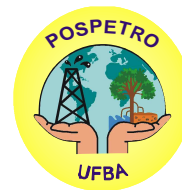




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GEOQUÍMICA: PETRÓLEO E**  
**MEIO AMBIENTE**



**ÍCARO THIAGO ANDRADE MOREIRA**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MODELOS DE**  
**REMEDIÇÃO APLICADOS EM SEDIMENTOS DE**  
**MANGUEZAL IMPACTADOS POR ATIVIDADES**  
**PETROLÍFERAS**

**SALVADOR**  
**2011**

ÍCARO THIAGO ANDRADE MOREIRA

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MODELOS DE  
REMEDIÇÃO APLICADOS EM SEDIMENTOS DE  
MANGUEZAL IMPACTADOS POR ATIVIDADES  
PETROLÍFERAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio ambiente, na Universidade Federal da Bahia, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira  
Co-orientador: Prof. PhD. Jorge Alberto Trigüis

Salvador  
2011

Moreira, Ícaro Thiago Andrade,  
Avaliação da eficiência de modelos de remediação aplicados em  
sedimentos de manguezal impactados por atividades petrolíferas. \_ 2010.  
221 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de  
Geociências, 2010.

1. Fitorremediação 2. Biorremediação 3. Petróleo 4. Metais  
Pesados. 5. Manguezal I. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira II. Universidade  
Federal da Bahia. Instituto de Geociências. III. Título.

***“Dedico este trabalho àquele que eu considero o maior geoquímico das causas ambientais em atividade no mundo, PhD Jorge Alberto Trigüis, às pessoas que vivem dos manguezais na BTS e ao meu anjo-irmão “Mariposo - MMAM” (in memoriam).”***

**ÍCARO THIAGO ANDRADE MOREIRA**

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MODELOS DE  
REMEDIAÇÃO APLICADOS EM SEDIMENTOS DE  
MANGUEZAL IMPACTADOS POR ATIVIDADES  
PETROLÍFERAS**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Olívia Maria Cordeiro de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Alberto Trigüis

Salvador, 08 de fevereiro de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**

.....  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira – Orientadora (UFBA)  
.....

Prof. PhD. Jorge Alberto Trigüis – Co-orientador (UENF)  
.....

Prof. Dr. Sérgio Luís Costa Ferreira (UFBA)  
.....

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliane Soares de Souza (UENF)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guardado, me governado e me iluminado durante este longo percurso cheio de obstáculos e dificuldades, sobretudo por ter colocado tantas pessoas especiais neste caminho para que eu pudesse cumprir de forma digna, com muita determinação e amor, parte da minha missão aqui na Terra com este trabalho.

Agradeço à minha família, base da minha vida e dos meus princípios/valores, sobretudo a minha mãe, Vera Andrade e aos meus irmãos: *Rô, Binho, Pôsa, Pôso, Iaiá, Kiko e João*, que me banham de amor a todo o momento e que sempre vibram com as minhas conquistas. A minha futura esposa, Carla Paixão, a qual me inspira e motiva a todo o momento com muito amor e carinho. Obrigado a todos pela paciência e me desculpem se mergulho fundo nesta aventura de ser pesquisador, mas é o que amo. É claro, amo muito mais vocês, não fiquem com ciúmes!

Agradeço imensamente a mais competente orientadora, minha amiga Dr<sup>a</sup> Olívia M. C. Oliveira, mãe acadêmica, a qual eu tenho grande consideração e respeito. Obrigado por ser essa pessoa cuidadosa, que se preocupa com as pessoas que estão ligadas a você e pela confiança de sempre no meu potencial. Tudo isso é recíproco! Gosto muito de você!

Àquele o qual considero o maior Geoquímico das causas ambientais em atividade, Jorge Alberto Trigüis, pai acadêmico. Estou aprendendo contigo muitas lições: profissionais, de ética e humanas. Obrigado pela amizade! Sou seu fã!

Ao coordenador da POSPETRO, Antonio F. S. Queiroz (A.F), pelo empenho constante na busca pela melhoria do nosso curso, pelo exemplo de gestor que és. Continue assim com esta humildade, respeito e preocupação com o próximo. *Uma vez Pospetro, sempre Pospetro!*

Ao Dr. Sérgio L. C. Ferreira, grande publicador em revistas científicas da UFBA. Obrigado por ter me auxiliado a escrever com qualidade, por me incentivar a buscar sempre o melhor. Levarei seus conselhos durante toda minha carreira acadêmica. Obrigado Serginho!

Agradeço aos professores do POSPETRO, sobretudo a Dr<sup>a</sup> Gisele Hadlich pelo exemplo de profissionalismo, ao Dr. Joil Celino pela disponibilidade em ajudar sempre, ao Dr. Paulo Mafalda pelo carinho que tem com os alunos e ao Dr. Ronaldo Montenegro (Ronaldão) pelas aulas divertidas. Valeu Drs!

Aos meus colegas do POSPETRO, sobretudo a Xandinho, Alex, Aline, Eduardo, Paulinha, Consul, Joana, Bonfim, Odete, Ana Carolina, Olga e Márcio. Obrigado pelos sorrisos de sempre nos seus rostos!

Agradeço aos meus velhos amigos: Victor, Monica, Lucas, César, Wai, Bruno e Tainã; e novos amigos: Rosenaide, Sara, Carine, Cintia, Claudia Reyes, Naraiana, Rafael, Marcelo, Gilmar, Célia Maria, Priscila e Rebeca. Vocês são muito importantes para mim! Obrigado por me colocarem sempre para cima! Amo vocês!

Aos meus irmãos acadêmicos: Danúsia, Ana Luiza, Danilo e A.J.. Obrigado cambada, pelo trabalho em equipe constante! Fiquem atentos, pois “mainha” tá de olho em todo mundo!!

Aos colaboradores e grandes profissionais do NEA pela realização das análises químicas. Sobretudo, a Gisele (F), os técnicos: Sarah Rocha (Sarinha), Jorge Palma (Jorginho), Marcos Melo e nossa coordenadora Karina Garcia. Obrigado e me desculpem se em algum momento fui chato com a minha persistência!

Aos colaboradores diretos e indiretos da RECUPETRO. Sobretudo a Cícero Gomes, pelo seu carisma e alegria constante. A Célia Maria, pela amizade que me prestou. A nossa eternizada Isabel Biasi, pelo carinho de sempre. A Naná, que vai sofrer sem mais ninguém para perturbá-la. À Priscila e aos motoristas Jairo e Deraldo, pela disponibilidade de sempre em viabilizar as idas ao campo. Não se preocupem que estarei mais alguns anos com vocês!

Agradeço à Dr<sup>a</sup> Tânia Barros (UFBA) por disponibilizar o seu Laboratório de Microbiologia e Análises Clínicas, para as análises microbiológicas. Também a Luina Benevides e à Dr<sup>a</sup> Vânia Maciel (UFCE) que possibilitaram o meu aprendizado na técnica das “microgotas”. Muito obrigado!

Ao Dr José Maria Landim, por ter disponibilizado o seu Laboratório de Estudos Costeiros e seus colaboradores para finalizar minhas análises de sedimento.

Mais uma vez aos co-autores dos artigos presentes nesta dissertação, sobretudo à Cintia (se continuar assim, vai longe!) pelo empenho e fidelidade, Carine (essa vai longe!) pelo mesmo motivo e a Brunno/Tainã/Rose por terem me ajudado a conseguir reproduzir em escala piloto um manguezal com plantas (foi muito difícil!). Obrigado meus amigos! Vocês são os maiores e os melhores!

À FAPESB, pela concessão da bolsa e à FINEP/CTPetro-Petrobras-CNPq pelo financiamento do projeto que viabilizou a presente pesquisa.

Que Deus ilumine todos vocês!!

***Determinação, coragem e autoconfiança são  
fatores decisivos para o sucesso.  
Se estamos possuídos por uma inabalável  
determinação conseguiremos superá-los.  
Independentemente das circunstâncias, devemos  
sempre acima de tudo amar o que fazemos, ser  
humildes, respeitadores e despidos de orgulho.***

*Dalai Lama (Adaptado)*



MOREIRA, Ícaro Thiago Andrade. **Avaliação da eficiência de modelos de remediação aplicados em sedimentos de manguezal impactados por atividades petrolíferas**. 221f. 2010. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, 2010.

## RESUMO

Neste estudo foi desenvolvido um experimento em escala piloto, durante 03 meses com intuito de avaliar a eficiência de 03 modelos diferentes de remediação (Biorremediação Intrínseca – microorganismos autóctones, Fitorremediação com *Avicennia schaueriana* – mangue preto e Fitorremediação com *Rizophora mangle* – mangue vermelho) para aplicação em sedimentos de manguezal contaminados por hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP's) e metais traços. Após 90 dias, uma maior eficiência na remoção de compostos orgânicos de sedimentos foi observada nos modelos da Fitorremediação (87% de remoção para a *R. mangle* e 89% para *A. schaueriana*). Em relação às diferentes frações foi observado que os três modelos avaliados apresentaram eficiência equivalente na remoção da fração 3A (C16-23), contudo quando se avaliou às frações 3B (C23-34) e 4 (C34-40) os dois modelos de Fitorremediação foram muito superiores. Esta maior eficiência na descontaminação pelas plantas foi reforçada com os resultados de crescimento das bactérias nas rizosferas, atingindo uma média máxima de  $31 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup> para o mangue vermelho e  $16 \times 10^6$  para o mangue preto, enquanto que o modelo aplicado apenas com microorganismos obteve uma média máxima de  $8,8 \times 10^6$ , demonstrando a capacidade das espécies vegetais utilizadas na fitoestimulação. A presença dos metais pesados não apresentou relação direta com a degradação dos hidrocarbonetos na Biorremediação Intrínseca, com exceção do cobre (Cu) que pode ter inibido uma maior degradação pelos microorganismos autóctones. Já nos modelos da Fitorremediação o mangue vermelho apresentou correlação positiva entre a degradação dos hidrocarbonetos e alguns metais (Cu, Zn, Cr, Ni), e com o mangue preto foram observadas com outros metais (Ni e Al). Foi observado um maior crescimento das plantas expostas a sedimentos contaminados em comparação com as cultivadas em sedimentos de referência nos dois modelos da Fitorremediação, sugerindo uma boa adaptação. Os dados mostraram que os dois modelos de Fitorremediação foram mais eficazes do que à Biorremediação Intrínseca na degradação de HTP's, tornando-se uma opção promissora ecologicamente correta na aplicação da técnica em áreas de manguezal impactadas por atividades petrolíferas.

Palavras-chave: Biorremediação, Fitorremediação, Hidrocarbonetos derivados do petróleo, metais traço, *Avicennia schaueriana*, *Rizophora mangle*, Manguezal, Sedimento.

MOREIRA, Ícaro Thiago Andrade. **Avaliação da eficiência de modelos de remediação aplicados em sedimentos de manguezal impactados por atividades petrolíferas**. 221f. 2010. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, 2010.

### ABSTRACT

In this study it was developed a pilot scale experiment, during 03 months with the aim of evaluating the effectiveness of 03 different models of remediation (Bioremediation Intrinsic – microorganisms indigenous, Phytoremediation with *Avicennia schaueriana* - black mangrove and Phytoremediation with *Rizophora mangle* - red mangrove) for use in sediment mangrove contaminated by total petroleum hydrocarbons (TPH's) and trace metals. After 90 days, greater efficiency in removing organic compounds from sediments was observed in models of Phytoremediation (87% removal for *R. mangle* and *A. schaueriana* 89%). For the different fractions was observed that the three models evaluated were efficient in the removal of fraction 3A (C16-23), yet when it was evaluated the fractions 3B (C23-34) and 4 (C34-40) the two models were Phytoremediation much higher the degradation. This greater efficiency in the decontamination by plants has been enhanced with the results of the rhizosphere bacteria growth, reaching an average maximum of  $31 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$  for red mangroves and  $16 \times 10^6$  for the black mangrove, while the model used only microorganism has an average maximum of  $8.8 \times 10^6$ , demonstrating the ability of the species used in phytostimulation. The presence of heavy metals showed no direct relationship with the degradation of hydrocarbons in the Intrinsic Bioremediation, with the exception of copper (Cu) which may have inhibited further degradation by indigenous microorganisms. In the Phytoremediation models the red mangrove showed a positive correlation between the degradation of hydrocarbons and some metals (Cu, Zn, Cr, Ni), and the black mangrove it was been observed with other metals (Ni and Al). It was observed a greater growth of plants exposed to contaminated sediments compared to those grown in sediments of reference in two models of Phytoremediation, suggesting a good adaptation the plants. The data showed that the two models of Phytoremediation were more effective than the Intrinsic Bioremediation in the degradation of TPH's, making it a promising option ecologically correct application of the technique in mangrove areas impacted by oil activities.

Keywords: Bioremediation, Phytoremediation, Totals Hydrocarbons of Petroleum, Heavy metals, *Avicennia schaueriana*, *Rizophora mangle*, Mangrove, Sediments.

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	12
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA.....	16
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
5. ARTIGOS SUBMETIDOS.....	42
5.1. PHYTOREMEDIATION USING <i>Rizophora mangle</i> L. IN MANGROVE SEDIMENTS CONTAMINATED BY PERSISTENT TOTAL PETROLEUM HYDROCARBONS (TPH's).....	42
5.2. INTEGRATED ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF METALS ON BIODEGRADATION OF TOTAL PETROLEUM HYDROCARBONS BY MICROORGANISMS AND <i>Rizophora mangle</i> L. ....	74
5.3. PHYTOREMEDIATION IN MANGROVE SEDIMENTS IMPACTED BY PERSISTENT TOTAL PETROLEUM HYDROCARBONS (TPH'S) USING <i>Avicennia schaueriana</i> .....	92
5.4. MODELS OF BIOREMEDIATION FOR THE DEGRADATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS IN THE PRESENCE OF HEAVY METALS IN MANGROVE SEDIMENTS .....	121
6. CONCLUSÕES .....	141
7. REFERÊNCIAS.....	143
ANEXOS .....	160

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação é composta por 7 seções. Inicialmente na seção “**Introdução**”, é realizada inicialmente uma discussão geral a cerca da problemática, hipótese, bem como os principais objetivos do presente trabalho. Em seguida, na seção “**Caracterização da Área**” é feita uma breve descrição da região onde foi simulado o experimento, bem como dos locais onde foram coletadas amostras de sedimentos e óleo residual para iniciar a avaliação da degradação pelos diferentes modelos de remediação desenvolvidos. Na seção “**Materiais e Métodos**” é descrita a metodologia desenvolvida para a realização dos experimentos. A seção “**Artigos Submetidos**” é composta por 4 artigos submetidos a revista científica:

- no artigo 1, intitulado “**Phytoremediation using *Rizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH’s)**” é apresentado o formato final da submissão para: “*Microchemical Journal*”, Fator de Impacto: 2.626 (A1 – Internacional; Peso: 100 em Geociências). As normas de submissão de artigos desta revista compõem o Anexo 1.

- no artigo 2, intitulado “**Integrated assessment of the effects of metals on biodegradation of total petroleum hydrocarbons by microorganisms and *Rizophora mangle* L.**” é apresentado o formato final da submissão para: “*Marine Pollution Buletin*”, Fator de Impacto: 2.644 (A1 – Internacional; Peso 100 em Geociências). As normas de submissão de artigos desta revista compõem o Anexo 2.

- no artigo 3, intitulado “**Phytoremediation in mangrove sediments impacted by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH’s) using *Avicennia schaueriana***” é apresentado o formato final da submissão para: “*Chemosphere Journal*”, Fator de Impacto: 3.253 (A1 – Internacional; Peso 100 em Geociências). As normas de submissão de artigos desta revista compõem o Anexo 3.

- no artigo 4, intitulado “**Models of bioremediation for the degradation of petroleum hydrocarbons in the presence of heavy metals in mangrove sediments**” é apresentado o formato final da submissão para: “*Environmental Science and Technology*”, Fator de Impacto: 4.630 (A1 – Internacional; Peso 100 em Geociências). As normas de submissão de artigos desta revista compõem o Anexo 4.

Na seção “**Conclusões**” são feitas considerações finais a cerca do trabalho, seguidas de sugestões para novas pesquisas na área de pesquisa da remediação em sedimentos de manguezal contaminados por atividades petrolíferas. Na seção “**Referências**” são apresentados todos os autores citados para confecção das seções e dos artigos submetidos.

## 1. INTRODUÇÃO

Palco de ações pioneiras na exploração do petróleo em território brasileiro, desde a década de 1950, diversas atividades ligadas à indústria petrolífera (exploração, perfuração, produção, transporte, refino e distribuição) estão instaladas nas proximidades da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. A região norte desta baía sofreu, na segunda metade do século XX, impactos decorrentes destas atividades. Um dos ecossistemas costeiros que é considerado mais afetado pelos derrames de petróleo nesta região é o manguezal e os seus compartimentos ambientais.

A presença de metais pesados e hidrocarbonetos derivados de petróleo em sedimento de manguezal representam um dos mais relevantes problemas ambientais neste ecossistema, devido, entre outros, à capacidade de biomagnificação destes poluentes na cadeia alimentar. Esta acarreta problemas múltiplos, tais como: riscos à saúde humana, a fauna, flora, à segurança pública, restrições ao desenvolvimento urbano e redução da qualidade, assim como, do valor agregado dos pescados.

De acordo com o diagnóstico realizado pelo IMA (2004), a principal problemática do estuário do Rio São Paulo, localizado na região norte da BTS, são justamente as grandes concentrações de alguns metais pesados e hidrocarbonetos derivados do petróleo em sedimentos de manguezal. Em função deste cenário surge a necessidade da elaboração e testes de metodologias para remediação destas áreas, já que não existem estudos aplicados deste tipo na literatura para o caso local em estudo nesta pesquisa.

A sobrevivência dos manguezais depende de vários fatores, que interagem de modo complexo. Embora o fator predominante seja geomorfológico, processos que contribuem para a sedimentação destas áreas e resultam em aumento do nível do mar (como barramento dos rios) e mudanças dos regimes climáticos regionais também influem na sobrevivência dos manguezais (LACERDA, 2006).

Alguns projetos objetivando a recuperação de manguezais impactados por hidrocarbonetos derivados de petróleo e metais pesados já foram realizados no Brasil, porém as tecnologias de remediação convencionais que são geralmente utilizadas são bastante caras e dispendiosas uma vez que em muitos casos a

maioria destas tem o risco de contaminação secundária quando os contaminantes são tratados de forma inadequada. Sendo assim, torna-se relevante, para o caso do estuário do Rio São Paulo, o estudo da eficiência das espécies vegetais de mangue na aplicação da Fitorremediação, que é uma técnica inovadora, expressivamente barata e ecologicamente correta. A sua aplicação em consórcio com bactérias hidrocarbonoclasticas (Biorremediação) para potencializar o processo pode se dar *in situ*.

A relevância de um projeto como este, está diretamente ligada à importância da recuperação, monitoramento e conservação do ecossistema de manguezal, devido as suas principais funções de acordo com Novelli (1990):

- Funciona como área de abrigo, reprodução, desenvolvimento e alimentação de espécies marinhas, estuarinas, terrestres e límnicas, ponto de pouso para aves migratórias, contribuindo também para manutenção da diversidade biológica costeira;

- Age na absorção e imobilização de contaminantes, além de contribuir para o tratamento de esgoto;

- É fonte de produtos para as comunidades humanas costeiras, usado para fins culturais, recreativos, lazer, para pesquisa científica e como recurso paisagístico.

Muitos estudos já foram realizados no Brasil tendo como base o monitoramento da qualidade deste ecossistema, gerando resultados relevantes para a comparação com os resultados deste projeto, tendo destaques: Cintrón e Novelli (1981), Lacerda (1984), Luiz-Silva et al., (1992), Lacerda e Novelli (1994), Menezes (1998), Carmo et al. (1998), Vanucci (1999), Oliveira (2000), Fidelman (2001), Souza e Sampaio (2001), Cunha-Lignon (2001), Soares et al., (2003), Veiga (2003), Fruehauf (2005), Silva et al., (2005), Rosa e Trigüis (2006), Queiroz e Celino (2008), Oliveira et al. (2008), Santana (2009), Lima (2010), Moreira, et al., (2010a; 2010b; 2010c).

É importante que seja destacado que a aplicação de um projeto de recuperação de áreas impactadas por petróleo, no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente (POSPETRO), com apoio Institucional e Laboratorial da Rede RECUPETRO, justifica-se como uma forma de contribuir para dotar a Região Nordeste de condições para a avaliação de métodos e técnicas de recuperação de áreas impactadas pela indústria do petróleo. Este apoio

se destaca pela avaliação da eficiência na remediação de áreas impactadas pela atividade petrolífera aliada a técnicas ecologicamente corretas.

Os elementos norteadores desta pesquisa se basearam em dois principais pontos: i) partindo da premissa que há contaminação no sedimento estudado proveniente de manguezal do Rio São Paulo (porção norte da BTS) por metais traço e hidrocarbonetos derivados do petróleo (CELINO et al., 2008; ONOFRE et al., 2008; SANTANA, 2008; VEIGA et al., 2008; GARCIA, 2009; LIMA, 2010; MOREIRA et al., 2010a; 2010b) e que os modelos de remediação desenvolvidos em escala laboratorial poderão auxiliar na compreensão do comportamento das espécies biológicas empregadas nas técnicas e da provável eficiência das mesmas na degradação dos hidrocarbonetos derivados do petróleo; no entanto, ii) deve ser levado em consideração que as particularidades de um ecossistema de manguezal no que se diz respeito às suas condições “biogeoquímicas” têm dificultado a elaboração de um modelo de remediação eficiente e ecologicamente correto para estes ambientes, principalmente quando são utilizados processos individualizados em um ecossistema, que não levam em conta que as interações interespecíficas em conjunto com os outros fatores ambientais são quem o dinamiza em uma restauração.

Portanto, dentro destas perspectivas, se teve como hipótese do trabalho: “*Os vegetais e microorganismos que vivem nestes sedimentos de manguezal devem possuir mecanismo(s) adaptativo(s) para degradação dos compostos orgânicos na presença de metais. Resta testar se este(s) é (são) realizado(s) através de mecanismos intraespecíficos ou de relações interespecíficas (consórcio); ou ainda se na presença dos poluentes estes organismos possam estabilizar os contaminantes ou até não se desenvolverem*”. A verificação dessa hipótese se deu a partir de linhas de ação que se seguiram: (a) construção do experimento, (b) monitoramento, (c) análises químicas, (d) obtenção de resultados, (e) interpretação dos resultados e (f) divulgação destas ações através submissão de artigos para revistas e em reuniões científicas.

## 2. CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA

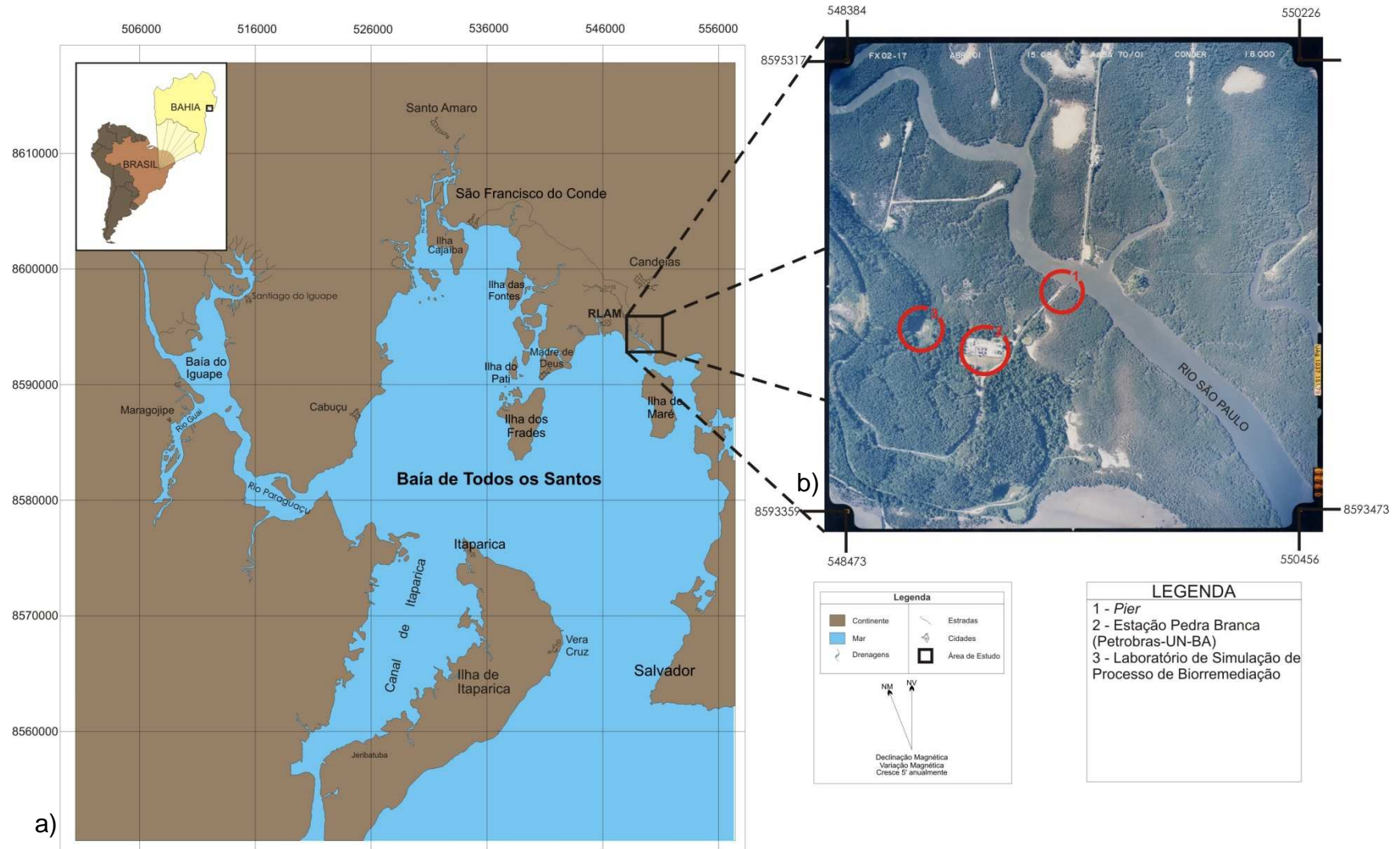
A Baía de Todos os Santos é considerada a maior e mais importante baía navegável da costa tropical do Brasil localizada em uma reentrância costeira, inserida na microrregião do Recôncavo Baiano, entre as coordenadas 12° 39' 4" S – 13° S de latitude e 38° 30' W – 38° 43' 30" W de longitude (LEÃO; DOMINGUEZ, 2000). Na porção norte desta Baía, entre os municípios de São Francisco do Conde e Candeias, ao lado da Refinaria Landulpho Alves, deságua o Rio São Paulo, conforme a **Figura 1** (BAHIA, 2004).

Este rio apresenta uma área de drenagem de 37 km<sup>2</sup>, vazão média de 0,3 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup>, uma extensão total de 17 km, sendo que 9 km do seu curso médio são margeados por florestas de manguezais. Não se constitui tributário de nenhum outro rio, nem possui um grande afluente (BAHIA, 2000). Na região que abrange a nascente do rio São Paulo, ocorre principalmente desenvolvimento de atividades agrícolas, sobretudo o cultivo de cana-de-açúcar e de espécies hortifrutigranjeiras. Predomina o tipo de vegetação formada por arbustos, árvores esparsas, gramíneas e vegetação halófito típica de manguezal na área estuarina, destacando-se as matas de galerias (BAHIA, 2002).

O clima da área caracteriza-se pela constante umidade, sem estação seca bem definida, com precipitação anual superior a 1800 mm, com os maiores índices registrados no período que compreende os meses de abril a julho. Nos meses de outubro, novembro e dezembro, as chuvas são menos intensas, com precipitação total anual variando de 1750 a 1900 mm. A temperatura média anual é da ordem de 25,3 °C. A amplitude térmica é de 5,5 °C. O clima úmido, nesta área, determina a constância do verde, bem como a existência de florestas com árvores de médio porte, geralmente densas (BAHIA, 1994).

A área de estudo geologicamente integra a bacia intracratônica do Recôncavo baiano, de idade cretácea. Os sedimentos desta região são predominantemente arenosos e argilosos, sendo depositados em um sistema delimitado por grandes falhas (BAHIA, 1994). Geologicamente observa-se predominância de sedimentos das Formações Itaparica, Candeias e do Grupo de Ilhas, litotipos da Formação São Sebastião, além dos depósitos quaternários e recentes que constituem as praias, manguezais (local de estudo desta pesquisa) e pântanos (BAHIA, 2002).





**Figura 1** – Mapa de Localização da Área de Estudo. a) Mapa de Situação e Localização da Baía de Todos os Santos. b) Fotografia aérea da área de coleta de sedimento. Fonte: Adaptado de Bahia (2004).

Em relação aos impactos nas águas superficiais e sedimentos existentes na área, destaca-se agentes provenientes da indústria petrolífera. De acordo com dados do estado (BAHIA, 2002) na bacia de drenagem deste rio se desenvolvem diversos tipos de atividades de natureza predominantemente industrial como exploração, refino e armazenamento de petróleo. Na bacia hidrográfica do rio São Paulo existem diversos poços de petróleo, com registro histórico de incidentes do tipo *blow-out* (explosão de poços), levando à contaminação por óleo cru (petróleo) aos ecossistemas, onde os manguezais ocupam um papel de destaque (BAHIA, 2002).

No rio São Paulo também, observa-se contribuições de esgotos domésticos, principalmente da cidade de Candeias e descargas industriais (BAHIA, 2004).

Vale destacar a importância socioeconômica deste estuário, já que são praticadas atividades de pesca artesanal e mariscagem, provendo o sustento de populações ribeirinhas (BAHIA, 2002).

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

Para a construção desta revisão foi feito um levantamento bibliográfico baseado em artigos científicos, dissertações, teses e trabalhos publicados em anais de congresso nacionais e internacionais sobre a aplicação da biorremediação, fitorremediação e seus consórcios em solos e sedimentos impactados por metais pesados e hidrocarbonetos derivados do petróleo.

#### **3.1 Metais pesados e hidrocarbonetos em sedimentos de manguezal**

O sedimento é um componente muito específico da biosfera, agindo não apenas como um depósito de contaminantes, mas também como um tampão natural, controlando o transporte de elementos químicos e substâncias para a atmosfera, hidrosfera e biota (CONAMA, 2009). A biodisponibilidade e degradação dos metais pesados e hidrocarbonetos na sua composição são fatores importantes a serem avaliados em um projeto de remediação.

Segundo Santos (2005), os metais pesados podem estar dispostos em sedimentos e no solo em diferentes formas: na forma iônica ou complexada na solução do meio, como íons trocáveis no material orgânico ou inorgânico de troca ativa, como íons mais firmemente presos ao complexo de troca, como íons quelatos em complexos orgânicos ou organominerais, incorporados em sequióxidos precipitados ou sais insolúveis, incorporados nos microorganismos e nos seus resíduos biológicos, ou presos nas estruturas cristalinas dos minerais primários ou secundários.

Para Adriano (1986), sua distribuição é influenciada pelas seguintes propriedades do solo: pH, potencial redox, textura, granulometria, composição mineral, características do perfil, capacidade de troca catiônica, componentes orgânicos do solo e na solução, presença de outros metais pesados, temperatura do solo, conteúdo de água e outros fatores que afetam a atividade microbiana. Segundo Pendias (2001), estes fatores que afetam a distribuição dos metais pesados no sistema controlam a sua disponibilidade, mobilidade do meio e disponibilidade às plantas.

Quando se trata de hidrocarbonetos derivados do petróleo, o processo de eliminação do óleo uma vez presente no sedimento em um manguezal é determinado pela sua interação com o sistema e controlado por fatores físicos, químicos e microbiológicos, tais como: sua composição, o hidrodinamismo local, a irradiação solar, a temperatura, a granulometria do sedimento, a composição da comunidade microbiana, a disponibilidade de nutrientes, entre outros (ATLAS, 1982; SUGIURA et al., 1997; COLOMBO et al., 2005).

A maioria dos componentes do óleo sofre intemperismo quando presentes em sedimentos de manguezal, mas a magnitude deste processo ainda é de difícil conhecimento. As razões de n-C17/Pristano e n-C18/Fitano vêm sendo usadas para avaliar a degradação. Porém esses isoprenóides são relativamente lábeis e, além disto, podem também provir da degradação da clorofila no meio ambiente, o que, muitas vezes, altera o resultado destas razões (FARIAS, 2006).

### **3.2 Remediação de áreas contaminadas**

O termo *remediation*, na língua inglesa, refere-se à abordagem de cunho educacional, uma ação ou processo de correção ou domínio do conhecimento ou problema. Porém, segundo Sánchez (2004) este termo foi introduzido nos Estados Unidos e Europa, pelos formadores de opinião, como um “conjunto de medidas objetivando a limpeza de sítios degradados por atividades industriais”, notadamente a disposição de resíduos tóxicos, que tenha causado a contaminação do solo ou do aquífero.

As técnicas de remediação de áreas contaminadas, por metais pesados e hidrocarbonetos podem ser feitas *in situ* (que é realizado na área contaminada) ou *ex situ* (que é realizado fora da área contaminada).

Algumas técnicas *in situ*, como: *Air sparging*, *Biosparging*, *Bioventing*, Barreira Reativa, Biorremediação (Bioaumento e Bioestímulo), Biorremediação Intrínseca (atenuação natural monitorada) e Fitorremediação. Assim como outras técnicas *ex situ* são muito utilizadas tais como: Oxidação Química, Dessorção Térmica, Biopilha e Incineração.

Nos últimos anos passou-se a dar preferência por métodos *in situ* que ofereçam menores riscos ao ambiente e que sejam economicamente viáveis. Dentro

deste contexto a biotecnologia oferece a Biorremediação e a Fitorremediação como alternativas que mais se enquadram às exigências.

### 3.3 Fitorremediação

Embora a fitorremediação seja uma técnica que tem sido mais estudada nos últimos anos, vários conceitos específicos têm sido empregados. Carneiro et al. (2002) definiram como sendo uma simples introdução de um vegetal em um solo contaminado. Ferreira et al. (2003) conceituaram como sendo uma técnica que objetiva a descontaminação do solo e água, utilizando plantas como agente de descontaminação. Já Dinardi et al. (2003) afirmaram esta como uma ferramenta da biotecnologia capaz de empregar sistemas vegetais fotossintetizantes e sua microbiota como o fim de desintoxicar ambientes degradados ou poluídos.

A Biotech (2004) definiu tratar-se de plantas - geneticamente alteradas ou não – capazes de absorver poluentes do solo ou de metabolizar as substâncias nas suas variações menos tóxicas. Pletsch et al. (2004) conceituaram como sendo a aplicação de sistemas vegetais (árvores, arbustos, plantas rasteiras e aquáticas) e de sua microbiota com fim de remover, degradar ou isolar substâncias tóxicas do ambiente. Gratão et al. (2005) em um dos conceitos mais recentes afirmaram ser o processo o qual se introduz plantas no ambiente que toleram altas concentrações de contaminantes nas raízes e partes aéreas.

