BA). Informações básicas dos municípios baianos: Região Metropolitana de Salvador – CEI/CONDER, 1994a.

BAHIA. Secretaria do Planejamento, Ciência e Tecnologia Companhia de Desenvolvimento da Região Metropolitana de Salvador (BA). Banco Mundial. **Plano Diretor de Limpeza Urbana-PDLU: Candeias, Madre de Deus e São Francisco do Conde**. Salvador , 1994b v.1 tomo III, 1994b.

BAHIA. Centro de Recursos Ambientais. **Avaliação da Qualidade das Águas costeiras da Baía de Todos os Santos**: Relatório técnico, Avaliação ambiental. Salvador, 2º semestre 2002.

BAHIA. Secretaria de Infraestrutura – Secretaria do Planejamento Ciência e Tecnologia – Consórcio HIDROS CH2M Hill / CRA - Centro de Recursos Ambientais – **Modelamento e Avaliação Ambiental**: Relatório de Diagnóstico da Qualidade das Águas da Baía de Todos os Santos, vol. III. Salvador, 122p, 2000.

BALBA, M.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R.. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of microbiological Methods** **32** , Kuwait, p.155-164, Abr 1998.

BANDARANAYAKE W.M.. Mangroves and their natural products. *Non-Wood News* p.24-25, 1998.

BARAKAT A.O. *et al.* Application of Petroleum Hydrocarbon Chemical Fingerprinting in Oil Spill Investigations. Gulf of Suez, Egypt II. **Spill Science & Technology Bulletin** **7**, Alexandria, p. 229–239, Dec 2002.

BARBOSA, O. C. D. R.. **Avaliação dos aportes de hidrocarbonetos à lagoa dos patos RS - Brasil**. 2005. 107f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica), Universidade de Rio grande, RS, 2005.

BARKER, C.. Organic Geochemistry in Petroleum Exploration. **American Association of Petroleum Geologists** **29**. Tulsa, Oklahoma, 1979.

BAYARDINO, R. A.. **A Petrobrás e o desafio da sustentabilidade ambiental**. 2004. 65f. Monografia (Graduação em economia). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

BAZYLINSKI, D. A.; WIRSEN, C. O.; JANNASCH, H. W.. Microbial utilization of naturally occurring hydrocarbons at the Guaymas Basin hydrothermal vent site. **Appl. Environ. Microbiol** **55**, Massachusetts, p. 2832-2836, Nov 1989.

BEKINS, BARBARA A.; BRUCE E; JACQUELINE A.. Natural Attenuation Strategy for Groundwater Cleanup Focuses on Demonstrating Cause and Effect. **Originally published in Eos, Transactions**, AGU, pp. 53, 57-58, 2001.

BENTO, D. M.. **Análise Química da Degradação dos Hidrocarbonetos de Óleo Diesel no Estuário da Lagoa dos Patos – Rio Grande/RS.** 2005. 112f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2005.

BENTO, F. M. *et al.* Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology** **96**, p. 1049–1055, 2005.

BERGER, T. M.. **Biorremediação de solos contaminados com Hidrocarbonetos Totais de Petróleo – Enfoque na aplicação do processo Terraferm.** 2005. 86f Tese (Doutorado em Ecologia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

BERGSTEIN P.E.; VESTAL J.R.. Crude oil biodegradation in arctic tundra ponds. **Arctic** **31**. p.159-16, 1978.

BERTRAND, J. C. *et al.* Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. **Biotechnology Letters** **5**, Marseille, p. 567-572, Aug 1983.

BÍCEGO, M.C.. **Contribuição ao estudo de hidrocarbonetos biogênicos e do petróleo no ambiente marinho.** 1988. 156f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.

BIOMONITORAMENTO E MEIO AMBIENTE LTDA, BMA. **Monitoramento da recuperação do manguezal adjacente a Estação Pedra Branca, Campo de Candeias – Ba - Petrobrás/ UN-BA:** Relatório Técnico. Salvador, 138p. out, 2005.

BLEINKINSOPP, S.*et al.* The freshwater biodegradation Potential of Nine Alaskan Oils. **Proceedings of the 20 th Arctic and Marine Oilspill Program Technical Seminar**, Canada, p.581-608, 1997.

BOEHM, P.D., FIEST D. L.. Subsurface distribution of petroleum from an offshore well blowout. The IXTOC I blowout, Bay of Campeche. **Environ. Sci. Technol.**, **16**(2), p. 67-74, 1982.

BORDENAVE S, JÉZÉQUEL R. *et al.* Degradation of the 'Erika' oil. **Aquat Living Resour** **17**, p.261–267, 2004.

BORGES, R. M. H.. **Biodegradação em solo argiloso contaminado com petróleo**. 2001.180f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

BORIN, J. E.. **Estudo geoquímico de óleos do campo de Marlim, bacia de campos, síntese de biomarcadores esteranos aromáticos**. 2003. 139f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.

BOULOUBASSI, I.; SALIOT, A.. Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers (NAH, LAB, PAH). *Oceanologica Acta* **16**, p.145-161., Jul 1993a.

BOULOUBASSI, I. & SALIOT, A. Investigation of anthropogenic and natural organic inputs in estuarine sediments using hydrocarbon markers (NAH, LAB, PAH). *Oceanologica Acta* **16**, 145-161, 1993b.

BORRESEN, M.H.; RIKE A.G.. Effects of nutrient content, moisture content and salinity on mineralization of hexadecane in an Arctic soil. *Cold Reg. Sci. Technol.* 48:p.129–138, 2007.

BOSSERT, I.; BARTHA, R.. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: **Petroleum microbiology**, Atlas, R. M. (ed). New York : Macmillan Publishing Co, p.434-476, 1984.

BRADDOCK, J. F.; LINDSTROM, J. E.; BROWN, E. J.. Distribution of hydrocarbon-degrading microorganisms in sediments from Prince William Sound, Alaska following the Exxon Valdez oil spill. *Marine Pollution Bulletin* 30, Alaska, p.125-132, Feb. 1995.

BRAGG, J. R.; OWENS, E. H.. Clay-oil flocculation as a natural cleansing process following oil spills: Part 1 – Studies of shoreline sediments and residues from past spills. **Proceedings of the 17 th Arctic and Marine Oilspill Program Technical Seminar**, v. 1, Canada, p.1-23, Feb.1994.

BRAGG, J.R. *et al.* Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature* **368**, USA, p.413-418. Mar.1994.

BRASIL .Ministério das Minas e Energia. Secretaria Geral. **PROJETO RADAMBRASIL**. Folha SD 24 – Rio de Janeiro, 624p, 1981.

BRASSELL, S.C. *et al.* Natural background of alkanes in the aquatic environment. *In* Hutzinger, O., van Lelyveld, L.H., and Zoeteman, B.C.J. (Eds.), **Aquatic Pollutants: Transformation and Biological Effects**: Oxford (Pergamon Press), p.69–86, 1978.

BUI, E.N; MAZULLO, J; WILDING ,L.P.. Using quartz grain size and shape analysis to distinguish between aeolian and fluvial deposits, in the Dallol Bosso of Niger (West Africa). **Earth Surface Processes and Landforms** **14**, p. 157–166, 1990.

BURNS, K.A., GARRITY, S.D.; LEVINGS, S.C.. How many years until mangrove ecosystems recover from catastrophic spills? **Marine Pollution Bulletin** **26**(5), p.239-248, 1993.

CABRAL, C. V.. **Análise de biomarcadores nos arenitos asfálticos da borda leste da Baía do Paraná**. 2006, 198f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

CARMOUZE, J. P.. **O metabolismo dos ecossistemas aquáticos**. São Paulo: Edgar Blücher, 254 p, 1994.

CARVALHO, L. V. M.. **Estudo da qualidade da água superficial em zona estuarina no Rio São Paulo – Região de Candeias- Ba**. 2007. 129f. Dissertação (Mestrado em Geologia), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

CARVALHAL, F.. **Conhecendo o Manguezal Aspectos Ecológicos e Sociais**. Disponível em: <http://www.ib.usp.br/ecosteiros/textos_educ/mangue/index.htm> Acesso em 28/06/2008.

CARVALHO, F. J. P. C. *et al.*. Biorremediação de solos contaminados pelo acidente ocorrido em 16 de julho de 2000. *Repar. 2º Seminário do Rio Iguaçu – Araucária, Paraná*, p.113-147, 2001.

CASARINI, C. P.; SPILBORGHS, M. C. F.. Biorrecuperação de locais contaminados com hidrocarbonetos. *In*: **First Labs. Latim Americam Biodeterioration Symposium**. 12p., 1992.

CAVALCANTI, S. S. *et al.*. Geofísica Elétrica na Caracterização da Hidrologia Subterrânea na Região do Aterro Metropolitano Centro, Salvador, Bahia. **Brazilian Journal of Geophysics** **19**(2), *São Paulo*, p. 155-168, Aug. 2001.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas**: Relatório técnico, 2003. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/aguas_final.zip> Acesso em: 26 de julho 2008.

CELINO, J.J.; QUEIROZ, A.F. de S.; TRIGUIS, J.A.; OLIVEIRA, O.M.C.; SANTIAGO, J.S. Fonte da matéria orgânica e grau de contaminação por hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) em sedimentos de manguezais na porção norte da Baía de Todos os Santos, Bahia. In: 4ºPDPETRO, 2007, Campinas – São Paulo. **Anais eletrônicos...** Campinas, 2007. Disponível em: <http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/4/resumos/4PDPETRO_6_2_0026-1.pdf> Acesso em: 06 fev. 2009.

CHAYABUTRA, C.; JU, L.K.. Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. **Appl Environ Microbiol** **66** (2), p.493–498, 2000.

CHHATRE, S. *et al.* Bacterial consortia for crude oil spill remediation, **Wat. Sci. Tech.**, 34 (10), p.187-193, 1996.

CLARK, R.B.. **Marine pollution**. Oxford University Press, Oxford, UK. 237 p., 2001.

COELHO, MARCELA F.. **Estudo do uso de fertilizante NPK imobilizado na Biorremediação de derrames de petróleo no mar Simulação em laboratório**. 2005. 36f. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Exploração e Produção de Petróleo), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé/RJ, 2005.

CONAMA, **Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**(on-line). Disponível em: <www.mma.gov.br/conama/res/res05/res35705.pdf> Acesso em 30/06/2008.

CONDER, Companhia de Desenvolvimento da Região Metropolitana de Salvador. **PLANO DIRETOR DE LIMPEZA URBANA-PDLU, BAHIA**, 1994.

CONNAN, J.. Biological Markers in crude oils. **Petroleum Geology in China** **1**(1), Penn Well-Books, Oklahoma, p.48-82, 1981.

COOKSON, J.T. **Bioremediation Engineering: Design and application**. New York, Mc Graw – Hill Inc.: 524p, 1995.

COONEY, J.. The Fate of Petroleum Pollutants in Fresh-water Ecosystems, in R. M. Atlas (ed.), **Petroleum Microbiology**, MacMillan, New York, pp. 399–433, 1984.

CORDAZZO, J.. **Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas**. 2000. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

CORSEUIL, H.X.; ALVAREZ, P.J.J.. Natural bioremediation perspective for BTXcontaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Wat. Sci. Tech.**, v. 34, p.311-318, 1996.

CORSEUIL, H. X.; MARINS, M.D.M.. Contaminação de água subterrânea por derramamento de gasolina: O problema é grave? **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 2, p.50-54, 1997.

CORSEUIL, H.X.. Influência do Receptor de Elétrons na Biorremediação de Águas Subterrâneas Contaminadas por Derramamentos de Gasolina. **VI Simpósio Luso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Florianópolis, Vol. I, p.68-75, 1994.

CORSEUIL, H. X.; MARINS, M. D. M. Efeitos causados pela mistura de gasolina e álcool em contaminações de águas subterrâneas. **Boletim Técnico Petrobrás**, v.41, p.133-138, 1998.

COULON, F. *et al.* Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. *Chemosphere* 58, p. 1439–1448, 2005.

CRA– Bacias hidrográficas do Recôncavo Norte, boletim técnico, p147-292, 2001.