Essa técnica, apesar de já ter sido utilizada por comunidades tradicionais naturalmente, foi empregada pioneiramente pelo pesquisador português K. Seidel em 1966. Este, em um experimento num aquário utilizou uma planta aquática e a sua microbiota associada, a fim de purificar uma água contaminada por fenóis e outros compostos químicos, obtendo excelentes resultados (LIMA, 2001).

As principais substâncias alvos da fitorremediação incluem, além dos metais pesados (Pb, Cd, Zn, Cu, As, Ni, Hg, Se), compostos inorgânicos ( $\text{NO}_3$ ,  $\text{PO}_4$ ), elementos químicos radioativos (U, Cs, Sr), hidrocarbonetos derivados de petróleo, pesticidas, xenobióticos e herbicidas (atrazina, bentazona, compostos clorados e nitro-aromáticos), explosivos (TNT, DNT), solventes clorados (TCE, PCE) e resíduos orgânicos industriais (PCPs, PAHs), entre outros (CUNNINGHAM, 1996; SURESH; RAVISHANKAR, 2004; SINGH; JAIN, 2003; NEWMAN; REYNOLDS, 2004; ARCHER e CALDWELL, 2004; GRATÃO et al., 2005, VENNILA et al., 2009).

A fitorremediação oferece diversas vantagens que devem ser levadas em consideração. Grandes áreas podem ser recuperadas de diversas maneiras, a baixo custo, com possibilidades de remediar águas contaminadas, solo, subsolo, ar e ao mesmo tempo embelezar o ambiente. Paradoxalmente, o tempo para se obter resultados satisfatórios, às vezes, pode ser longo. Segundo Dinardi (2003), a concentração do contaminante e a presença de toxinas devem estar dentro dos limites de tolerância da planta usada para não comprometer o tratamento.

Muitas vezes esta técnica é empregada de forma incorreta, quando se utiliza plantas frutíferas e outras de importância alimentícia, pois corre o risco do contaminante entrar na cadeia alimentar. Hoje em dia, existe uma grande busca por vegetais com características diferentes dessas para utilização eficiente e com menores riscos (MOREIRA et al., 2006).

A estimativa mundial para os gastos anuais com a despoluição ambiental gira em torno de 25 a 30 bilhões de dólares. Este mercado, que já estável nos Estados Unidos (7 – 8 bilhões de dólares), tende a crescer no Brasil uma vez que os investimentos para tratamento dos rejeitos humanos, agrícola e industrial crescem à medida que aumentam as exigências da sociedade e leis mais rígidas são aplicadas. Apesar das pressões, são as tecnologias mais baratas, como a fitorremediação, com capacidade de atender uma maior demanda e que apresentam mais capacidade de desenvolvimento que tendem a obter maior sucesso atualmente (DINARDI et al., 2003).

### **3.3.1 Mecanismos da Fitorremediação**

As espécies vegetais que podem realizar a fitorremediação apresentam vários mecanismos fisiológicos, a depender da natureza físico-química ou da propriedade do poluente, podendo ser classificados como: Fitoextração, Fitodegradação, Fitoestabilização, Fitoestimulação e Fitovolatilização.

#### **3.3.1.1 Fitoextração**

A fitoextração, segundo Mcgrath (1998), envolve a absorção dos contaminantes pelas raízes, os quais são nelas armazenados ou transportados e acumulados nas partes aéreas, sendo aplicada principalmente para metais pesados

podendo ser usada também para compostos orgânicos. Esta técnica utiliza as plantas hiperacumuladoras, que tem a capacidade de armazenar altas concentrações de metais específicos (0,1% a 1% do peso seco, dependendo do metal). Segundo Dinardi et al. (2003), as espécies de *Brassica juncea*, *Aeolanthus biformifolius*, *Alyssum bertolonii* e *Thlaspi caerulescens* são exemplos de fitoextratoras em solo e em sedimentos *Rizophora mangle* tem se destacado.

#### 3.3.1.2 Fitodegradação

Segundo Cunnigham (1996), neste mecanismo os contaminantes orgânicos são degradados e/ou mineralizados dentro das células vegetais por enzimas específicas, destacando-se as nitroredutases (degradação de nitroaromáticos), desalogenases (degradação de solventes clorados e pesticidas) e lacases (degradação de anilinas), sendo *Populus* sp. e *Myriophyllum spicatum* exemplos de plantas fitodegradadoras.

#### 3.3.1.3 Fitoestabilização

Na fitoestabilização, segundo Cunnigham (1996), os contaminantes são incorporados à lignina da parede vegetal ou ao húmus do solo precipitando os metais sob formas insolúveis, sendo posteriormente aprisionados na matriz, evitando a mobilização do contaminante e limitando sua difusão no solo, através de uma cobertura vegetal. Segundo Dinardi et al. (2003), exemplos de plantas cultivadas com este fim são os gêneros de *Haumaniastrum*, *Eragrostis*, *Ascolepis*, *Gladiolus* e *Alyssum*.

#### 3.3.1.4 Fitoestimulação

Segundo Brooks (1998), neste mecanismo as raízes em crescimento (extremidades e ramificações laterais) promovem a proliferação de microrganismos degradativos na rizosfera, que usam os metabólitos exudados da planta como fonte de carbono e energia. Além disso, as plantas podem secretar, elas próprias, enzimas biodegradativas, porém as *Pseudomonas* são os organismos predominantes

associados às raízes, ocorrendo com grande densidade em *Rizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* em sedimentos de manguezal.

#### 3.3.1.5 Fitovolatilização

Neste processo, segundo Brooks (1998), alguns íons de elementos dos subgrupos II, V e VI da Tabela Periódica, mais especificamente, mercúrio, selênio e arsênio, são absorvidos pelas raízes, convertidos em formas não tóxicas e depois liberados na atmosfera. Este mecanismo é empregado também para compostos orgânicos derivados do petróleo.

### 3.4 Aplicações no Brasil

As pesquisas sobre plantas hiperacumuladoras para serem utilizadas na fitorremediação e da sua própria aplicação em solos contaminados, têm como referências os trabalhos da USEPA – “United States Environmental Protection Agency” (1983; 1987; 1991; 1994; 2000). Porém no Brasil, existem alguns pesquisadores que estão avançados sobre maior conhecimento da técnica. Outros já aplicaram ou estão em fase de aplicação, porém na maioria dos casos voltados apenas para contaminação por metais pesados.

Carneiro et al. (2001) avaliaram o estabelecimento de plantas herbáceas em solo contaminado por metais pesados e inoculação de fungos micorrizicos arbusculares, onde puderam observar que a mostarda (*Brassica juncea*) com a inoculação dos fungos teve o melhor resultado em relação à acumulação do chumbo, cádmio e zinco.

Em 2002, Carneiro et al. avaliaram o crescimento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. Como principais resultados, puderam observar que a população de *Ginseng brasileiro* (*Pffafia* sp.) apresentou elevada tolerância a altas concentrações de cádmio e zinco e sendo hiperacumuladora do primeiro.

Pletsch et al. (2002) utilizaram culturas de raízes geneticamente transformadas da cenoura (*Daucus carota*) como modelo experimental para o estudo da tolerância ao fenol e seus derivados clorados, obtendo bons resultados com alguns cultivares.



Melo et al. (2002) avaliaram a fitotoxicidade do tomate (*Lycopersicon lycopersicum*) e do repolho (*Brassica oleraceae*) em solo contaminado por metais pesados concluindo que estas espécies apresentam grande potencial para o teste por serem pouco sensíveis aos contaminantes.

Pires et al. (2003) fizeram um grande levantamento bibliográfico quanto a espécies capazes de fitorremediar solos contaminados por herbicidas, ressaltando a Erva-de-queimada (*Kochia scoparia*) como grande potencial rizosférico para fitoestimular a degradação da molécula de atrazine.

Thassi e Barbaferi (2004) avaliaram a eficiência de alguns espécimes vegetais na fitorremediação de solo contaminado por metais pesados, porém adicionaram alguns agentes específicos de mobilização dos contaminantes para os tornarem mais biodisponíveis. A mostarda (*Brassica juncea*) apresentou os melhores resultados para o chumbo e o arsênio.

Bernardes Júnior et al. (2004) testaram um sistema de fitorremediação com espécies nativas das florestas pluvial atlântica e estacional semidecídua e do cerrado brasileiro em um solo contaminado por organoclorados. Em seus resultados preliminares, em um período de 3 anos obteve resultados até então não satisfatórios.

Gratão (2005) analisou a resposta antioxidativa de células do tabaco (*Nicotiana tabacum*) submetidas ao cádmio observando principalmente que o principal mecanismo de defesa da espécie foi a produção de enzimas como substrato para fitoquelatinas, que são proteínas ligantes de metais pesados

Santos (2005) avaliou a eficiência de alguns espécimes em acumular alguns metais pesados, tendo grande destaque a mostarda (*Brassica juncea*) na absorção de zinco.

Em um dos trabalhos mais relevante para o tema da futura pesquisa a ser desenvolvida, Crapez et al., (2000) avaliaram a sensibilidade do consórcio das espécies vegetais de mangue vermelho (*Rizophora mangle*) e bactérias hidrocarbonoclasticas em sedimentos contaminados por hidrocarbonetos, obtendo bons resultados.

### 3.5 Biorremediação

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

Essa técnica de limpeza usa microrganismos ou processos microbianos para reduzir a concentração e/ou a toxicidade de determinados poluentes acelerando o processo de biodegradação (ATLAS, 1981). Por tanto, pode-se considerar que a biorremediação é a otimização da biodegradação, sendo que esta aceleração pode ser de três principais tipos: pela adição de fertilizantes (bioestímulo), pela introdução de microrganismos (bioaumento), ou ainda através da atenuação natural monitorada (biorremediação intrínseca).

A utilização da técnica de biorremediação foi descoberta através de pesquisas de investigavam da 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).

Em se tratando da remediação *ex situ* de solos contaminados por atividades petrolíferas existem várias técnicas de biorremediação: landfarming, biopilhas e diferentes tipos de biorreatores (BERGER, 2005; COELHO, 2005). Os processos de biorremediação *ex situ* podem ser realizados com unidades móveis no local da contaminação (*on-site*) ou em estações fixas de tratamento (*off-site*). Estas técnicas 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 impreterivelmente eleva o custo do tratamento (ABBAS, 2003).

Em relação à biorremediação *in situ* esta técnica visa tratar o solo no local da contaminação utilizando-se de tecnologias que vão desde a introdução de oxigênio e nutrientes até a adição organismos selecionados para cada tipo de contaminante.

Neste caso 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 de três processos: biorremediação intrínseca, bioestímulo e bioaumento (ATLAS, 1997).

### **3.5.1 Mecanismos empregados na Biorremediação**

#### **3.5.1.1 Biopilhas**

As biopilhas são conhecidas como biocélulas ou pilhas compostas, sendo usadas para reduzir as concentrações de constituintes do petróleo em solos escavados, através do uso da biodegradação (EPA, 1994). Esta tecnologia envolve o empilhamento de camadas de solo e a estimulação da atividade microbiana do solo pela aeração e/ou adição de minerais, nutrientes e umidade (JORGENSEM, 2003).

A utilização do oxigênio tem como objetivo estimular o crescimento e a reprodução das bactérias aeróbicas que degradam os constituintes do petróleo. As biopilhas são aeradas forçando-se o ar a se mover por meio da injeção ou extração através de tubos perfurados colocados por toda a pilha (EPA, 1994).

Muitos contaminantes orgânicos têm sido reduzidos com a utilização de biorremediação através das biopilhas (JORGENSEM, 2003). Esta tecnologia tem demonstrado funcionar com sucesso especialmente para os hidrocarbonetos petrolíferos, hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) e cloretos.

#### **3.5.1.2 Landfarming**

*Landfarming* é uma tecnologia de superfície de remediação do solo, onde o solo contaminado é escavado em camadas finas e espalhado sobre a superfície do terreno onde ocorre a estimulação da atividade microbiana aeróbica por intermédio da aeração e/ou adição de minerais, nutrientes e umidade (AZEVEDO, 2006). Esta técnica é empregada com elevada eficiência no tratamento de rejeitos industriais,

especialmente na indústria petroquímica. O rejeito é misturado ao solo por aração e dragagem e as condições físico-químicas do solo (água, aeração e nutrientes) são monitoradas para maximizar a atividade heterotrófica (EPA, 1994).

Esta foi à primeira técnica *ex situ* aplicada em grande escala e surgiu nos EUA. O processo pode ser aplicado com grande sucesso quando o material é contaminado com substâncias de fácil degradação aeróbica (BERGER, 2005). Entretanto, a quantidade de resíduo a ser aplicada é determinada pelo índice de toxicidade, e desde que uma taxa desejável de atividade da camada reativa do solo esteja sendo mantido, o teor de metais só é controlado porque ele próprio pode interferir nesta atividade (DAL FORNO, 2006).

### 3.5.1.3 Biorreatores

Os biorreatores têm como diferencial o tratamento em um espaço confinado, o reator. A sua aplicação apresenta como maior vantagem o fácil controle de degradação biológica que permite um tratamento rápido e eficaz. As concentrações de oxigênio e de nutrientes, o teor de água, a temperatura e o pH são monitorados *in situ* e podem ser regulados de forma eficiente.

Basicamente diferenciam-se dois tipos de reatores: biorreatores do tipo a seco e biorreatores do tipo suspensão (*slurry bioreactors*) (BERGER, 2005). Este último baseia-se na principal tecnologia eletrônica utilizada no processo de biodegradação: aeróbio (oxigênio molecular), anóxica (nitrito e de alguns metais cátions), anaeróbio (sulfatos-redutores, metanogênicos, fermentação), ou misto ou combinado de elétrons (GONZÁLEZ et al., 2008).

Nesta técnica, nutrientes e outros aditivos, tais como agentes neutralizantes, surfactantes, dispersantes, e co-metabólitos podem ser oferecidos para melhorar características e taxas de degradação microbiana. Micróbios indígenas podem ser utilizados ou microorganismos podem ser acrescentados no biorreator ou podem ser adicionados continuamente para manter níveis adequados de biomassa (EPA, 1990).

### 3.5.1.4 Biorremediação Intrínseca (Atenuação Natural Monitorada)

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. Esta forma de aplicação refere-se aos processos físicos, químicos e biológicos que facilitam o processo de remediação de maneira global (MARIANO, 2006).

Neste tipo de atenuação não é utilizada nenhuma ação de tratamento esta 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 e MARINS, 1998).

A biodegradação se baseará na capacidade de microrganismos autóctones degradarem contaminantes que eventualmente tenham sido derramados em subsuperfície sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (MARIANO, 2006).

Quando se trata dos hidrocarbonetos ocorre essencialmente uma reação de oxi-redução onde o este é oxidado e um aceptor de elétrons é reduzido. Há vários compostos que podem agir como aceptores de elétrons, tais como o oxigênio ( $O_2$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ), óxidos de ferro (p.e.  $Fe(OH)_3$ ), sulfato ( $SO_4^{2-}$ ), água ( $H_2O$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ). A seguinte seqüência de preferência de utilização desses aceptores foi observada: oxigênio > nitrato > óxidos de ferro > sulfato > água (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

O monitoramento da atenuação natural se faz a partir do acompanhamento de indicadores geoquímicos (pH,  $E_H$ , O.D., temperatura, aceptores de elétrons). A diminuição da concentração de oxigênio dissolvido (O.D.) na água e um aumento da concentração de dióxido de carbono são indicativos de um processo aeróbio de biodegradação, enquanto que a produção de íons  $Fe^{2+}$  ou diminuição de íons nitrato indicam a presença de processos anaeróbios. Um declínio do potencial redox ( $E_H$ ) de valores positivos para negativos reflete a mudança de condições oxidantes (favoráveis aos microrganismos aeróbios) para condições redutoras (melhores condições aos processos anaeróbios, que são mais lentos que os aeróbios). Um aumento nos valores de pH pode ser creditado ao consumo de íons  $H^+$  durante a redução de íons férricos ou do nitrato (MARIANO, 2006).

### 3.5.1.5 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).

Esta técnica 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). Além disso, é utilizada principalmente para tratar biodegradação aeróbia de contaminantes, como os compostos orgânicos voláteis e hidrocarbonetos.

Bioventilação é utilizada principalmente para tratar biodegradação aeróbia de contaminantes, como os compostos orgânicos voláteis e não-clorados (EPA, 2006).

### 3.5.1.6 Bioaumento

O bioaumento 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 bioreatores 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 (ROSA, 2003). Mas a aplicação do método na descontaminação de ambientes costeiros não se mostrou suficientemente eficaz, devido 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 (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; SOUZA, 2003).

#### 3.5.1.7 Bioestímulo

O bioestímulo é a aceleração da reprodução microbiana e de suas atividades metabólicas, pela adição de oxigênio, água e nutrientes ao meio ambiente contaminado (ROSA, 2001). No bioestímulo 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 (MARIANO, 2006).

Durante o bioestímulo 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 microrganismos nativos (VALLEJO et al., 2005).

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia utilizada na presente pesquisa baseou-se na seleção de técnicas e procedimentos adotados no âmbito das Geociências, relacionada a estudos de geoquímica e processos de biorremediação. Partiu-se da premissa que há contaminação no sedimento estudado proveniente de manguezal do Rio São Paulo (porção norte da BTS) por metais traço e hidrocarbonetos derivados do petróleo (CELINO et al., 2008; ONOFRE et al., 2008; SANTANA, 2008; VEIGA et al., 2008; GARCIA, 2009; e LIMA, 2010) e que os procedimentos de monitoramento escolhidos para esta pesquisa auxiliarão na compreensão do comportamento das espécies biológicas empregadas nas técnicas e da provável eficiência das mesmas na degradação dos hidrocarbonetos derivados do petróleo.

A verificação da hipótese do trabalho, apresentada na **Introdução**, deu-se a partir de linhas de ação que seguiram: **a) construção do experimento, b) monitoramento, c) análises químicas, d) obtenção de resultados**, além da **e) interpretação dos resultados** (de forma comparativa com resultados disponíveis na literatura e com os dados encontrados nos diferentes modelos).

Paralelamente foi dada continuidade do levantamento de referências a respeito de técnicas de biorremediação aplicadas em sedimentos com características parecidas em outras áreas, contaminação ambiental no Rio São Paulo (e norte da BTS) e fatores físico-químicos que afetam a biodegradação dos hidrocarbonetos derivados do petróleo em sedimentos de manguezal.

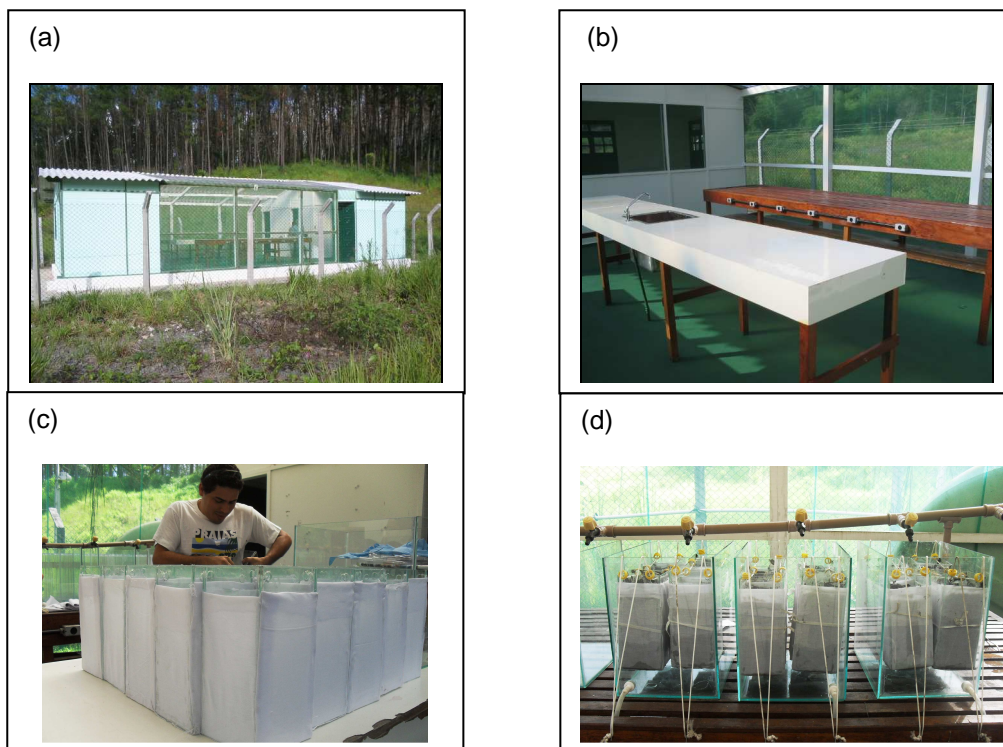
##### **a) Construção do experimento**

Esta pesquisa esteve voltada para o desenvolvimento de processos de biorremediação em áreas afetadas por atividades petrolíferas. Para tanto foi escolhida uma região localizada nas imediações da base de poço da Petrobras, Estação Pedra Branca, local onde está instalado o Laboratório de Simulação dos Processos de Biorremediação (LEPETRO – Unidade de Simulação) em São Francisco do Conde (zona de intensa atividade petrolífera no Recôncavo Baiano).

A realização dos experimentos de simulação ocorreu no laboratório implantado para realização de pesquisas desenvolvidas no âmbito da rede RECUPETRO (Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas).



Para a aplicação dos procedimentos foram utilizados acessórios como aquários confeccionados especificamente para tal finalidade (**Figura 2**).



**Figura 2** - (a) Vista lateral evidenciando o Laboratório de Simulação, construído e cercado; (b) Vista interna evidenciando as bancadas; (c) Tubos de ensaio para processos de biorremediação; (d) Tubos de ensaio dentro das unidades de simulação.

Para a construção dos ambientes (simulados nos aquários) foram definidos locais de coletas (**Figura 3**) que representaram as condições mais próximas da contaminação do estuário. Sendo assim, foram coletadas aleatoriamente amostras de sedimento com borras de óleo com auxílio de um testemunhador de metal inoxidável em regiões onde forem observadas exsudações e em uma área controle, definidas a partir de uma avaliação preliminar, foram coletados os sedimento sem contaminação por HTP's, baseados em estudo anterior (Moreira et al., 2010c). Posteriormente foi realizada a homogeneização do sedimento com resíduo de óleo definindo então o tratamento de sedimento contaminado, o qual foi usado neste estudo.

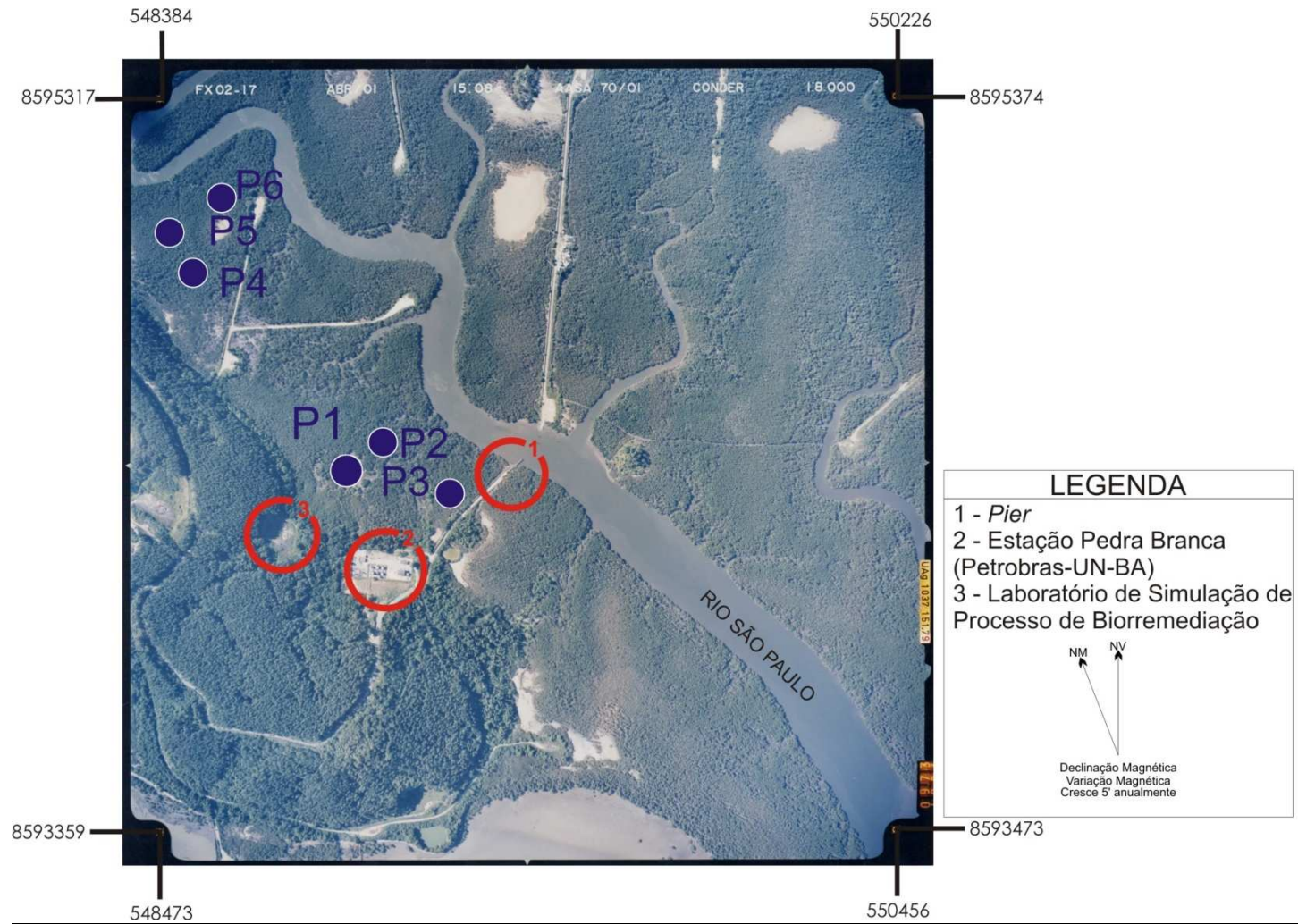
A água dos aquários foi captada diretamente do rio São Paulo (região de interesse) para distribuição e simulação do regime de maré. Posteriormente foram analisadas as concentrações iniciais dos metais e hidrocarbonetos totais, a fim de realizar uma investigação confirmatória inicial e finalmente detalhada (CETESB, 1999; OLIVEIRA et al., 2008).

Prioritariamente foram montados nos aquários três modelos de remediação (Fitorremediação I, Fitorremediação II, Biorremediação Intrínseca) com monitoramento durante 90 dias, conforme o seguinte delineamento:

1) Fitorremediação I – foram submetidas em sedimentos coletados na área, mudas de mangue vermelho (pré-selecionadas em pesquisa piloto) coletadas no local (foram validados os mecanismos da fitorremediação: fitodegradação, fitoestimulação e rizodegradação);

2) Fitorremediação II – foram submetidas em sedimentos coletados na área, mudas de mangue preto (pré-selecionadas em pesquisa piloto) coletadas no local (foram avaliados os mecanismos da fitorremediação: fitodegradação, fitoestimulação e rizodegradação); e

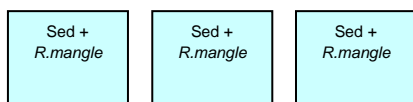
3) Biorremediação Intrínseca (atenuação natural monitorada) – onde foi monitorado a degradação dos hidrocarbonetos derivados do petróleo pelas bactérias hidrocarbonoclasticas intrínsecas, sendo caracterizada a densidade de bactérias nos três modelos, a fim de avaliar a eficiência da técnica, seguindo Romeiro (2001).



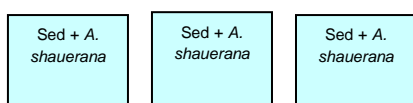
**Figura 3** – Mapa de Localização da dos pontos de coletas de sedimentos e borras de óleo na área de estudo. Os pontos P1, P2 e P3 são da área contaminada com borras de óleo. Os pontos P4, P5 e P6 são da área controle (confirmada em estudo anterior: Moreira et al., 2010b).

### Esquema de montagem do experimento:

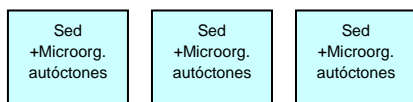
- 3 aquários (contendo 06 cubas cada) com sedimento controle + *R.mangle* = 18 cubas;



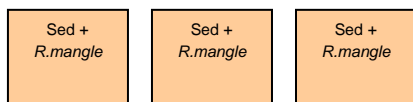
- 3 aquários (contendo 06 cubas cada) com sedimento controle + *A.schaueriana* = 18 cubas;



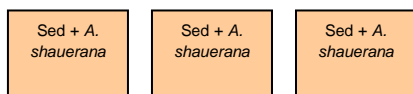
- 3 aquários (contendo 06 cubas cada) com sedimento controle + Microorganismos autóctones = 18 cubas;



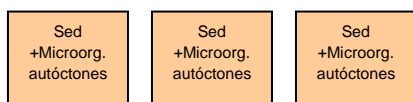
- 3 aquários (contendo 06 cubas cada) com sedimento contaminado + *R.mangle* = 18 cubas;



- 3 aquários (contendo 06 cubas cada) com sedimento contaminado + *A. schaueriana* = 18 cubas;



- 3 aquários (contendo 06 cubas cada) com sedimento contaminado + com Microorganismos autóctones = 18 cubas;



**TOTAL = 18 aquários = 108 cubas**

Esta metodologia teve como intuito avaliar qual o modelo mais eficiente na remediação, levando em consideração a segurança da população e dos compartimentos ambientais local.

### **b) Monitoramento**

Durante o desenvolvimento destes modelos, os organismos vegetais foram monitorados, por meio de parâmetros morfofisiológicos (Biomonitoramento). Em relação aos microorganismos, foi determinada a densidade de bactérias hidrocarbonoclásticas em cada modelo de remediação a fim de estabelecer possíveis relações com a capacidade de degradação dos contaminantes disponíveis nos sedimentos e a sensibilidade devido à presença de metais.

Foram monitorados também para cada modelo os parâmetros físico-químicos (pH,  $E_H$ , Salinidade, Condutividade e Oxigênio Dissolvido) nos sedimentos e nas águas utilizadas, além da biodisponibilidade dos contaminantes, sendo:

a) oxigênio dissolvido, usando-se um medidor de O.D. micro-processado, portátil, com precisão de  $\pm 0,05\%$ ;

b) pH, medidas efetuadas com medidor de pH portátil, digital, com precisão de 0,01 unidades de pH;

c)  $E_H$ , medidas efetuadas com medidor de  $E_H$  portátil, digital, com precisão de 0,01 unidades de  $E_H$ ;

d) salinidade, usando-se um refratômetro manual, com precisão de  $\pm 0,5$ ;

e) temperatura, usando-se termômetro acoplado ao oxímetro anterior, com precisão de  $\pm 0,5$  °C;

f) condutividade, efetuada com condutivímetro portátil, digital, com precisão de 0,05 %.

### **c) Análises químicas**

Ao final de cada intervalo estabelecido T0, T1, T2, T3, T4, T5 (conforme **Quadro 1**) foram determinadas em amostras selecionadas aleatoriamente às

concentrações quantitativas de hidrocarbonetos totais (análises cromatográficas) e de metais pesados (Pb, Cd, Zn, Cu, Ni, Cr, Al, Fe), através de espectrofotômetro de absorção atômica, nos sedimentos para cada modelo. Foi avaliado também o mecanismo da fitorremediação empregado mais eficiente de acordo com a EPA (2000). As amostras foram encaminhadas para Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO) para determinação das frações dos hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos através dos métodos USEPA8270D e USEPA8015B. As análises foram efetuadas utilizando padrões internos e o programa analítico conduzido sob condições controladas de laboratório como descritas a seguir.

**Quadro 1** - Intervalo amostral para o experimento de remediação de sedimentos provenientes de área impactada por atividades petrolíferas.

<p><b>TO</b> = No dia da primeira coleta* em campo (amostragem sem provetas), quando o experimento será montado e iniciado = equivalente a 3 amostras (triplicatas) coletadas no campo – água, sedimento e mudas;</p> <p><b>T1</b> = <u>7º dia da coleta em campo</u> = equivalente a 3 amostras (triplicatas) coletadas em cada modelo do experimento – água, sedimento e mudas;</p> <p><b>T2</b> = <u>15º dia subsequente à coleta em campo</u> = equivalente a 3 amostras (triplicatas) coletadas em cada modelo do experimento – água, sedimento e mudas;</p> <p><b>T3</b> = <u>30º dia após a coleta em campo</u>= equivalente a 3 amostras (triplicatas) coletadas em cada modelo do experimento – água, sedimento e mudas;</p> <p><b>T4</b> = <u>60º dia após a coleta em campo</u> = equivalente a 3 amostras (triplicatas) coletadas em cada modelo do experimento – água, sedimento e mudas;</p> <p><b>T5</b> = <u>90º dia após a coleta em campo</u> = equivalente a 3 amostras (triplicatas) coletadas em cada modelo do experimento – água, sedimento e mudas.</p>
<p>*A coleta da água para esta avaliação será feita no mesmo dia da coleta dos sedimentos, ou seja, nos 09 períodos acima mencionados. No entanto, a cada dia, juntamente com a simulação da maré, os parâmetros físico-químicos (pH, E<sub>H</sub>, salinidade, temperatura, O.D., condutividade) serão quantificados ao inserir e ao retirar a água do aquário (intervalo de horas estabelecido: 2h).</p>

### **- Cromatografia Líquida**

Uma massa de 5 g da amostra de sedimento, sem tratamento prévio, foi extraída com diclorometano ultrapuro em soxhlet. O extrato orgânico foi então concentrado em um concentrador de célula fechada do tipo Kuderna Danish a um volume de 1 mL. A massa de óleo foi determinada neste concentrado por gravimetria.

A fração de hidrocarbonetos saturados foi separada deste extrato através do tratamento do mesmo com uma coluna de sílica gel ativada e eluição com hexano ultrapuro. A fração de hidrocarbonetos aromáticos foi separada através da eluição com uma mistura de hexano/diclorometano da mesma coluna, e a fração de NSO separada através da eluição do mesmo extrato na coluna com metanol. Todas as frações foram determinadas por gravimetria.

### **- Cromatografia gasosa de hidrocarbonetos saturados**

Uma massa de 5 g da amostra de sedimento, sem tratamento prévio, foi fortalecida com uma solução de hidrocarboneto a concentrações definidas e extraída com hexano ultrapuro em soxhlet. O extrato orgânico foi então concentrado em um concentrador de célula fechada do tipo Kuderna Danish a um volume de 1 mL. A massa de óleo determinada neste concentrado por gravimetria e a fração de hidrocarbonetos saturados foi separada deste extrato através do tratamento com uma coluna de sílica-gel ativada. O concentrado final foi diretamente injetado, sem divisão de fluxo, em uma coluna de fase estacionária 30m DB-5 instalada em um cromatógrafo a gás HP 6890.

A programação de cromatografia gasosa (CG) foi a seguinte: injeção sem divisão de fluxo, com o injetor a 280 °C; temperatura inicial da coluna 50 °C, isoterma por 1 minuto, taxa de aquecimento de 6 °C/min até a temperatura final de 310 °C, isoterma de 10 minutos.

### **- Espectrometria de absorção atômica**

Em laboratório, para determinar os teores de metais totais foi utilizado o método de digestão com Água Régia (FOSTER, 1995) utilizando a proporção 3:1 (clorídrico - nítrico). Foi pesado 5 g de cada tratamento de sedimento para cada um

erlenmeyer de capacidade de 125 mL. Logo após foi adicionado 10 mL da solução submetida a um aquecimento de 95 °C durante 10 minutos sem ebulição. Em seguida, após esfriar foram adicionados 5,0 mL de ácido nítrico concentrado e colocados sobre refluxo de 30 minutos.

Após os procedimentos iniciais foi submetido às soluções a evaporação para cerca de 5 mL, sem ebulição. Em seguida foi adicionado 5,0 mL de ácido clorídrico concentrado em 10 mL de água deionizada, deixando sobre refluxo por 15 minutos, sem ebulição. Por fim, foi utilizado papel de filtro quantitativo para filtrar as soluções em balões volumétricos de 50 mL. Após a extração dos metais pesados as amostras foram submetidas a análises químicas utilizando-se a técnica de espectrometria de absorção atômica.

#### **- Biomonitoramento fisiológico**

Durante período de três meses as espécies vegetais serão monitoradas, sendo avaliadas as modificações morfológicas nas folhas e quanto ao crescimento. Ao final do trimestre foram medidos os tamanhos dos espécimes, em cada proveta e logo após, calculada a média de tamanho (biometria) para cada uma no sedimento controle e contaminado.

#### **e) Análises Microbiológicas**

Durante os noventa dias de experimento foram coletadas amostras de sedimentos nos dois modelos e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia e Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia (UFBA) para avaliar a densidade bacteriana. Para cada amostra 25g de diferentes amostras de sedimentos foram transferidos para erlenmeyers contendo 90mL de água peptonada estéril a 0,1%. Cada amostra foi agitada a 200rpm/30 minutos. Para a contagem de colônias, foi utilizada a técnica de plaqueamento por "microgota" (Romeiro, 2001), onde foram feitas diluições decimais em ágar nutriente (AGAR). As placas foram incubadas a 25° C ± 1° C por 24 horas. Após a incubação, as placas selecionadas foram as que continham entre 1-30 colônias. O número de colônias contadas foi multiplicado pelo inverso da diluição e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC).



## **f) Obtenção de Resultados**

Os dados foram registrados e tabulados diariamente para o Biomonitoramento e também das medições parâmetro não conservativos (Parâmetros físicos e químicos). Para os resultados de análises químicas foram tomados a cada intervalo estabelecido (1º, 7º, 15º, 30º, 60º e 90º dia) e tabulados em planilhas Excel.

## **f) Interpretação dos Resultados**

Todos os dados gerados foram analisados de forma comparativa com outros dados na literatura, assim como submetidos a tratamento estatístico, tendo como base a Estatística Multivariada aplicada a projetos ambientais.

Além da utilização das análises estatísticas descritivas, para alcançar o objetivo proposto foi utilizado para o tratamento estatístico o aplicativo *Statistica for Windows, versão 7.0 da Statsoft Inc.*. Sendo assim, as etapas desenvolvidas no tratamento estatístico dos dados foram as seguintes:

- Análise descritiva para identificação de valores discrepantes, a partir de gráficos do tipo “Box-plot”;

- Utilização do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, para verificar se existiram diferenças estatisticamente significativas entre os valores obtidos de concentração de hidrocarbonetos e metais pesados para cada modelo em cada intervalo amostral definido, avaliando-se a possibilidade de utilização de dados em conjunto;

- Comprovação da existência ou não de significância estatística das diferenças observadas entre os dados nos diferentes modelos, para cada intervalo estabelecido, pelo método paramétrico Anova, comprovando para propriedades físico-químicas, os metais e hidrocarbonetos, a possibilidade de utilização como dados em conjunto;

- Análise descritiva dos dados em conjunto através da Correlação de Pearson e da Análise de Componentes Principais (PCA).

## 5. ARTIGOS SUBMETIDOS

### 5.1. PHYTOREMEDIATION USING *Rizophora mangle* L. IN MANGROVE SEDIMENTS CONTAMINATED BY PERSISTENT TOTAL PETROLEUM HYDROCARBONS (TPH's)

Icaro T. A. Moreira<sup>a</sup>, Olivia M. C. Oliveira<sup>a, b</sup>, Jorge A. Triguís<sup>a</sup>, Sérgio L. Ferreira<sup>a, c</sup>, Antonio F. S. Queiroz<sup>a</sup>, Gilmar A. Nuno<sup>a</sup>, Marcelo O.M. Cruz<sup>a</sup>, Taina C. A. Mamede<sup>a</sup>

a. Núcleo de Estudos Ambientais, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

b. Instituto de Geociências, Departamento de Geofísica Aplicada, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Campus de Ondina, 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

c. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Campus de Ondina, 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

d. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, INCT, de Energia e Ambiente, 40170-290 Salvador-BA, Brasil.

\* Corresponding author: Tel: +55 71 3283 8632, Fax: + 55 71 3283-8632, Emails address: [icaromoreira@ufba.br](mailto:icaromoreira@ufba.br); [icarotam@gmail.com](mailto:icarotam@gmail.com) (Ícaro Thiago Andrade Moreira)

**“Capsule”:** *Total petroleum hydrocarbons in the mangrove sediments can be removed more completely and rapidly by using the phytoremediation*

#### **Abstract**

In this study it was developed a pilot-scale experiment during 03 months on the implementation of a Phytoremediation model with species *Rizophora mangle* L. and a model of Intrinsic Bioremediation, in order to trying to compare which model

would achieve the maximum effectiveness of degradation of total petroleum hydrocarbons in mangrove sediment. After 90 days a higher efficiency in removing organic compounds from sediment by Phytoremediation (87%) was observed. This larger efficiency in the remediation of the plant was enhanced with the largest growth of bacteria in its rhizosphere, reaching the highest CFU g<sup>-1</sup>, 31 x10<sup>6</sup>. It was observed a larger growth of plants exposed to contaminated sediments (46.3 cm) compared to those grown in reference sediments (34.4 cm), suggesting a good adaptation. The data showed that the Phytoremediation is an effective in the degradation of TPH's, becoming a promising option in the application of the technique in mangrove areas.

*Keywords:* Phytoremediation, Total Petroleum Hydrocarbons (TPH's), Mangrove sediments, *Rizophora mangle* L., Red mangrove

## **1. Introduction**

Accidents caused by oil spills have the potential to cause various environmental and economic effects on a wide variety of natural resources and services. Pilot studies based on environmental restoration of coastal regions are becoming increasingly necessary, given the importance of these ecosystems to the ecological balance and also because they are targets of major impacts of petrogenic origin, caused mainly by the oil industry accidents. The severity of these effects depends on the season, the discharge volume, type and location where such discharge occurs, and especially the environmental conditions at the time of

occurrence (Bossert, 1984; Peters et al., 2005; Wang and Stout, 2007). Contamination of the aquatic environment has become a serious problem in many parts of the world, with rivers and bays often seriously affected. Almost all marine coastal ecosystems have complex structural and dynamic characteristics that can be easily modified by human influence. Estuarine and marine sediments are sinks for various contaminants transported from other ecosystems (Fedo et al., 1996; Nesbitt et al., 1996; Nath et al., 2000; Adamo, 2005, Celino et al., 2008).

Total Petroleum Hydrocarbons (TPH's) represents one of the most common groups of persistent organic pollutants in the environment. They have been studied much more because they are toxic to many organisms and human health. The main sources of contamination in soil and sediment by TPH's include the different sectors of the petroleum industry, such as extraction, refining and consumption (McNicoll and Baweja, 1995; EPA, 2000). Remediating persistent TPHs from soils is generally a slow and expensive process. This is particularly true for the most recalcitrant portion of TPHs. For instance, the high molecular weight fractions derived from oil refinery sludge are exceptionally hard to remediate (Mc Nicoll and Baweja, 1995; Huang et al., 2005). The process of TPH's removal in the sediments of aquatic environments is determined by its interaction with the system and controlled by physical and chemical factors, composition of the microbial community, the hydrodynamic site, sunshine, temperature, sediment grain size, nutrient availability, among others (Atlas, 1982, Sugiura et al., 1997; Colombo et al., 2005; Lacerda, 2006).

Many TPH's removal techniques in soils and sediments are being applied to attempt the restoration of environments, such as ex situ: Chemical Oxidation, Thermal Desorption, Biopiles and Incineration. Moreover, other in situ techniques, such as: Landfarming, Air sparging, Biosparging, Bioventing, Reactive Barriers,

Bioremediation (Bioaugmentation and Biostimulation), Intrinsic Bioremediation (monitored natural attenuation) and Phytoremediation, were applied (Atlas, 1982; Seabra, 2008). In recent years, there was a larger tendency for in situ methods once they offer less risk to the environment, which are efficient and cheap. With advances in biotechnology, Phytoremediation has emerged as the alternative that best fit the requirements listed here (Espinosa, et al., 2005; Huang, et al., 2005; Parrish, et al., 2005; Doumet, et al., 2008).

Phytoremediation is a biological technology that utilizes natural plant processes to enhance degradation and removal of contaminants in soil, sediments or groundwater. Broadly, Phytoremediation can be cost-effective in large areas with high residual-levels of contamination by organic, nutrient, or metal pollutants, when applied correctly (Kamath et al., 2004). The correct application depends on a previous study to be able to assess the efficiency of the plant specimen to be applied and the possible risks to the ecosystems where it is applied.

In mangrove sediment, the capture, transformation, volatilization and rhizodegradation of TPH's are important processes that occur during Phytoremediation. Microbial degradation in the rhizosphere (rhizodegradation) may be the main mechanism for cleaning a variety of soils contaminated by petroleum, including mangrove sediments. This occurs because the contaminants, such as PAHs, are highly hydrophobic, and their absorption into the soil reduces their bioavailability for capture by plants and consequently their phytotransformation (Kamath et al., 2004). The success of rhizodegradation depends on the presence of and interaction between specific microorganisms, adequate environmental conditions and the oil availability (Santos et al., 2010).

A promising species for the application of Phytoremediation in mangrove sediments is *Rizophora mangle* L. (red mangrove), due to its characteristics of absorber plant, of strong interaction with the microbial community, not being sensitive to the presence of TPH's in the sediment (Fruehauf, 2005; Moreira et al., 2010a). *R. mangle* L. are native species found along the Atlantic coast from Florida to Southern Brazil, and in western Africa from Senegal to Angola. The cold climate in the North sets the limits of mangrove forests in the region. For the *R. mangle* in the U.S.A. coast is the limit, Bermuda the most precise. (Thomas 1993, Smith 1998; Zomlefer et al., 2006; Stuart et al., 2007).

The objective in this study was to evaluate the efficiency of the *R. mangle* application to the Phytoremediation of contaminated sediments by TPH's. The research was based on a controlled pilot-scale, where it was the closest simulated environmental conditions of a mangrove. The sediment used was monitored for 90 days, with six samples, using physical, chemical and geochemical parameters and nutrients.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Sediments sampling/collection and mixing*

The sediments used in the models of remediation in this study were collected in an estuary located near the cities of Candeias and São Francisco do Conde, North of the Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. Sediment samples were collected from 0

to 30 cm depth at random from five locations. The sediment samples were sieved through a 4 mm sieve to eliminate coarse rock and plant material, thoroughly mixed to ensure uniformity. Five sub-samples were dried in a lyophilize cold for 72 hours and sieved through 2 mm mesh to determine selected soil physical and chemical characteristics (**Table 1**). Particle-size distribution was determined after the organic matter was removed with 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, by the Folk and Ward (1957) method. Soil organic matter was determined using a modified Mebius method (Nelson and Sommers, 1982). Total N was determined by the Kjeldahl's digestion, distillation and titration method (Bremner and Mulvaney, 1982) and available P by the Olsen extraction method (Olsen and Dean, 1982).

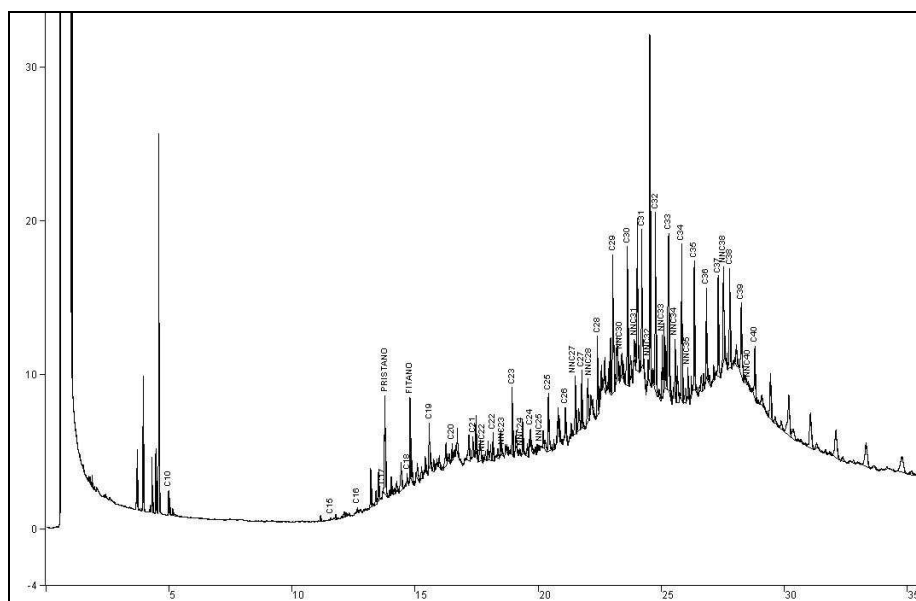
**Table 1** - Some selected physicochemical properties of the sediment used in experiment.

<b>Parameters</b>	<b>Value</b>
<b>Textural class</b>	Sandy Mud
<b>Particle-size distribution</b>	
<b>Sand (%)</b>	23,65
<b>Silt (%)</b>	73
<b>Clay (%)</b>	3,25
<b>Organic matter (%)</b>	5,73
<b>Organic carbon (%)</b>	3,32
<b>Total N (%)</b>	0,36
<b>Avaiable P (mg/L)</b>	1,8

## 2.2. Addition of oil residual in the sediment

Sediment samples were mixed in a 1:10 ratio with oil residue found in the same area, a region with many activities in the petroleum industry (extraction, transportation and refining). Immediately after being mixed the oil residue with the sediment, five samples of the mixture were collected to analyze the concentration of TPH's. The composition of the oil residue used is shown in **Fig. 1**. It was collected a sediment in a reference area, as discussed in another research by Moreira et al. (2010b) for comparisons of the parameters analyzed in this study.

**Figure 1.** Gas Chromatography (FID) of residual oil used in the study



## 2.3. Sediment remediation

All experiments were conducted in a greenhouse (Laboratory deployed to conduct research developed within the network RECUPETRO/UFBA - Cooperative



Network Recovery in Areas Contaminated by Petroleum Activities, linked to the Federal University of Bahia) near the mangroves where they collected samples of sediments, in environmental conditions very close to the original ecosystem, with an average temperature of 24.6 ° C. The dynamics of a mangrove was simulated, with tidal regime, sediment used for the application of remediation techniques. These simulation units were made of glass (50X30X40cm). Within each unit of simulation 6 tubs of glass were added (30X10X10cm) and they were applied to two models of remediation compared in this study. These tubs of glass, were suspended in the unit simulation, allowing the simulation of tidal regime with water runoff. Tubs of glass were closed at the bottom to prevent loss of chemical residue when watering. All units received the treatment simulation of daily tidal regime with an adequate amount of water (approximately 10L) to maintain constant humidity of sediment, as in the mangrove ecosystem. The experimental projects are three replicates of each treatment and analysis of three samples from each repetition. To assess the efficiency of TPH's Phytoremediation in the sediment, each of the components described below were tested separately, taking into consideration public safety and local environmental compartments.

### *2.3.1. Phytoremediation*

To evaluate the efficiency of Phytoremediation in mangrove sediment, the species *R. mangle* (red mangrove) was selected. This choice was based on pre-tests conducted earlier by our group as well as with other studies suggesting the use of this for Phytoremediation (Eysink 1997, Moreira et al., 2010a, Moreira et al., 2010b).

Seedlings of *R. mangle* were collected at low tide, taking into consideration their height (average of 3 months old), defining a standard sampling in order not to compromise the research results. The plants were submitted in sediments mixed with waste oil from the study area. In the laboratory simulation, the species were planted in glass tubes, where the daily regimen was simulated with the tidal water of the mangrove and morphophysiological monitoring was conducted during 90 days. During the growth period, plants were watered twice a week with bottled water as needed.

#### *2.3.2. Bioremediation*

It was used the Intrinsic Bioremediation (Natural Attenuation Monitored) - where it was monitored the degradation of hydrocarbons derived from petroleum hydrocarbon by bacteria present in the sediment mixed. It was characterized the density of the bacterial community in order to compare the presence of microorganisms in phytoremediation.

#### *2.4. Quantification of bacterial community*

For microbiological analysis, 25 g of different samples were transferred to Erlenmeyer flasks containing 90 mL of sterile 0.1% peptone water. Each sample was stirred at 200 rpm/30 minutes. For colony counting, it was used the technique of

plating by “microgota” (Romeiro, 2001), decimal serial dilutions in agar nutrient agar (NA) (in g / L beef extract, 3; bacteriological peptone, 5; NaCl, 3; agar, 13). The plates were incubated at  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  for 24 hours. After incubation, the plates selected were the ones that contained between 3-30 colonies. The number of colonies counted was multiplied by the reciprocal of the dilution and the results expressed as Colony Forming Units (CFU). Quantification of bacterial density was assessed in two models of remediation.

### *2.5. TPH extraction and analysis*

TPH levels in the sediment were determined by assaying for total hydrocarbons. Sediment samples (approximately 50 g) from their remediation experiments were collected at 0, 7, 15, 30, 60 and 90 days after the start of the experiments they were stored at  $4^{\circ}\text{C}$  until analysis. The storage time for the collected samples was no longer than 10 days and the storage had no effect on TPH levels in soil (data not shown). The sediment samples were dried in a cold lyophilizer, constant temperature -  $50^{\circ}\text{C}$ . The dried sediments (5 g) without previous treatment, were extracted with dichloromethane/hexane mixing (1:1, v/v). The extracts were concentrated to allow the solvent to evaporate completely, and then the amount of extracted sludge was determined gravimetrically. The extracted oil was weighed approximately 0.02 g for the fractionation of saturated compounds in an activated silica gel column and eluted with ultrapure hexane (30mL). After that the eluted was evaporated and then swelled to 1 mL with the same solvent elution. Extracts were quantified using a Varian CP 3800 gas chromatograph equipped with a

DB-5 capillary column (30 m length, 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m film thickness) and Flame Ionization Detector (FID). GC conditions were as follows: injector temperature, 300° C, starting oven temperature, 40° C; 40° C (hold 2min) ramp 10° C  $\text{min}^{-1}$  to 300 (hold 12min); detector temperature, 300° C. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0  $\text{ml min}^{-1}$  and a split ratio of 10:1 was used. Standard was prepared from the same TPH (C10 – C40) stock chemicals.

### *2.6. Statistical analysis*

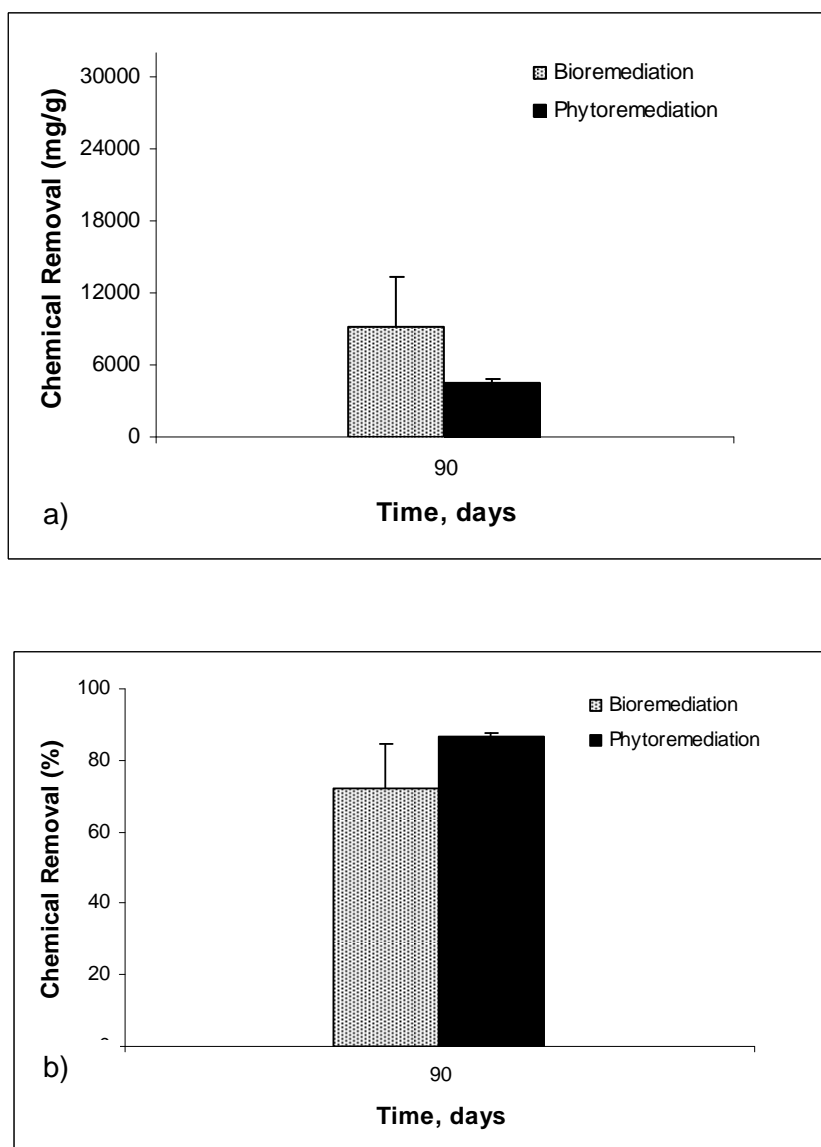
It was used analysis of variance in order to verify the existence or not of significant difference between the two models used. Whereas the condition to submit sample data to a parametric analysis of variance is that their variances do not show significant difference, it was applied the test of Bartlett described in Beiguelman, to test the homogeneity of variances. To check the normality of data the Kolmogorov-Smirnov test was applied. This test indicated, through a chi-square, that there is no significant difference between the variances of the samples. As variances were homogeneous, ANOVA was applied to a single parametric classification, which showed significant difference between the two models. But it has been done, "a posteriori", a test for multiple parametric Turkey-Kramer to affirm the significant difference between the models. These statistical analyses were performed using the GraphPad Software.

## **3. Results**

### 3.1. The effectiveness of the models remediation for removal of TPH's from sediment of mangrove

With the intention of evaluating the effectiveness of remediation models employed in this research (Intrinsic Bioremediation and Phytoremediation) for removal of HTP's in mangrove sediments contaminated, an experiment was conducted in pilot scale to compare the different methods of correction. The results showed that after 90 days the Intrinsic Bioremediation (Natural Attenuation Monitored) was able to remove 70% of TPH's individually, while the Phytoremediation (*R. mangle*) was able to remove approximately 87% of the TPH's present in the contaminated sediment (**Fig. 2a**). It was a statistically significant removal of the TPH's Phytoremediation with *R. mangle* regarding Intrinsic Bioremediation in contaminated sediments. These results indicate that the Phytoremediation with *R. mangle* has a larger capacity for degradation of TPH's in mangrove sediments. Analysis of TPH's removed by Phytoremediation with *R. mangle* showed that levels of contaminants in the sediment were reduced from 33.2 to 4.5 mg / g, while the Intrinsic Bioremediation has lowered from 33.2 to 9.2 mg / g in a growing season of 3 months (**Fig 2b**). Thus, Phytoremediation was able to remove approximately 17% more sediment TPH's than the Intrinsic Bioremediation.

**Figure 2.** TPH's removal for Intrinsic Bioremediation and Phytoremediation (*Rizophora mangle* L.). The data are presented as percent of chemical removed relative to the sediment that contains 32,2 mg/g of 100% residual oil (n=3). a) Indicates removal percentage, b) Indicates the removal in mg/g.

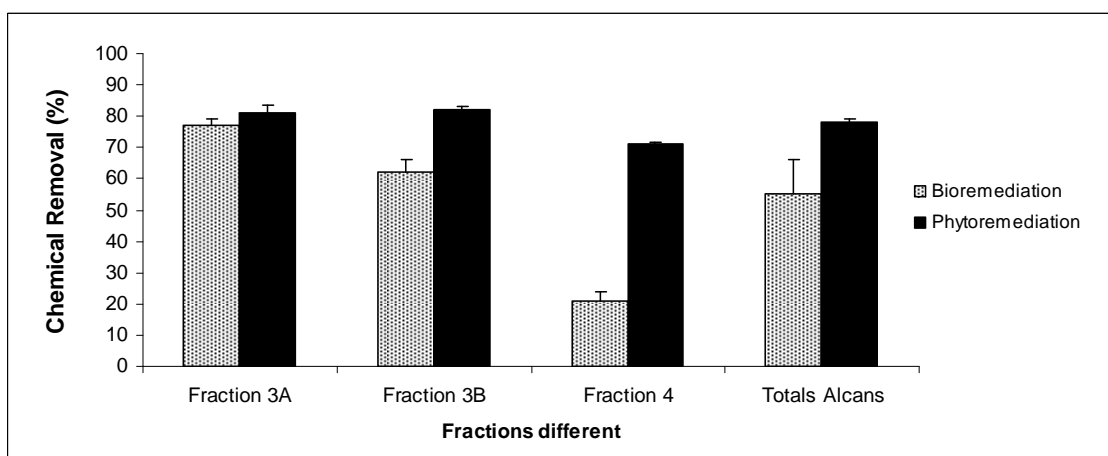


### 3.2. The effectiveness of the models remediation for removal of different fractions of TPH's from sediment of mangrove

Based on Huang and employees (2005), it was used fractions 3A (C16-23), 3B (C23-34) and 4 (C34-40) which are the most TPH's of recalcitrant contaminants in

the sediment. These molecules are very resistant to remediation because of their fractions which are hydrophobic and have a high molecular weight. The results indicate that the Phytoremediation with *R. mangle* was more effective than the Intrinsic Bioremediation in the removal of all fractions of TPH's contaminated sediment. However in fraction 3A (C16-C23), both models remediation efficiencies gained quite close. In the fraction 3B (C23-34) the results showed that the degradation efficiency of Phytoremediation was moderately higher (82%) than that of Intrinsic Bioremediation (63%), while the fraction (C24-C40) this difference was the larger (Phytoremediation: Intrinsic Bioremediation and 70%: 21%). After three months of the Phytoremediation with *R. mangle* had fallen into major components of fractions 3A, 3B and 4, with an efficiency of about 78%, the Intrinsic Bioremediation declined only about 55%, taking into account the levels of total remediation TPH's (**Fig. 3**).

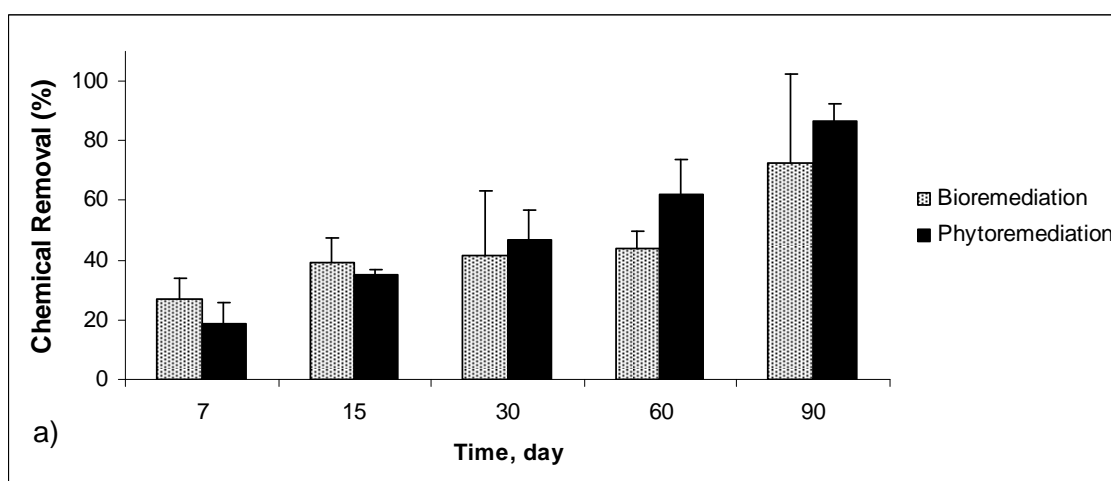
**Figure 3.** Chemical removal (%) the fractions different in the remediation models, after 90 days (n=3).



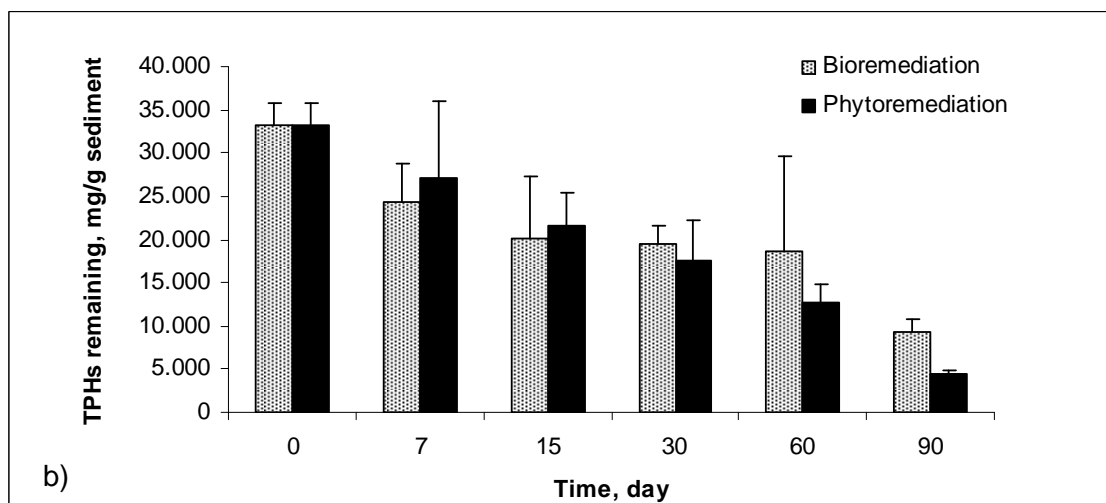
### 3.3. Temporal analysis of the models remediation for removal of TPH's from sediment of mangrove

It was assessed the effectiveness of two models of remediation applied (Phytoremediation and Bioremediation Intrinsic) based on the total content of TPH's staying in the mangrove sediment a function of time (**Fig. 4**). The repair rate remained relatively constant for Phytoremediation, resulting in pseudo-zero order kinetics for the whole period of 3 months. This behavior of Phytoremediation became a more effective model than the Intrinsic Bioremediation, despite having degraded a higher rate at the beginning of the experiment, failed to keep their initial rates of recovery during the experiment. After 90 days, the total amount removed by TPH's *R. mangle* was approximately 87%, while for the Bioremediation was approximately 70%, with a strong decrease in the rate of removal.

**Figure 4.** TPH's removal in the mangrove sediment a function of time (n=3). a) Indicates removal percentage, b) Indicates the removal in mg/g.





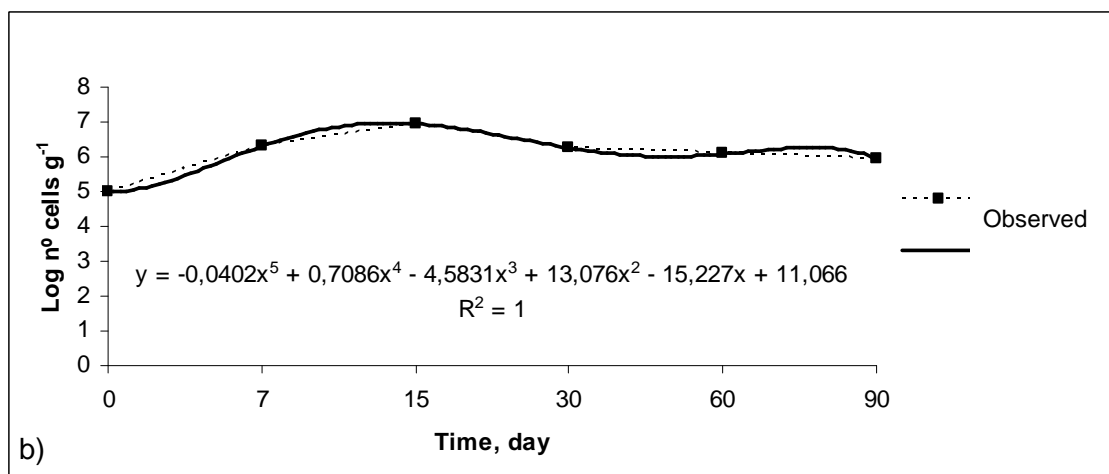
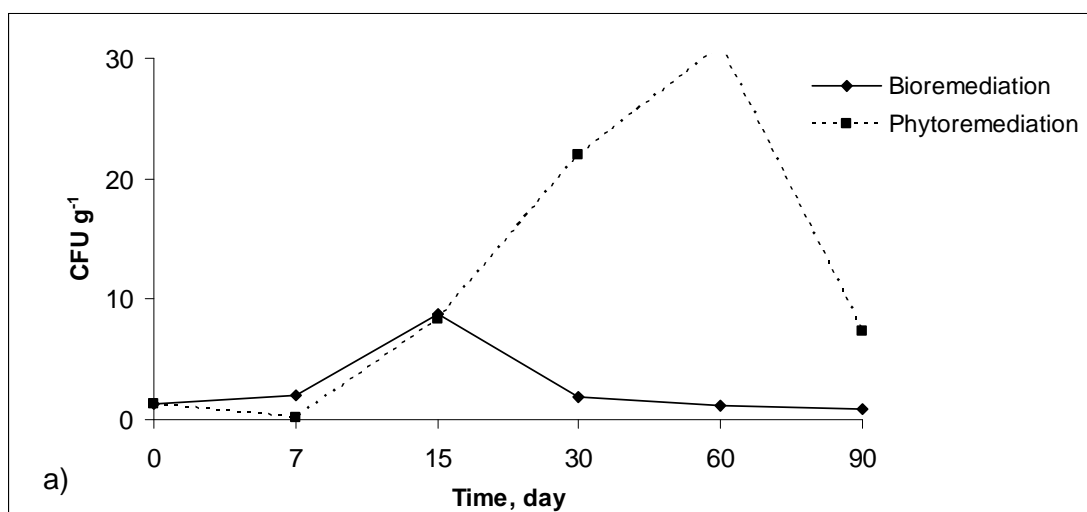


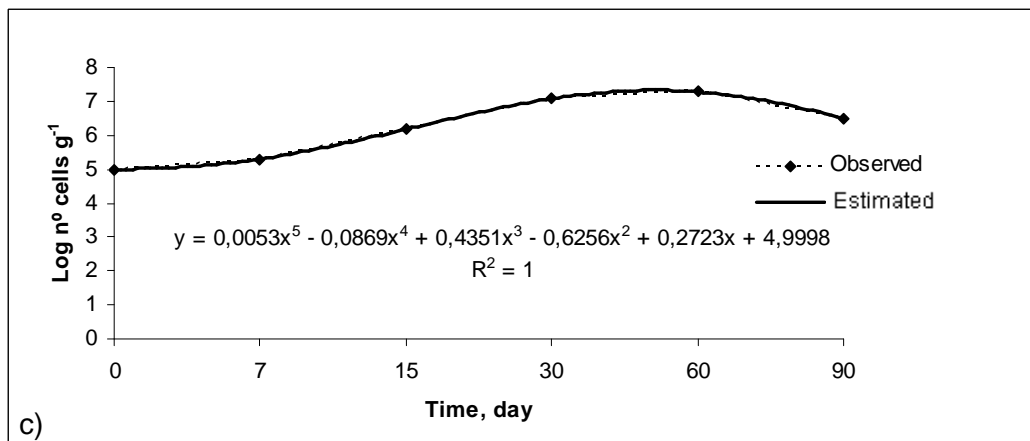
#### 3.4. Temporal quantification of bacterial community of the models remediation

During the 90 days of the experiment, the total number of viable bacteria for the two models remediation (Phytoremediation and Bioremediation Intrinsic) applied to sediment contaminated with TPH's, were quantified in six pre-established samples. The results concerning the initial average count of bacteria are between  $0.1$  and  $0.2 \times 10^6 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$ , determined at the beginning of the experiment. After being applied the models of the remediation in sediments, there was a significant increase in the number of microorganisms after the 7th day in the two models, showing significant difference compared to the initial sediment sample,  $8.3 \times 10^6$  and  $8.8 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$  respectively. After the 30th day there was a drastic drop in the number of microorganisms in the application model of Intrinsic Bioremediation ( $1.8 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$ ), however there was an increase in Phytoremediation of the microbial community, and quantified values from  $20.2 \times 10^6$  to  $24.4 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$ . **Figure 5** presents the

total count of bacteria for 90 days, with data expressed in polynomial trend with a coefficient of determination  $R^2$  of 100% for total bacterial counts.