CRAPEZ, M.A.C. *et al.* Acute and chronic impacts caused by aromatic hydrocarbons on bacterial communities at Boa Viagem and Forte do Rio Branco Beaches, Guanabara Bay, Brazil. **Environmental Pollution**, 108 (2) , p.291-295, 2000.

CRAPEZ, M.A.C. *et al.* Biorremediação: Tratamento para Derrames de Petróleo. **Ciência Hoje** 30 (179), p.32-37. Jan. 2002.

CRICHTON, R. R.. Iron and oxidative damage. **In Inorganic Biochemistry of Iron Metabolism**; Ellis Horwood: U.K., 1991.

CUNHA, C.D.; LEITE, S. G. F.. Optimization of same environmental conditions to enhance gasoline biodegradation in soil microcosms bioaugmented with *Pseudomonas putida*. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology**, 28, p.129-134, 1997.

DAL FORNO, Rafaela G.. **Avaliação da poluição do solo por derivados de petróleo e sua remediação**. 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2006.

DEL'ARCO, J. P.; DE FRANCA, F. P.. Biodegradation of crude oil in sandy sediment. **International Biodeterioration & Biodegradation** 44, p.87–92, 1999.

DE LEEUW, J.W., & BAAS, M.. Early-stage Diagenesis of Steroids. In: R. B. ERD-ENVIRONMENTAL RESPONSE DIVISION. **Fundamental Principles of Bioremediation: An Aid to the Development of Bioremediation Proposals**, April 1998.

DIAS, F.G.. **Utilização de consorcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo**. 2007. 106f. Tese (Doutorado em Engenharia dos Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo Campinas, 2007.

DIBBLE J.T; BARTHA R.. Effect of iron on the biodegradation of petroleum in seawater. **Appl Environ Microbiol** 31(4), p.544–550, Apr 1972.

DIBBLE. J. T.; BARTHA, R.. Effect of environmental parameters on parameters on the biodegradation of oil sludge. **Appl. Environ. Microbiol.** 37 .p.739-39, 1979.

DIDYK, B.M. *et al.* Organic geochemical indicators of paleoenvironmental conditions of sedimentation. **Nature**, v.272, pp. 216-222, 1978.

DOTT, Wolfgang *et al.* Comparison of Ex situ and In situ techniques for Bioremediation of Hydrocarbon-polluted Soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 301-316, 1995.

EGLINTON, G.; CALVIN, M. Chemical Fossils. **Scientific American**, v. 261, pp. 32-43, 1967.

EMBRAPA. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Rio de Janeiro: XXVI, (5) 412, 1998.

EPA - Environmental Protection Agency (EUA). ***Design Document for Passive Bioventing. How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites: A Guide For Corrective Action Plan Reviewers***, 2006 (EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007; and EPA 510-R-04-002). Disponível em: <http://www.epa.gov/swerust1/pubs/tum_ch3.pdf> Acesso em: 10 de Novembro de 2008.

ESTEVES, F. A.. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro. Interciência: FINEP, 574 p., 1988.

FAYAD, N. M.; OVERTON, E.. A unique biodegradation pattern of the oil spilled during the 1991 Gulf war. **Marine Pollution Bulletin**, 30, p.239–246, 1995.

FAYAD, N.M. *et al.* Effectiveness of a bioremediation product in degrading the oil spilled in the 1991 Arabian Gulf War, **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 49, p. 787-796, 1992.

FEIJOO, G. M., LEMA, M. T., MANUEL, Z.. Recuperación do Litoral Contaminado por Fuel Mediante Técnicas de Biorremediación. **Boletín das Ciencias**. Compostela, p. 87- 102, Maio 2003.

FIGUEIREDO, L.H.M.. Investigação das contribuições orgânicas antrópicas e naturais em sedimentos costeiros utilizando-se hidrocarbonetos marcadores. 1999. 169f. Tese (Doutorado em Química), PUC / RJ, Rio de Janeiro, 1999.

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

FINGAS, M.F.. Studies on the evaporation of crude oil and petroleum products II. Boundary layer regulation. **Journal of Hazardous Materials**, 57: 41 58, 1998b.

FINGAS, M.F., FIELDHOUSE, B., MULLIN, J.. Studies of water-in-oil emulsions: Stability and oil properties. **Proceedings of 21th Artic and Marine Oilspill Program Technical Seminar**, p. 1-25, 1998b.

FINGAS, M.; FIELDHOUSE, B.; MULIN., J.. Studies of water-in-emulsions: stability and oil properties. In: **Proceedings of the Twenty-first Arctic and Marine Oil Spill Program Technical Seminar**. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada. pp. 1–25, 1998b.

FINGAS, M.F. *et al.* The effect of energy, settling time, and shaking time on the swiflask dispersant apparatus. **Spill Science and Technology Bulletin**3(4), p.193-194,1996.

FINGAS, M.F. *et al.* Studies of water-in-oil emulsions : Stability classes and measurement. *Proceedings of the 18th Arctic and Marine Oilspill Program Technical Seminar*, Canada, p. 21-42. 1995.

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

FOLK R.L.; WARD W.C.. Brazos river bar: a study of significant of grain size parameters. *J. Sediment. Petrol.* **27**, p. 3-26, 1957.

FRONZA, Lize. **Capacidade de Liberação de Hidrocarbonetos dos Sedimentos de Áreas Contaminadas do Estuário da Lagoa dos Patos – RS**. 2006. 116f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Física, Química e Geológica), Universidade Federal do Rio Grande, 2006

GAGLIANONE, P. C., TRINDADE, L. A. F.. Caracterização Geoquímica dos óleos da Baía do Recôncavo. **Geochimica Brasiliensis**, v. 2, n. 1, pp. 15-39. 1988.

GAMA, R.. **Caracterização Geoquímica de óleos biodegradados dos campos de Marlim Sul e Roncador, na Baía de Campos**. 2008. 183f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

GARRETT, R.M., PICKERING, I.J., HAITH, C.E., PRINCE, R.C.. Photooxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons in crude oils. **Proceedings of 21th Arctic and Marine Oilspill Program Technical Seminar**, p.99-114, 1998.

GEOBRASIL - Revista GEOBRASIL. **Perspectivas do meio ambiente no Brasil**. Disponível em: <<http://www.wwiuma.org.br/geobrasil/geobrasil.html>>. Acesso em 16 de fevereiro de 2008.

GÉRMEN/UFBA – NIMA– Baía de Todos os Santos: diagnóstico sócio - ambiental e subsídios para a gestão, Salvador, 244p., 1997.

GLICK, B.R.. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. **Biotechnological Advances** 21, Canadá, p. 383-393. Agu.2003

GOLDSTEIN R.M, MALLORY M.; ALEXANDER M.. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. **Appl. Environ. Microbiol.** 50, p. 977-983, 1985.

HAZEN, T. C. **In Situ: Groundwater Bioremediation**. Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA, USA 2010.

HOFF, R.Z.. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup, **Marine Pollution Bulletin**, 26 (9), p. 476-481, 1993.

HOFF, R.Z.. Bioremediation: A countermeasure for marine oil spills, **Newsletter Spill Technology**, 17 (1): 14p., 1992.

HOFF, R. Oil Spills in Mangroves. **U.S. Department of Commerce National Oceanic and Atmospheric Administration NOAA Ocean Service**, 72p., Jan. 2002.

HOFFMANN, J. & VIEDT, H. Biologische Bodenreinigung - Ein Leitfaden für die Praxis. **Springer, Berlin**. 311 S, 1998.

HOROWITZ A.; ATLAS R.M.. Continuous open flow-through as a model for oil degradation in the Arctic Ocean. **Appl Environ Microbiol** 33, p.647-653, 1977.

HOZUMI, T., TSUTSUMI, H., KONO, M.. Bioremediation on the shore after an oil spill from the *Nakhodka* in the Sea of Japan. I. Chemistry and characteristics of heavy oil loaded on the *Nakhodka* and biodegradation tests by a bioremediation agent with microbiological cultures in the laboratory. **Marine Pollution Bulletin** 40 (4), p. 308-314, 2000.

HUNT, J. M. *Petroleum geochemistry and geology*. Second edition, New JOHNS (Ed.) "Biological Markers in the Sedimentary Record". Amsterdam: *Elsevier*. (**Methods in Geochemistry and Geophysics**), pp. 101-124, 1986.

HUANG, W.Y., MEINSCHIN, W.G., Sterols as ecological indicators. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.43, pp. 739-745. May.1979

HUNT, E. J.. **Petroleum Geochemistry and Geology**, 2 ed. New York, W. H. 1996.

HUTCHINSON, S.L., BANKS, M.K., SCHWAB, A.P.. Phytoremediation of aged petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. **Journal of Environmental Quality** 30, West Lafayette, p.395-403, Apr. 2001.

HYPOLITO, Raphael. Comportamento de espécies de mercúrio no sistema Sedimento-água do mangue no Município de Cubatão, São Paulo, 2005. **Águas Subterrâneas**, v.19, n.1, p.15-24_(on-line). Disponível em <<http://calvados.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/asubterraneas/article/viewPDFInterstitial/1348/1105>>. Acesso em: 22 de abril 2008.

IARC - International Agency for Research on Cancer, **Occupational Exposures in Petroleum Refining: Crude Oil and Major Petroleum Fuels**. In: IARC Monographs on The Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon. 1989.

IPIECA **Dispersants and their Role in Oil Spill Response**. IPIECA Report No. 5, International Petroleum Industry Environmental Conservation Association, London, 1993.

ITOPF, International Tanker Owners Pollution Federation **Limited Technical Information Paper Fate of Marine Oil Spills**. Disponível em: <http://www.itopf.com/fate.html>, Acesso em novembro de 2009.

JORDAN, R.E.; PAYNE, J.. Fate and weathering of petroleum spills in the marine environment: A literature review and synopsis, Michigan: **Ann Arbor Praxis. Springer Verlag** Berlin Heidelberg, 1998.

KARRICK, N. L.. Alteration in petroleum resulting from physical-chemical and microbiological factors. **In Malins (Ed) Effects of Petroleum on Arctic and Subarctic Environments and Organisms** Vol. 1. Nature and Fate of Petroleum. Academic Press, Inc., New York, pp 225-299, 1997.

KASSIM, T.A.; SIMONEIT, B.R.T.. The Handbook of Environmental Chemistry – Pollutant-Solid Phase Interactions: Mechanism. **Chemistry and Modeling Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg, 5 Part E, p. 6-8, 2001.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B.L... Biology of mangroves and mangrove ecosystem. **Adv. Mar. Biol.** 40, p.81-251, 2001.

KENNISH, M.J.. Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects. **CRC Press**, Inc. Florida, p. 133-181, 1992.

KE, L.; WONG, T.W.Y.; TAM, N. F. Y. "Fate of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in a mangrove swamp in Hong Kong following an oil spill" **Marine Pollution Bulletin**, 45, pp. 339-347, 2002.

KOWALSKA, M.; GULER, H.; COCKE, D.L.. Interactions of clay minerals with organic pollutants. **The Science of The Total Environment** 141, p.223-240, 1994.

KÖEPPEN, W.. Climatologia, com un estudio de los climas de la Tierra. Buenos Aires: Ed. Fundo de Cultura Econômica, 1948. 478p.

KRUEGER, Guilherme Greca. **Avaliação das Fontes Poluentes Pontuais da Baía de Guaratuba–Paraná**, 2004 (on-line). Disponível em: <http://www.pucpr.br/educacao/academico/graduacao/cursos/ccet/engambiental/tcc/2004/pdf/guilherme_krueger.pdf>. Acesso em 30 de junho 2008.

KRUMBEIN, W. C.. Application of logarithmic moments to size frequency distributions of sediments: **J. Sediment. Petrol.**, v. 6, no. 1, p. 35–47, 1936.

LACERDA, L. D.. Brazil, In: **Principles for a code of conduct for the management and sustainable use of mangrove ecosystems**, CenTer/ISME/World Bank, *no prelo*. 2005.

LACERDA, L. D.. Os manguezais do Brasil, In: Marta Vannucci, **Os manguezais e nós**, São Paulo: Edusp, p. 185-206, 1999.