**Figure 5.** Total count of bacteria during 90 days, with data expressed in polynomial trend with a coefficient of determination  $R^2$  of 100% ( $n=3$ ). (a) Comparison between models, b) Count of bacteria in the Intrinsic Bioremediation, observed and estimated, c) Count of bacteria in the Phytoremediation, observed and estimated.

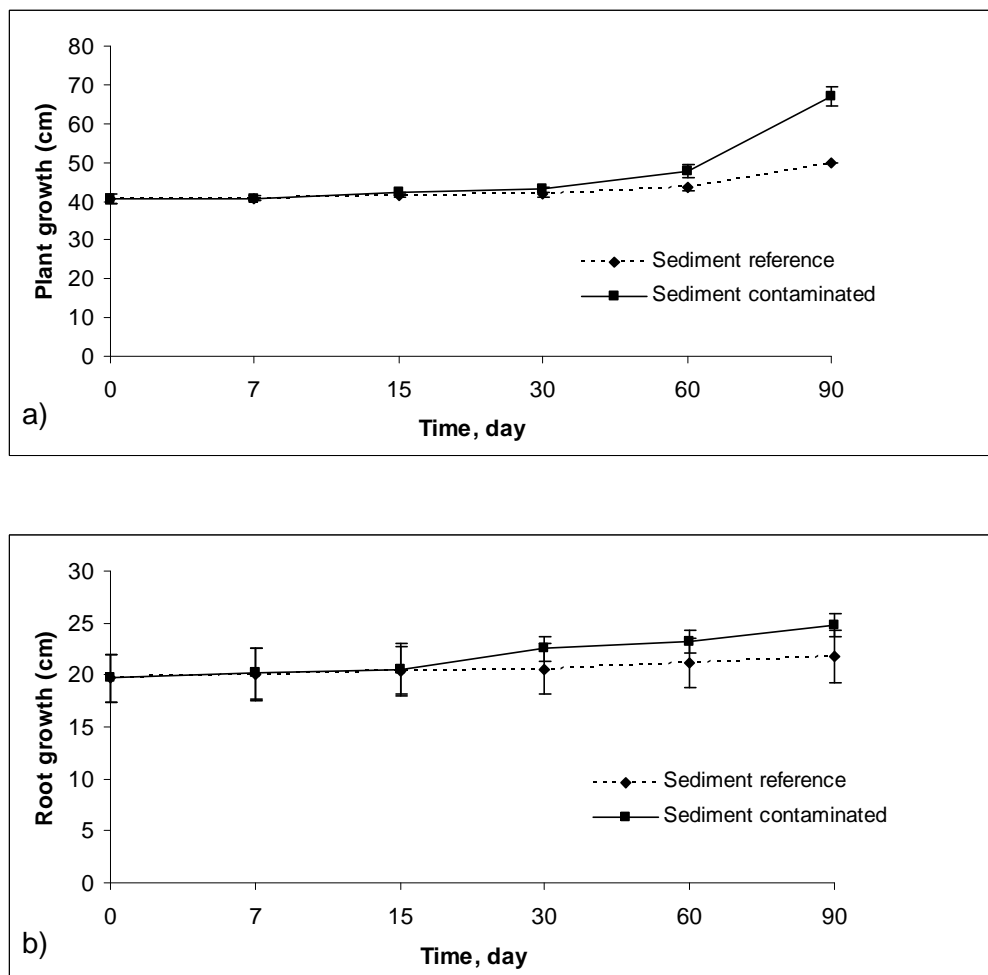




### 3.5. Physiology of *Rizophora mangle* used for Phytoremediation

The sediments have high concentrations of TPH's, like those that were quantified in this study are quite toxic to plants, as these contaminants cause in many cases a negative impact on the vegetation growth of plants. Thus, the effects of TPH's in the sediment on the growth of *R. mangle* were evaluated by measuring the sizes of plants and their roots, by comparing the growth of plants of the contaminated sediment with the sediment reference (**Fig. 6**). Unexpectedly there was a higher growth in the experiments of Phytoremediation in contaminated sediments compared to the reference sediment, watching 22% increases in plant growth and root 4% bigger. Therefore, biomass accumulation of plants in contaminated sediment was higher than the plants in sediment reference non-contaminated. This growth increased in the red mangrove sediments probably indicates that the plant has a good adaptation to the conditions found in contaminated sediment, allowing for larger growth than plants in contaminated sediment.

**Figure 6.** Growth of *R. mangle* evaluated by measuring the sizes of plants (a) and their roots (b) (n=3).



#### 4. Discussions

The results of this study showed that the model of Phytoremediation with *Rizophora mangle* is more effective in removing each the TPH's fractions in the contaminated sediment in relation to Intrinsic Bioremediation. Despite this trend already observed in other studies (Yuan et al., 2001; Tam et al., 2008; Yergeau et al., 2009) of remediation processes applied in sediments contaminated by TPH's, it is still

observed an increased use of other techniques in the recovery of areas impacted by oil activities, such as the "Land farming" (McCarthy et al., 2002; Huang et al., 2004; Huang et al., 2005) that is a bioremediation technique in field scale at which the surface of contaminated sediments are removed by wind, enhancing the activity of endogenous microorganisms and Intrinsic Bioremediation. However, these conventional techniques mentioned, although having a larger number of applications, especially in industrial areas contaminated, they have severe limitations in the removal of highly hydrophobic organic compounds, problems of degradation in sediments that have concentrations of contaminants at different heterogeneous depths, mainly when applied individually in the contaminated areas. This research shows once again that the Intrinsic Bioremediation is less efficient in the degradation of TPH's than the Phytoremediation.

The results for the removal of different fractions of TPH's found in this study showed that application of Phytoremediation was more efficient for the three fractions analyzed - 3A (C16-23), 3B (C23-34) and 4 (C34-40) - after the 90 days experiment compared with Intrinsic Bioremediation. This is justified probably because of the Phytoremediation act in the removal of contaminants jointly with different processes which also includes transfer, stabilization and destruction of organic compounds in sediments (Rocha, 1997; Cunningham et al., 1996; Cunningham et al., 1995). Degradation mechanisms that may have used *Rizophora mangle*, ranges from phytostabilization, preventing the absorption and acts by phytostimulation of microorganisms present in its rhizosphere, therefore acting with rhizodegradation. One should also consider the possibility of the plant had absorbed the organic compounds and, later had achieved the phytodegradation. However, despite these possibilities, probably the mechanisms used by the red mangrove, had the lowest

efficiency for fraction 4 (C34-40), which was observed in the results, although quite significant compared with Intrinsic Bioremediation, which had a decrease in kinetic remediation after the degradation of the lighter compounds. This is because of the Phytoremediation which is a set of processes acting in the degradation of organic compounds, unlike the Natural Attenuation.

The total number of bacteria that degrade hydrocarbons were evaluated during the application of two models of remediation over 90 days of the experiment, where the concentration in Intrinsic Bioremediation was higher until day 30, compared to Phytoremediation, hence indirectly the most initial efficiency degradation of different fractions of organic compounds. However, from the 30<sup>th</sup> day on it was observed an increase in bacterial density in sediment treated by red mangrove, reaching a count up to ten times more than the Bioremediation, which in turn may have caused a major acceleration in the kinetics of remediation and with it a more efficient process. The vegetated sediment microbial community is usually larger than that of non-vegetated sediment (Anderson et al., 1993). Importantly, the presence of contaminants and root exudates usually modifies the composition and activity of these communities (Walton et al. 1994; Espinosa et al., 2005). This higher concentration of bacteria in contaminated sediments, was also evidenced by other researchers in studies that evaluated the degradation of organic compounds (Nichols et al, 1997; Espinosa et al., 2005), confirming that the growth of hydrocarbon degraders was favored by the presence of the plant.

Importantly, the actuation of the rhizosphere on the degradation of contaminants already well reported in surveys (Rovira et al., 1979; Melo, 2008). In the case of *R. mangle*, this plant should probably produce allelopathic compounds, similar to organic compounds that stimulate the defenses of the communities of

microorganisms in the face of environmental stress conditions, besides the possibility of entry of oxygen made possible by the rhizosphere (Siciliano et al., 2001; Weibner et al., 2002). Other studies evaluating the degradation of toxic compounds also found the presence of compounds exuded by the roots, such as carbohydrates, organic acids and amino acids that probably might have stimulated the degradation of contaminants (Joner et al., 2002).

## 5. Conclusions

The study results in a pilot scale showed that the model applied to Phytoremediation with *Rizophora mangle* achieved larger efficiency in the degradation of different fractions of TPH's, reaffirming this technique to be promising in the recovery of areas contaminated by the activities of the oil industry, in addition to be an environmentally correct technique. The study found that the monitored natural attenuation (intrinsic bioremediation) has low efficacy when applied individually, although initially it has been more effective in the degradation of contaminants. Moreover, the data of microbiological analysis found that the association of plants with the community of microorganisms in the rhizosphere enhanced the degradation of organic compounds in the sediment, with 87% efficiency, and foster increased growth of these plants. It is suggested that a more detailed study would combine these processes into a new product for application in remediation of contaminated sediments by mangrove TPH's, especially when dealing with sediment contamination heterogeneous at different depths. New researches on the transformation of TPH's in the environment are needed to see whether this

transformation produces toxic co-products. Finally, it is important to assess whether the model of Phytoremediation produced in pilot scale in this study is as effective in situ, large scale, as it was observed under laboratory conditions.

### **Acknowledgements**

This study has been carried out with the financial support of the FAPESB, FINEP and PETROBRAS.

### **References**

Adamo P., Arienzo M., Imperato M., Naimo D., Nardi G., Stanzione D., 2005. Distribution and partition of heavy metals in surface and sub-surface sediments of Naples city port. *Chemosphere*. 61(6), 800-809.

Anderson, T.A., Guthrie, E.A., Walton, B.T., 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environ Sci Technol*. 27, 2630–2636

Atlas, R.M., 1982. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*. 45, 180-209.



Bremner, J.M., Mulvaney, C.S., 1982. Nitrogen–Total. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. SSSA Madison WI, 595–624.

Bossert, L., Bartha, R., 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. MacMillan. New York. 435-473.

Celino, J.J., Cordeiro, O.M.C., Hadlich, G.M., Queiroz, A.F.S., Garcia, K.S., 2008. Assessment of contamination by trace metals and petroleum hydrocarbons in sediments from the tropical estuary of Todos os Santos Bay, Brazil. *Rev. Bras. Geoc.* 38(4), 753-760.

Colombo, J.C., Barreda, A., Bilos, C., Cappelletti, N., Migoya, M.C., Skorupka, C., 2005. Oil spill in the Rio de la Plata Estuary, Argentina: 2-hydrocarbon disappearance rates in sediments and soils. *Environmental Pollution*. 134, 267– 276.

Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C., 1996. Phytoremediation of soil contaminated with organic pollutants. *Advance in Agronomy*. 56, 55-71.

Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W., 1995. Phytoremediation of contaminated soil. *Trends Biotechnol.* 13, 393-397.

Doumett, S., Lamperi, L., Checchini, L., Azzarello, E., Mugnai, S., Mancuso, S.,

Petruzzelli, G., Del Bubba, M., 2008. Heavy metal distribution between contaminated soil and *Paulownia tomentosa*, in a pilot-scale assisted phytoremediation study: Influence of different complexing agents. *Chemosphere*. 72, 1481-1490.

Espinosa, E., Martinez, M.E., Torres, E.F., Rojas, M.G., 2005. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere*. 59, 406.

Eysink, G.G.J., 1997. Recuperação de áreas de manguezais degradados através do uso de propágulos de *Rizophora mangle* acondicionado em estufa. *Arquivo do Instituto Biológico*. v.24, 1-65.

Fedo C.M., Eriksson K., Krogstad E.J. 1996. Geochemistry of shales from the Archean Abitibi greenstone belt, Canada: Implications for provenance and source-area weathering. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 60,1751-1763.

Folk, R.L., Ward, W.C.. 1957. Brazos river bar: a study of significant of grain size parameters. *J. Sediment. Petrol.* 27,3-26.

Fruehauf, S.P., 2005. *Rizophora mangle* (mangue vermelho) em áreas contaminadas de manguezal na Baixada Santista. Tese (Doutorado em Ecologia de Agrossistemas) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 223p.

Huang, X.D., El-Alawi, Y., Penrose, D.M., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2004. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Pollution*. 130, 465-476.

Huang, X.D., El-Alawi, Y., Gurska, J., Glick, B.R., Greenberg, B.M., 2005. *Microchemical Journal*. 81, 139-147.

Joner, E.J., Corgie, S., Amellal, N., Leyval, C., 2002. Nutritional constraints to PAH degradation in a rhizosphere model. *Soil Biology and Biochemistry*. 34, 859-864.

Kamath, R., Rentz, J.A., Schnoor J.L., Alvarez, P.J.J., 2004. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils: principles and applications. In: *Studies in Surface Science and Catalysis*. R. Vazquez-Duhalt and R. Quintero-Ramirez (Editors). Elsevier. 32p.

Lacerda, L.D., 2006. Manguezais do nordeste e mudanças ambientais. *Ciência Hoje*. 39 (220), 24-28.

McCarthy, K., Walkerb, L., Vigorenc, L., Barteld, J., 2004. Remediation of spilled petroleum hydrocarbons by in situ landfarming at an arctic site. *Science and Technology*. 40, 31-39.

McNicoll, D.M., Baweja, A.S., 1995. Bioremediation of petroleum-contaminated soils: an innovative, environmental friendly technology. Environment Canada. 15p.

Moreira, I.T.A, Freitas, P.F, Nascimento, R.S.A, Oliveira, O.M.C, Triguís, J.A., 2010a. Selection of species plant mangrove for assessment phytoremediation of contaminated sediments by in oil and derivatives. In: Rio Oil & Gas Expo and Conference, IBP2899\_10.

Moreira, I.T.A, Martins, C.M.S., Oliveira, M.C., Oliveira, O.M.C, Triguís, J.A. 2010b. Detailed and confirmatory investigation in an area with contaminated sediment, in order for the application of phytoremediation. In: XII Workshop and Congress Geochemistry Organic American Latin Association, 13-16.

Nath B.N., Kunzendorf H., Pluger W.L., 2000. Influence of provenancer weathering, and sedimentary processes on the elemental ratios of the fine-grained fraction of the

bedload sediments from the Vembanad Lake and the adjoining continental shelf, southwest coast of India. *Journal of Sedimentary Petrology*. 70, 1081-1094.

Nelson, D.W., Sommers, L.E., 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., (Eds.). *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*;SSSA Madison WI, 539–577.

Nesbitt, H.W., Young, G.M., McLennan, S.M., Keays, R.R., 1996. Effects of chemical weathering and sorting on the petrogenesis of siliclastic sediments, with implications for provenance studies. *Jl. of Geology*. 104, 525-542.

Nichols, T.D., Wolf, D.C., Rogers, H.B., Beyrouy, C.A., Reynolds, C.M., 1997. Rhizosphere microbial populations in contaminated soil. *Water, Air and Soil Pollution*. 95, 165–178.

Olsen, S.R., Dean, L.A., 1982. Phosphorus. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., (Eds.). *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*;SSSA Madison WI, 1035–1049.

Parrish, Z.D., Banks, M.K., Schwab, A.P., 2005. Assessment of contaminant liability during phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon impacted soil. *Environ. Pollut.* 137, 187–197.

Rock, S., 1997. Phytoremediation. In: Freeman, H. (Ed.), Standard Handbook of Hazardous Waste Treatment and Disposal, second ed. McGraw Hill Inc, New York, USA.93-112.

Romeiro, R. S., 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV. 279p.

Rovira, A.D., Davey, C.B., 1979. In: Carson, E.W. (Ed.), The Plant Root and Its Environment. University Press of Virginia, Charlottesville. 153–204p.

Santos, H.F., Carmo F.L., Paes, J.E.S., Rosado, A.S., Peixoto, R.S., 2010. Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum. Water Air Soil Pollut. In press.

Seabra, P.N., 2008. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In: Microbiologia Ambiental. V.2, 548-570.

Siciliano, S. D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., Beaumier, D., Ouellette, D., Roy, R., Whyte, L. G., Banks, M. K., Schwab, P., Lee, K., Greer, C. W. (2001). Selection of Specific Endophytic Bacterial Genotypes by Plants in Response to Soil Contamination. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2469-2475

Smith, G.M., Spencer, T., Murray, A.L., French, J.R., 1998. Assessing seasonal vegetation change in coastal wetlands with airborne remote sensing: an outline methodology. *Mangroves and Salt Marshes*. 15-28.

Stuart, S.A., Choat, B., Martin, K.C., Holbrook, N.M. and Ball, M.C., 2007. The role of freezing in setting the latitudinal limits of mangrove forests. *New Phytologist*. 576-583.

Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T., Harayama, S., 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environmental Science and Technology*. 31, 45–51.

Tam, N.F., Wong, Y.S., 2008. Effectiveness of bacterial inoculum and mangrove plants on remediation of sediment contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*. 57, 716–726.

Thomas, M.L.H., 1993. Mangrove swamps in Bermuda, *Atoll Res.Bull*, 1-17.

U.S. EPA, 2000. Introduction to phytoremediation. Washington, DC, (February). EPA/600/R-99/107.

Yang, S.Z., Jin, H.J., Wei, Z., He, R.X., Ji, Y.J., Li, X.M., 2009. Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: A Review. *Pedosphere*. 19, 371–381.

Yergeau, E., Arbour, M., Brousseau, R., Juck, D., Lawrence, J.R., Masson, L., 2009. Microarray and Real-Time PCR Analyses of the Responses of High-Arctic Soil Bacteria to Hydrocarbon Pollution and Bioremediation Treatments. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(19), 6258–6267.

Yuan, S.Y., Chang, J.S. and Chang, B.V., 2001. Biodegradation of phenanthrene in river sediment. *Chemosphere*. 43, 273– 278.

Walton, B.T., Guthrie, E.A., Hoylman, A.M., 1994. Toxicant degradation in the rhizosphere. In: Anderson, T.A., Coats, J.R. (Eds.), *Bioremediation through Rhizosphere Technology*. ACS Series 563, Washington DC. 11-26p.

Wang, Z., Stout, S.A., 2007. *Oil Spill Environmental Forensics*. Academic Press, California.

Weibner, A., Kusch, P., Stottmeister, U., 2002. Oxygen release by roots of *Typha latifolia* and *Juncus effusus* in laboratory hydroponic systems. *Acta Biotechnol.* 1–2, 209–216.



Zomlefer, W.B., Judd, W.S., Giannasi, D.E., 2006. Northernmost limit of *Rhizophora mangle* (red mangrove;Rhizophoraceae) In: St. Johns County, Florida. Castanea. 239-244.

## 5.2. INTEGRATED ASSESSMENT OF THE EFFECTS OF METALS ON BIODEGRADATION OF TOTAL PETROLEUM HYDROCARBONS BY MICROORGANISMS AND *Rizophora mangle* L.

Ícaro T. A. Moreira<sup>a</sup>, , Olívia M. C. Oliveira<sup>a, b</sup>, Jorge A. Triguís<sup>a</sup>, Sérgio L. Ferreira<sup>a, c</sup>, Antonio F. S. Queiroz<sup>a</sup>, Cintia M. S. Martins<sup>a</sup>, Carine S. Silva<sup>a</sup>, Bruno A. Falcão<sup>a</sup>

a. Núcleo de Estudos Ambientais, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

b. Instituto de Geociências, Departamento de Geofísica Aplicada, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Campus de Ondina, 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

c. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Campus de Ondina, 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

d. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, INCT, de Energia e Ambiente, 40170-290 Salvador-BA, Brasil.

\* Corresponding author: Tel: +55 71 3283 8632, Fax: + 55 71 3283-8632, Emails address: [icaromoreira@ufba.br](mailto:icaromoreira@ufba.br); [icarotam@gmail.com](mailto:icarotam@gmail.com) (Ícaro Thiago Andrade Moreira)

### Abstract

In order to evaluate the efficiency of biodegradation of petroleum hydrocarbons in the presence of heavy metals in mangrove sediments, we applied two models of remediation (Intrinsic Bioremediation and Phytoremediation with *Rizophora mangle*) during ninety days on a pilot scale, with monitored physical-chemicals parameters. The results showed that both techniques were effective in the degradation of organic compounds from oil, being the Phytoremediation the most efficient (87% removal). It was also observed that the biodegradation model of Intrinsic Bioremediation did not

have a direct correlation with the concentrations of metals, however a positive correlation with some metals (Cu, Zn, Cr, Ni) for the model *R. mangle* (red mangrove) was verified in the removal of hydrocarbons, being observed that the plant presents efficiency in the phytoextraction and in the phytostimulation. The results suggest that red mangroves through their rhizosphere mechanisms become a promising plant for the removal of hydrocarbons derived from petroleum in the presence of metals in mangrove sediments.

Keywords: Heavy metals, Total Petroleum Hydrocarbons, Intrinsic Bioremediation, Phytoremediation, Mangrove.

## **1. Introduction**

The mangroves are transitional coastal ecosystems between terrestrial and marine environments characteristic of tropical and subtropical regions, of great ecological and economical importance and for the coastal geology. In recent years data ITOPF [1] found that the number of spills in mangrove areas has increased, especially in countries where the oil industry has recorded growth. These accidents have the potential to cause environmental and economic effects on a wide variety of natural resources and services in these regions. Studies on the application of remediation techniques in coastal regions are becoming increasingly necessary, given the importance of these ecosystems to the ecological balance and also because they are targets of major impacts of petrogenic origin [2-4].

Many mangrove areas that are hit by oil spill contain high concentrations of heavy metals that are enhanced by the composition of spilled oil. Heavy metals at certain concentrations may limit microbial activity and plant in the degradation of organic compounds, causing serious problems in the application of bioremediation and phytoremediation in mangrove sediments [5, 6].

Some studies have been conducted regarding the individual effects of heavy metals, biotic and abiotic factors in the degradation of total petroleum hydrocarbons, however few studies have addressed the effects of all factors convergent in the biodegradation in mangrove sediments [7-9]. These sediments are rich in microbial diversity that in a set of interactions with the mangrove plant species are fundamental to the maintenance of conservation, productivity and recovery of this ecosystem when impacted by some type of antropic activity [10].

The decision to correct hydrocarbon contaminated areas should be based on pilot studies through integrated assessment of the presence of metals and also the main physical, chemical and biological agents that can act positively or inhibiting the biodegradation in sediments of mangrove. Therefore, the objective in the study was to evaluate how the presence of metals and other abiotic and biotic factors influence the degradation of total petroleum hydrocarbons in mangrove sediments from two models of remediation: Intrinsic Bioremediation and Phytoremediation with *Rizophora mangle* L., simulated pilot scale.

## **2. Materials and methods**

### 2.1. Sediment sampling and analysis

Surfaces sediments mangrove samples used in the experiment were collected at 0-30cm deep, between the cities of Candeias and São Francisco do Conde (region with many activities in the petroleum industry: extraction, transportation and refining), Bahia, Brazil. These sediment samples were sieved through a 4mm sieve to remove rocks, and plant material was homogenized immediately after to ensure uniformity. It was collected five sub-samples of sediment that were homogenized and freeze-dried in a cold for 72 hours and sieved through 2 mm mesh to determine the initial physical and chemical properties of the selected sediment. Soon after, sediment samples were mixed in a 1:10 ratio with oil residue found in the same area and five samples of the mixture were collected to analyze the new concentrations of TPH's, metals and nutrients (**Table 1**). In the determination of metals in the homogenized sediments aluminum (Al), iron (Fe), lead (Pb), chromium (Cr), copper (Cu), zinc (Zn) and nickel (Ni) were analyzed by USEPA method 3015. The total petroleum hydrocarbons (TPH's) were determined by USEPA 8015B method. Particle-size distribution was determined after the organic matter was removed with 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, by the Folk and Ward method [11]. Soil organic matter was determined using a modified Mebius method [12]. Total N was determined by the Kjeldahl's digestion, distillation and titration method [13] and available P by the Olsen extraction method [14]. Measurements were taken for pH and Eh through the method of potentiometry using a pH / mV HandyLab1, SchottGlaswerkeMainz. The salinity was measured by the index of refraction, using the portable refractometer atoga S / Mill-E and dissolved oxygen (DO) was measured with a WTW Oximeter OXI 3151 (SCHOTT-GERÄTE).

## 2.2. Models for remediation

During 90 days two models were used to evaluate remediation of contaminated sediment removal for TPH's. One type of remediation used to compare the removal of TPH's was the Intrinsic Bioremediation (Natural Attenuation Monitored) – where the degradation by bacteria present in the mixed sediment was monitored. Other remediation model was of phytoremediation in mangrove sediment, the specie *R. mangle* (red mangrove) was selected. This choice was based on pre-tests conducted earlier by our group as well as with other studies, suggesting the use of this for phytoremediation [15-17]. Seedlings of *R. mangle* were collected at low tide, taking into consideration their height (average of 3 months old), defining a standard sampling in order not to compromise the research results. The density of the bacterial community was characterized in order to compare the presence of microorganisms with the Intrinsic Bioremediation.

## 2.3. Experimental design

The project design was based on pilot-scale simulation of the dynamics of mangrove, where it was simulated with the tidal regime in the sediment used for the application for remediation models. This experiment was conducted in a greenhouse (Laboratory deployed to conduct research developed within the network RECUPETRO/UFBA - Cooperative Network Recovery in Areas Contaminated by Petroleum Activities, linked to the Federal University of Bahia) near the mangroves, with environmental conditions very close to the original ecosystem, with an average temperature of 24.6° C. For this, simulation units were made of glass (50X30X40cm). Within each unit of simulation 6 tubes of glass were added (30X10X10cm) were

applied to two models of remediation compared in this study. These tubes of glass were suspended in the unit simulation, allowing the simulation of tidal regime with water runoff. Tubes of glass were closed at the bottom to prevent loss of chemical residue when watering. All units received the treatment simulation of daily tidal regime with an adequate amount of water (approximately 10L) to maintain constant humidity of sediment, as in the mangrove ecosystem. The experimental projects were three replicates of each treatment and analysis of three samples from each repetition.

#### *2.4. Statistical analysis*

It was applied to principal components analysis (PCA) to the average concentrations of all the data analyzed in surface sediments of each type of remediation, in order to find the main variables that influence the degradation of TPH's. Other statistical tests were applied to the K-means, the Kolmogorov-Smirnov test for multiple parametric Turkey-Kramer test and Pearson correlation. All statistical evaluation was performed using the STATISTICA 6.0 and GraphPad Software.

### **3. Results and discussion**

#### *3.1. Initial chemical properties of sediments*

The **Table 1** presents the data of physical and chemical analysis of sediments contaminated and not contaminated by waste oil, used in this study. The analytical results showed that, except for iron (Fe), all values of the other metals were increased after the homogenization of the sediment and residue of oil in two models of treatment, corroborating other studies [7, 11]. However, the values averaged for

the two different metals in the sediments below the TEL [12], and previously found that these concentrations do not influence the biota negatively. The pH values of the two sediments were consistent with estuarine waters between 7.51 and 7.59. These pH data are favorable to the majority of biodegraders microorganisms of TPH in mangrove sediments, not compromising the principle bioremediation processes [13]. The temperatures of the two sediments were also very close to being as expected for an optimal biodegradation, where there is a higher enzyme activity, between 25 ° - 38 ° C [14]. The initial concentrations of salts in the sediment confirmed the brackish characteristic of the medium, causing a selection of biodegraders microorganisms of hydrocarbons, but not bringing great harm to the application of remediation techniques [15]. Concentrations of macronutrients (N and P) and organic matter in sediments were also found in what is expected for degradation by the biota in sediments impacted by organic compounds [13]. After homogenization of the sediment and residue oil the initial concentration of TPH's was approximately 33 ug / g, and it is considered a moderate contamination in the sediment [16].

**Table 1** - Some selected physicochemical properties of the sediments used in experiment.

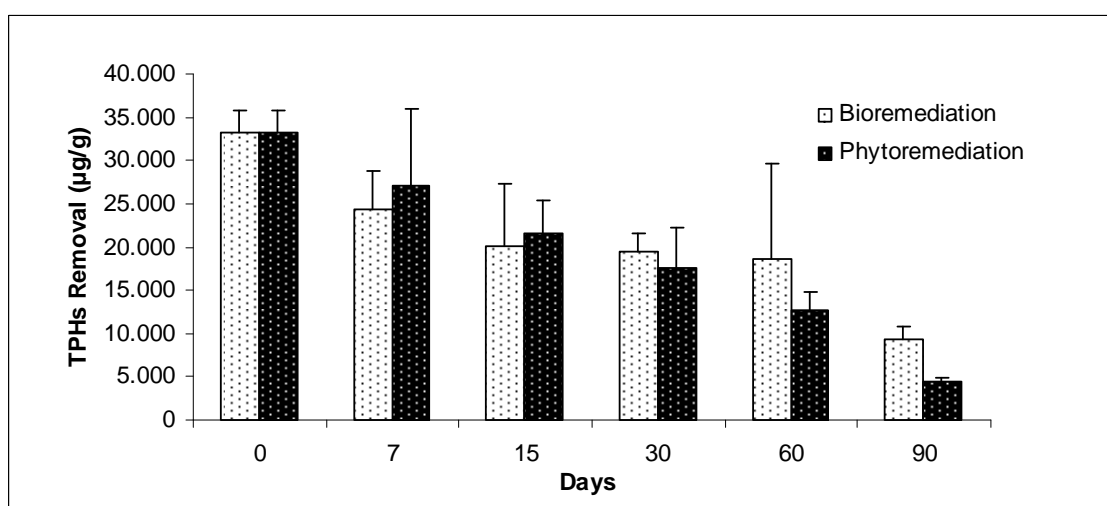
<b>Sediment</b>	<b>Reference</b>	<b>Contaminated</b>
<b>Cu</b> (µg/g)	13,37	17,86
<b>Zn</b> (µg/g)	12,66	22,23
<b>Pb</b> (µg/g)	6,02	18,21
<b>Cr</b> (µg/g)	7,43	11,47
<b>Ni</b> (µg/g)	7,49	17,43
<b>Fe</b> (µg/g)	12014,88	10739,67
<b>Al</b> (µg/g)	7401,69	7925,57
<b>pH</b>	7,51	7,59
<b>Eh</b>	-12	-12,3
<b>T</b> (°C)	26,9	27
<b>Salinity</b>	27	24
<b>DO</b> (mg/L)	4,39	4,53
<b>TPH</b> (µg/g)	-	33215,16
<b>TOM</b> (%)	0,63	5,73
<b>TOC</b> (%)	0,37	3,32
<b>TN</b> (%)	0,06	0,36
<b>P</b> (mg/L)	0,90	2,70
<b>C/N</b>	5,74	9,26



### 3.2. Temporal assessment of biodegradation

During three months of the experiment, which evaluated the effectiveness of two models of remediation for the removal of TPH's in the sediment, the results showed that during the first days the Intrinsic Bioremediation was more efficient, but from day 30 on, the Phytoremediation with *R. mangle* has become more efficient (**Figure 1**). This may have happened because plants need an initial time to adapt to the environment contaminated by organic compounds [17]. After 90 days the analysis of the removal of TPH's removed, showed that the phytoremediation of contaminant levels in sediment were reduced from 33.2 to 4.5 ug / g while the intrinsic bioremediation decreased from 33.2 to 9.2 mg / g . Thus, phytoremediation was able to remove the sediment about 17% more than the TPH's intrinsic bioremediation. This increased efficiency of phytoremediation with respect to intrinsic bioremediation corroborates other studies in sediments affected by oil organic compounds [18-20].

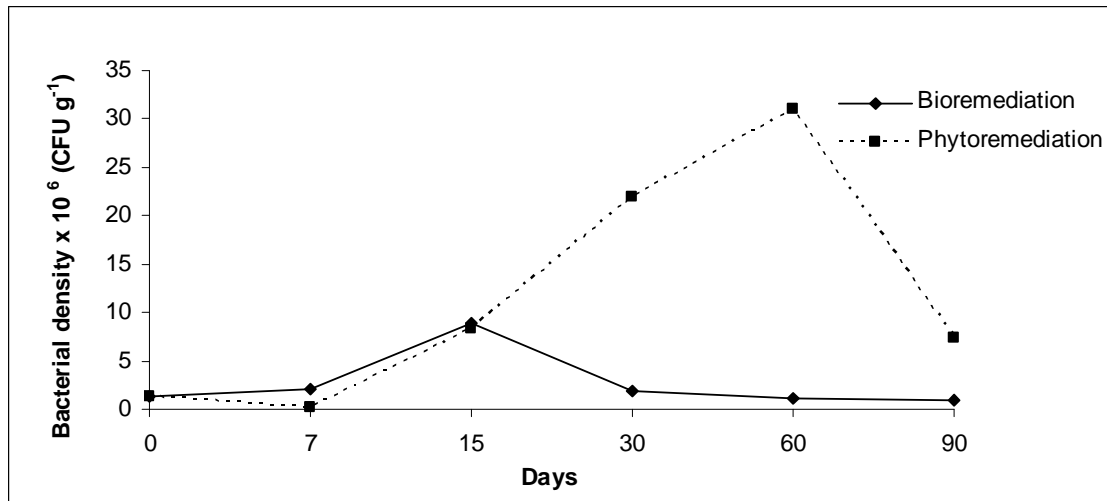
**Figure 1.** TPH's removal (mg/g) in the mangrove sediment a function of time in the two models (n=3).



One must consider that the mangrove plants act in consortium with the microorganisms present in sediments, magnifying the degradation mechanisms. This

fact was proven in this study by the count of bacteria in two models of remediation (**Figure 2**), since after the thirtieth day there was a large drop in the number of microorganisms in the intrinsic bioremediation ( $1.8 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup>), whereas in the rhizosphere of *R. Mangle* there was a large increase in bacterial density ( $24.4 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup>), when compared to the initial 15 days. This higher concentration of microorganisms in the rhizosphere has been reported by other researchers [21], probably in the present study the red mangroves had produced allelopathic compounds, similar to organic compounds that stimulate the defenses of microbial communities on environmental stress conditions, besides the production of carbohydrates, organic acids and amino acids that probably could have stimulated the degradation of organic compounds [22-24].

**Figure 2.** Total count of bacteria during 90 days, comparison between models (n=3).



### 3.3. Integrated Assessment of the analyzed parameters

To evaluate in an integrated manner how metals and other physic-chemical parameters influence the biodegradation of total petroleum hydrocarbons the Pearson correlation was initially used, which aimed to get an indication of the

strength and direction of linear relationship between the variables in both remediation models, besides the Principal Components Analysis (PCA) which had as main objective to obtain a small number of linear combinations of all variables, which makes environmental events understandable, if not explained by Pearson Correlation.

In Intrinsic Bioremediation (**Table 2**) strong positive correlations between metals and TPH's were not observed, however a strong negative correlation with concentrations of copper (Cu) was observed, which indicates that the more reduced the concentration of organic compounds, the higher the concentration of available copper in the sediment. There was also strong positive correlation between the concentrations of macronutrients (N, P) and dissolved oxygen (DO) with the concentration of TPH's, indicating that the more nutrients and oxygen available, the greater was the degradation of organic compounds in this model. This is probably because these factors are of great influence to the microorganisms in an efficient degradation [13]. In Phytoremediation (**Table 3**) strong positive correlations of TPH's four metals (Cu, Zn, Cr, Ni) were found, with pH and DO. On the other hand, strong negative correlations were observed in relation to salinity TOM and TOC. These types of positive correlations between metals and organic compounds derived from petroleum found in sediments where they grew *R. mangle*, indicate that the plant in addition to contributing to the biodegradation of TPH's is probably doing phytoextraction of metals in the sediment, which consequently caused a decrease in the concentration of these elements after 90 days of experiment, corroborating other studies [25, 26].

**Table 2.** Pearson Correlation in Intrinsic Bioremediation

	pH	Eh	T	Sal	DO	Cu	Zn	Pb	Cr	Ni	Fe	Al	TOM	TOC	TN	P	TPH
pH	1																
Eh	-0,92	1															
T	-0,23	0,18	1														
Sal	-0,80	0,58	0,31	1													
DO	-0,31	-0,07	0,10	<b>0,74</b>	1												
Cu	-0,21	-0,09	0,04	<b>0,73</b>	0,90	1											
Zn	-0,04	0,03	0,93	0,27	0,09	0,17	1										
Pb	-0,39	0,28	<b>0,76</b>	<b>0,71</b>	0,46	0,57	<b>0,85</b>	1									
Cr	-0,17	0,23	<b>0,88</b>	0,32	-0,02	0,11	0,97	<b>0,86</b>	1								
Ni	-0,01	0,08	<b>0,64</b>	0,29	0,03	0,30	<b>0,87</b>	<b>0,84</b>	0,92	1							
Fe	-0,46	0,32	<b>0,79</b>	<b>0,65</b>	0,50	0,39	<b>0,72</b>	<b>0,84</b>	<b>0,70</b>	0,54	1						
Al	0,48	-0,34	0,43	-0,30	-0,22	-0,14	0,59	0,33	0,57	0,60	0,40	1					
TOM	-0,47	0,22	0,05	<b>0,85</b>	<b>0,86</b>	<b>0,89</b>	0,13	<b>0,60</b>	0,14	0,27	0,57	-0,05	1				
TOC	0,50	-0,23	-0,71	-0,82	-0,73	-0,68	-0,67	-0,87	-0,60	-0,50	-0,82	0,00	-0,65	1			
TN	<b>0,67</b>	-0,38	-0,50	-0,91	-0,83	-0,68	-0,39	-0,72	-0,35	-0,23	-0,83	0,13	-0,79	0,92	1		
P	-0,52	0,24	0,43	0,91	<b>0,86</b>	<b>0,87</b>	0,46	<b>0,83</b>	0,44	0,46	<b>0,76</b>	-0,02	0,90	-0,91	-0,93	1	
TPH	0,52	-0,16	-0,24	-0,85	0,91	-0,83	-0,18	-0,54	-0,09	-0,07	-0,49	0,44	-0,74	<b>0,84</b>	<b>0,87</b>	<b>0,86</b>	1

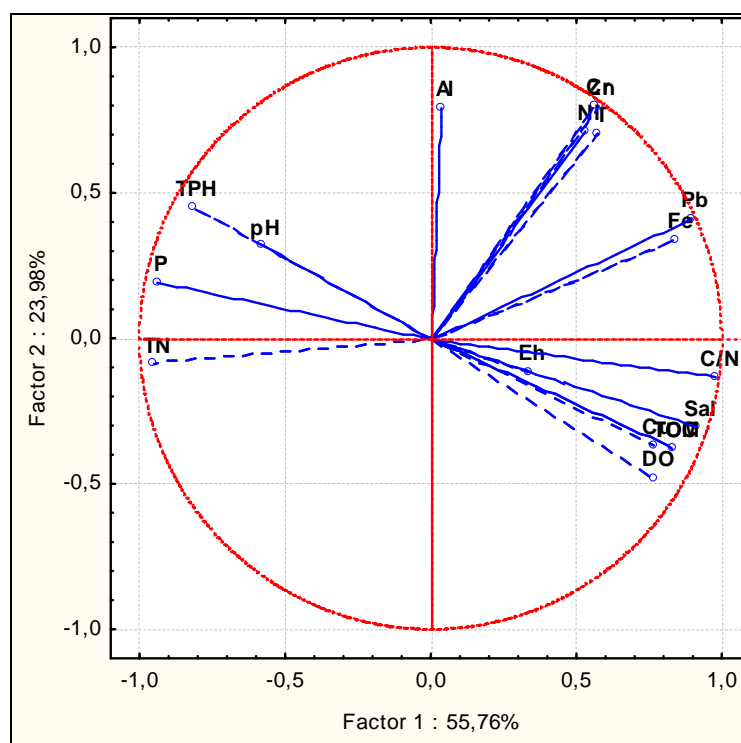
**Table 3.** Pearson Correlation in Intrinsic Phytoremediation

	pH	Eh	T	Sal	DO	Cu	Zn	Pb	Cr	Ni	Fe	Al	TOM	TOC	TN	P	TPH
pH	1,00																
Eh	-0,15	1,00															
T	-0,51	-0,16	1,00														
Sal	-0,86	0,31	0,37	1,00													
DO	-0,55	-0,53	0,50	0,19	1,00												
Cu	<b>0,87</b>	0,08	-0,76	-0,65	-0,55	1,00											
Zn	<b>0,76</b>	0,16	-0,06	-0,48	-0,71	0,55	1,00										
Pb	-0,05	-0,60	0,37	0,11	0,02	-0,40	0,11	1,00									
Cr	<b>0,78</b>	-0,04	-0,77	-0,79	-0,54	<b>0,71</b>	0,36	-0,10	1,00								
Ni	<b>0,82</b>	0,19	-0,78	-0,75	-0,68	<b>0,81</b>	0,50	-0,28	0,96	1,00							
Fe	-0,09	-0,72	0,21	0,08	0,14	-0,37	-0,10	0,96	-0,01	-0,25	1,00						
Al	0,57	-0,42	-0,82	-0,49	-0,21	<b>0,67</b>	0,01	0,07	<b>0,71</b>	0,60	0,26	1,00					
TOM	-0,86	0,29	0,51	<b>0,76</b>	0,59	-0,62	-0,61	-0,33	-0,87	-0,80	-0,33	-0,65	1,00				
TOC	-0,86	0,29	0,51	<b>0,76</b>	0,59	-0,62	-0,61	-0,33	-0,87	-0,80	-0,33	-0,65	1,00	1,00			
TN	0,24	<b>0,87</b>	-0,47	0,04	-0,65	0,54	0,36	-0,72	0,19	0,45	-0,80	-0,06	0,04	0,04	1,00		
P	0,03	<b>0,78</b>	-0,16	0,10	-0,22	0,34	0,17	-0,88	-0,13	0,14	-0,96	-0,32	0,40	0,40	<b>0,87</b>	1,00	
TPH	<b>0,85</b>	0,31	-0,48	-0,76	<b>0,72</b>	<b>0,74</b>	<b>0,75</b>	-0,30	<b>0,78</b>	0,90	-0,38	0,25	-0,72	-0,72	0,52	0,30	1,00

The principal component analysis (PCA) in Intrinsic Bioremediation indicated that the two main factors can explain 79.74% of the considered analytical data variation, with the first factor alone explained 55.76% of the data (**Figure 3**). The values of TPH's, P, TN, Sal, C / N, Pb, Cu and Zn are well represented in the graph.

We observed strong positive correlation between pH and P with TPH's, suggesting that these factors acted convergent for biodegradation. However, it was evident that the degradation of TPH's was independent of the variables Al, Ni, Cu, Zn, Fe and Pb, confirming the results of Pearson correlation that showed that in this model of remediation the metals, apparently, did not influence the process. Finally, it was found in this model a negative correlation between the variables DO, TOC, TOM, Sal, C / N with the TPH's. This fact must have occurred, because the degradation of organic compounds in sediments with indigenous microorganisms was directly linked to the consumption of oxygen, organic matter and nutrients [13].

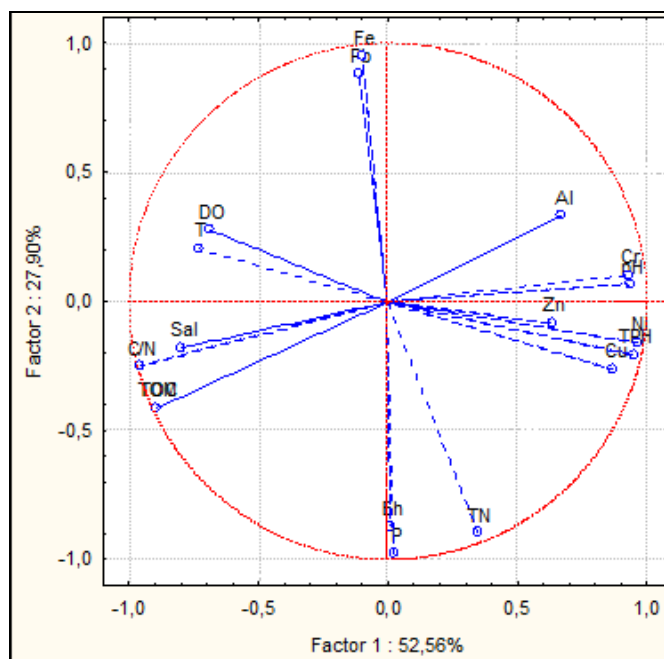
**Figure 3.** PCA in Intrinsic Bioremediation (n=3).



For the model of Phytoremediation the two main factors could explain 80.56% of the variation of the analyzed data, and the factor 1 explained 52.56% of the data (**Figure 4**). In this case, the values of TPH's, TN, P, TOM, Cu, Ni, Pb, Fe, Cr and pH were well represented in the graph. Strong positive correlation was found between

Cu and Ni, with TPH's, suggesting that phytostimulation by plants in the microorganisms to degrade the organic compounds were also removing sediment from the two metals. However, it was evident that the degradation of TPH in this model's was independent variables: Al, Cr, Sal, C / N, TOM and TOC, suggesting that plants have provided allelopathic compounds for microorganisms to degrade. The PCA analysis in this model did not show a strong negative correlation between some variable and TPH's, although there is a moderate negative correlation between DO and TPH's with T, suggesting that the further degradation of the compounds happened with higher temperature and bigger concentration of dissolved oxygen. The fact that a higher oxygen concentration has occurred over time can be explained by the presence of the roots of *R. mangle* that may be helping the greater concentration of this variable in the middle, providing a greater degradation of TPH's [23, 24].

**Figure 4.** PCA in Phytoremediation (n=3).



#### 4. Conclusions

This study showed that the *R. mangle* applied in phytoremediation was more efficient than the Intrinsic Bioremediation in the biodegradation of organic compounds derived from petroleum in the sediments of mangroves, through an evaluation in pilot scale. It was shown that metals do not show a positive correlation in the biodegradation model of Intrinsic Bioremediation, but that Cu may have been a negative factor in lower efficiency of the model. In Phytoremediation, the analyzed metals (Cu, Zn, Cr, Ni) had a direct and positive influence on the degradation of hydrocarbons, confirming the important role of red mangrove in the mobilization and removal of contaminants joint, being a fundamental factor for the growth of microorganisms in sediment. The relevance of the interaction between the plants and the microorganisms in the model when evaluated Phytoremediation when the biodegradation of hydrocarbons in the presence of metals, since the presence of the plant caused the decrease of the concentration of toxic metals in the sediment. However, we must evaluate whether the concentrations of metals and hydrocarbons were larger and more diverse, it would be found the same results. However, for the present study, *R. mangle* was classified as promising in the application of remediation in mangrove sediments impacted by moderate concentrations of TPH's and heavy metals.

### **Acknowledgements**

This study has been carried out with the financial support of the FAPESB, FINEP and PETROBRAS.

### **REFERENCES**

- [1] International Tanker Owners Pollution Federation - ITOPF. 2001. Apresenta informações, publicações, conselhos e assistência técnica com relação a respostas a poluição por vazamentos de óleo. Acessível em <http://www.itopf.com>. Acesso em 2011.
- [2] Duke, N. C., Meynecke, J. O., Dittmann, S., Ellison, A. M., Anger, K., Berguer, U., et al. (2007). A world without mangroves? *Science*, 317, 41–42.
- [3] Barbier, E. B., Koch, E. W., Siliman, B. R., Hacker, S. D., Wolanski, E., & Primavera, J. (2008). Coastal ecosystem based management with nonlinear ecological functions and values. *Science*, 318, 321–323.
- [4] Li, C. H., Zhou, H. W., Wong, Y. S., & Tam, N. F. (2009). Vertical distribution and anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments in Hong Kong, South China. *Science of The Total Environment*, 21(407), 5772–5779.
- [5] Giller, K.E., Witter, E., McGrath, S., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1389–1414.
- [6] Baath, E., Diz-Ravina, M., Frostegard, A., Campell, C.D., 1998. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 238–245.
- [7] Ming Nie, Naixing Xiana, Xiaohua Fub, Xiaofeng Chenc, Bo Lia, The interactive effects of petroleum-hydrocarbon spillage and plant rhizosphere on concentrations and distribution of heavy metals in sediments in the Yellow River Delta, China, *Journal of Hazardous Materials*. 174 (2010) 156–161.



- [8] A.H. BuOlayan, M.N.V. Subrahmanyam, Accumulation of copper, nickel, lead and zinc by snail, *Lunella coronatus* and pearl oyster, *Pinctada radiata* from the Kuwait coast before and after the Gulf War oil spill, *Sci. Total Environ.* 197 (1997) 161–165.
- [9] J. Wang, C.B. Zhang, Z.X. Jin, The distribution and phytoavailability of heavy metal fractions in rhizosphere soils of *Paulownia fortunei* (seem) Hems near a Pb/Zn smelter in Guangdong, PR China, *Geoderma* 148 (2009) 299–306.
- [10] Alongi, D. M. (2002). Present state and future of the world's mangrove forests. *Australian Institute Marine Science*, 29, 331–349.
- [11] J. Santos-Echeandia, R. Prego, A. Cobelo-Garcia, Influence of the heavy fuel spill from the Prestige tanker wreckage in the overlying seawater column levels of copper, nickel and vanadium (NE Atlantic ocean), *J. Mar. Syst.* 72 (2008) 350–357.
- [12] NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION (NOAA). 1999. *Screening Quick Reference Tables, National Oceanic and Atmospheric Administration*. Seattle, USA, 12p.
- [13] ATLAS, RONALD M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 31 (4) : 178-182, 1995.
- [14] LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R.. Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial Reviews*, 53(3), p.305-315, 1990.
- [15] 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.
- [16] Celino, J.J., Cordeiro, O.M.C., Hadlich, G.M., Queiroz, A.F.S., Garcia, K.S., 2008. Assessment of contamination by trace metals and petroleum hydrocarbons in

sediments from the tropical estuary of Todos os Santos Bay, Brazil. *Rev. Bras. Geoc.* 38(4), 753-760.

[17] Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C., 1996. Phytoremediation of soil contaminated with organic pollutants. *Advance in Agronomy.* 56, 55-71.

[18] Tam, N.F., Wong, Y.S., 2008. Effectiveness of bacterial inoculum and mangrove plants on remediation of sediment contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin.* 57, 716–726

[19] Yuan, S.Y., Chang, J.S. and Chang, B.V., 2001. Biodegradation of phenanthrene in river sediment. *Chemosphere.* 43, 273– 278.

[20] Yergeau, E., Arbour, M., Brousseau, R., Juck, D., Lawrence, J.R., Masson, L., 2009. Microarray and Real-Time PCR Analyses of the Responses of High-Arctic Soil Bacteria to Hydrocarbon Pollution and Bioremediation Treatments. *Applied and Environmental Microbiology.* 75(19), 6258–6267.

[21] Anderson, T.A., Guthrie, E.A., Walton, B.T., 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environ Sci Technol.* 27, 2630–2636

[22] Joner, E.J., Corgie, S., Amellal, N., Leyval, C., 2002. Nutritional constraints to PAH degradation in a rhizosphere model. *Soil Biology and Biochemistry.* 34, 859-864.

[23] Siciliano, S. D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., Beaumier, D., Ouellette, D., Roy, R., Whyte, L. G., Banks, M. K., Schwab, P., Lee, K., Greer, C. W. (2001). Selection of Specific Endophytic Bacterial Genotypes by Plants in Response to Soil Contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2469-2475.

- [24] Weibner, A., Kusch, P., Stottmeister, U., 2002. Oxygen release by roots of *Typha latifolia* and *Juncus effusus* in laboratory hydroponic systems. *Acta Biotechnol.* 1–2, 209–216.
- [25] E. Smits, J.L. Freeman, Environmental cleanup using plants: biotechnological advances and ecological considerations, *Front. Ecol. Environ.* 4 (2006) 203–210.
- [26] M.S. Reddy, S.B. Basha, H.V. Joshi, B. Jha, Evaluation of the emission characteristics of trace metals from coal and fuel oil fired power plants and their fate during combustion, *J. Hazard. Mater.* 123 (2005) 242–249.

**5.3. PHYTOREMEDIATION IN MANGROVE SEDIMENTS IMPACTED BY  
PERSISTENT TOTAL PETROLEUM HYDROCARBONS (TPH'S) USING *Avicennia  
schaueriana***

Icaro T. A. Moreira<sup>a</sup>, Olivia M. C. Oliveira<sup>a,b</sup>, Jorge A. Triguís<sup>a</sup>, Sergio L. C. Ferreira<sup>a,c</sup>,  
Antonio F. S. Queiroz<sup>a</sup>, Cintia M. S. Martins<sup>a</sup>, Rosenaide, S. Jesus<sup>a</sup>, Danusia F. Lima<sup>a</sup>

a. Núcleo de Estudos Ambientais, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

b. Instituto de Geociências, Departamento de Geofísica Aplicada, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Campus de Ondina, 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

c. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Campus de Ondina, 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

d. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, INCT, de Energia e Ambiente, 40170-290 Salvador-BA, Brasil.

\* Corresponding author: Tel: +55 71 3283 8632, Fax: + 55 71 3283-8632, Emails address: [icaromoreira@ufba.br](mailto:icaromoreira@ufba.br); [icarotam@gmail.com](mailto:icarotam@gmail.com) (Ícaro Thiago Andrade Moreira)

### **Abstract**

This study evaluated the efficiency of *Avicennia schaueriana* in the implementation of Phytoremediation compared with Intrinsic Bioremediation in contaminated sediments mangrove by total petroleum hydrocarbons (TPH's). For three months the experiment was conducted in pilot scale under conditions similar to a mangrove swamp, the dynamics of the tides was simulated and the physical, chemical, microbiological and biogeochemical parameters were monitored. After the ninety days it was found that the Phytoremediation was more efficient in the degradation of TPH's, reducing the

initial concentration of 32.2 to 4.2 mg / g. *A. schaueriana* was also more efficient in assessing the degradation of different fractions of hydrocarbons, achieving a removal efficiency of 87%. The microbiological results consisted of higher growth in the model with plants, demonstrating the ability of the plant species utilized in phytostimulation. Finally, the experiment showed that the Phytoremediation is a promising alternative in mangrove impacted by oil activities.

*Keywords:* Phytoremediation, Total Petroleum Hydrocarbons (TPH's), Mangrove sediments, *Avicennia schaueriana* L., Black mangrove

## **1. Introduction**

The mangrove is a coastal ecosystem of great ecological importance to tropical countries. It is in this environment where there are renovations of biomass and nutrients to the sea, acting as ecologically nursery of marine organisms, but IT is relevant to geochemical studies since a large part of nutrients is accumulated there, besides its economic importance and protection against erosion coast (Alongi, 2002; Lee et al., 2005; Duke et al., 2007; Santos et al., 2010). However, according to the Environmental Sensitivity Index for Coastal Areas published by NOAA (2010), the mangrove habitat is classified as a more sensitive tropical habitat to oil spills due to the difficulties of implementing a contingency plan.

The existing remediation techniques for application in these environments impacted by Total Petroleum Hydrocarbons (TPH's) are expensive and limited when

one wants to apply them in field scale, *in situ* (Seabra et al., 1999; Burns et al., 2000; Huang et al., 2004; Yu et al., 2005; Oliveira, 2008; Brito et al., 2009; Moreira et al., 2010a). These toxic compounds represent one of the most common and persistent contaminants in the environment, being highly toxic to the mangrove forests that are particularly difficult to be protected, since many of the techniques will be applied in the other sites, subsequently they may cause other secondary impacts (McNicoll e Baweja, 1995; EPA, 2000).

Advances in biotechnology have prompted several researchers to use the Phytoremediation, which can be an alternative potentially more effective in soils and sediments contaminated with TPH's and more profitable compared to alternative traditional existing remediation (Salt et al., 1998; Günther et al., 1996; Susarla et al., 2002). This technique is well defined in literature as the method that uses plants to stabilize, extract, accumulate, degrade or transform contaminants in sediments, soils or aquatic environments. These plants use some processes, such as phytodegradation, or phytostabilization phytoextraction of contaminants (Günther et al., 1996). In the case of sediments contaminated by oil, the effect of phytoremediation is based mainly on the rhizosphere microorganisms phytostimulation degrading, known as rhizodegradation (Garbisu and Alkorta, 2001, Santos et al., 2010).

For maximum success in the implementation of Phytoremediation in the contaminated areas is essential to use plants endemic areas requiring treatment, since these plants offer significant advantages because they are adapted to local environmental conditions, besides having an interaction with the microorganisms of their own area (Anderson et al., 1993). In the case of mangrove ecosystem of the diversity of plant species is very low. It was found that the *Avicennia schaueriana*

(black mangrove) is a plant that does not have much sensitivity in the presence of sediments contaminated by oil, becoming a promising application of the technique (Moreira et al. 2010a; Moreira et al., 2010b). This plant species has its discontinuous distribution, being found mainly in Brazil (90% of coastal area occupied) and at the bottom of the Leeward Islands, the Atlantic coast of northern South America, south of Guyana and Suriname (Dodd and Rafii 2002; Wilkie and Fortuna, 2003).

Within this perspective, the purpose of this study was to evaluate the application of *A. schaueriana* in Phytoremediation, compared to an Intrinsic Bioremediation in mangrove sediments contaminated by TPH's, in a pilot study using controlled laboratory conditions. It was the closest simulated environmental conditions of a mangrove. For 90 days the contaminated sediment used was monitored with six samples, using physical and chemical parameters, nutrients, microbiological and geochemical studies.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Sediment preparation and addition for residual oil*

Surface sediment samples were collected at 0-30cm deep in a mangrove ecosystem in northern Bay of Todos os Santos, between the cities of Candeias and São Francisco do Conde, Bahia, Brazil. These sediment samples were sieved through a 4mm sieve to remove rocks and plant material was homogenized immediately after to ensure uniformity. It was collected five sub-samples of sediment

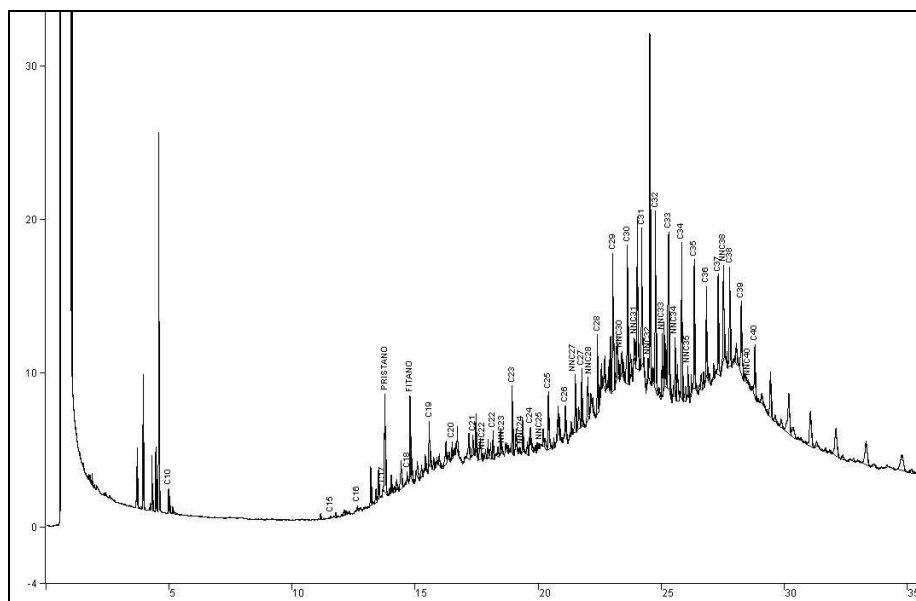
that were homogenized and freeze-dried in a cold for 72 hours and sieved through 2 mm mesh to determine selected sediment physical and chemical properties (**Table 1**). Organic matter in sediment was determined using a modified Mebius method (Nelson and Sommers, 1982). Total N was determined by distillation Kjeldahl digestion and titration method (Bremner and Mulvaney, 1982), available P by Olsen extraction method (Olsen and Dean, 1982). Particle size distribution was determined after organic matter was removed with 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the method of Folk and Ward (1957). After homogenization, sediment samples were mixed in a 1:10 ratio with oil residue found in the same area, a region with many activities in the petroleum industry (extraction, transportation and refining). Then, five replicates of homogenized sediment samples were collected to analyze the initial concentrations of TPH's (**Fig. 1**). It was collected a sediment in a reference area, as discussed elsewhere (Moreira et al. 2010b) for comparisons of the parameters analyzed in this study.

**Table 1** - Some selected physicochemical properties of the sediment used in experiment.

<b>Parameters</b>	<b>Value</b>
<b>Textural class</b>	Sandy Mud
<b>Particle-size distribution</b>	
<b>Sand (%)</b>	23,65
<b>Silt (%)</b>	73
<b>Clay (%)</b>	3,25
<b>Organic matter (%)</b>	5,73
<b>Organic carbon (%)</b>	3,32
<b>Total N (%)</b>	0,36
<b>Avaiable P (mg/L)</b>	1,8



**Figure 1.** Gas Chromatography (FID) of residual oil used in the study



## 2.2. Simulation of the mangrove

The dynamics of a mangrove was simulated with the tidal regime in the sediment used for the application for remediation techniques. This experiment was conducted in a greenhouse (Laboratory deployed to conduct research developed within the network RECUPETRO/UFBA - Cooperative Network Recovery in Areas Contaminated by Petroleum Activities, linked to the Federal University of Bahia) near the mangroves where they collected samples of sediments, with environmental conditions very close to the original ecosystem, with an average temperature of 24.6 ° C. For this, simulation units were made of glass (50X30X40cm). Within each unit of simulation were added 6 tubes of glass (30X10X10cm) were applied to two models of remediation compared in this study. These tubes of glass were suspended in the unit simulation, allowing the simulation of tidal regime with water runoff. Tubes of glass were closed at the bottom to prevent loss of chemical residue when watering. All

units received the treatment simulation of daily tidal regime with an adequate amount of water (approximately 10L) to maintain constant humidity of sediment, as in the mangrove ecosystem. The experimental projects are three replicates of each treatment and analysis of three samples from each repetition. To assess the efficiency of phytoremediation of TPH's in the sediment, each of the remediation models described below were tested separately, taking into consideration public safety and local environmental compartments.

### *2.3. Application of Remediation Models*

Two models were used to evaluate remediation of contaminated sediment removal for TPH's. To evaluate the efficiency of phytoremediation in mangrove sediment, the species *A. schaueriana* (black mangrove) was selected. This choice was based on pre-tests conducted earlier by our group as well as with other studies suggesting the use of this for phytoremediation (Eysink 1997, Moreira et al., 2010a, Moreira et al., 2010b). Seedlings of *A. schaueriana* were collected at low tide, taking into consideration their height (average of 3 months old), defining a standard sampling in order not to compromise the research results. The plants were submitted in sediments mixed with waste oil from the study area. In the laboratory simulation, the species were planted in glass tubes, where the daily regimen was simulated with the tidal water of the mangrove and morphophysiological monitoring was conducted during 90 days. During the growth period, plants were watered twice a week with bottled water as needed. The other type of remediation used to compare the removal of TPH's was the Intrinsic Bioremediation (Natural Attenuation Monitored) – where

the degradation of hydrocarbons derived from petroleum hydrocarbon by bacteria present in the sediment mixed was monitored, and the density of the bacterial community was characterized in order to compare the presence of microorganisms in Phytoremediation.

#### *2.4. Sediment extraction and analysis of the TPH's*

The TPH's levels in the sediment were determined by assaying for total hydrocarbons. Sediment samples (approximately 50 g) from their remediation models were collected at 0, 7, 15, 30, 60 and 90 days after the start of the experiments and were stored at 4° C until analysis. The storage time for the collected samples was no longer than 10 days and the storage had no effect on TPH levels in soil (data not shown). The sediment samples were dried in a lyophilizer to cold, constant temperature - 50 ° C. The dried sediments (5 g) without previous treatment, was extracted with dichloromethane/hexane mixing (1:1, v/v). The extracts were concentrated to allow the solvent to evaporate completely, and then the amount of extracted sludge was determined gravimetrically. The extracted oil was weighed approximately 0.02 g for the fractionation of saturated compounds in an activated silica gel column and eluted with ultrapure hexane (30mL). After the eluted was evaporated and then swelled to 1 mL with the same solvent elution. Extracts were quantified using a Varian CP 3800 gas chromatograph equipped with a DB-5 capillary column (30 m length, 0.25 mm ID, 0.25 μm film thickness) and Flame Ionization Detector (FID). GC conditions were as follows: injector temperature, 300° C, starting oven temperature, 40° C; 40° C (hold 2min) ramp 10° C min<sup>-1</sup> to 300 (hold

12min); detector temperature, 300° C. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 ml min<sup>-1</sup> and a split ratio of 10:1 was used. Standard was prepared from the same TPH (C10 – C40) stock chemicals.

### *2.5. Bacterial density in the two models*

Quantification of bacterial density was assessed in two models of remediation studied. For microbiological analysis, 25 g of different sediments samples were transferred to Erlenmeyer flasks containing 90 mL of sterile 0.1% peptone water. Each sample was stirred at 200 rpm/30 minutes. For colony counting, it was used the technique of plating by “microgota” (Romeiro, 2001), decimal serial dilutions in agar nutrient agar (NA) (in g / L beef extract, 3; bacteriological peptone, 5; NaCl, 3; agar, 13). The plates were incubated at 25 °C ± 1 °C for 24 hours. After incubation, the plates selected were the ones that contained between 3-30 colonies. The number of colonies counted was multiplied by the reciprocal of the dilution and the results expressed as Colony Forming Units (CFU).

### *2.6. Statistical analysis*

It was used analysis of variance in order to verify the existence or not of significant difference between the two remediation models used. Whereas the condition to submit sample data to a parametric analysis of variance is that their

variances do not show significant difference, it was applied the test of Bartlett described in Beiguelman, to test the homogeneity of variances. To check the normality of data the Kolmogorov-Smirnov test was applied. This test indicated, through a chi-square, that there is no significant difference between the variances of the samples. As variances were homogeneous, ANOVA was applied to a single parametric classification, which showed significant difference between the two models. But it has been done "a posteriori" a test for multiple parametric Turkey-Kramer to affirm the significant difference between the models. These statistical analyses were performed using the GraphPad Software.