LACERDA, L.D.; ITTEKKOT, V.; PATCHINEELAM, S.R. Biogeochemistry of mangrove soil organic matter: a comparison between *Rhizophora* and *Avicennia* soil in south – eastern Brazil, **Estuarine, Coastal and Shelf Science** 40, p.713 –720, 1995.

LACERDA, L.D.. **Trace metas biogeochemistry and diffuse pollution in mangrove ecosystems**, ISME Mangrove ecosystems occasional Papers n.2, 65p. 1998.

LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R.. Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbial Reviews**, 53(3), p.305-315, 1990.

LEAHY, JOSEPH G.; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews** 54 (3), Maryland, p. 305 – 315, Sep.1990.

LEÃO, Z.M.A.N.; DOMINGUEZ, J.M.L.. Tropical coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin** 41, p. 112 – 122, 2000.

LEE, K.; LEVY, E. M. Bioremediation: Waxy crude oils stranded on low-energy shorelines. **Proceedings of the 1991 Oil Spill Conference**, American Petroleum Institute, Washington, D. C., pp 541-54, 1991.

LEE K.; LEVY,E. M.. Enhanced biodegradation of a light crude oil in sandy beaches." **Proceedings of 1987 International Oil Spill Conference**. American Petroleum Institute Pub. No. 4452., Washington DC, USA. pp. 411-416, 1987.

LEE, K.; TREMBLAY, G.H.; COBANLI, S.E.. Bioremediation of oiled beach sediments: Assessment of inorganic and organic fertilizers., **Proceedings of 1995 Oil Spill Conference**. American Petroleum Institute, Washington, DC, pp107-113, 1995a.

LEE, K., SIRON, R., TREMBLAY, G.H., Effectiveness of bioremediation in reducing toxicity in oiled intertidal sediments. In: Hinchey, R.E., Vogel, C.M., Brockman, F.J. (Eds.), **Microbial Processes for Bioremediation**, vol. 3, no. 8. Battelle Press, OH, pp. 117–127, 1995b.

LEE, K.; TREMBLAY, G. H.. Bioremediation: Application of slow-release fertilizers on low energy shorelines. **Proceedings of the 1993 Oil Spill Conference**, American Petroleum Institute, Washington, D. C., pp. 449-454,1993.

LEITE, O.R.. **Evolução geológica da Baía de Todos os Santos in Baía de Todos os Santos: diagnóstico sócio - ambiental e subsídios para a gestão** – Germen / Universidade Federal da Bahia – NIMA – Salvador, p.15 – 29, 1997.

LEMOS, R. M.. **Degradação ambiental causada pela ocupação antrópica em área de manguezais no bairro São Domingos em Ilhéus, Ba.** 2004. 21f. Monografia (Graduação em Geografia), Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2004. Disponível em:< www.manguezais.vilabol.uol.com.br >. Acesso em: 02 de maio de 2008.

LESSA, G.C. *et al.* Oceanografia física e Geologia da BTS, 2000. Disponível em:<http://www.cpgg.ufba.br/~glessa/bts>. Acesso em: 24 de março 2008.

LIMA, D. F.. **Análises Preliminares dos Indicadores físico-químicos de Água para Avaliação de Impactos no Manguezal da Praia do Cação Madre de Deus-Ba.** 2005. 72f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Católica do Salvador, Salvador, 2005.

LINDSTROM, J. E. *et al.* Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill. **Appli. Env. Micro** **57(1)**, Alaska, p.2514-2522, Sep.1991.

LUGO, A. E; BROWN S.; BRINSON, M. M.. Concepts in wetland ecology. In: Lugo,A E; Brinson, M M; Brown, S (eds). **Forested wetlands. Ecosystems of the world** 15. Elsevier. p 53-85, 1990.

MACHADO, J.C.V.. **Estudo do grau de contaminação por hidrocarbonetos nos sedimentos da Baía de Todos os Santos.**1996.137f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1996.

MACHADO, W.; TANIZAKI, K. F.; LACERDA, L. D.. Metal accumulation on the fine roots of *Rizophora mangle* L. **ISME/Glomis Eletronic Journal**, , v. 4, n. 2, 2 p. 2004

MACKENZIE, A. S.. Application of biological markers in petroleum geochemistry. **Advances in Petroleum Geochemistry**, 1(1), p.1-210, 1984.

MAIA, B.. Terminology and Translation -Bringing Research and Professional Training Together Through Technology. In **META Simposium - For a Proactive Translatology** (Université de Montréal, Québec, Canadá, p.7-9, Abr. 2005.

MARIANO, A. P.. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel.** 2006. 162 f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2006.

MARTINS, L. K. P.. **Evidência de toxicidade em sedimentos associados à indústria petrolífera: uso de biomarcadores.** 2001. 151 f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica e Meio Ambiente), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.

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

MEDEIROS, P. M.. **Avaliação da origem de hidrocarbonetos em sedimentos marinhos de Santos e São Sebastião, utilizando-se hidrocarbonetos marcadores geoquímicos**. 102f. 2000. Dissertação (Mestrado em Oceanografia), Universidade de São Paulo. São Paulo, 2000.

MEDEIROS, P.M. *et al.* Natural and anthropogenic hydrocarbon inputs to sediments of Patos Lagoon Estuary, Brazil. ***Environment International*** **31**, p.77-87, 2005.

MEDEIROS, P.M.; BÍCEGO, M.C.. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. I. Santos, SP--Brazil. ***Marine Pollution Bulletin*** **49**, p.761-769, 2004a.

MEDEIROS, P.M.; BÍCEGO, M.C.. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. II. Sao Sebastiao, SP--Brazil. ***Marine Pollution Bulletin*** **49**, p.892-899, 2004b.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT R.; INFANTE C.. Phytoremediation in the tropics e influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. ***Environmental Pollution*** **138**, p.86 - 91, 2005.

METTING, F.B.. ***Soil Microbial Ecology***. Environmental Sciences Departement Bettelle Pacific Northwest Laboratories. Richland, Washington, 1993.

MICHEL, J. Assessment and recommendations for the oil spill cleanup of Guanabara Bay, Brazil. ***Spill Sci. Technol. Bull.*** v. 6, p. 89-96, 2000.

MONTEIRO, M. T.. **Fitorremediação de Rejeito Contaminado Proveniente do Canal do Fundão, na Baía de Guanabara-RJ**. 2008. 317 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008

MONTEIRO, L.H.U.. **Estudo das áreas de mangues entre os estados Piauí Pernambuco com um enfoque para o estado do Ceará nos anos de 1978 e 1999/2004 utilizando sensoriamento remoto**, 2005, 98 f. Dissertação (Mestrado Disponível em <<http://www.glomis.com/ej/pdf/ej04-1.pdf>>. Acesso em: 28 mai. 2008. (Ciências marinhas tropicais), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

NASCIMENTO, I.A.. **Testes toxicológicos do Programa de Monitoramento dos Ecossistemas ao norte da Baía de Todos os Santos**. Convênio PETROBRÁS/UFBA; Relatório setorial final do sub-projeto. Salvador, 80p. 1996.

NASCIMENTO, T. V.. **Aplicação da Biorremediação a Derrames de Petróleo Em Manguezal do Rio Das Ostras, Rj: Simulação Laboratorial** . 2006. 73f. Monografia (Bacharel em Engenharia de Exploração e Produção de Petróleo), Universidade Estadual Norte Fluminense, Macaé, 2006.

NEVES, R. L. S.. **Avaliação da contaminação de óleo no ambiente estatutário da Baía de Guanabara (RJ) pela determinação fluorimétrica de hidrocabornetos policíclicos aromáticos (HPAs) na bÍlis de peixes Mugil Liza** .120f. 2006. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Pontifícia Universidade Católica do Salvador - PUC, RJ, 2006.

NTG-Northern Territory governments. **Mangrove Management in the Northern Territory** . Department of Lands, Planning and Environment: Darwin NT, Australian, 2002. Disponível em: <http://www.nt.gov.au/nreta/wildlife/nature/mangroves.html>. Acesso em: 12 de maio de 2009.

NISHIGIMA, F.N.; WEBER, R.R.; BÍCEGO, M.C.. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of Santos and Cananéia, SP, Brazil, **Marine Pollution Bulletin** 42 (11), p.1064 – 1072, 2001.

NOVELLI, Y.S.. **Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar** – Caribbean Ecological Research, SP, 64p., 1995.

NOVELLI, Y.S. *et al.* Brazilian mangroves. **Aquatic ecosystem health and management** 3, p.561 – 570, 2000.

NRC Oil in the sea III Inputs, Fates and Effects. **National Academy of Sciences**, Washington. 265 p., 2003.

OLIVEIRA, O.M.C. Processos de Biorremediação em Áreas Influenciadas por Atividades Petrolíferas. In: **IV WORKSHOP DA REDE RECUPETRO. Salvador, 2008. Disponível em:** <http://www.recupetro.ufba.br/>. **Acesso em 24 novembro de 2008.**

OLIVEIRA, F.J.Santos de. **Biorremediação de solo arenoso contaminado por óleo cru**. 2001. 110f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

OLIVEIRA, W.F. Evolução sócio – econômica do Recôncavo Baiano in Baía de Todos os Santos: diagnóstico sócio - ambiental e subsídios para a gestão – Germen / Universidade Federal da Bahia – NIMA – Salvador, 43 – 56, 1997.

OLIVEIRA, D.S. ; BAISCH, P.R.M. ; MACHADO, M.I.. Degradação do petróleo em ambiente estuarino da Lagoa dos Patos através de um derrame induzido 4º **PDPETRO**, Campinas, SP 21-24 de Outubro de 2007.

OLIVIERI, R. *et al.* Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow-release fertilizer. **Appl Environ Microbiol.** 31 (5), p.629–634, May. 1976.

OURISSON, G.; ALBRECHT, P.; ROHMER, M.. The hopanoids. Paleochemistry of a group of natural products. **Pure and Applied Chemistry** 51, p.709-729, 1979.

OWENS, E. H.; BRAGG, J. R.; HUMPHREY, B.. Clay-oil flocculation as a natural cleansing process following oil spills: Part 2 – Implications of study results in understanding past spills and for future response decisions. **Proceedings of the Seventeenth Arctic and Marine Oilspill Program Technical Seminar**, Canada, volume 1: p.25-37, 1994.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E.. **Soil microbiology and biochemistry**. Academic Press, San Diego, CA. 1989.

PEDRO, H. H. B.. **Avaliação Geoquímica Correlacionada aos Eventos Anóxicos da Formação Tetuan da Bacia do Vale Superior de Magdalena, Colômbia**. 2007. 111f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

PESO – AGUIAR, M.C. *et al.* Effects of petroleum and its derivatives in benthic communities at Baía de Todos os Santos, Bahia, Brazil. **Aquatic Ecosystem Health and Management** 3, p.459-470, 2000.

PESO-AGUIAR, M.C.; ALMEIDA, V.G.. **Testes toxicológicos do Programa de Monitoramento dos Ecossistemas ao norte da Baía de Todos os Santos**. Convênio PETROBRÁS/UFBA. (Relatório Gerencial final). Salvador. 30p, 1996.

PETERS, K.E. & MOLDOWAN, J.M.. The biomarker guide: interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments. **Prentice-Hall International**, New Jersey, USA. 363 p., 1993.

PETERS, K.E. *et al.* Petroleum systems in the Jiangling-Dangyang area, Jiangnan Basin, China. **Organic Geochemistry**, v. 24, n. 10-11, p. 1035-1060, 1996.

PETERS, K.E., WALTERS, C.C., MOLDOWAN, J.M.. **The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Petroleum Exploration and Earth History**, 2nd Edition, Vol.2, Cambridge University Press, 2005.

PHILP, R., LEWIS, C. A.. Organic geochemistry of biomarkers. **Annual Reviews Earth Planet Science Report**, 15(1), p.363-394, 1987.

PHILP, R.P.. Fossil fuel biomarkers. **Methods in Geochemistry and Geophysics**. New York. 292 p., 1985.

PRINCE, R.C.. Petroleum spill bioremediation in marine environments, **Critical Reviews in Microbiology**, 19 (4), p. 217-242, 1993.

PRITCHARD, P. H.; COSTA, C. F.. EPA's Alaska Oil Spill Bioremediation Project." **Environ. Sci. Technol.** 25, p.372-379, 1991.

PRIYANTO, S., MANSOORI, A.. "Measurement of property relationships of nano structure micelles and coacervates of asphaltene in pure solvent." **Chemical Engineering Science**, v. 56, pp. 6933-6939, 2001.

PROFFI TT, C.E. (ed.). Managing oil spills in mangrove ecosystems: effects, remediation, restoration, and modeling. OCS Study MMS 97-0003. New Orleans: U.S. Department of the Interior, Minerals Management Service, Gulf of Mexico OCS Region. 76 pp, 1997.

QUEIROZ, A.F. *et al.* **Fonte da matéria orgânica e grau de contaminação por hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) em sedimentos de manguezais na porção norte da Baía de Todos os Santos, Bahia.** In: 4ºPDPETRO, 2007, Campinas – São Paulo. **Anais eletrônicos...** Campinas, 2007. Disponível em: <http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/4/resumos/4PDPETRO_6_2_0026-1.pdf> Acesso em: 27 fev. 2009.

QUEIROZ, A.F.. **Mangrove de la Baía de Todos os Santos - Salvador , Bahia - Bresil. Ses caracteristiques et l'influence antropique sur la Geochimie.** 1992.148f. (Tese de Doutorado), Universite Louis Pasteur - Estrasburgo, 1992.

QUEIROZ S *et al.* Parâmetros físico-químicos e microbiológicos do processo de atenuação natural monitorada em área contaminada por solventes clorados. **Natureza on line** 5(1): 10-18. (on line) Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br>. Acesso em: 28 fev. 2009.

RAMBELOARISOA, E. *et al.* Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams. **Marine Biology**, v. 83, p: 69 – 81, 1984.

READMAN, J.W. *et al.* Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. **Marine Pollution Bulletin** **44**, p.48-62, 2002.

READMAN, J.W.; MANTOURA, R.F.C.; RHEAD, M.M.. The physicochemical speciation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in aquatic systems. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry** **319**, p.126-131,1984.

REBOUÇAS, L.M.C., *et al.* Hidrocarbonetos saturados e policíclicos aromáticos em óleos do campo pilar, sub-bacia alagoas: identificação e concentração. **Geochimica Brasiliensis**. 22(2), p. 091-102, 2008.

REGATO, Sabrina Batista. **Caracterização geoquímica de óleos selecionados da Bacia de Sergipe-Alagoas**. 2008. 116 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

RICKLEFS, R. E.. **A Economia da Natureza**, Quinta Edição Editora Guanabara Koogan 503p., 2001.

RODRIGUES, F.O.. **Derramamentos de óleo no ecossistema manguezal: limpeza do ambiente, efeitos e metodologia de estudo**. 1997. 190f. Dissertação (Mestrado em Saúde Ambiental), Universidade de São Paulo, SP,1997.

ROSA, A.P. & TRIGÜIS, J. A. Processo de biorremediação usando o fertilizante NPK, em eventuais derrames de óleo – Experimentos Laboratoriais. **Revista Brasileira de Geociências**, V. 36, n. 2, p. 232 – 242, 2006.

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

ROSA, R.; SOUTO, J.; MAGALHÃES, J.. Excursão de Campo à Bacia do Recôncavo com a Universidade Federal da Bahia (UFBA); **Roteiro de Campo. PETROBRÁS – UN-BA/ATEX/GL**, Salvador, 2001.

ROSENBERG, E. *et al.* Petroleum bioremediation - a multiphase problem **Biodegradation** **3**, p. 337–350, 1992.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z.. Bioremediation of petroleum contamination, *In* R. L. Crawford; D. G. Crawford. (ed.), **Bioremediation: principles and applications**. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, p. 100-124. 1996.

RYTKONEN J., ITAVAARA M., PAULSEN J. E. The Improvement of oil biodegradation on the shoreline. *In: Proceedings of the 7th International Offshore and Polar Engineering Conference*, Honolulu, USA, 2(1), p.25-30, 1997.

SANTANA, R. C.. **O Método da Biorremediação Aplicado na Limpeza de Substrato de Manguezal Impactados por Petróleo, na Baía de Todos os Santos – Bahia**. 2008. 59f. Monografia (Bacharel em Oceanografia), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.

SANTOS, J.B.dos.. **Estudos biogeoquímicos em substrato lamoso de zonas de manguezal da região norte da região de S. Francisco do Conde – recôncavo baiano: subsídios a um programa de diagnóstico e monitoramento ambiental para regiões de manguezal influenciadas por atividades petrolíferas**. 2002. 142f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica e Meio Ambiente), Universidade Federal da Bahia, 2002.

SANTOS, P. R. P; OLIVEIRA NETO, F. A; GOMES, Z. L. G. C.. **Considerações sobre tecnologias para remediação de solos e águas subterrâneas contaminadas e suas aplicações em pólos industriais na região metropolitana de Salvador e na antiga fábrica da Cobrac em Santo Amaro - BA**. 1999. 79p. Monografia (Graduação em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais na Indústria), Universidade Federal da Bahia, BA, 1999.

SANTOS, WILSON S. D. J.. **Estudos geoquímicos em sedimentos de manguezal, como indicadores de impactos ambientais na região petrolífera de São Francisco do Conde –BA**. 2005. 142p. Dissertação (Mestrado em geoquímica e meio ambiente), Universidade Federal da Bahia, 2005.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y.. **Manguezal: Ecosistema entre a terra e o mar**, São Paulo: Caribbean Ecological Research, 64 p. il. 1995.

SHEPARD, F.P.. Nomenclature based on sand-silt-clay ratios. **Journal of Sedimentary Petrology**, v. 24, p. 151-158. 1954.

SILVA, A. D. A. D. ; AZEVEDO, D. D. A.. Razão isotópica de carbono estável de compostos individuais (n-alcanos) de petróleos brasileiros. **32a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009.

SILVA, P. R.. **Transporte marítimo de petróleo e derivados na costa brasileira: Estrutura e implicações ambientais**". 157f. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências planejamento Ambiental), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004a.

SILVA, Edmilson Pinto. **Avaliação Preliminar do Potencial de Aplicação da Tecnologia de Biopilhas para a Biorremediação do Solo de Guararé-RN**. 2004. 119f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2004b.

SILVA, S.M.T.. **Avaliação da contaminação por HPAs individuais e totais em sedimentos de mesolitoral na Baía de Todos os Santos**. 2002. 109 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2002

SIMON, M. *et al.* Evaluation of bioaugmentation for remediation of petroleum in a wetland. **Proceedings of 1999 International Oil Spill Conference**. American Petroleum Institute, Washington, 1999.

SIMONEIT, B.R.T.. Organic chemistry of marine sediments. In: **R. Chester and J.P Riley (Eds.)**, Chemical Oceanography. Academic Press, New York. p. 233-311 1978.

SOARES, Mario Luiz Gomes. **Estrutura Vegetal e Grau de Perturbação dos Manguezais da Lagoa da Tijuca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil**. Rev. Bras. Biol. v.59 n.3 São Carlos ago. 1999 (on-line). Disponível em 28 de junho 2008.

SOUZA FILHO, A. M.. **Planos Nacionais de Contingência para atendimento a derramamento de óleo: análise de países representativos das Américas para implantação no caso do Brasil**". 2006. 217f. Dissertação (Mestrado em Ciências planejamento Ambiental), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

SOUZA, E. S.. **Desenvolvimento de métodos de biorremediação aplicados a derrames de petróleo em água do mar - testes laboratoriais**. 2003. 315f. Tese (Doutorado em Engenharia de Reservatório e Exploração de Petróleo), Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Macaé – RJ, 2003.

SPEIGHT, J. G.. **The Chemistry of Petroleum**. 2. ed., New York, Marcel Dekker. 1991.

SPILBORGHS, M. C. F.. **Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto**. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, 1997.

SUTHERSAN, S. S.. "Remediation Engineering: Design Concepts". 1998.

SUTHERSAN, S.S.. IN SITU BIOREMEDIATION. **Remediation engineering : design concepts** Ed. Suthan S. Suthersan Boca Raton: CRC Press LLC, 1999.

SVEUM, P.; LADOUSSE, A.. Biodegradation of oil in the Arctic: enhancement by oil-soluble fertilizer application. In: **Proceedings 1989 International Oil Spill Conference**, American Petroleum Institute, Washington, pp. 439–446, 1989.

SEIFERT, W.K., MOLDOWAN, J.M. .."Use of biological markers in petroleum exploration". In: Jonhs, R.B. (eds), **Methods in Geochemistry and Geophysics**, v.24, Elsevier, Amsterdam, pp. 261-290, 1986.

TAGGER, S. *et al.* Effect of microbial seeding of crude oil in seawater in a model system. **Mar Biol** **78**. p.13–20, 1983.

TAKADA, H.; ISHIWATARI, R.; ORUGA, N.. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) and linear alkylbenzene-sulphonates (LAS) in Tokyo Bay sediments. **Estuarine Coastal Shelf Science** **35**, p.141-156. , 1992.

TANO-DEBRAH, K. *et al.* An inoculum for the aerobic treatment of wastewaters with high concentrations of fats and oils. **Biotechnology Resources**, v. 69, p. 133 – 139, 1999.

TAVARES, T.M.. **Distribuição espacial de metais pesados e hidrocarbonetos, em programa de monitoramento dos ecossistemas ao norte da Baía de Todos os Santos**; Relatório Final. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 85p., 1996.

TEZAK, J., MILLER, J. A., LAWRENCE, A. W., KEFFER, R. E., WEIGHTMAN, R.. **Bioremediation evaluation of surface soils contaminate with organic compounds**. Eastern Regional Conference & Exhibition, Charleston, USA, p.345-360, 1994.

TING, Y. P.; HU, H. L.; TAN, H. M.. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil microcosms. **Resource and Environmental Biotechnology**, 2, p.197–218, 1999.

TISSOT, B. P.; WELTE, D. H.. **Petroleum Formation and Occurrence**. A New Approach to Oil and Gas Exploration. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Vol.1, 540p., 1978.

TISSOT, B. P.; WELTE, D. H.. **Petroleum formation and occurrence**. Second revised and enlarged edition. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, p. 699, 1984.

TSUTSUMI, H. *et al.* Bioremediation on the shore after an oil spill from the *Nakhodka* in the Sea of Japan. III. Field tests of a bioremediation agent with microbiological cultures for the treatment of an oil spill. **Marine Pollution Bulletin** **40 (4)**, p. 320-324, 2000a.

TSUTSUMI, H., HIROTA, Y., HIRASHIMA, A.. Bioremediation on the shore after an oil spill from the *Nakhodka* in the Sea of Japan. II. Toxicity of a bioremediation agent with microbiological cultures in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin** **40 (4)**, p. 315-319, 2000b.

UNEP/IOC/IAEA. Determination of petroleum hydrocarbons in sediments. **Reference methods for marine pollution studies**. No 20 UNEP, Monaco, 75 p., 1992.

USEPA, **Phytoremediation Resource Guide.EPA542-B-99-003**. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, D.C. 1999.

USEPA- United States Environmental Protection Agency (EPA/600/R-99/107). "Introduction to Phytoremediation". EPA, Cincinnati- Ohio, 2000.

USEPA. **Guidelines for the Bioremediation of Oil-Contaminated Salt Marshes** EPA/600/R-04/074 Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency. July 2004.

UNA, G. V.; GARCIA, M. P. N.. Biodegradation of non-ionic dispersants in sea water. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. Vol.18, p.315-319, 1983.

UNICAMP. **O Petróleo**. 2001. Disponível em: <<http://www.dep.fem.unicamp.br/>>. Acesso em: 12 de maio 2008.

URURAHY, A.F.P.. **Biodegradação de resíduo oleoso proveniente de refinaria de petróleo**. 1998. 324f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.

VALENTIM-NETO, P. A.. **Possíveis causas da mortalidade do Caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* no Estuário do rio Jaguaribe – Ceara** 2004. (on-line). Disponível em: <www1.capes.gov.br/estudos/dados/2004/22001018/006/2004_006_22001018040P4_Tesepdf>. Acesso em: 15 de setembro 2008.