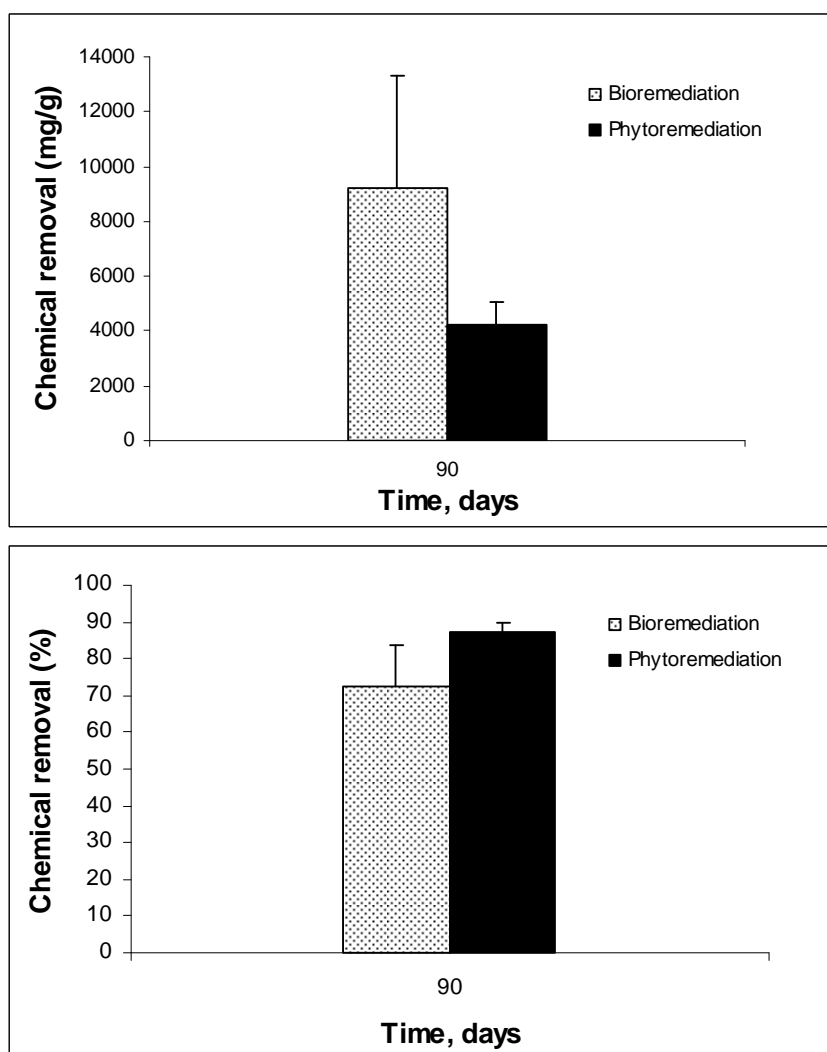
### 3. Results

#### 3.1. Removal of TPH's in remediation models

With the objective of evaluating the degradation in the remediation models employed in this study (Intrinsic Bioremediation and Phytoremediation) for removal of TPH's in mangrove sediments contaminated, an experiment was conducted in pilot scale to compare the different methods of correction. After 90 days, the results showed that the Intrinsic Bioremediation (Natural Attenuation Monitored) was able to remove 70% of TPH's individually, while *A. schaueriana* (Phytoremediation) was to approximately 89%, of TPH's in the contaminated sediment (**Fig. 2a**). It was a statistically significant removal of the TPH's Phytoremediation with *A. schaueriana* regarding Intrinsic Bioremediation in contaminated sediments. These results indicate

that the Phytoremediation with *A. schaueriana* has a greater capacity for degradation of TPH's in mangrove sediments. The Phytoremediation was able to remove approximately 19% more sediment TPH's than the Intrinsic Bioremediation, the analysis of TPH's removed by Phytoremediation with *A. schaueriana*, showed that levels of contaminants in the sediment were reduced from 33.2 to 4.2 mg / g, while the Intrinsic Bioremediation has lowered from 33.2 to 9.2 mg / g in a growing season of 3 months (**Fig 2b**).

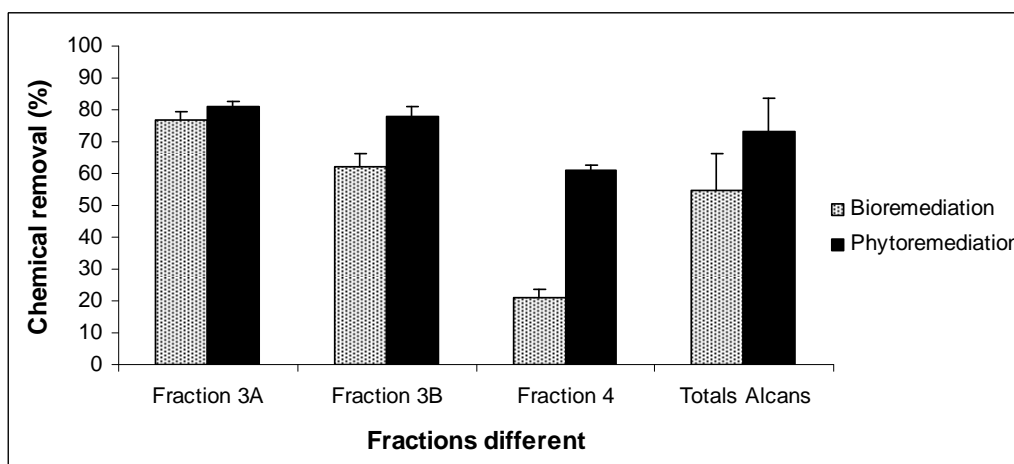
**Figure 2.** TPH's removal for Intrinsic Bioremediation and Phytoremediation (*Avicennia schaueriana*). Data were generated from CG(FID) analyses of the sediments samples collected after 90 days of remediation. They are presented as percent of chemical removed relative to the sediment that contains 32,2 mg/g of 100% residual oil. a) Indicates removal percentage, b) Indicates the removal in mg/g.



### 3.2. Removal of the different fractions of TPH's in the remediation models

It was used the fractions 3A (C16-23), 3B (C23-34) and 4 (C34-40) which are the most TPH's of recalcitrant contaminants in the sediment, based on Huang and colleagues (2005). The results indicate that the Phytoremediation with *A. schaueriana* was more effective than the Intrinsic Bioremediation in the removal of all fractions of TPH's contaminated sediment. However, in the fraction 3A (C16-C23), both models remediation efficiencies were quite close (81 and 77% respectively). In the fraction 3B (C23-34) the results showed that the degradation efficiency of Phytoremediation was moderately higher (78%) than that of Intrinsic Bioremediation (63%), while in the fraction (C24-C40) this difference in effectiveness was much greater (Phytoremediation: Intrinsic Bioremediation and 61%: 21%). After 90 days, of the Phytoremediation with *A. schaueriana* had fallen into major components of fractions 3A, 3B and 4, with an efficiency of about 73%, the Intrinsic Bioremediation declined only about 55%, taking into account the levels of total remediation TPH's (Fig. 3).

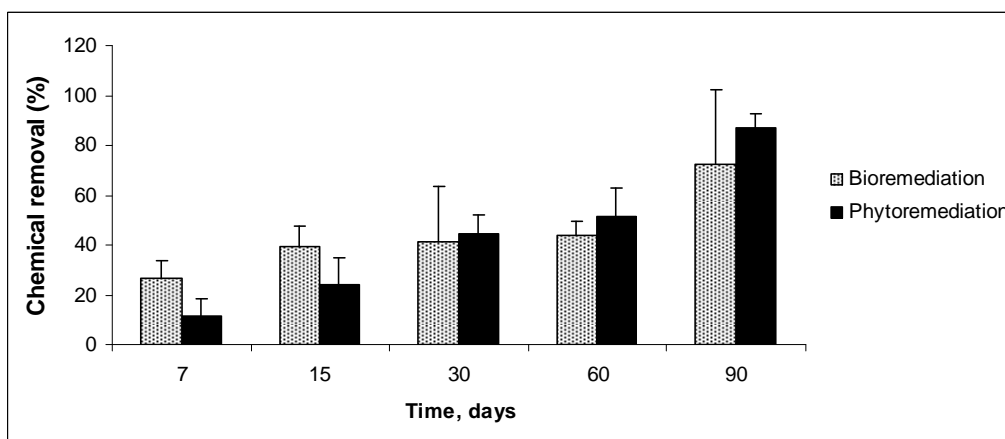
**Figure 3.** Chemical removal (%) the fractions different in remediation models, after 90 days.



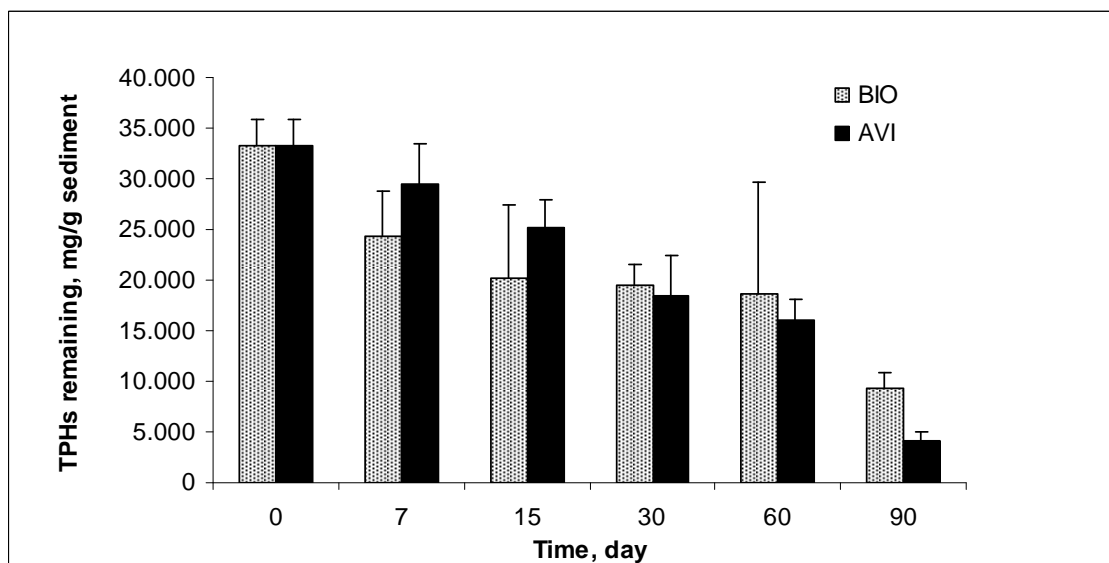
### 3.3. Temporal analysis of the models remediation for removal of TPH's

It was assessed the temporal degradation of the two models of remediation applied (Phytoremediation and Bioremediation Intrinsic), based on the total content of TPH's in the mangrove sediment (**Fig. 4**). The removal rate remained relatively constant for Phytoremediation, resulting in pseudo-zero order kinetics for the whole period of 90 days. This behavior of Phytoremediation became a more effective model for remediation than the Intrinsic Bioremediation that, despite having received a higher rate at the beginning of the experiment, failed to keep their initial rates of recovery during the experiment. After three months, the total amount removed by TPH's *A. schaueriana* was approximately 89%, while for the Bioremediation was approximately 70%, with a strong decrease in the rate of removal.

**Figure 4.** TPH's staying in the mangrove sediment a function of time.





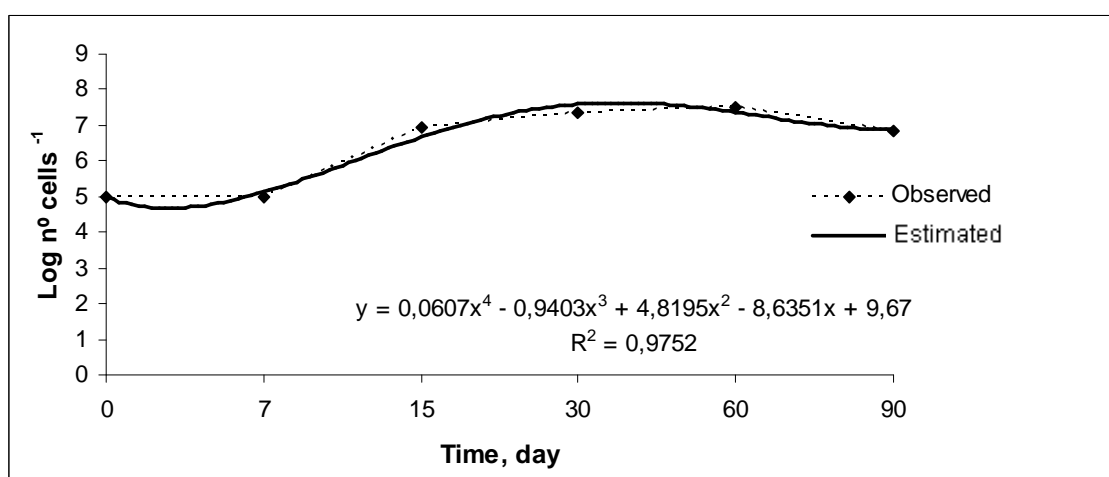
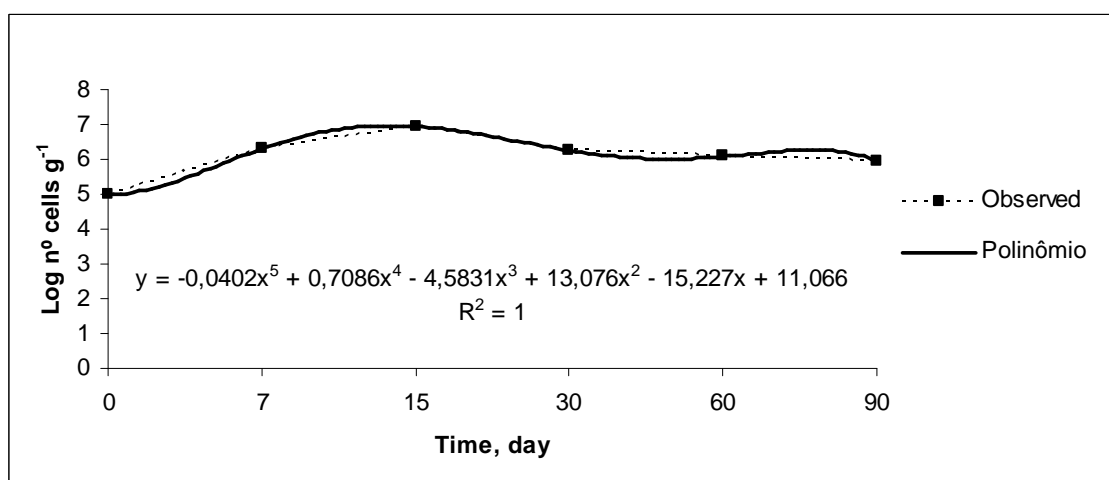
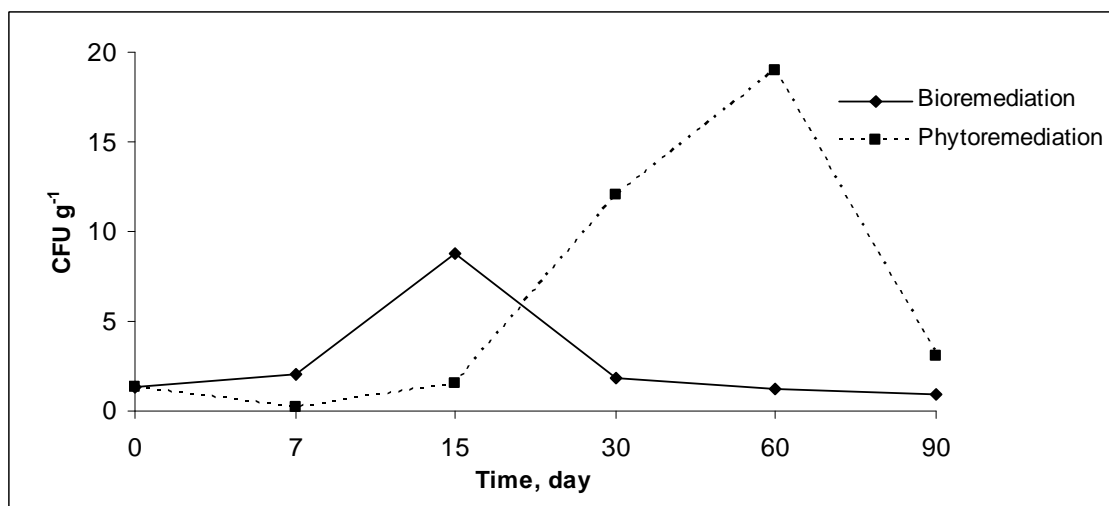


#### 3.4. Counting of bacterial communities in two models of remediation

During the 90 days of the experiment, the total number of viable bacteria for the two remediation models applied to sediment contaminated with TPH's, were quantified in six pre-established samples. The results concerning the initial average count of bacteria are between  $0.1$  and  $0.2 \times 10^6 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$  determined at the beginning of the experiment. After being applied the models of the remediation in sediments, there was a significant increase in the number of microorganisms after the 7th day in the two models, showing significant difference compared to the initial sediment sample,  $8.3 \times 10^6$  (Intrinsic Bioremediation) and  $1,5 \times 10^6$  (Phytoremediation by *A. schaueriana*) CFU  $g^{-1}$  respectively. After the 30th day there was an increase in Phytoremediation of the microbial community, and quantified values from  $8 \times 10^6$  to  $16 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$ , however there was a drastic drop in the number of microorganisms in the application model of Intrinsic Bioremediation ( $1.8 \times 10^6$  CFU  $g^{-1}$ ). **Figure 5** presents the total count of bacteria during the 90 days, with

data expressed in polynomial trend with a coefficient of determination  $R^2$  of 100% for total bacterial counts.

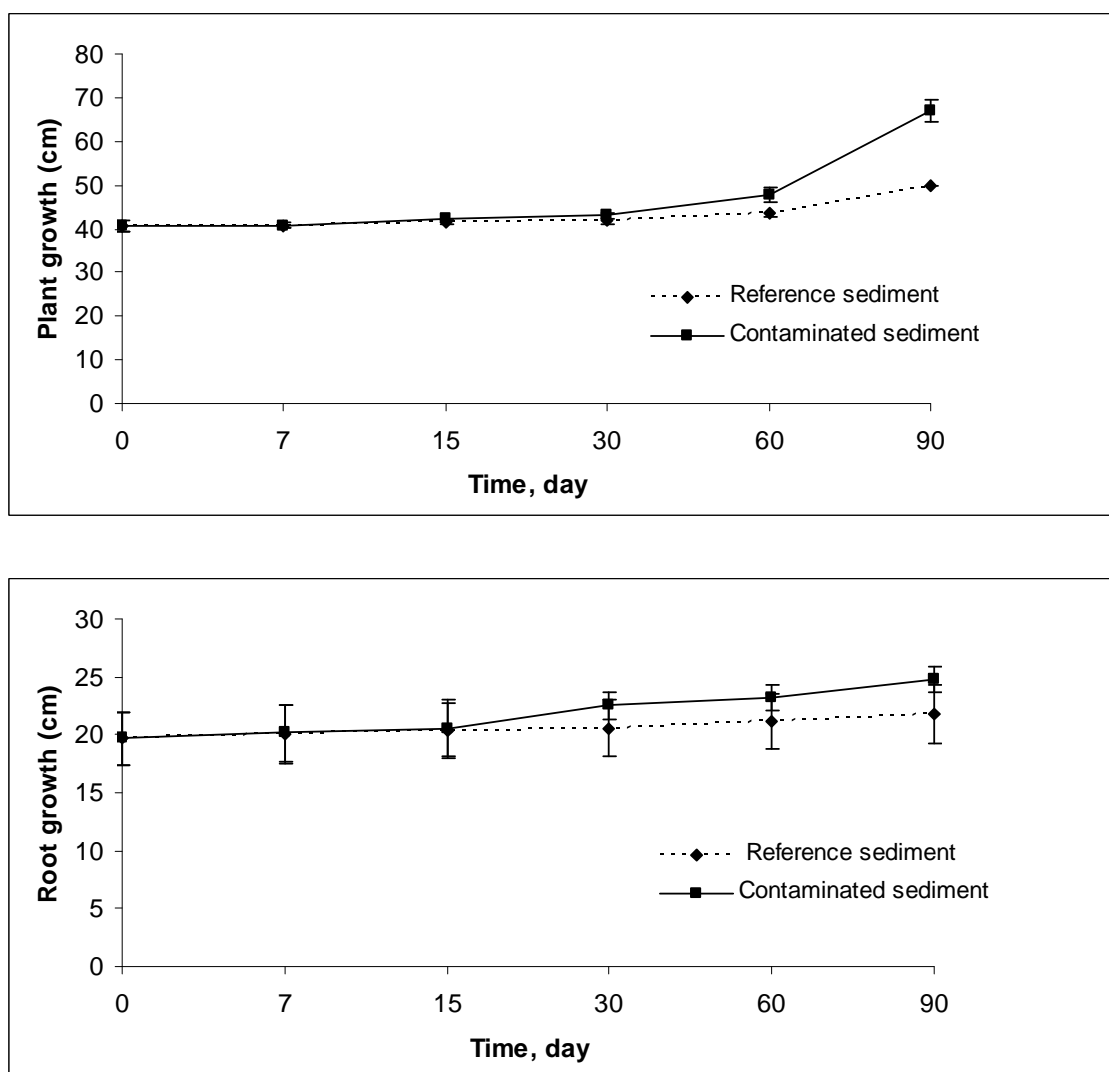
**Figure 5.** Total count of bacteria for 90 days, with data expressed in polynomial trend with a coefficient of determination  $R^2$  of 100%.



### 3.5. Evaluation the physiology of *Avicennia schaueriana* used for Phytoremediation

It is very important to investigate the physiology of a plant used in the application of Phytoremediation, since the contaminants found in polluted sediments may often affect the growth of plant species, and from this point it is possible to say if the plant is able to degrade toxic compounds or not. The effects of TPH's in the sediment on the growth of *A. schaueriana* were evaluated by measuring the sizes of plants and their roots, by comparing the growth of plants of the contaminated sediment with the sediment reference (**Fig. 6**). It was not expected, but there was a higher growth in the experiments of Phytoremediation in contaminated sediments compared to the reference sediment, watching an increase of 24% in plant growth and a root 7% bigger. Therefore, biomass accumulation of plants in contaminated sediments was higher than the plants in non-contaminated sediment reference. It was proved that the plant species are very promising for the application of the technique, since this growth increased in the black mangrove probably indicates that the plant has a good adaptation to the conditions found in contaminated sediments.

Figure 6. Growth of *A. schaueriana* were evaluated by measuring the sizes of plants and their roots



#### 4. Discussions

In this research it was developed two models of treatment, using the Intrinsic Bioremediation and Phytoremediation by the *A. schaueriana* to assess the capability of removing organic compounds (TPH's) in mangrove contaminated sediments. The results showed that the Phytoremediation was more efficient in the degradation of organic compounds. The results corroborates with other studies that evaluated

similar situations (Yuan et al., 2001, Huang et al., 2004, Tam et al. 2008; Yergeau et al., 2009). However, despite many recent studies found the efficient use of plants in the removal of TPH's, the traditional remediation techniques are still the most used in these situations of contamination (Jorgensen et al., 2000, McCarthy et al., 2002; Huang et al., 2005). Some of the difficulties encountered by these traditional techniques in the removal of TPH's in polluted industrial areas are the different concentrations of organic compounds in soils, sediments and groundwater, the application of isolated remediation processes and high costs. (McNicol et al., 2005).

The successful implementation in the remediation of sediments contaminated by organic compounds in oil depends on the efficiency of degradation of different fractions of alkanes present in sediments contaminated by TPH's, mainly alkanes most recalcitrant as fraction 3B (C23-C34) and 4 (C34-C40) (Huang et al., 2001). The results of this study with residual oil in contaminated sediments showed that Phytoremediation by *A. schaueriana* was more effective at removing all fractions of organic compounds evaluated (3A (C16-23), 3B (C23-34) and 4 (C34-40)) in the experiment after 90 days. However it is worth noting that the Intrinsic Bioremediation was also efficient in the removal of fractions 3A (77%) and 3B (62%) as well as the Phytoremediation (3A - 3B and 81% - 72%), suggesting that the two models of remediation can be used in areas contaminated by these fractions of TPH's. However, for the fraction 4 was verified a very significant degradation by the *A. schaueriana* (73%) compared to Bioremediation (21%). This greater efficiency found in Phytoremediation process for fraction 4 is probably due to the plant's capacity to act together from an interaction (phytostimulation) with microorganisms in their rhizosphere, promoting the rhizodegradation. It is also important to consider the degradation and transformation of compounds made by plants that grow in mangrove

sediments contaminated by TPH's (Rock, 1997; Cunningham et al, 1996; Cunningham et al., 1995).

Another important theme in this research was the evaluation of the number of viable bacteria that grew in the rhizosphere of *A. schaueriana*, compared to the amount that grew on the model of Intrinsic Bioremediation. During the first 15 days of Bioremediation, growth was higher, but from the thirtieth day until the ninetieth day it was found a higher concentration of bacteria in the rhizosphere. These results corroborate the thirtieth day of the experiment in which the Phytoremediation has become more efficient in the degradation of TPH's in relation to Bioremediation. This suggests that plant species used in the experiment have high ability to stimulate the degradation of organic compounds by bacterial communities, through some allelopathic compounds, similar to organic compounds that stimulate the defenses of communities, corroborating other studies (Rovira et al., 1979; Anderson et al., 1993, Walton et al. 1994; Espinosa et al. 2005). Other compounds that are provided by plant roots act by stimulating the microorganisms that degrade TPH, such as carbohydrates, organic acids and amino acids. (Joner et al., 2002). The oxygenation promoted by the presence of mangrove roots in the black anoxic sediment of the mangrove forest would be another factor stimulating the biodegradation (Siciliano et al., 2001; Weibner et al., 2002).

The results of the comparison of plant growth in sediment reference with respect to contaminated sediment showed that plant species have developed the greatest biomass and roots in the substrate contaminated with TPH's. These results confirm that *A. schaueriana* has not been affected by the toxic effects of petroleum compounds present in the sediment, being different from what some researchers

report for sensitive species (Dowty et al, 2001; Culbertson et al, 2008; Peng et al, 2009; Nie et al., 2010).

## 5. Conclusions

The results of this research found that the model applied with Phytoremediation by *Avicennia schaueriana* was more efficient in the degradation of different fractions of TPH, although the Intrinsic Bioremediation has also been effective in the lighter fractions. However, it is noteworthy that the Phytoremediation by the plant species used was shown to be promising for the decontamination of contaminated sediments by the activities of the oil industry, and indirectly contribute to the minimization of global warming from carbon sequestration, a technology so ecologically correct. The study also found that Intrinsic Bioremediation has low efficacy when applied individually in the fractions of alkanes recalcitrantes , in addition, its maximum efficiency in just in the first 30 days. Furthermore, data from Microbiological analysis revealed that the association of plants with the community of microorganisms in the rhizosphere increased degradation of organic compounds in sediments, and thus promoted the major development of plant biomass in sediments contaminated by TPH's. However it must be evaluated if the model of phytoremediation produced in pilot scale in this study will be as effective in situ, as observed in laboratory conditions. It is suggested that a more detailed study would be to combine these processes into a new product for application in remediation of contaminated sediments by mangrove TPH's, especially when it comes to heterogeneous sediment contamination at different depths, and new research on the transformation of TPH's

in environment are needed to see if this transformation produces toxic by-products for the organisms and human health.

### **Acknowledgements**

This study has been carried out with the financial support of the FAPESB, FINEP and PETROBRAS.

### **References**

Atlas, R.M. 1982. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45: 180-209.

Alongi, D.M. 2002. Present state and future of the world's mangroves forests. *Environmental Conservation* 29: 331-349.

Bremner, J.M., Mulvaney, C.S., 1982. Nitrogen–Total. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*; SSSA Madison WI, pp. 595–624.

Brito, E. M., Duran, R., Guyoneaud, R., Goni-Urriza, M., Garcia de Oteyza, T., Crapez, M. A. 2009. A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, 58, 418–423.



Burns, K.A., Codi, S., Duke, N. C. 2000. Gladstone, Australia Field Studies: Weathering and Degradation of Hydrocarbons in Oiled Mangrove and Salt Marsh Sediments With and Without the Application of an Experimental Bioremediation Protocol. *Marine Pollution Bulletin*, 41, 392–402.

Culbertson, J.B., Valiela, I., Pickart, M., Peacock, E.E., Reddy, C.M. 2008. Long-term consequences of residual petroleum on salt marsh grass. *J. Appl. Ecol.* 45, 1284-1292.

Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C., 1996. Phytoremediation of soil contaminated with organic pollutants. *Advance in Agronomy* 56, 55e71.

Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W., 1995. Phytoremediation of contaminated soil. *Trends Biotechnol.* 13, 393e397.

Dowty, R.A., Shaffer, G.P., Hester, M.W., Childers, G.W., Campo, F.M., Greene, M.C. 2001. Phytoremediation of small-scale oil spills in fresh marsh environments: a mesocosm simulation. *Marine Environmental Research*, 52, 195-211.

Duke, N. C., Meynecke, J. O., Dittmann, S., Ellison, A. M., Anger, K., Berguer, U. (2007). A world without mangroves? *Science*, 317, 41–42.

Espinosa, E., Martinez, M.E., Torres, E.F., Rojas, M.G. 2005. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere*. 59, 406.

Eysink, G.G.J. Recuperação de áreas de manguezais degradados através do uso de propágulos de *Rizophora mangle* acondicionado em estufa. *Arquivo do Instituto Biológico*. v.24, p1-65, 1997.

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.

Gunther, T., Dornberger, U., Fritsche, W. 1996. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 33, 203–215.

Joner, E.J., Corgie, S., Amellal, N., Leyval, C. 2002. Nutritional constraints to PAH degradation in a rhizosphere model. *Soil Biology and Biochemistry*. 34, 859-864.

X.D. Huang, Y. El-Alawi, J. Gurska, B.R. Glick, B.M. Greenberg, *Microchemical Journal*. 81 (2005) 139-147.

Jorgensen, K.S., Puustinen, J., Suortti, A.-M. 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. 107: 245-254.

Lee, J. U.; Kim, S. M.; Kim, K. W.; Kim, I. S. 2005. Microbial removal of uranium in uranium-bearing black shale. *Chemosphere*, 59, 147–154.

McCarthy, K., Walkerb, L., Vigorenc, L., Barteld, J. 2004. Remediation of spilled petroleum hydrocarbons by in situ landfarming at an arctic site. *Science and Technology*. 40, 31-39.

D.M. McNicoll, A.S. Baweja, *Bioremediation of petroleum-contaminated soils: an innovative, environmental friendly technology*, Environment Canada, 1995.

Moreira I.T. A, Freitas, P. F, Nascimento, R. S. A, Oliveira, O. M. C, Triguís, J. A. Selection of species plant mangrove for assessment phytoremediation of contaminated sediments by in oil and derivatives. In: Rio Oil & Gas Expo and Conference, IBP2899\_10. 2010a

Moreira I.T. A, Martins, C. M. S., Oliveira, M. C., Oliveira, O.M.C, Triguís, J.A. Detailed and confirmatory investigation in an area with contaminated sediment, in order for the application of phytoremediation. In: XII Workshop and Congress Geochemistry Organic American Latin Association (ALAGO). 2010b

Nelson, D.W., Sommers, L.E., 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., (Eds.). *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*; SSSA Madison WI, pp. 539–577.

Nie, M., Yang, Q., Jiang, L.F., Fang, C.M., Chen, J.K., Li, B. 2010. Do plants modulate biomass allocation in response to petroleum pollution? *Biol. Lett.* doi:10.1098/rsbl.2010.0261.

Oliveira, O.M.C. *Processos de Biorremediação em áreas influenciadas por atividades petrolíferas*. Rio Oil & Gás. IBP174\_08. 2008.

Olsen, S.R., Dean, L.A., 1982. Phosphorus. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., (Eds.). *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*; SSSA Madison WI, pp. 1035–1049.

Peng, S.W., Zhou, Q.X., Cai, Z., Zhang, Z.N. 2009. Phytoremediation of petroleum

contaminated soils by *Mirabilis jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. *J. Hazard. Mater.* 168, 1490-1496.

Rock, S., 1997. Phytoremediation. In: Freeman, H. (Ed.), *Standard Handbook of Hazardous Waste Treatment and Disposal*, second ed. McGraw Hill Inc, New York, USA, pp. 93e112.

Romeiro, R. S. *Métodos em bacteriologia de plantas*. Viçosa: UFV, 2001. 279 p.

Rovira, A.D., Davey, C.B., 1979. In: Carson, E.W. (Ed.), *The Plant Root and Its Environment*. University Press of Virginia, Charlottesville. 153–204p.

Salt, D. E.; Smith, R. D.; Raskin, I. 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Phys.* 49, 643–668.

Siciliano, S. D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., Beaumier, D., Ouellette, D., Roy, R., Whyte, L. G., Banks, M. K., Schwab, P., Lee, K., Greer, C. W. 2001. Selection of Specific Endophytic Bacterial Genotypes by Plants in Response to Soil Contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2469-2475.

Susarla, S.; Medina, V. F.; McCutcheon, S. C. 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.* 18, 647–658.

Henrique F. Santos & Flávia L. Carmo & Jorge E. S. Paes & Alexandre S. Rosado & Raquel S. Peixoto. Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum. *Water Air Soil Pollut.*

Seabra, P.N. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In: *Microbiologia Ambiental*. V.2.2008.(548-570).

Tam, N. F., & Wong, Y. S. (2008). Effectiveness of bacterial inoculum and mangrove plants on remediation of sediment contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 716–726.

Kathleen McCarthy, Langston Walkerb, Leah Vigorenc and Janet Barteld. Remediation of spilled petroleum hydrocarbons by in situ landfarming at an arctic site. *Science and Technology* Volume 40, Issues 1-2, November 2004, Pages 31-39

U.S. EPA, Introduction to phytoremediation. EPA/600/R-99/107, Washington, DC, 2000 (February).

Yergeau, E., Arbour, M., Brousseau, R., Juck, D., Lawrence, J. R., Masson, L., et al. (2009). Microarray and Real-Time PCR Analyses of the Responses of High-Arctic Soil Bacteria to Hydrocarbon Pollution and Bioremediation Treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (19), 6258–6267.

Ke, L., Yu, K. S., Wong, Y. S., & Tam, N. F. 2005. Spatial and vertical distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments. *The Science of the Total Environment*, 340, 177–187.

Yuan, S. Y., Chang, J. S., & Chang, B. V. (2001). Biodegradation of phenanthrene in river sediment. *Chemosphere*, 43, 273– 278.

Walton, B.T., Guthrie, E.A., Hoylman, A.M. 1994. Toxicant degradation in the rhizosphere. In: Anderson, T.A., Coats, J.R. (Eds.), *Bioremediation through Rhizosphere Technology*. ACS Series 563, Washington DC. 11-26p.

Wilkie, M.L. and Fortuna, S. 2003. Status and trends in mangrove area extent worldwide. *FAO Working Paper FRA 63*.

Weibner, A., Kusch, P., Stottmeister, U. 2002. Oxygen release by roots of *Typha latifolia* and *Juncus effuses* in laboratory hydroponic systems. *Acta Biotechnol.* 1–2, 209–216.



## 5.4. MODELS OF BIOREMEDIATION FOR THE DEGRADATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS IN THE PRESENCE OF HEAVY METALS IN MANGROVE SEDIMENTS

Ícaro T. A. Moreira<sup>a</sup>, Olívia M. C. Oliveira<sup>a, b</sup>, Jorge A. Triguís<sup>a</sup>, Sérgio L. Ferreira<sup>a, c</sup>, Antonio F. S. Queiroz<sup>a</sup>, Paulo O. Mafalda<sup>a</sup>, Carine S. Silva<sup>a</sup>, Claudia. Y. Reyes<sup>a</sup>

a. Núcleo de Estudos Ambientais, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

b. Instituto de Geociências, Departamento de Geofísica Aplicada, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Campus de Ondina, 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

c. Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Campus de Ondina, 40170-290, Salvador-BA, Brasil.

d. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, INCT, de Energia e Ambiente, 40170-290 Salvador-BA, Brasil.