VALLEJO, V.; SALGADO, L.; ROLDAN, F.. Evaluacion de la bioestimulacion em la biodegradacion de TPHs em suelos contaminados com petróleo. Bioestimulation process during the biodegradation of THH in oil contaminated soil. **Rev. colomb. Biotecnol.** Vol. VII no. 2, p.67-78, 2005.

VANNUCCI, M.. **O manguezal e nós: uma síntese de percepções.** Edusp - SP, 235p., 1999.

VEIGA, G.I.. **Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da Baía de Todos os Santos/BA.** 2003. 205 f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica e Meio Ambiente), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Macaé - RJ, 2003.

VENOSA, A. D. *et al.* Bioremediation of experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. **Environmental Science and Technology**, **30**. p.1764-1775, 1996.

VENOSA, A. D. *et al.* Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. **In: proceedings of the 8th international symposium on microbial ecology**, Canada. Bell C. R.; Brylinsky, M.; Johnson-Green, P. (editors). Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, 1999.

VENOSA, A.D.; HAINES, J.R.,; AND ALLEN, D.M.. Efficacy of commercial inocula in enhancing biodegradation of crude oil contaminating a Prince William Sound beach. **J. Ind. Microbiol.**, **10**, p.1-11, 1992.

VIANA, Francine. *et al.* Utilização da fitorremediação em áreas contaminadas por petróleo e seus resíduos. **4o PDPETRO**, Campinas, p.21-24, 2007.

VIDALI, M.. Bioremediation: An overview, **Journal of Applied Chemistry**, **73** (7), p.1163-1172, 2001,

VOLKMAN, J.K. *et al.* Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. **The Science of The Total Environment** **112**, p. 203-219., 1992.

VOLKMAN, J.K.. "A review of sterol biomarkers for marine and terrigenous matter", **Organic Geochemistry**, v.9, pp.83-99, 1986.

WALWORTH, J.L.; REYNOLDS, C.M.. Bioremediation of a petroleum contaminated soil: effects of phosphorus, nitrogen and temperature. **Journal of Soil Contamination 4 (3)**, p.299–310, 1995.

WANG, Z., FINGAS, M., LANDRIAULT, M., SIGOUIN, L., XU, N. Identification of and direct determination of BTEX and (BTEX + C3-Benzenes) in oils by GC/MS. *Analytical Chemistry*, 67 (19) : 3491-3500,1995.

WANG, Z.; BARTHA, R.. Effects of bioremediation on residues, activity and toxicity in soil contaminated by fuel spills. **Soil Biology Biochemistry**, 22(4), p.501-505, 1990.

WANG, Z.; FINGAS, M. BTEX.. Quantitation in oils by GC/MS. In: Meyers, R.A. (ed.) **Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation**. Canada, p.829-852, 1998.

WANG, Z.; FINGAS, M.. Study of the effects of weathering on the chemical composition of a light crude oil. **Proceedings of 17th Arctic and Marine Oilspill Program Technical Seminar**. 1, p.133-171, 1994.

WAPLES, D. W.. Organic Geochemistry for Explorations Geologists. **Burgess Publishing Company**, USA. 1981.

WARDROP, J.A. *et al.* **The distribution, persistence and effects of petroleum hydrocarbons in mangroves impacted by the "Era" oil spill** (September, 1992): Final Phase One report. Adelaide: Office of the Environment Protection Authority, South Australian Department of Environment and Natural Resources, 1996.

WEBER, R.R.. Sistemas costeiros e oceânicos. **Química Nova** 15, p.137-143,1992.

WOLFE DA, HAMEEDI *et al.* The fate of the oil spilled from the Exxon Valdez. **Environ Sci Technol** 28, p.561A–568, 1994.

XU, R.; LAU, N. L. A.; K. L. NG; OBBARD, J.P.. Application of a Slow-Release Fertilizer for Oil Bioremediation in Beach Sediment.j. **Environ. Qual.** 33, p.1210–1216, 2004.

YEUNG, P.Y.; JOHNSON, R.L.; XU, J.G.. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil as affected by heating and forced aeration. **Journal of Environmental Quality** **26**, p. 1511–1516, 1997.

ZHENG, G.J. *et al.* Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediment of a sub - tropical coastal wetland. **Water Research** **36**, p.1457 – 1468, 2002.

ZHOU, E.; CRAWFORD, R.L.. Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. **Biodegradation** **6**, p.127–140, 1995.

ZHU, X., VENOSA, A. D., SUIDAN, M. T., LEE, K. . Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands. U. S. Environmental Protection Agency, 2001.

ZHU, XUEQING *et al.*. Guidelines for the Bioremediation of Oil-Contaminated salt Marshes. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. EPA/600/R-04/074, July 2004a.

ZHU, X.; VENOSA, A.D.; SUIDAN. M.T.. **Literature review on the use of commercial bioremediation agents for cleanup of oil-contaminated estuarine environments**. EPA/600/R-04/075, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 2004b.

ZOBELL, C. E.. Action of microorganisms on hydrocarbons, ***Bacteriol. Review*** **10** (1), 1946.

ANEXO A

Tabelas

Parâmetros Físico-químicos

Anexo A.1. Tabela com a variação dos valores da Temperatura (°C) ao longo do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Dia	RIO	Ref.	Ref.	Ref.	NPK	NPK	NPK	OSM	OSM	OSM
1º	25,2	28,4	28,2	28,5	29,1	29,2	28,7	28,8	28,6	28,6
2º	24,4	28,8	27,1	27,0	27,0	26,6	26,9	27,1	27,0	27,2
8º	25,2	25,8	25,4	25,6	25,5	25,4	25,6	25,6	25,5	25,5
15º	25,8	29,0	28,0	28,3	28,4	27,9	28,4	28,8	28,5	28,9
30º	27,1	29,4	28,9	29,1	29,3	29,1	29,3	29,4	29,2	29,2
45º	27,0	30,7	29,3	29,6	29,8	29,7	30,3	30,3	30,1	30,4
60º	28,2	30,4	29,7	30,2	30,2	29,9	30,4	30,2	30,3	30,3
90º	27,2	28,7	28,2	28,4	28,4	28,4	28,5	28,5	28,4	28,6

Anexo A.2. Tabela com a variação dos valores do pH ao longo do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Dia	RIO	Ref.	Ref.	Ref.	NPK	NPK	NPK	OSM	OSM	OSM
1º	7,20	7,30	7,52	7,66	7,62	7,70	7,70	7,72	7,77	7,73
2º	7,59	7,62	7,75	7,78	7,67	7,70	7,65	7,71	7,76	7,76
8º	7,50	7,79	7,93	7,96	7,83	7,82	7,80	7,95	7,99	7,98
15º	7,36	7,67	7,78	7,72	7,84	7,75	7,74	7,74	7,76	7,78
30º	7,13	7,05	7,40	7,57	7,57	7,73	7,66	7,69	7,70	7,95
45º	7,37	7,78	7,62	7,84	7,78	7,82	7,83	7,80	7,83	7,80
60º	7,56	7,93	7,91	7,93	7,94	7,88	7,91	7,92	8,01	7,72
90º	7,25	7,79	7,83	7,78	7,78	7,99	7,31	7,98	7,91	7,82

Anexo A.3. Tabela com a variação dos valores do E_H (mV) ao longo do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Dia	RIO	Ref.	Ref.	Ref.	NPK	NPK	NPK	OSM	OSM	OSM
1º	40	16	-6	-16	-15	-19	-20	-22	-24	-23
2º	-10	-12	-20	-24	-19	-21	-19	-22	-23	-24
8º	-8	-21	-30	-35	-29	-28	-25	-33	-37	-36
15º	-6	-21	-31	-31	-35	-36	-30	31	-29	-32
30º	-5	22	-6	-15	-18	-25	-24	-25	-25	-41
45º	-4	-29	-22	-34	-30	-32	-32	-31	-33	-31
60º	-18	-31	-28	-41	-39	-34	-38	-38	-41	-28
90º	45	-39	-41	-39	-39	-52	-11	-52	-47	-42

Anexo A.4. Tabela com a variação dos valores da salinidade (‰) ao longo do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Dia	RIO	Ref.	Ref.	Ref.	NPK	NPK	NPK	OSM	OSM	OSM
1º	37	30	30	32	32	32	32	32	31	33
2º	33	32	32	31	32	32	32	31	30	30
8º	31	30	30	31	31	31	32	32	31	31
15º	37	36	37	37	38	38	37	39	39	38
30º	37	35	36	36	35	37	36	36	36	37
45º	35	30	31	32	32	34	34	34	33	32
60º	38	36	36	37	39	39	40	40	41	41
90º	34	32	33	33	33	33	32	32	32	33

Anexo A.5. Tabela com a variação dos valores do O.D.(mg/l) ao longo do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Dias	RIO	Ref.	Ref.	Ref.	NPK	NPK	NPK	OSM	OSM	OSM
1º	6,7	6,5	5,9	6,1	6,2	5,9	6,1	6,0	6,6	6,3
2º	6,6	7,5	8,0	7,6	7,7	7,7	7,5	7,9	7,7	7,4
8º	5,2	6,7	6,9	7,2	7,3	6,8	6,7	7,1	7,4	7,2
15º	6,9	6,7	6,9	6,8	7,4	7,4	7,4	6,5	6,5	6,5
30º	4,8	7,7	7,9	7,8	7,6	7,9	7,6	7,8	7,9	7,8
45º	6,6	7,7	7,6	7,6	7,6	7,3	7,6	7,1	6,8	7,0
60º	5,4	8,4	7,7	7,9	7,6	8,7	8,1	7,9	8,0	7,9
90º	6,2	7,8	7,8	7,7	8,1	8,0	7,8	8,3	8,1	7,9

ANEXO B
Tabelas

Avaliação geoquímica inorgânica

Anexo B.1. Tabela com a variação dos valores dos teores do íon fósforo (mg kg^{-1}) ao longo do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Simulação	0	1º	2º	8º	15º	30º	45º	60º	90º
Background	29,03								
Ref.		31,30	33,59	32,12	24,94	33,29	24,94	34,65	18,40
Ref.		31,13	31,82	31,88	37,50	34,08	37,50	32,50	18,30
Ref.		32,41	30,55	32,09	27,55	24,82	27,55	29,08	18,02
NPK		153,46	200,30	133,68	165,20	165,24	165,20	156,27	129,00
NPK		224,92	141,35	192,61	180,49	108,77	180,49	140,14	147,56
NPK		135,85	143,60	144,91	177,38	189,26	177,38	142,52	89,47
OSM		34,71	36,18	49,94	56,27	86,51	56,27	81,32	138,43
OSM		32,55	38,35	45,06	99,41	87,46	99,41	147,50	193,03
OSM		34,82	34,34	42,03	96,90	82,05	96,90	72,99	102,35

Anexo B.2. Tabela com a variação dos valores dos teores do íon amônia ($\text{mg N-NH}_4^+\text{kg}^{-1}$) ao longo do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Simulação	0	1º	2º	8º	15º	30º	45º	60º	90º
Background	2,03								
Ref.		3,49	5,0	9,70	5,6	18,4	5,6	5,8	8,77
Ref.		3,41	2,3	4,38	5,0	16,4	5,0	5,8	9,57
Ref.		3,22	2,9	4,90	5,0	31,4	5,0	5,6	9,26
NPK		327,46	294,6	180,06	9,1	15,8	9,1	8,1	11,08
NPK		338,06	290,8	253,36	8,0	18,5	8,0	9,8	11,21
NPK		304,99	270,5	276,85	12,48	21,78	12,48	8,50	11,09
OSM		18,28	8,2	38,82	41,80	33,58	41,80	15,98	26,87
OSM		16,76	13,5	30,95	41,20	60,78	41,20	46,23	24,05
OSM		26,69	17,8	25,23	38,78	44,00	38,78	11,89	24,40

Anexo B.3. Tabela com a variação dos valores dos teores do íon nitrato ($\text{mg N-NH}_3\text{kg}^{-1}$) ao longo do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Simulação	0	1º	2º	8º	15º	30º	45º	60º	90º
Background	2,01								
Ref.		3,70	4,8	7,55	8,0	21,0	8,0	8,5	10,52
Ref.		3,41	1,7	6,56	5,8	17,2	5,8	7,2	10,83
Ref.		3,87	3,3	3,63	6,6	32,2	6,6	7,2	10,51
NPK		271,83	263,8	172,06	9,8	19,9	9,8	8,8	11,83
NPK		281,36	236,5	222,65	8,5	29,9	8,5	10,6	11,46
NPK		243,46	231,7	238,29	13,28	24,39	13,28	9,83	11,60
OSM		19,67	9,6	40,29	45,47	40,75	45,47	17,29	29,72
OSM		14,92	16,2	34,89	47,01	62,59	47,01	49,40	24,56
OSM		27,10	21,4	20,45	39,83	53,05	39,83	15,32	28,18

Anexo B.4. Tabela com a variação dos valores dos teores COT (%) ao longo do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

Simulação	0	1º	2º	8º	15º	30º	45º	60º	90º
Background	4,70								
REF.		4,01	4,50	4,17	4,85	5,03	4,64	4,77	5,40
REF.		3,63	4,46	4,47	3,83	5,09	4,19	4,47	5,33
REF.		4,55	4,71	4,24	4,32	5,43	4,69	4,88	5,10
NPK		4,43	4,54	4,81	4,71	5,05	4,75	4,79	5,46
NPK		4,86	4,56	4,62	4,59	5,89	4,54	4,91	5,06
NPK		4,16	4,92	4,43	4,49	4,80	4,77	4,76	5,22
OSM		4,72	4,06	4,75	4,63	4,93	4,54	5,28	5,38
OSM		4,48	4,93	4,69	4,67	4,98	4,64	5,22	5,18
OSM		4,61	4,46	4,83	5,04	5,06	4,24	4,97	5,57

ANEXO C

Tabelas

Avaliação geoquímica
orgânica/Cromatografia Líquida

Anexo C.1. Tabela representando em percentagens dos teores de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NOS nas unidades de simulação Referências (1, 2 e 3) do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

		1 Dia	2 Dias	8 Dias	15 Dias	30 Dias	45 Dias	60 Dias	90 Dias
Referência 1	SAT	33	27	25	61	85	44	43	2
	ARO	7	11	62	28	8	39	6	28
	NSO	60	62	13	11	7	17	51	70
Referência 2	SAT	34	33	19	42	61	49	37	29
	ARO	35	7	10	35	14	38	15	13
	NSO	30	60	71	23	25	13	48	58
Referência 3	SAT	39	38	44	48	49	74	31	24
	ARO	23	19	47	39	24	15	12	12
	NSO	38	44	8	13	27	11	56	64

Anexo C.2. Tabela representando em percentagens os teores de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NOS nas unidades de simulação NPK (1, 2 e 3) do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

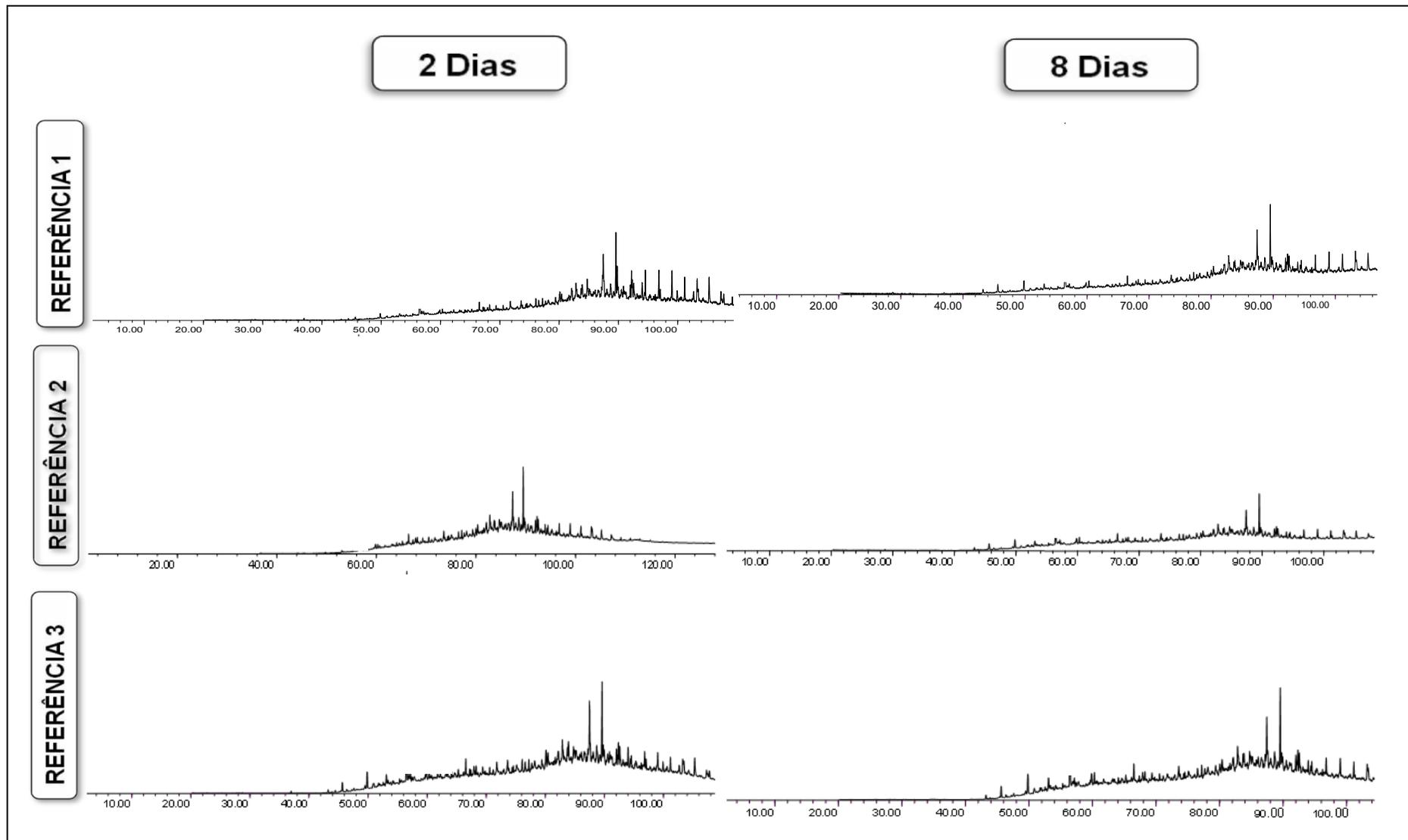
		1 Dia	2 Dias	8 Dias	15 Dias	30 Dias	45 Dias	60 Dias	90 Dias
NPK 1	SAT	48	49	56	31	73	52	56	18
	ARO	30	26	11	31	16	29	6	12
	NSO	22	24	33	38	11	19	38	71
NPK 2	SAT	24	26	57	60	30	38	32	29
	ARO	13	13	29	37	20	48	15	17
	NSO	63	62	14	3	50	14	53	54
NPK 3	SAT	35	45	42	34	63	59	49	3
	ARO	19	23	24	17	24	34	22	2
	NSO	46	32	34	49	13	7	29	95

Anexo C.3. Tabela representando em percentagens os teores de hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NOS nas unidades de simulação OSMOCOTE (1, 2 e 3) do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

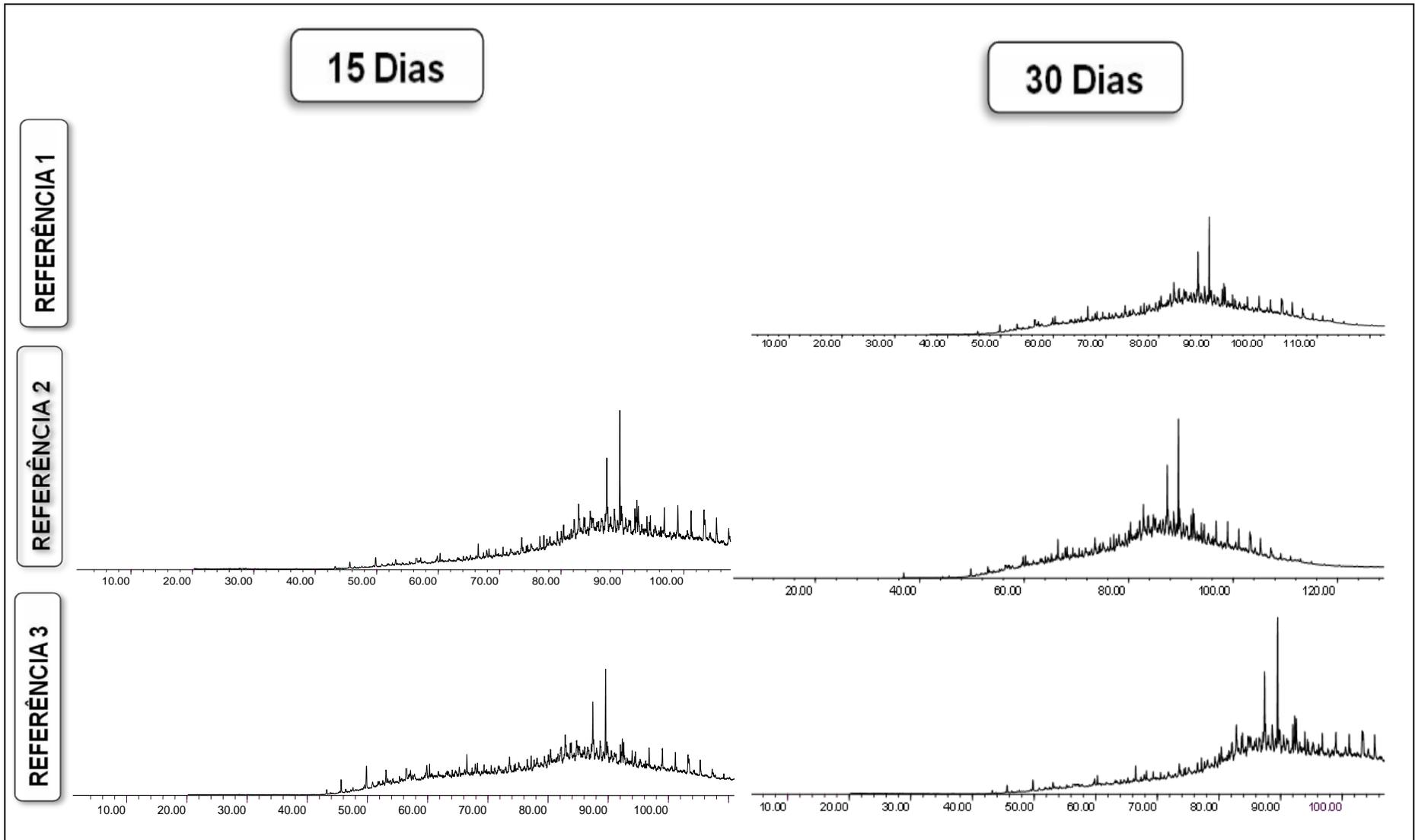
		1 Dia	2 Dias	8 Dias	15 Dias	30 Dias	45 Dias	60 Dias	90 Dias
OSMOCOTE 1	SAT	50	38	60	59	37	35	58	31
	ARO	15	21	27	19	16	15	23	15
	NSO	35	41	13	22	47	49	19	55
OSMOCOTE 2	SAT	13	60	63	61	66	55	53	33
	ARO	7	26	21	37	21	14	29	20
	NSO	80	14	16	2	12	31	18	47
OSMOCOTE 3	SAT	44	56	39	45	38	36	53	27
	ARO	24	14	14	45	21	7	12	14
	NSO	32	31	47	10	40	57	35	59