\* Corresponding author: Tel: +55 71 3283 8632, Fax: + 55 71 3283-8632, Emails address: [icaromoreira@ufba.br](mailto:icaromoreira@ufba.br); [icarotam@gmail.com](mailto:icarotam@gmail.com) (Ícaro Thiago Andrade Moreira)

### Abstract

Contamination by oil spills in coastal ecosystems, especially in mangrove sediments, has been commonplace in countries with strong performance in oil industry. Therefore, the aim of this study was to evaluate the efficiency of application of the two models developed in pilot scale remediation, Intrinsic Bioremediation (indigenous microorganisms) and Phytoremediation (*Avicennia schaueriana*) in the degradation of hydrocarbons associated with heavy metals in mangrove sediments, besides monitoring other biogeochemical parameters (nitrogen, phosphorus, TOC, pH, Eh, DO, salinity, temperature, bacterial density). The integrated assessment of data

showed that both techniques were effective in degrading organic compounds from oil, but the phytoremediation is the most efficient (89% removal). It was also noted that the model of Intrinsic Bioremediation has no direct correlation with metal concentrations, but a positive correlation with Al and Ni was found in the hydrocarbon removal in Phytoremediation, it was observed that the plant presents efficiency and phytoextraction in phytostimulation. The results suggest that the model of Phytoremediation through its various mechanisms may become a technique for the removal of petroleum hydrocarbons in the presence of metals in mangrove sediments near industrial areas.

## **Introduction**

The development of models and remediation processes has the objective of being applied to mangrove sediments affected by the presence of petroleum hydrocarbons in conjunction with heavy metals has become a major technological need in the countries of coastal regions with a strong oil industry (1, 2). Especially when it comes to an ecosystem with ecological and economic importance such as a mangrove that is ranked as one of the most sensitive habitats in the world ranking of coastal areas in the NOAA Environmental Sensitivity index, a tool that manages contingency plans for oil spills (3).

The mangrove sediments have some special characteristics such as low or zero oxygen availability, average salinity and low diversity of microorganisms in relation to other environmental compartments. Such factors can provide a greater or lesser biodegradation of toxic compounds. However, the impact of oil on mangroves depend on the types of pollutants, concentration, toxicity, distribution and also the

retention time (3). In many cases the sediment can behave as reservoirs of pollutants such as heavy metals that are coming from marine or terrestrial environment, and thus, the toxicity of the contamination is higher and the degree of difficulty in the removal of organic compounds derived from petroleum becomes more complex (4, 5).

A technique widely used in mangrove areas affected by oil is the Intrinsic Bioremediation (Natural Attenuation Monitored), which is a process based on natural factors in which indigenous microorganisms will act in the degradation of petroleum hydrocarbons that are bioavailable in the sediment through a redox (6). However, this technique depends on the monitoring through geochemical indicators (pH, Eh, DO, temperature, nutrients) as well as the monitoring of microbial density. This remedial option has been used mainly for the user's low cost and its wide acceptance (7).

The Phytoremediation has also been applied with intensity in areas affected by oil in recent years. This technique can be defined as a process that applies plant systems, often associated with their microorganisms, with the intention of removing, degrading and immobilizing toxic substances in the environment or with tolerance to high concentrations of contaminants in the roots, stems and leaves (8). Plant species that perform phytoremediation have several physiological mechanisms, depending on the physicochemical nature of the pollutant or property and may be classified as: phytoextraction, phytodegradation, phytostabilization, phytostimulation and phytovolatilization. Large areas can be retrieved in several ways, low cost, with opportunities to remediate contaminated water, soil, subsoil, sediments, while beautifying the environment. Paradoxically, the time to obtain satisfactory results can sometimes be long. The concentration of the contaminant and the presence of toxins

must be within the tolerance limits of plant used to avoid compromising the treatment (9).

In contaminated mangrove sediments by heavy metals and hydrocarbon it is difficult to choose the best technique to be applied. Few organisms can tolerate a heterogeneous contamination, even though some microbes use oil as an energy source (10). Therefore, the objective of this study was to evaluate the efficiency of two models developed in pilot scale remediation, the Intrinsic Bioremediation (indigenous microorganisms) and Phytoremediation (*Avicennia schaueriana*), the degradation of hydrocarbons associated with heavy metals in mangrove sediments, and monitored other biogeochemical parameters (pH, Eh, DO, salinity, temperature, bacterial density).

## **Experimental Section**

**Sediment.** In a mangrove ecosystem located in the North of Bahia de Todos os Santos, between the cities of Candeias and São Francisco do Conde, Bahia, Brazil, sediment samples at 0-30 cm depth were collected. These samples were sieved (4 mm sieve) and homogenized. Five sub-samples of sediments were collected, lyophilized for 72 hours and sieved through 2 mm mesh to determine the physical and chemical properties of the selected sediment. The organic matter in sediments was determined using a modified Mebius method (11). Total N was determined by Kjeldahl digestion, distillation and titration method (12), method of extraction to evaluate P (phosphorus) by Olsen (13). Particle size distribution was determined after organic matter was removed with 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the method of Folk and Ward

(14). After homogenization, sediment samples were mixed at 1:10 with oil residue found in the same area, a region with many activities in the petroleum industry (extraction, transportation and refining). Then, five replicates of homogenized sediment samples were collected for analysis of the initial concentration of TPHs. We collected a sediment in a reference area as found in another study (15) for comparisons of the parameters analyzed in this study.

**Remediation Models.** This research was developed on a pilot scale with two remediation models, the first being the model of Intrinsic Bioremediation (Monitored Natural Attenuation) and the second model was the Phytoremediation (*Avicennia schaueriana* - black mangrove). These models were developed by building units of simulated mangrove, and the material used was glass (50x30x40cm). Within each unit of simulation 6 glass tubes were added (30x10x10cm), each tube would be a repetition for each developed model, resulting in three units of simulation with six replicates for each model. The experiment was conducted during three months in a greenhouse near the mangrove in which the sediment and also waste oil samples were collected. The tidal regime was daily simulated in each unit, in order to provide models for remediation conditions closer to a wetland ecosystem. The choice of plant species used in the model of Phytoremediation of this study was based on pre-tests done earlier by our group, attesting to their ability to grow in sediments with high concentrations of petroleum hydrocarbons (16). Seedlings of *A. schaueriana* were collected at low tide, taking into consideration their height (average of 3 months old), defining a standard sample.

**Monitoring.** For monitoring of the study sediment in the two models, the samples were collected in five pre-set times (7, 15, 30, 60, 90 days). TPH concentrations were analyzed by USEPA determined 8015B method, metals determined by USEPA method 3015, macronutrients (TN, P), TOC, TOM, pH and Eh through the method of potentiometry using a pH / mV HandyLab1, SchottGlaswerkeMainz. The salinity was Measured by the index of refraction, using the portable refractometer Atoga S / Mill-E and dissolved oxygen (DO) was Measured with a WTW Oximeter OXI 3151 (SCHOTT-GERÄTE). Was also analyzed using the bacterial density of the "microgotas" (17). The analysis of these parameters aimed at enabling an integrated assessment of biodegradation of organic compounds derived from petroleum in the presence of metals.

**Statistical Analysis.** Integrated assessment of the data for the two models of remediation was made possible also by statistical tests, such as principal component analysis (PCA) to the average concentrations of all data analyzed in surface sediments of each type of remediation, in order to find the main variables influencing the degradation of TPHs. Other statistical tests were applied to the K-means, the Kolmogorov-Smirnov test, parametric Tukey-Kramer and Pearson correlation. All the statistical evaluation was performed using the software STATISTICA 6.0 and GraphPad Software.

## Results and Discussions

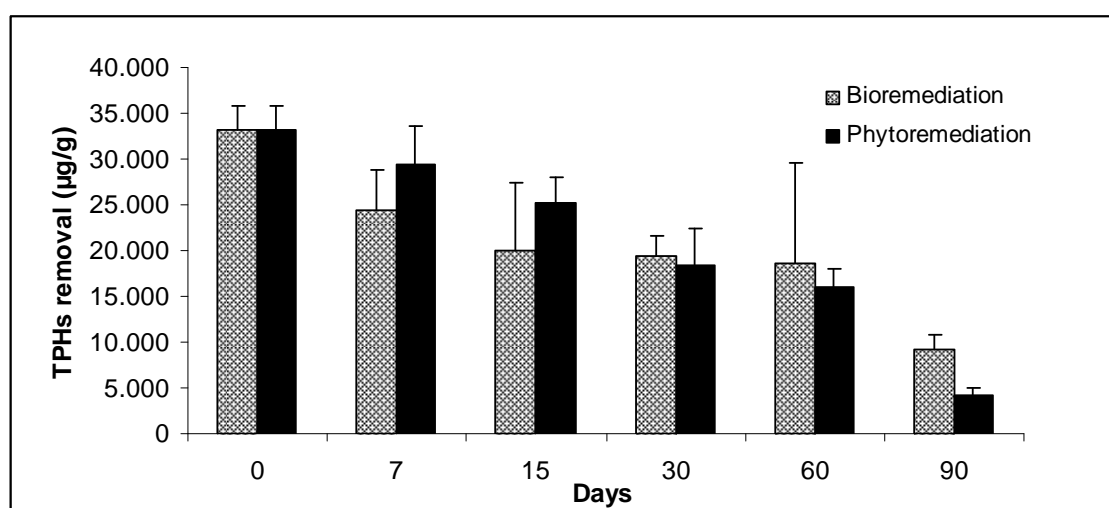
**Monitoring of the experiment.** Initially, before the start of the experiments, pre-established parameters were analyzed in the sediment before (Reference) and after mixing with the oil (Contaminated, day 0). During the three month experiment, the same parameters were also monitored, as shown in **Table 1**. The results found that after the homogenization of the sediment reference to the oil there was an increase in the concentration of most metals tested, except for iron (Fe), but all values were below the TEL (18), not being toxic to biota. In other experiments this behavior in relation to the higher concentration of metals in a sediment contaminated with oil was also observed (19, 20). During the experiment in Intrinsic Bioremediation the pH values found ( $7.79 + / - 7.31$ ) and Phytoremediation ( $7.6 + / - 6.93$ ) were within the expected range for optimum degradation (21). Regarding the monitoring of temperature ( $30^{\circ} + / - 25^{\circ} \text{C}$ ), the averages were classified as ideals where the greatest enzymatic activity of microorganisms in bioremediation happens (22). The salinity during the experiment in both models showed a variation that would not jeopardize the degradation of microorganisms (23). Concentrations of macronutrients (N and P) and organic matter in sediments also were within what is expected for degradation by the biota in sediments impacted by organic compounds (21).

**Table 1.** Monitored parameters during the three months experiment (n=3).

	<b>IB 0</b>	<b>PA 0</b>	<b>IB 7</b>	<b>PA 7</b>	<b>IB 15</b>	<b>PA 15</b>	<b>IB 30</b>	<b>PA 30</b>	<b>IB 60</b>	<b>PA 60</b>	<b>IB 90</b>	<b>PA 90</b>
<b>pH</b>	7,62	7,51	7,79	7,6	7,68	7,53	7,31	7,25	7,64	7,6	7,37	6,93
<b>Eh</b>	-23,7	-9,7	-43	-30	-36	27	-15	-9,7	-35	-33	-22	-7,6
<b>T (°C)</b>	28	27,2	27	27	25	25	27	27	30	30	29,1	29,8
<b>Sal</b>	25	27	23,67	22	28	27	30	30	29	26	32	32
<b>DO (mg/L)</b>	4,58	5,49	5,01	5,17	5,27	5,14	5,18	4,46	5,32	4,58	5,36	6,32
<b>Cu (µg/g)</b>	17,86	17,86	18,25	17,60	19,50	19,35	18,59	18,07	19,23	18,30	19,43	18,60
<b>Zn (µg/g)</b>	22,23	22,23	19,95	18,69	19,27	18,99	19,43	17,53	24,60	20,82	22,91	22,31
<b>Pb (µg/g)</b>	18,21	18,21	11,06	15,26	16,87	20,91	16,87	18,92	27,15	19,45	25,63	28,87
<b>Cr (µg/g)</b>	11,47	11,47	6,34	5,87	6,75	8,53	7,38	7,09	13,11	8,74	11,33	10,61
<b>Ni (µg/g)</b>	17,43	17,43	13,56	16,57	15,81	16,51	14,01	15,34	18,39	15,10	17,04	14,43
<b>Fe (µg/g)</b>	10739,67	10739,67	9961,20	9867,57	10082,18	9960,58	12591,74	9441,30	14787,52	12916,35	12692,93	13095,78
<b>Al (µg/g)</b>	7925,57	7925,57	6177,15	5665,04	6239,41	9098,65	5497,63	6386,87	9879,28	6936,10	4628,46	4542,79
<b>TPH (µg/g)</b>	33215,16	33215,16	24351,27	29494,29	20098,74	25253,30	19437,69	18396,79	18698,49	16041,15	9225,12	4222,98
<b>TOM (%)</b>	5,73	5,73	5,56	5,53	15,40	5,51	13,85	9,84	15,13	12,73	14,08	14,08
<b>TOC (%)</b>	3,32	3,32	3,23	3,21	8,93	3,19	8,04	5,71	8,77	7,38	8,16	8,16
<b>TN (%)</b>	0,36	0,36	0,35	0,30	0,33	0,32	0,30	0,30	0,23	0,32	0,21	0,29
<b>P (mg/L)</b>	2,70	2,70	2,50	1,80	2,30	1,80	1,80	1,50	1,70	1,50	1,60	1,70
<b>C/N</b>	9,26	9,26	9,28	10,79	26,74	9,90	26,45	19,09	37,94	23,26	39,32	28,13
<b>CFU g<sup>-1</sup></b>	1,33	1,33	2	0,2	8,8	1,5	1,8	12	1,2	19	0,9	3,1

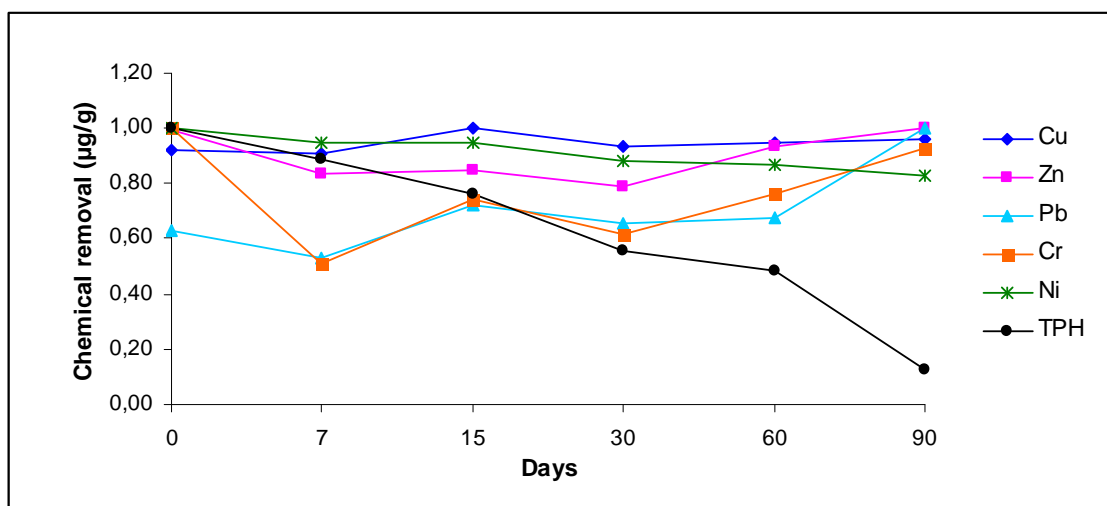


**Biodegradation.** The removal of hydrocarbons derived from petroleum in the presence of metals was evaluated in two models of biodegradation during remediation of the 90 day experiment. Within fifteen days of the initial model Intrinsic Bioremediation of a higher efficiency was verified compared to Phytoremediation, which has become more efficient from the 15th day on . This result was expected, since plants need a period of days to adapt to the contaminated sediment to reach its maximum efficiency at removing contaminants (24). After three months it was observed that *A. schaueriana* showed a removal of compounds in sediments from the initial 33.2 to 4.2  $\mu\text{g} / \text{g}$ , while the intrinsic bioremediation decreased from 33.2 to 9.2  $\mu\text{g} / \text{g}$  (**Figure 1**). Thus, phytoremediation was able to remove the sediment about 19% more than the intrinsic bioremediation. This increased efficiency of phytoremediation with respect to the intrinsic bioremediation corroborates other studies in sediments affected by oil organic compounds (25-27).

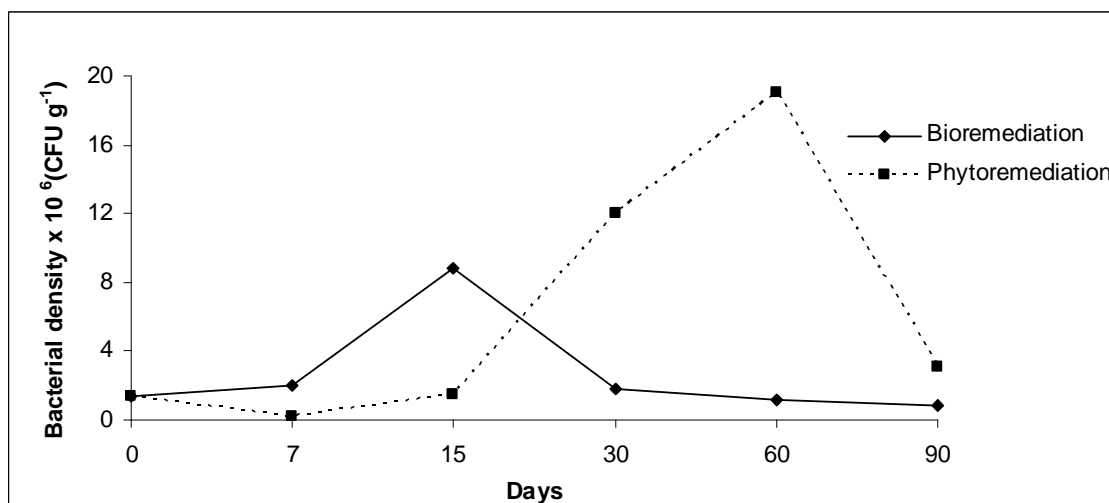


The values of metals in the two models during the ninety days have showed relatively constant, though we observed a moderate removal (18%) of nickel (Ni) and low removal (8%) of chromium (Cr) by the black mangrove (**Figure 2**). This sequence of

degradation and higher removal of the template for Phytoremediation was consistent with the results of the analysis of bacterial density in the sediment.



After applying models of remediation in sediments, it was observed a significant increase in the number of microorganisms after 7 days in both models, showing significant difference from the original sediment sample,  $8.3 \times 10^6$  (Intrinsic Bioremediation) and  $1,5 \times 10^6$  (phytoremediation by *A. schaueriana*) CFU g<sup>-1</sup>, respectively (**Figure 3**). After 30 days, an increase of microbial communities in phytoremediation, as well as the quantified values of  $8 \times 10^6$ - $16 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup> were observed, but there was a drastic drop in the number of microorganisms in the application model of intrinsic bioremediation ( $1,8 \times 10^6$  CFU g<sup>-1</sup>). These results suggest that the black mangrove should have high capacity to stimulate the degradation of organic compounds by bacterial communities, through some allelopathic compounds, similar to organic compounds that stimulate the defenses of communities or other compounds that are provided by the action of the plants' roots, stimulating the microorganisms, such as carbohydrates, organic acids and amino acids, corroborating other studies (28, 29).



**Integrated Assessment.** To appreciate how the metals and other parameters in this experiment influenced the removal of organic compounds derived from petroleum, we used Pearson correlation to get an indication of the strength and direction of the linear relationship between variables in both models of remediation applied. In Intrinsic Bioremediation (**Figure 4**) it was observed a strong negative correlation between concentrations of copper (Cu) and TPHs throughout the experiment, indicating that there was a greater availability of the metal during the biodegradation of hydrocarbons, which may have inhibited greater removal of indigenous microorganisms (30). As for the other metals no strong correlation was observed. With regard to macronutrients (N, P) and dissolved oxygen (DO), the correlation was strongly positive with the removal of TPHs, indicating that in this model of remediation the oxygen and nutrients in the sediment were more available, the greater was the degradation of organic compounds which agrees with enough information published in the literature (31). When the model of Phytoremediation was evaluated, a strong positive correlation between the removal of hydrocarbons and nickel (Ni) and aluminum (Al), and the consumption of nitrogen and phosphorus has been observed, noting that this model *A. schaueriana* held phytoextraction of metals

in the sediment and associated with microorganisms also removed the oil, and this same behavior has already been seen applied to other plant species in contaminated sediments (32, 33). It was also observed that the degradation of the hydrocarbons in black mangrove may have used the mechanism of phytostabilization for lead (Pb), taking into account the negative correlation between the variables.

**Table 2.** Pearson Correlation in Intrinsic Bioremediation

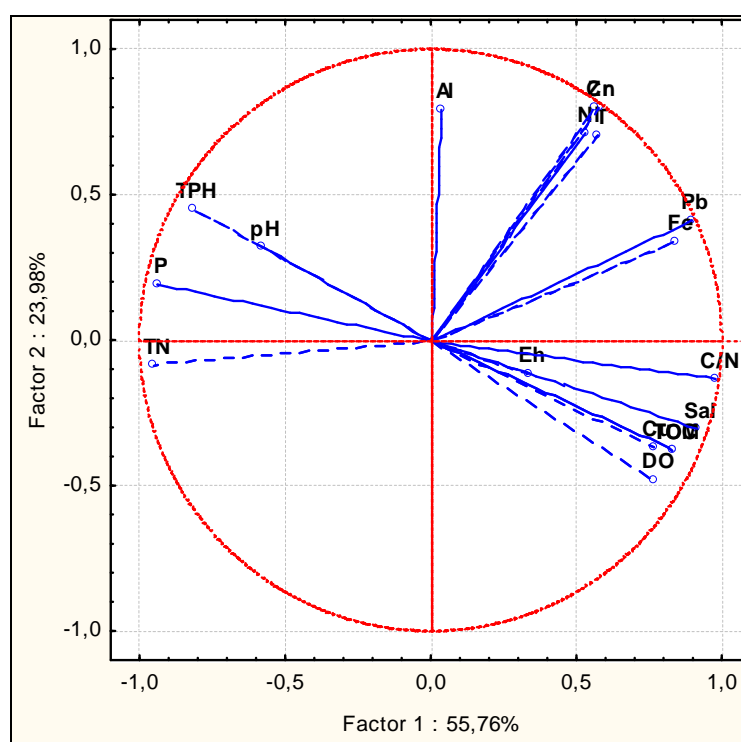
	pH	Eh	T	Sal	DO	Cu	Zn	Pb	Cr	Ni	Fe	Al	TOM	TOC	TN	P	TPH
pH	1																
Eh	-0,92	1															
T	-0,23	0,18	1														
Sal	-0,80	0,58	0,31	1													
DO	-0,31	-0,07	0,10	<b>0,74</b>	1												
Cu	-0,21	-0,09	0,04	<b>0,73</b>	0,90	1											
Zn	-0,04	0,03	0,93	0,27	0,09	0,17	1										
Pb	-0,39	0,28	<b>0,76</b>	<b>0,71</b>	0,46	0,57	<b>0,85</b>	1									
Cr	-0,17	0,23	<b>0,88</b>	0,32	-0,02	0,11	0,97	<b>0,86</b>	1								
Ni	-0,01	0,08	<b>0,64</b>	0,29	0,03	0,30	<b>0,87</b>	<b>0,84</b>	0,92	1							
Fe	-0,46	0,32	<b>0,79</b>	<b>0,65</b>	0,50	0,39	<b>0,72</b>	<b>0,84</b>	<b>0,70</b>	0,54	1						
Al	0,48	-0,34	0,43	-0,30	-0,22	-0,14	0,59	0,33	0,57	0,60	0,40	1					
TOM	-0,47	0,22	0,05	<b>0,85</b>	<b>0,86</b>	<b>0,89</b>	0,13	<b>0,60</b>	0,14	0,27	0,57	-0,05	1				
TOC	0,50	-0,23	-0,71	-0,82	-0,73	-0,68	-0,67	-0,87	-0,60	-0,50	-0,82	0,00	-0,65	1			
TN	<b>0,67</b>	-0,38	-0,50	-0,91	-0,83	-0,68	-0,39	-0,72	-0,35	-0,23	-0,83	0,13	-0,79	0,92	1		
P	-0,52	0,24	0,43	0,91	<b>0,86</b>	<b>0,87</b>	0,46	<b>0,83</b>	0,44	0,46	<b>0,76</b>	-0,02	0,90	-0,91	-0,93	1	
TPH	0,52	-0,16	-0,24	-0,85	0,91	-0,83	-0,18	-0,54	-0,09	-0,07	-0,49	0,44	-0,74	<b>0,84</b>	<b>0,87</b>	<b>0,86</b>	1

**Table 3.** Pearson Correlation in Intrinsic Phytoremediation (*A. schaueriana*).

	pH	Eh	T	Sal	DO	Cu	Zn	Pb	Cr	Ni	Fe	Al	TOM	TOC	TN	P	TPH
pH	1,00																
Eh	-0,17	1,00															
T	-0,38	-0,66	1,00														
Sal	-0,88	0,37	0,29	1,00													
DO	-0,58	0,21	0,23	0,36	1,00												
Cu	-0,19	<b>0,80</b>	-0,22	0,40	0,16	1,00											
Zn	-0,27	-0,11	0,58	0,28	<b>0,69</b>	0,02	1,00										
Pb	-0,84	0,33	0,45	<b>0,82</b>	<b>0,69</b>	0,56	0,52	1,00									
Cr	-0,33	0,24	0,31	0,52	0,60	0,23	<b>0,89</b>	0,56	1,00								
Ni	<b>0,67</b>	0,20	-0,69	-0,60	-0,09	-0,23	-0,07	-0,67	0,03	1,00							
Fe	-0,36	-0,32	<b>0,89</b>	0,34	0,43	0,16	<b>0,76</b>	<b>0,65</b>	0,55	-0,61	1,00						
Al	<b>0,63</b>	0,57	-0,65	-0,25	-0,38	0,42	-0,15	-0,38	0,14	<b>0,64</b>	-0,40	1,00					
TOM	-0,64	-0,32	<b>0,87</b>	<b>0,62</b>	0,16	0,13	0,35	<b>0,69</b>	0,24	-0,94	<b>0,80</b>	-0,61	1,00				
TOC	-0,64	-0,32	<b>0,87</b>	<b>0,62</b>	0,16	0,13	0,35	<b>0,69</b>	0,24	-0,94	<b>0,80</b>	-0,61	1,00	1,00			
TN	0,50	0,20	-0,27	-0,19	-0,05	-0,03	0,39	-0,33	0,57	<b>0,73</b>	-0,11	<b>0,73</b>	-0,49	-0,49	1,00		
P	0,22	0,15	-0,27	-0,15	0,37	-0,26	0,51	-0,20	0,59	<b>0,77</b>	-0,15	0,37	-0,56	-0,56	<b>0,82</b>	1,00	
TPH	<b>0,78</b>	0,06	-0,68	-0,71	-0,30	-0,35	-0,24	-0,83	-0,17	0,97	-0,68	<b>0,61</b>	-0,93	-0,93	<b>0,65</b>	<b>0,64</b>	1,00

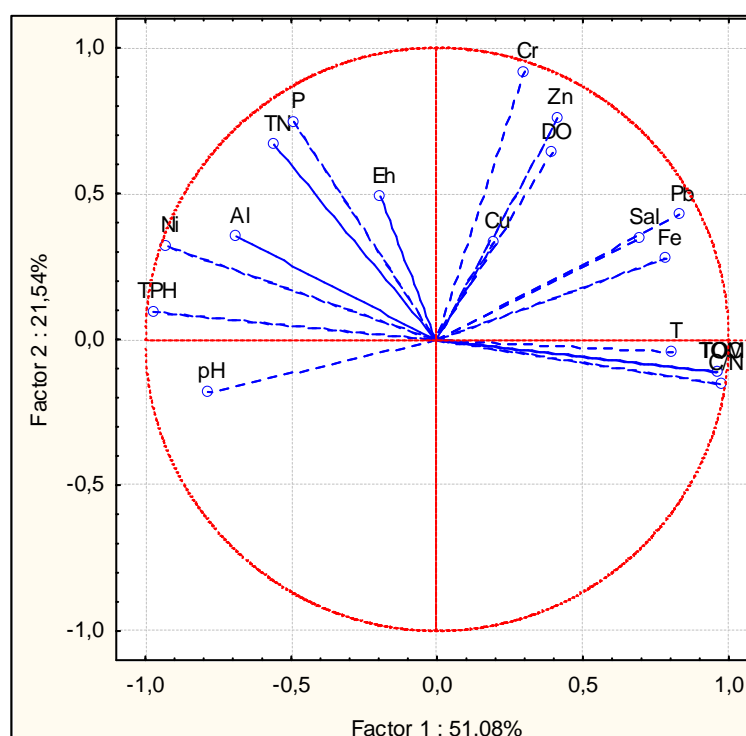
With the objective of obtaining a smaller number of linear combinations than the ones found in the Pearson correlation, it was also carried out an analysis of the principal component models remediation (PCA). Intrinsic Bioremediation in the two main factors could explain 79.74% of the variation in the data analyzed with the first factor explaining 55.76% and second 23,98%. The values of TPHs, Pb, Cu, Zn, P, TN are well represented on the chart where strong positive correlations were noted between pH and P TPH's, corroborating the results of the Pearson correlation. However, this analysis showed that the concentrations of Al, Ni, Cu, Zn, Fe and Pb are independent of the removal of hydrocarbons, making it clear once again that all metals are likely to have influenced both the biodegradation. It has been shown that this model was a negative correlation between the variables DO, TOC, TOM, Sal, C / N with the TPHs. This fact must have occurred, because the degradation of organic compounds in sediments with indigenous microorganisms was directly linked to the consumption of oxygen, organic matter and nutrients (31).

**Figure 4.** PCA in Intrinsic Bioremediation.



In the PCA applied to Phytoremediation, the two main factors explained 72.62% of the variance, with factor 1 explaining 51.08% and the second factor explaining 21.54% of the evaluated data (**Figure 5**). In this model, the graph represented well the values of TPH's, Ni, Pb, Cr, TN, P, Al and Ni strongly correlated with TPHs agreeing with Pearson's correlation. Moreover, it was evident that the hydrocarbons removal was independent of variables: Cr, Cu, Zn, Pb, Fe, DO and salt, suggesting that these variables did not influence the biodegradation, maybe by the phytostabilization in the metals, besides the *A. schaueriana* behavior as halophyte species in the presence of salts (34). Moreover, a strong negative correlation between some variable and the TPHs was not shown, although there is a moderate negative correlation between TPHs with TOC and T, suggesting that the greater degradation of compounds happened when the temperature was higher and the quantity of organic carbon was bigger in the environment (31 ).

**Figure 5.** PCA in Intrinsic Phytoremediation (*A. schaueriana*).



The conclusion is, regarding the developed models applied to remediation of mangrove sediments simulated on a pilot scale, a higher efficiency of Phytoremediation, in relation to the removal of the Intrinsic Bioremediation of petroleum hydrocarbons was observed. The presence of metals did not influence directly on Bioremediation, except for Cu, which may have moderately inhibited greater efficiency in the process. On the other hand, Ni and Al seem to have been absorbed by *A.schaueriana*, while they were removed from the hydrocarbons, which may have favored more the growth of microorganisms in the rhizosphere, besides the stimulation by the allelopathic compounds. Finally, it was emphasized that the implementation of the Phytoremediation model in areas impacted by oil activities can be very important, since it is an inexpensive, environmentally friendly and socially correct technique. Moreover, this process may also contribute to reduce global warming through carbon sequestration by applied plants, showing its not only local but also global importance.

### **Acknowledgements**

This study has been carried out with the financial support of the FAPESB, FINEP and PETROBRAS.

### **Literature Cited**

(1) Schnoor, J. L., Licht, L. A., McCutcheon S. C., Wolfe, N. L., Carreira, L. H. 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environmental Science & Technology*. Vol. 29, n.7, 318-323.

(2) Barbier, E. B., Koch, E. W., Siliman, B. R., Hacker, S. D., Wolanski, E., & Primavera, J. (2008). Coastal ecosystem based management with nonlinear ecological functions and values. *Science*, 318, 321–323.

(3) NOAA (2002). *Oil Spills in Mangroves: Planning and response considerations*. Washington, D.C.

(4) Santos, H.F., Carmo F.L., Paes, J.E.S., Rosado, A.S., Peixoto, R.S., 2010. *Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum*. *Water Air Soil Pollut.* In press.

(5) Brito, E. M., Duran, R., Guyoneaud, R., Goni-Urriza, M., Garcia de Oteyza, T., Crapez, M. A., et al. (2009). A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, 58, 418–423.

(6) 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.

(7) Atlas, R.M., 1982. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*. 45, 180-209.

(8) Gratão, P. L., Prasad, M. N. V., Cardoso, P. F., Lea, P. J., Azevedo, R.A. *Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment*. *Brazililian Journal Plant Physiology*, vol.17, n.1, p.53-64, jan-mar.2005.

(9) Kamath, R., Rentz, J.A., Schnoor J.L., Alvarez, P.J.J., 2004. *Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils: principles and applications*. In: *Studies in Surface*



Science and Catalysis. R. Vazquez-Duhalt and R. Quintero-Ramirez (Editors). Elsevier. 32p.

(10) Shi, W., Becker, J., Bischoff, M., Turco, R. F., Konopka, A. E. 2008. Association of Microbial Community Composition and Activity with Lead, Chromium, and Hydrocarbon Contamination. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68, No. 8, 3859–3866p.

(11) Nelson, D.W., Sommers, L.E., 1982. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., (Eds.). *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*; SSSA Madison WI, pp. 539–577.

(12) Bremner, J.M., Mulvaney, C.S., 1982. Nitrogen–Total. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*; SSSA Madison WI, pp. 595–624.

(13) Olsen, S.R., Dean, L.A., 1982. Phosphorus. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., (Eds.). *Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties*; SSSA Madison WI, pp. 1035–1049.

(12) 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.

- (15) Moreira I.T. A, Freitas, P. F, Nascimento, R. S. A, Oliveira, O. M. C, Triguís, J. A. Selection of species plant mangrove for assessment phytoremediation of contaminated sediments by in oil and derivatives. In: Rio Oil & Gas Expo and Conference, IBP2899\_10. 2010a
- (16) Moreira I.T. A, Martins, C. M. S., Oliveira, M. C., Oliveira, O.M.C, Triguís, J.A. Detailed and confirmatory investigation in an area with contaminated sediment, in order for the application of phytoremediation. In: XII Workshop and Congress Geochemistry Organic American Latin Association (ALAGO). 2010b
- (17) Romeiro, R. S., 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV. 279p.
- (18) NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION (NOAA). 1999. *Screening Quick Reference Tables, National Oceanic and Atmospheric Administration*. Seattle, USA, 12p.
- (19) J. Santos-Echeandia, R. Prego, A. Cobelo-Garcia, Influence of the heavy fuel spill from the Prestige tanker wreckage in the overlying seawater column levels of copper, nickel and vanadium (NE Atlantic ocean), *J. Mar. Syst.* 72 (2008) 350–357.
- (20) Nie, M., Xiana, N., Fub, X., Chenc, X., Lia, B. The interactive effects of petroleum-hydrocarbon spillage and plant rhizosphere on concentrations and distribution of heavy metals in sediments in the Yellow River Delta, China, *Journal of Hazardous Materials*. 174 (2010) 156–161
- (21) Atlas, R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, 31 (4) : 178-182, 1995.

(22) LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R.. Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial Reviews*, 53(3), p.305-315, 1990.