ANEXO D
Cromatogramas
Avaliação geoquímica
orgânica/Cromatografia gasosa

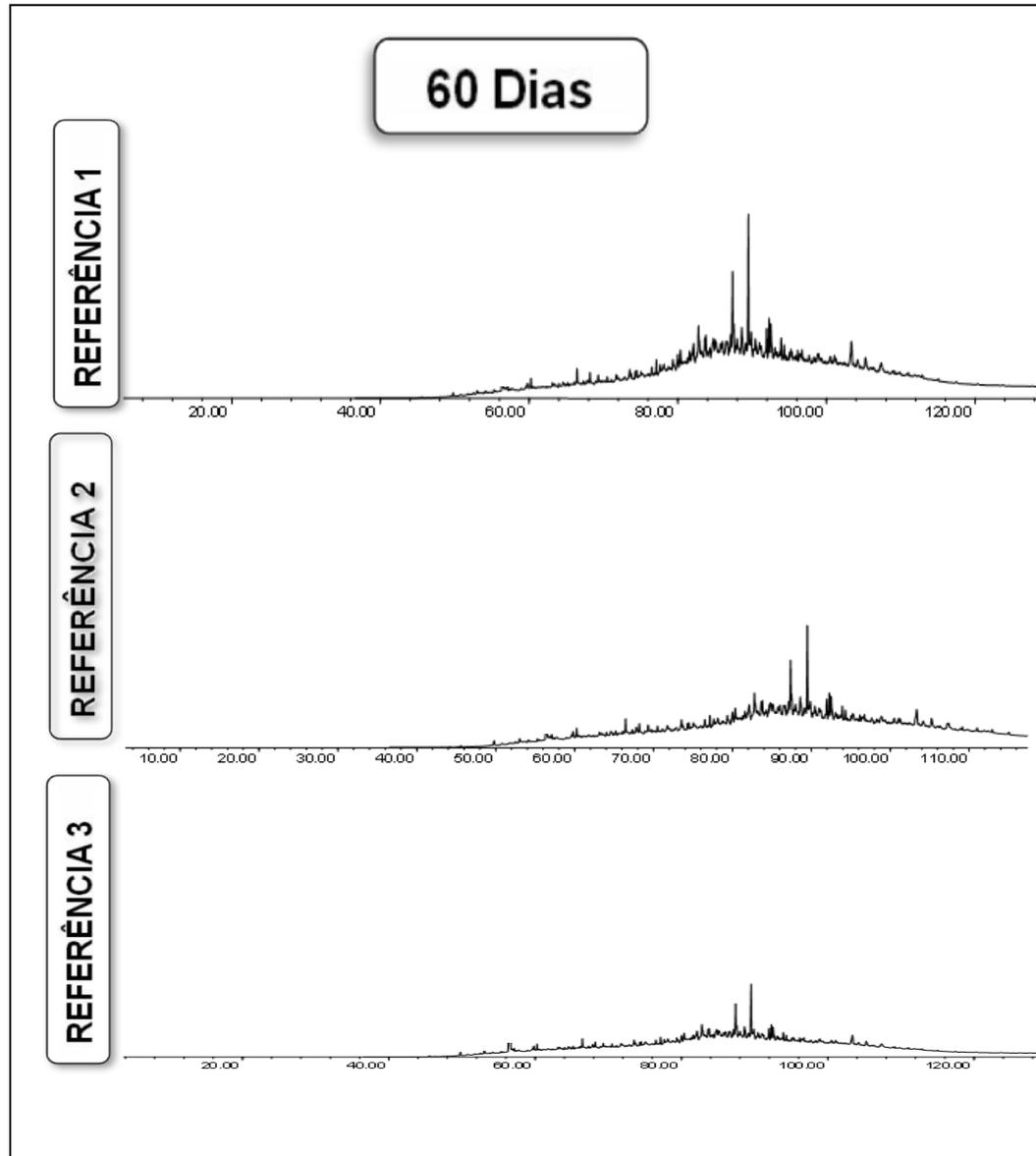
Anexo D.1. Cromatogramas dos Hidrocarbonetos Saturados das amostras extraídas das unidades referências no 2º e 8º dia de simulação do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.



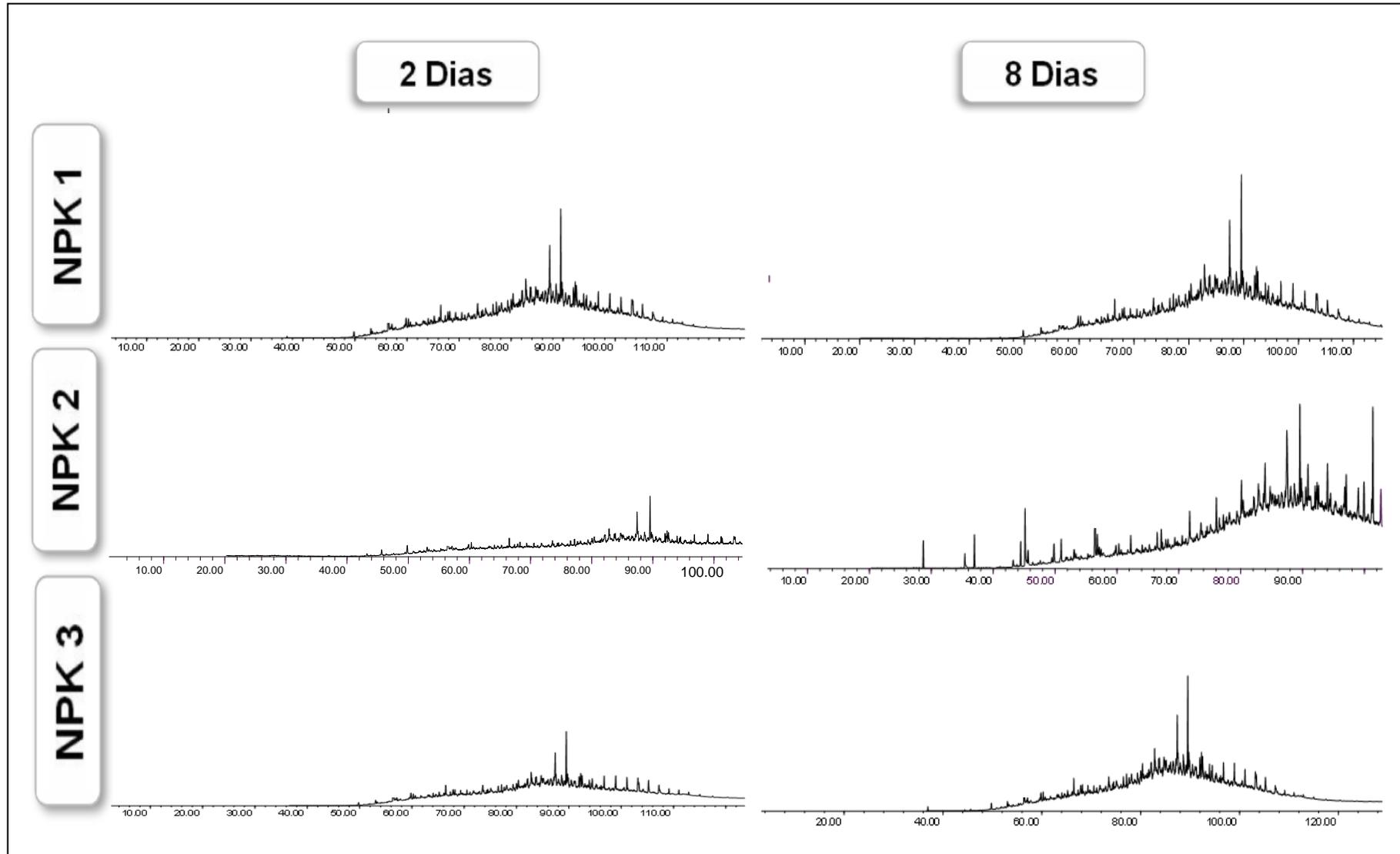
Anexo D.2. Cromatogramas dos Hidrocarbonetos Saturados das amostras extraídas das unidades referências no 15º e 30º dia de simulação do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.



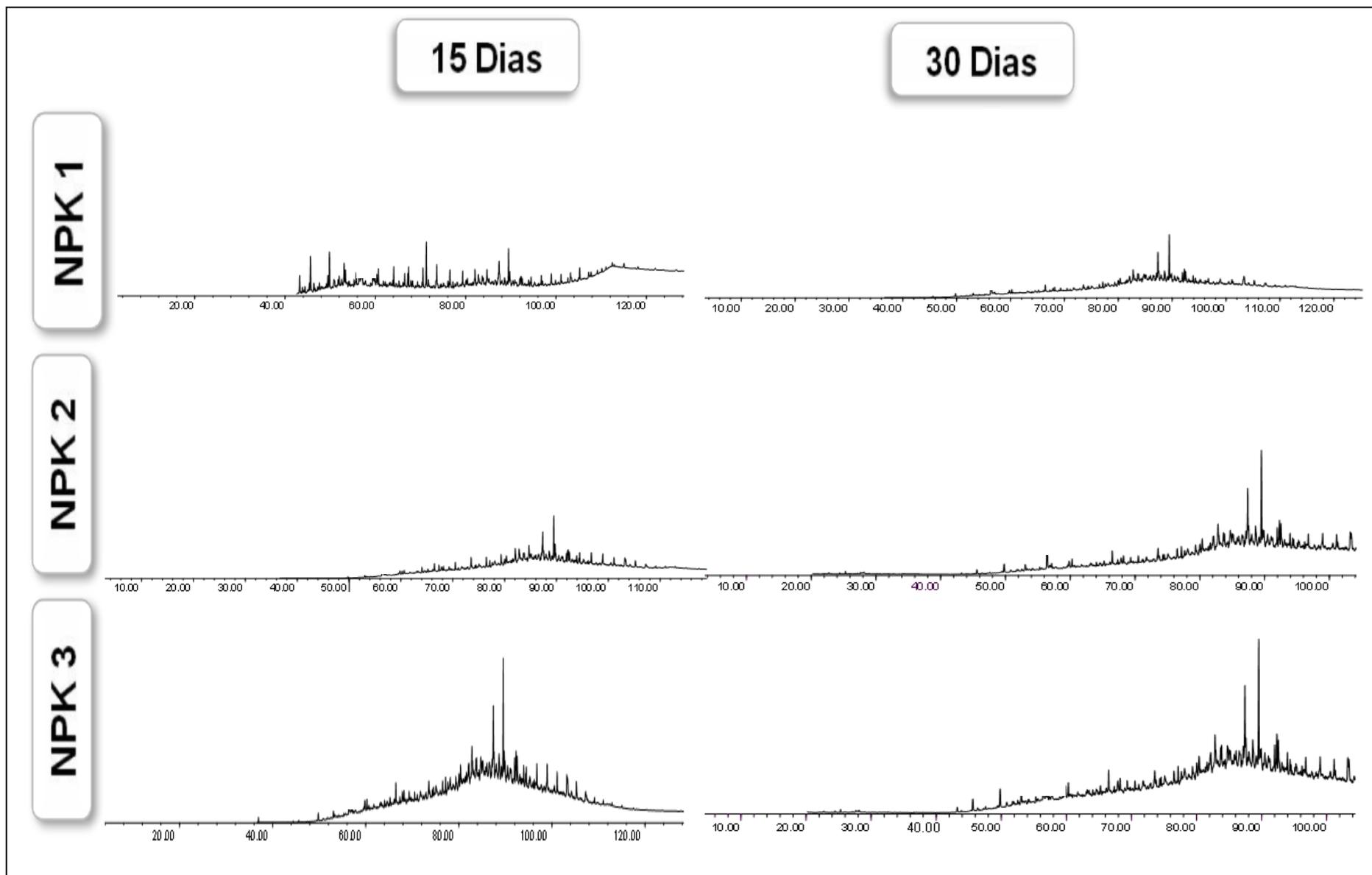
Anexo D.3. Cromatogramas dos Hidrocarbonetos Saturados das amostras extraídas das unidades referências no 60º dia de simulação do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.



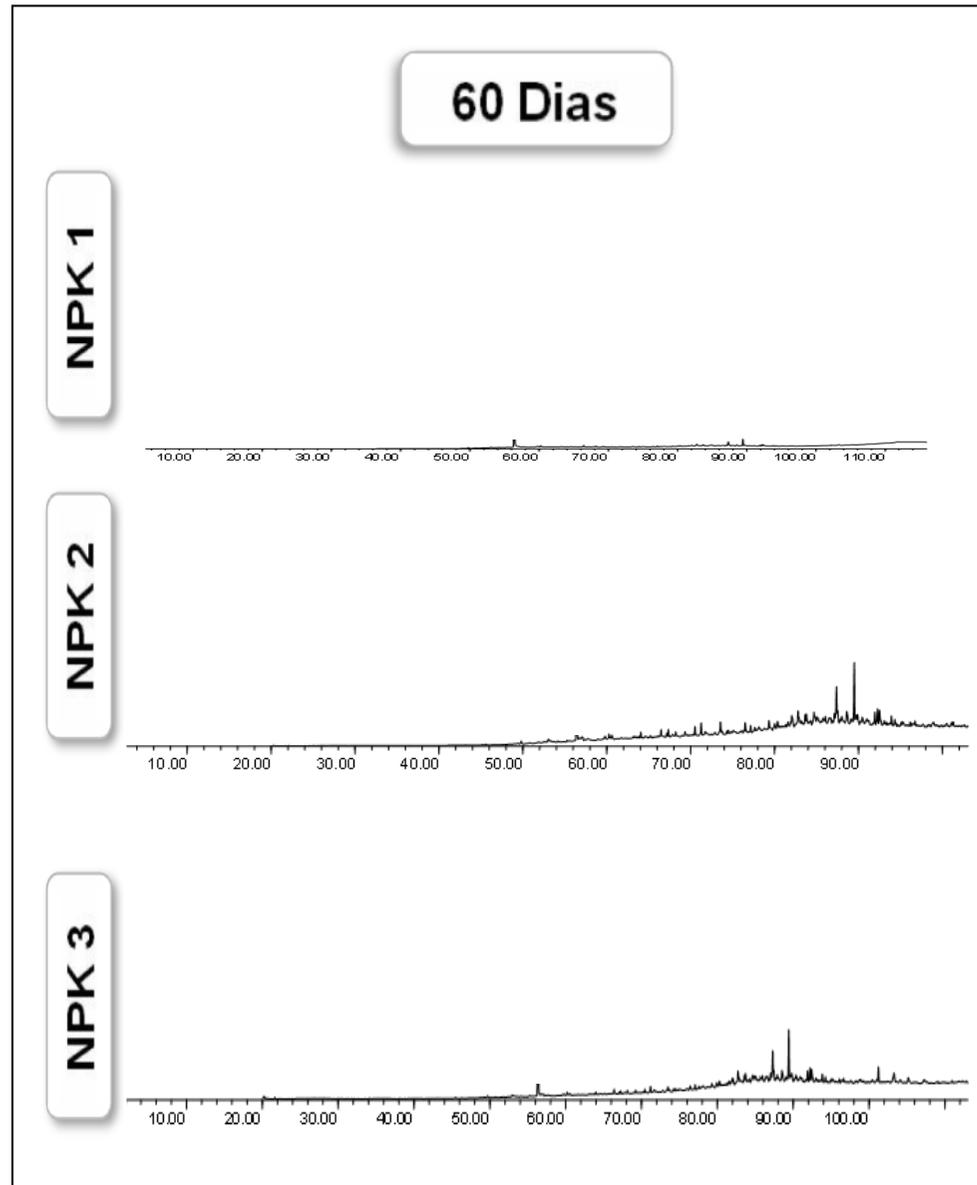
Anexo D.4. Cromatogramas dos Hidrocarbonetos Saturados das amostras extraídas das unidades NPK no 2º e 8º dia de simulação do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.



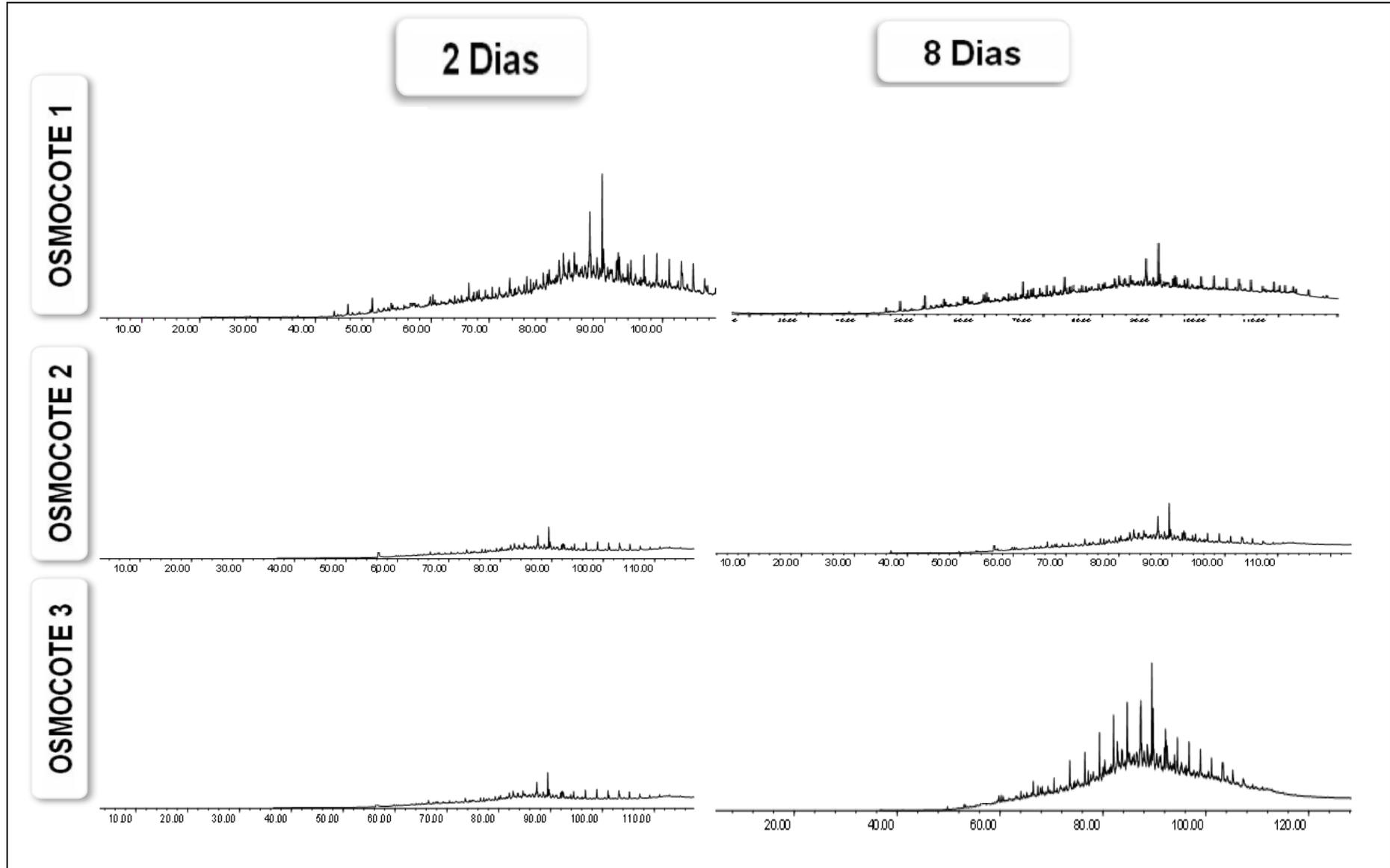
Anexo D.5. Cromatogramas dos Hidrocarbonetos Saturados das amostras extraídas das unidades NPK no 15º e 30º dia de simulação do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.



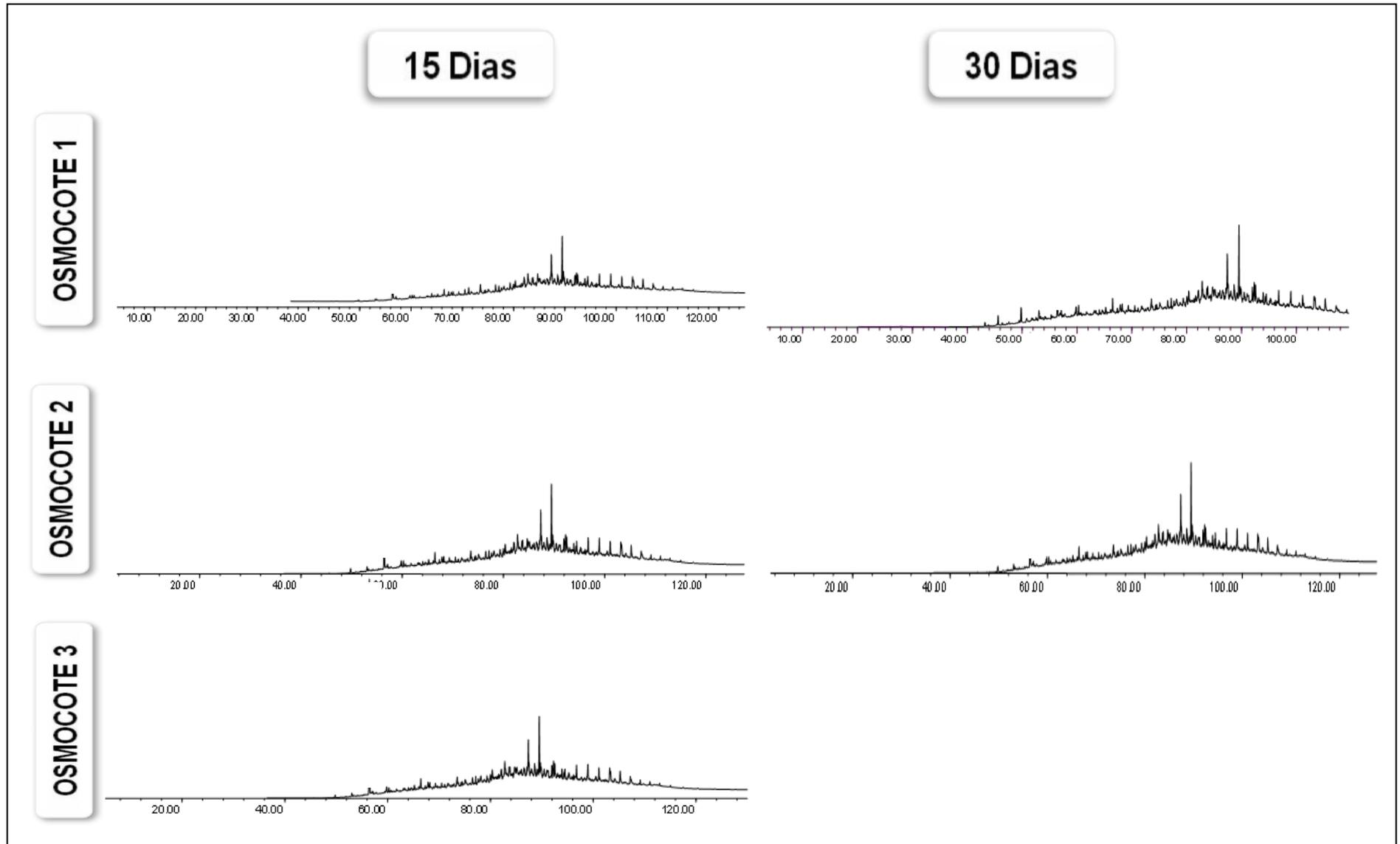
Anexo D.6. Cromatogramas dos Hidrocarbonetos Saturados das amostras extraídas das unidades NPK no 60º dia de simulação do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.



Anexo D.7. Cromatogramas dos Hidrocarbonetos Saturados das amostras extraídas das unidades OSMOCOTE no 2º e 8º dia de simulação do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.



Anexo D.8 Cromatogramas dos Hidrocarbonetos Saturados das amostras extraídas das unidades OSMOCOTE no 15º e 30º dia de simulação do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.



Anexo D.9 Cromatogramas dos Hidrocarbonetos Saturados das amostras extraídas das unidades OSMOCOTE no 60º dia de simulação do experimento de biorremediação em sedimentos do manguezal do estuário do rio São Paulo.