(23) 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.

(24) Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C., 1996. Phytoremediation of soil contaminated with organic pollutants. *Advance in Agronomy.* 56, 55-71.

(25) Tam, N.F., Wong, Y.S., 2008. Effectiveness of bacterial inoculum and mangrove plants on remediation of sediment contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin.* 57, 716–726

(26) Yuan, S.Y., Chang, J.S. and Chang, B.V., 2001. Biodegradation of phenanthrene in river sediment. *Chemosphere.* 43, 273– 278.

(27) Yergeau, E., Arbour, M., Brousseau, R., Juck, D., Lawrence, J.R., Masson, L., 2009. Microarray and Real-Time PCR Analyses of the Responses of High-Arctic Soil Bacteria to Hydrocarbon Pollution and Bioremediation Treatments. *Applied and Environmental Microbiology.* 75(19), 6258–6267.

(28) Espinosa, E., Martinez, M.E., Torres, E.F., Rojas, M.G. 2005. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere.* 59, 406.

(29) Joner, E.J., Corgie, S., Amellal, N., Leyval, C. 2002. Nutritional constraints to PAH degradation in a rhizosphere model. *Soil Biology and Biochemistry.* 34, 859-864.

(30) Baath, E., Diz-Ravina, M., Frostegard, A., Campell, C.D., 1998. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 238–245.

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

(32) E. Smits, J.L. Freeman, Environmental cleanup using plants: biotechnological advances and ecological considerations, *Front. Ecol. Environ.* 4 (2006) 203–210.

(33) Reddy, M.S., Basha, S.B., Joshi, H.V., Jha, B. Evaluation of the emission characteristics of trace metals from coal and fuel oil fired power plants and their fate during combustion, *J. Hazard. Mater.* 123 (2005) 242–249.

(34) Brito, E. M., Duran, R., Guyoneaud, R., Goni-Urriza, M., Garcia de Oteyza, T., Crapez, M. A. 2009. A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, 58, 418–423.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados do estudo em escala piloto, mostraram que os modelos de Fitorremediação aplicados com *Rizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* alcançam maior eficiência na degradação de diferentes frações de HTP's, reafirmando que esta técnica seja promissora na recuperação de áreas contaminadas pelas atividades da indústria do petróleo.

O estudo constatou que a Biorremediação Intrínseca tem baixa eficácia quando aplicada individualmente, apesar de inicialmente ter sido mais eficaz na degradação de contaminantes.

Os dados da análise microbiológica revelaram que a associação de plantas com a comunidade de microrganismos na rizosfera aumentou a degradação de compostos orgânicos no sedimento, e conseqüentemente promoveu um maior crescimento dessas plantas no sedimento contaminado.

As análises integradas da biodegradação dos compostos orgânicos derivados do petróleo na presença de metais pesados nos diferentes modelos de remediação revelaram que as plantas desenvolvem mecanismos de fioextração, que conseqüentemente promove a remoção dos metais, além da degradação dos hidrocarbonetos. Contudo, a presença dos metais pode ter inibido parcialmente a biodegradação por parte dos microrganismos na Biorremediação Intrínseca.

É importante avaliar se os modelos de remediação desenvolvidos em escala piloto neste estudo é tão eficaz *in situ*, em grande escala, como foi observado em condições de laboratório.

Sugere-se que um estudo mais detalhado a partir da combinação dos três processos em um novo produto para aplicação em remediação de sedimentos de manguezal contaminados HTP's, especialmente quando se tratar de ambientes que apresentesetem uma poluição heterogênea dos sedimentos em diferentes profundidades.

Novas pesquisas sobre a transformação do HTP's no ambiente são necessárias para avaliar se essa transformação gera co-produtos tóxicos ao ecossistema de manguezal.

Por fim, é válido ressaltar que a aplicação da Fitorremediação em áreas impactadas por atividades petrolíferas é de grande relevância, visto que se trata de

uma técnica barata, ecologicamente e socialmente correta. Além disso, este processo contribuir para a minimização do aquecimento global, através do seqüestro de carbono pelas plantas aplicadas, evidenciando a sua importância não só local, mas também a nível global.

## 7. REFERÊNCIAS

ABBAS, M. Z. M. **A biorremediação como ferramenta para a minimização de problemas ambientais**. 2003. 56 f. Monografia (Especialização em Gerenciamento Ambiental) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

ABICHEQUER, A. D.; BOHNEN, H. Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, p. 21-26, 1998.

ADAMO P.; ARIENZO M.; IMPERATO M.; NAIMO D.; NARDI G.; STANZIONE D. Distribution and partition of heavy metals in surface and sub-surface sediments of Naples city port. **Chemosphere**, v. 61, n. 6, p. 800-809, 2005.

ADRIANO, D. C. **Trace elements in the terrestrial environment**. New York: Springer-Verlang. cap.4, p.105-155. 1986.

ALONGI, D. M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Australian Institute Marine Science**, v. 29, p. 331–349, 2002.

ANSELMO, A. L. F.; JONES, C. M. Fitorremediação de Solos Contaminados – O Estado da Arte. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 25., 2005, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: editora, 2005. Disponível em: <[http://antonio-fonseca.com/Unidades%20Curriculares/1-Ano/Biologia%20Geral%20I/6%20Apontamentos/ ENEGEP2005\\_Enegep1005\\_0558%5B1%5D.pdf](http://antonio-fonseca.com/Unidades%20Curriculares/1-Ano/Biologia%20Geral%20I/6%20Apontamentos/ ENEGEP2005_Enegep1005_0558%5B1%5D.pdf)>. Acesso em: 01 dez. 2010.

ANDERSON, T. A.; GUTHRIE, E. A.; WALTON, B. T. Bioremediation in the rhizosphere. **Environ Sci Technol**, v. 27, p. 2630–2636, 1993.

ARCHER M. J. G.; CALDWELL R. A. Response of six Australian plant species to heavy metal contamination at an abandoned mine site. **Water Air Soil Poll.** v. 157, p. 257-267. 2004.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: na environmental perspective. **Microbiology**, v. 45, p. 180-209, 1981.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological Reviews**, v. 45, p.180-209. 1982.

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

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

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. 49f. Monografia (Especialização em gerenciamento e Tecnologias Ambientais no Processo Produtivo) – Universidade Federal da Bahia, Bahia, Salvador, Departamento de Engenharia Ambiental, 2006.

BAATH, E.; DIZ-RAVINA, M.; FROSTEGARD, A.; CAMPPELL, C.D. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 238–245, 1998.

BAHIA. Centro de Recursos Ambientais. **Diagnóstico do grau de contaminação da Baía de Todos os Santos por metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo a partir da análise das suas concentrações nos sedimentos de fundo e na biota associada:** relatório do diagnóstico da concentração de metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo nos sedimentos e biota na BTS, I, II, IV, Salvador. 2004.

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. 3. Salvador, 122p, 2000.

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 3, 1994.

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

BARBIER, E. B.; KOCH, E. W.; SILIMAN, B. R.; HACKER, S. D.; WOLANSKI, E.,; PRIMAVERA, J. Coastal ecosystem based management with nonlinear ecological functions and values. **Science**, v. 318, p. 321–323, 2008.

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.**, v. 55, p. 2832-2836, 1989.

BERNARDES JÚNIOR, C. Sistema de fitorremediação com espécies nativas das florestas pluvial atlântica e estacional semidecídua e do cerrado brasileiro: resultados preliminares : **Remediação e revitalização de áreas contaminadas: Aspectos técnicos, legais e financeiros.** 1.ed. p.198-204, Signus: São Paulo, 2004.



BERTRAND, J. C.; RAMBELOARISOA, E.; RONTANI, J. F.; GIUSTI, G.; MATTEI, G. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. **Biotechnology Letters**, v.5, p. 567-572, 1983.

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.

BITTAR, P. R. **Biorremediação através do uso de biopilhas**. Disponível em: <[www.bluepointambiental.com.br/biopilha.html](http://www.bluepointambiental.com.br/biopilha.html)>. Acesso em 27 mai 2009.

BOSSERT, L.; BARTHA, R. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas R.M. (Ed.), **Petroleum Microbiology**. MacMillan. New York. p. 435-473, 1984.

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.** v.48, p.29–138, 2007.

BREMNER, J. M.; MULVANEY, C. S. Nitrogen–Total. In: PAGE, A.L., MILLER, R.H., Keeney, D.R. (Eds.), **Methods of Soil Analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties**. SSSA Madison WI, p. 595–624, 1982.

BREGNARD, T. P. A.; HÖHENER, P.; HÄNER, A.; ZEYER, J. Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. **Env. Tox. Chem.**, v. 15, n. 3, p. 299-307, 1996.

BRITO, E. M.; DURAN, R.; GUYONEAUD, R.; GONI-URRIZA, M.; GARCIA DE OTEYZA, T.; CRAPEZ, M. A. A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 418–423, 2009.

BROOKS, P. C. The use of microbial parameters in soil pollution by heavy metals. **Biol. Fertil. Soils**, v.19, p. 269-279, 1998.

BUOLAYAN, B. H.; SUBRAHMANYAM, M. N. V. Accumulation of copper, nickel, lead and zinc by snail, *Lunella coronatus* and pearl oyster, *Pinctada radiata* from the Kuwait coast before and after the Gulf War oil spill, **Sci. Total Environ.** v.197, p. 161–165, 1997.

BURNS, K. A.; CODI, S.; DUKE, N. C. G. Australia Field Studies:Weathering and Degradation of Hydrocarbons in Oiled Mangrove and Salt Marsh Sediments With and Without the Application of an Experimental Bioremediation Protocol. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, p. 392–402, 2000.

CARMO, T. M. S. Caracterização do manguezal do Rio Reis Magos. **Anais... Simpósio de Ecossistemas Brasileiros**. 1998.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Estabelecimento de plantas herbáceas em solo com contaminação de metais pesados e inoculação de

fungos micorrízicos arbusculares. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 6, n.12, p.1443-1452, dez. 2001.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O. M. Behavior of herbaceous species in soil mixes with different degree of contamination with heavy metal. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n.11, p.1629-1638, nov. 2002.

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: 4<sup>o</sup> PDPE TRO, 2008, Campinas – São Paulo. **Anais eletrônicos**. Campinas, 2007. Disponível em: <[http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/4/resumos/4PDPETRO\\_6\\_2\\_0026-1.pdf](http://www.portalabpg.org.br/PDPetro/4/resumos/4PDPETRO_6_2_0026-1.pdf)> Acesso em: 06 fev. 2010.

CELINO, J. J.; CORDEIRO, O. M. C.; HADLICH, G. M.; QUEIROZ, A. F. S.; GARCIA, K. S. Assessment of contamination by trace metals and petroleum hydrocarbons in sediments from the tropical estuary of Todos os Santos Bay, Brazil. **Rev. Bras. Geoc.** v. 38, p. 753-760, 2008.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas**. Relatório técnico, 1999. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/aguas\\_final.zip](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/aguas_final.zip)> Acesso em: 26 jan. 2010.

CINTRON, G.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Proposta para estudo dos recursos de marismas e manguezais. **Relat. Intern. Inst. Oceanogr.** Univ. São Paulo. v. 10, p. 10-13, 1981.

COELHO, M. F. **Estudo do uso de fertilizante npk imobilizado na Biorremediação de derrames de petróleo no mar Simulação em laboratório**. Monografia (Bacharelado em Engenharia de Exploração e Produção de Petróleo) – Macaé/RJ, Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, 36p, 2005.

COLOMBO, J. C.; BARREDA, A.; BILOS, C.; CAPPELLETTI, N.; MIGOYA, M. C., SKORUPKA, C. Oil spill in the Rio de la Plata Estuary, Argentina: 2-hydrocarbon disappearance rates in sediments and soils. **Environmental Pollution**. v. 134, p. 267– 276, 2005.

CORDAZZO, J. **Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas**. 2000. 123f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Costeira) – Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Mecânica, 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**, v. 2, p.50-54, 1997.

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.

COOKSON, J. T. **Bioremediation Engineering – Design and application**. New York: Mc Graw – Hill Inc. 524 p, 1995.

COLOMBO, J. C.; BARREDA, A., BILOS, C.; CAPPELLETTI, N.; MIGOYA, M. C., SKORUPKA, C. Oil spill in the Rio de la Plata Estuary, Argentina: 2-hydrocarbon disappearance rates in sediments and soils. **Environmental Pollution**, v. 134, p. 267–276. 2005.

CRAPEZ, M. A. C. 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**, v. 108 , p.291-295, 2000.

CULBERTSON, J. B.; VALIELA, I.; PICKART, M.; PEACOCK, E. E.; REDDY, C. M. Long-term consequences of residual petroleum on salt marsh grass. **J. Appl. Ecol.** v. 45, p. 1284-1292, 2008.

CUNNINGHAM, S. D.; ANDERSON, T. A.; SCHWAB, A. P.; HSU, F. C. Phytoremediation of soil contaminated with organic pollutants. **Advance in Agronomy**. v. 56, p. 55-71, 1996.

CUNNINGHAM, S. D.; BERTI, W. R.; HUANG, J. W. Phytoremediation of contaminated soil. **Trends Biotechnol.** v.13, p. 393-397, 1995.

DAL FORNO, R. G. **Avaliação da poluição do solo por derivados de petróleo e sua remediação**. Pós Graduação em Ciência do Solo, (Mestrado em Ciência do Solo) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, 2006.

DAHLQUIST, R. L.; KNOLL, J. W. Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: Analysis of biological materials and soils for major, trace, and ultra-trace elements. **Appl. Spectrosc.**, v. 32, p. 1-29, 1978.

DINARDI, A. Fitorremediação. III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas. **Anais...** Rio Claro, São Paulo, 2003.

DOTT, WOLFGANG; FEIDIEKER, DORIS; STEIOF, MARTIN; BECKER, PETRA M.; KAMPFER, PETER. Comparison of Ex situ and In situ techniques for Bioremediation of Hydrocarbon-polluted Soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**. p.301-316, 1995.

DOUMETT, S.; LAMPERI, L.; CHECCHINI, L.; AZZARELLO, E.; MUGNAI, S.; MANCUSO, S.; PETRUZZELLI, G.; DEL BUBBA, M. Heavy metal distribution between contaminated soil and *Paulownia tomentosa*, in a pilot-scale assisted

phytoremediation study: Influence of different complexing agents. **Chemosphere**. v. 72, p. 1481-1490, 2008.

DOWTY, R. A.; SHAFFER, G. P.; HESTER, M. W.; CHILDERS, G. W.; CAMPO, F. M.; GREENE, M. C. Phytoremediation of small-scale oil spills in fresh marsh environments: a mesocosm simulation. **Marine Environmental Research**, v. 52, p. 195-211, 2001.

DUKE, N. C.; MEYNECKE, J. O.; DITTMANN, S.; ELLISON, A. M.; ANGER, K., BERGUER, U. A world without mangroves? **Science**. v. 317, p. 41–42, 2007.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA (EUA). **How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank sites: a guide for corrective action plan reviewers**. (EPA 510-B-94-003 and EPA 510-B-95-007) 1994. Disponível em: <<http://www.epa.gov/swerust1/pubs/tums.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2010.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA (EUA) (2006). **Design Document for Passive Bioventing. How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites: A Guide For Corrective Action Plan Reviewers** (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](http://www.epa.gov/swerust1/pubs/tum_ch3.pdf). Acesso em: 07 abr. 2010.

EPA. **Engineering Bulletin: Slurry Biodegradation**. EPA/540/2-90/016. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, 1990.

ESPINOSA, E.; MARTINEZ, M. E.; TORRES, E. F.; ROJAS, M. G. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. **Chemosphere**. v. 59, p. 406, 2005.

EYSINK, G. G. J., 1997. Recuperação de áreas de manguezais degradados através do uso de propágulos de *Rizophora mangle* acondicionado em estufa. **Arquivo do Instituto Biológico**. v. 24, p. 1-65.

FARIAS, C. O. **Avaliação da degradação de óleo em sedimentos de manguezal: Estudo de caso, Baía de Guanabara, RJ**. Tese (Doutorado em Química). PUC-Rio de Janeiro, 302f, 2006.

FEDO C. M.; ERIKSSON K.; KROGSTAD E. J. Geochemistry of shales from the Archean Abitibi greenstone belt, Canada: Implications for provenance and source-area weathering. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. v.60, p.1751-1763, 1996.

FERREIRA, L. R.; FREITAS, R. S.; BERGER. P. G. Manejo de plantas daninhas na cultura do algodoeiro. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS**. São Pedro: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2003.

FRUEHAUF, S. P. **Rizophora mangle (mangue vermelho) em áreas contaminadas de manguezal na Baixada Santista**. 2005. 223f. Tese (Doutorado em Ecologia de

Agrossistemas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2005.

FOSTER, J. C. **Total heavy metal contents by aqua regia digestion**. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Eds.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. San Diego: Academic, 1995.

FOLK, R. L.; WARD, W. C. Brazos river bar: a study of significance of grain size parameters. **J. Sediment. Petrol.** 27, 3-26, 1957.

GARCIA, K. S. **Biodisponibilidade e toxicidade de contaminantes em sedimentos na porção nordeste da Baía de Todos os Santos**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 119p. 2009.

GILLER, K. E.; WITTER, E.; MCGRATH, S. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review. **Soil Biology and Biochemistry**, 30, 1389–1414, 1998.

GLICK, B. R. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. **Biotechnological Advances** 21, 383-393, 2003.

GONZÁLEZ, I. V. R.; FAVA, F., POGGI-VARALDO, H. M. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. **Microbial Cell Factories** 7:5 doi:10.1186/1475-2859-7-5, 2008.

GRATÃO, P. L. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal Plant Physiology**, vol.17, n.1, p.53-64, jan-mar.2005.

\_\_\_\_\_. **Análise da resposta antioxidativa de células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas ao cádmio**. 128f. Dissertação (Mestrado Agronomia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura, São Paulo, 2003.

GUNTHER, T.; DORNBERGER, U.; FRITSCH, W. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. **Chemosphere**. v. 33, p. 203–215, 1996.

HUANG, X. D.; EL-ALAWI, Y.; PENROSE, D. M.; GLICK, B. R., GREENBERG, B. M. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. **Environmental Pollution**. v. 130, p. 465-476, 2004.

HUANG, X. D.; EL-ALAWI, Y.; GURSKA, J.; GLICK, B. R.; GREENBERG, B. M. **Microchemical Journal**. v. 81, p. 139-147, 2005.

HUTCHINSON, S. L.; BANKS, M. K.; SCHWAB, A. P. Phytoremediation of aged petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. **Journal of Environmental Quality**. v. 30, 395-403p, 2001.

HOFF, R. Z. Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup, **Marine Pollution Bulletin**. v. 26, p. 476-481, 1993.

Instituto do Meio Ambiente da Bahia (IMA). **Diagnóstico do grau de contaminação da baía de todos os santos por metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo a partir da análise das suas concentrações nos sedimentos de fundo e na biota associada.** Consorcio HYDROS Engenharia e Planejamento Ltda., CH2M Hill do Brasil Serviços de Engenharia Ltda. e CH2M Hill International, Ltda. 366 p. 2004.

International Tanker Owners Pollution Federation - ITOPF. 2001. **Apresenta informações, publicações, conselhos e assistência técnica com relação a respostas a poluição por vazamentos de óleo.** Acessível em <http://www.itopf.com>. Acesso em 2011.

JONER, E.J.; CORGIE, S.; AMELLAL, N.; LEYVAL, C. Nutritional constraints to PAH degradation in a rhizosphere model. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 34, p. 859-864, 2002.

JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEN, J.; SUORTI, A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting biopiles. **Environmental Pollution**. v. 107, p. 245-254, 2003.

KAMATH, R.; RENTZ, J. A.; SCHNOOR J. L.; ALVAREZ, P. J. J. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils: principles and applications. **In: Studies in Surface Science and Catalysis**. R. Vazquez-Duhalt and R. Quintero-Ramirez (Editors). Elsevier. 32p, 2004.

KE, L.; YU, K. S.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Spatial and vertical distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments. **The Science of the Total Environment**, v. 340, p. 177–187, 2005.

LACERDA, L. D. **Manguezais - florestas de beira-mar**. *Ciência Hoje*. v. 3, p. 62-70. 1984.

LACERDA, L. D; SHAEFFER-NOVELLI, Y. **Manguezais: Diagnostico ambiental oceânico e costeiro das regiões sul e sudeste do Brasil**. SAO PAULO: FUNDESPA, v. 1, p. 128-197, 1994.

LACERDA, L. D. **Manguezais do nordeste e mudanças ambientais**. *Ciência Hoje* v. 39, p. 24-28. 2006.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 305 – 315, 1990.

LEÃO, Z. M. A. N.; DOMINGUEZ, J. M. L.. Tropical coast of Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, p. 112 – 122, 2000.

LI, C. H.; ZHOU, H. W.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Vertical distribution and anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments in Hong Kong, South China. **Science of The Total Environment**, v. 21, p. 5772–5779, 2009.

LIMA, D. F. **Biorremediação em sedimentos impactados por petróleo na Baía de**

**Todos os Santos, Bahia: avaliação da degradação de hidrocarbonetos saturados.** 2000. 234f. Dissertação (Mestrado em Geologia Ambiental), Universidade Federal da Bahia, 2000.

LIMA, M. A. V. A. Fitorremediação: **Série Fichas Temáticas 5 “Material Didático Multimídia de Genética e Biotecnologia Vegetal”**, 5p. Disponível em: <<http://www.institutovirtual.pt/edu-agri-biotec>>. Acesso em: 09 jun. 2009.

LINDSTROM, J. E.; PRINCE, R. C.; CLARK, R. C.; GROSSMAN, J. C.; YEAGER, T. R.; BRADDOCK, J. F.; BROWN, E. J. Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill. **Appli. Env. Micro**, v.57, p. 2514-2522, 1991.

SILVA, L. Geoquímica e índice de geoacumulação de mercúrios em sedimentos e na biota, no estuário de Santos, Cubatão. **Química Nova**. v. 24, n.2, 10p., 1992.

MAILA, MPHEKGO P.; CLOETE, T. E. (2004). **Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages?**. Reviews in Environmental Science & Bio/Technology (2004) 3: 349–360. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/r361465u74126032/fulltext.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2010.

MARIANO, ADRIANO P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel.** 2006. 162f. Tese (Doutorado em Meio Ambiente) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas – Rio Claro, 2006.

MCGRATH, S .P. **Phytoextraction for soil remediation.** In Brooks, R. R [Ed], Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals, CAB International, Wallingford, p.261. 1998.

MCCARTHY, K.; WALKERB, L.; VIGORENC, L.; BARTELD, J. Remediation of spilled petroleum hydrocarbons by in situ landfarming at an arctic site. **Science and Technology**. v. 40, p. 31-39, 2004.

MCNICOLL, D. M.; BAWEJA, A. S. Bioremediation of petroleum-contaminated soils: an innovative, environmental friendly technology. **Environment Canada**. 15p, 1995.

MELO, M. C. Estudos de fitotoxicidade em aterros de resíduos sólidos urbanos. **Biotecnologia, ciências e desenvolvimento**. v. 28, p.48-52. 2002.

MENEZES, G. V. **Estudo sobre a viabilidade e diferentes técnicas de recuperação de manguezais degradados em Cubatão**, São Paulo. São Paulo, 25p., 1998.

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**. v.138, p. 86-91, 2005.

MOREIRA, I, T, A. Coleta de solo e de folhas de Aroeirinha (*Schinus terebinthifolius*, R.) e Mamona (*Ricinus communis*, L.) para quantificação dos teores de metais pesados, para futura aplicação da técnica de Fitorremediação na área da PLUMBUM LTDA., Santo Amaro da Purificação, BA: **Anais...** ENCOBIO-Encontro de Biólogos, VIII ENCOBIO, Resumos... Feira de Santana, Bahia. 2006.

MOREIRA, I. T. A.; FREITAS, P. F; NASCIMENTO, R. S. A.; OLIVEIRA, O. M. C.; TRIGUIS, J. A. Selection of species plant mangrove for assessment phytoremediation of contaminated sediments by in oil and derivatives. **Anais...** Rio Oil & Gas Expo and Conference, IBP2899\_10, 2010a.

MOREIRA, I. T. A.; MARTINS, C. M. S.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, O. M. C.; TRIGUIS, J. A. Detailed and confirmatory investigation in an area with contaminated sediment, in order for the application of phytoremediation. **Anais...** XII Workshop and Congress Geochemistry Organic American Latin Association, p. 13-16, 2010b.

NATH, B. N.; KUNZENDORF, H.; PLUGER, W. L. Influence of provenancer weathering, and sedimentary processes on the elemental ratios of the fine-grained fraction of the bedload sediments from the Vembanad Lake and the adjoining continental shelf, southwest coast of India. **Journal of Sedimentary Petrology**. v. 70, p. 1081-1094, 2000.

NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E. Total carbon, organic carbon and organic matter. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., (Eds.). **Methods of Soil Analysis**, Part 2. Chemical and Microbiological Properties;SSSA Madison WI, p. 539–577, 1982.

NESBITT, H. W.; YOUNG, G. M.; MCLENNAN, S. M.; KEAYS, R. R. Effects of chemical weathering and sorting on the petrogenesis of siliclastic sediments, with implications for provenance studies. **Jl. of Geology**. v. 104, p. 525-542, 1996,

NIE, M.; YANG, Q.; JIANG, L.F.; FANG, C.M.; CHEN, J.K.; LI, B. Do plants modulate biomass allocation in response to petroleum pollution? **Biol. Lett.** doi:10.1098/rsbl.2010.0261. 2010.

NICHOLS, T.D.; WOLF, D.C.; ROGERS, H.B.; BEYROUTY, C.A.; REYNOLDS, C.M. Rhizosphere microbial populations in contaminated soil. **Water, Air and Soil Pollution**. v. 95, p. 165–178, 1997.

NEWMAN L. A.; REYNOLDS C. M. Phytodegradation of organic compounds. *Curr. Opin. Biotech.* v. 15, p. 225-230. 2004.

NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION (NOAA). **Screening Quick Reference Tables, National Oceanic and Atmospheric Administration**. Seattle, USA, 12p, 1999.

ONOFRE, R. E. Sulfetos Voláteis acidificados (SVA) e metais extraídos simultâneos (MES) em sedimentos de manguezais da Baía de Todos os Santos. In: **Avaliação de ambientes na Baía de Todos os Santos: aspectos geoquímicos, geofísicos e biológicos**. Salvador: UFBA, 300 p. 2008.



OLIVEIRA, O.M.C. **Diagnóstico Geoambiental em Zonas de Manguezal da Baía de Camamu BA**. 2000. 276f. Tese (Doutorado em Geoquímica), Universidade Federal Fluminense, 2000.

OLIVEIRA, O. M. C. Processos de Biorremediação em áreas influenciadas por atividades petrolíferas. **Anais...** Rio Oil & Gás. IBP174\_08. 2008.

OLSEN, S. R.; DEAN, L. A. Phosphorus. In: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R., (Eds.). **Methods of Soil Analysis**, Part 2. Chemical and Microbiological Properties; SSSA Madison WI, p. 1035–1049, 1982.

PARRISH, Z.D.; BANKS, M.K.; SCHWAB, A.P. Assessment of contaminant liability during phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon impacted soil. **Environ. Pollut.** v. 137, p. 187–197, 2005.

PENDIAS, H.; KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 2ª ed. Boca Raton, CRC, 1992. 315p.

PENG, S.W.; ZHOU, Q.X.; CAI, Z.; ZHANG, Z.N. Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. **J. Hazard. Mater.** v. 168, p. 1490-1496, 2009.

PIRES, F. R. Fitorremediação de solos contaminados herbicidas. **Planta daninha**, v. 21, n.2, p.335-341, 2003.

PLETSCH, M.; CHARLWOOD, B. V.; ARAÚJO, B. S. Fitorremediação de água e solos poluídos. **Biotecnologia, Ciências e Desenvolvimento**, v.34, p.26-29, 2004.

PRITCHARD, P. H.; COSTA, C. F. EPA's Alaska oil spill bioremediation project. **Environmental Science and Technology**, v.25, p. 372–379, 1991.

PRINCE, R. C. Petroleum spill bioremediation in marine environments, *Critical Reviews in Microbiology*, v. 19, p. 217-242, 1993.

PRIZZIA, R. (2001). **Natural attenuation as a viable remediation method**. Environmental Management and Health, Vol. 12 No. 4,. 428-435. # MCB University Press, 0956-6163. Disponível em: <http://www.emeraldinsight.com/Insight/ViewContentServlet?Filename=/published/emeraldfulltextarticle/pdf/0830120408.pdf>. Acesso em: 15 Jan. 2010.

QUEIROZ, A. F. de S.; CELINO, J. J. (Org.). **Avaliação de ambientes na Baía de Todos os Santos: aspectos geoquímicos, geofísicos e biológicos**. Salvador: UFBA, 300 p. 2008.

REDDY, M.S.; BASHA, S.B.; JOSHI, H.V.; JHA, B. Evaluation of the emission characteristics of trace metals from coal and fuel oil fired power plants and their fate during combustion, **J. Hazard. Mater.** v. 123, p. 242–249, 2005.

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 - UENF, Macaé - RJ, 2001.

ROSA, R. Excursão de Campo à Bacia do Recôncavo com a Universidade Federal da Bahia (UFBA); **Roteiro de Campo**. PETROBRÁS – UN-BA/ATEX/GL, Salvador, 2003.

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.

ROCK, S. Phytoremediation. In: Freeman, H. (Ed.), **Standard Handbook of Hazardous Waste Treatment and Disposal**, second ed. McGraw Hill Inc, New York, USA.93-112, 1997.

ROMEIRO, R. S., 2001. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV. 279p.

ROVIRA, A.D.; DAVEY, C.B. IN: CARSON, E.W. (Ed.), **The Plant Root and Its Environment**. University Press of Virginia, Charlottesville. 153–204p, 1979.

SANCHEZ, Luís Enrique. Revitalização de áreas contaminadas: **Remediação e revitalização de áreas contaminadas: Aspectos técnicos, legais e financeiros**. 1.ed, v.1, p.80-90. Signus: São Paulo, 2004.

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-ECHEANDIA, J.; PREGO, R.; COBELO-GARCIA, A. Influence of the heavy fuel spill from the Prestige tanker wreckage in the overlying seawater column levels of copper, nickel and vanadium (NE Atlantic ocean), **J. Mar. Syst.** v. 72, 350–357, 2008.

SANTOS, H.F.; CARMO F.L.; PAES, J.E.S.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S. Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum. **Water Air Soil Pollut.** In press. 2010.

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 (Especialização em Gerenciamento e Tecnologias Ambientais na Indústria -- Departamento de engenharia Ambiental, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1999.

SANTOS, Gláucia Cecília Gabrielle dos. **Comportamento de B, Zn, Cu, Mn e Pb em solo contaminado sob cultivo de plantas e adição de fonte de matéria orgânica como amenizantes do efeito tóxico**. 153f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, São Paulo, 2005.

SCHAEFFER-NOVELLI, Y., *et al.* **Brazilian mangroves. Aquatic Ecosystem Health and Management** v. 3, p. 561-570, 2000.

SCHNEIDER, M.R.; CORSEUIL, H. X.; PEDROZO, M. F. M.; BARBOSA, E. M.; LINHARES, M. M. **Ecotoxicologia e Avaliação de Risco do Petróleo**. Salvador : Centro de Recursos Ambientais - BA, v.12, 229p, 2002.

SEABRA, P.N. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. **Microbiologia Ambiental**. v.2, p. 548-570, 2008.

SICILIANO, S. D.; FORTIN, N.; MIHOC, A.; WISSE, G.; LABELLE, S.; BEAUMIER, D.; OUELLETTE, D.; ROY, R.; WHYTE, L. G.; BANKS, M. K.; SCHWAB, P.; LEE, K.; GREER, C. W. Selection of Specific Endophytic Bacterial Genotypes by Plants in Response to Soil Contamination. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 67, p. 2469-2475, 2001.

SINGH O. V.; JAIN R. K. Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. **Appl. Microbiol. Biotech.** v. 63, p.128-135, 2003.

SMITH, G.M.; SPENCER, T.; MURRAY, A.L.; FRENCH, J.R. Assessing seasonal vegetation change in coastal wetlands with airborne remote sensing: an outline methodology. **Mangroves and Salt Marshes**. v.23, p. 15-28, 1998.

SMITS, E.; FREEMAN, J.L. Environmental cleanup using plants: biotechnological advances and ecological considerations, **Front. Ecol. Environ.** v. 4, p. 203–210, 2006

SOARES, C. R. F. S. Toxidez de zinco no crescimento e nutrição de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.339-348, 2003.

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

SONG, H. G.; WANG, X.; BARTHA, R. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p.652-656, 1990.

SPILBORGHS, M. C. F. **Biorremediação de aquífero contaminado com hidrocarboneto**. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, 1997.

SUGIURA, K.; ISHIHARA, M.; SHIMAUCHI, T.; HARAYAMA, S. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 45–51. 1997.

STUART, S.A.; CHOAT, B.; MARTIN, K.C.; HOLBROOK, N.M.; BALL, M.C. The role of freezing in setting the latitudinal limits of mangrove forests. **New Phytologist**. v.22, p. 576-583, 2007.

SURESH B.; RAVISHANKAR G. A. Phytoremediation - A novel and promising approach for environmental clean-up. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 24, p. 97-124. 2004

TAM, N.F.; WONG, Y.S. Effectiveness of bacterial inoculum and mangrove plants on remediation of sediment contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Marine Pollution Bulletin**. v. 57, p. 716–726, 2008.

TASSI, E.; BARBAFIERI, M. PHYTODEC: um projeto europeu para o uso da vegetação no gerenciamento de áreas contaminadas com metais pesados. O aumento da biodisponibilidade do metal como uma estratégia para a fitorremediação: **Remediação e revitalização de áreas contaminadas: Aspectos técnicos, legais e financeiros**. 1.ed, v.1, p.160-167. Signus: São Paulo, 2004.

THOMAS, M.L.H. Mangrove swamps in Bermuda, **Atoll Res.Bull**, v.17, p. 1-17, 1993.

TRAPP, S.; U. KARLSON. Aspects of phytoremediation of organic pollutants. **J. Soils & Sediments** , 1: 37-43. DOI <http://dx.doi.org/10.1065/jss2001.04.007>, 2001.

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, SPE 029195, v. 1, p. 345-360p, 1994.

UDOTONG, I.R. Density of Hydrocarbonoclastic Bacteria and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Accumulation in Iko River Mangrove Ecosystem, Nigeria. **Rev. Engineering and technology**. v 34, p.123- 142. 2008.

UNA, G. V.; GARCIA, M. P. N. Biodegradation of non-ionic dispersants in see water. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**.v.18, p. 315-319, 1983.

USEPA - 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**, 1991 (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](http://www.epa.gov/swerust1/pubs/tum_ch3.pdf).>Acesso em: 10 Mar. 2010.

USEPA. United States Environmental Ptrotection Agency. **Phytoremediation Resource Guide.EPA542-B-99-003**. Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, D.C. 1999.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. **A citizen's guide to phytoremediation**. Washington, 542-F-01-002, apr. 1998.

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 1994.

VANNUCCI, M.. **O manguezal e nós: uma síntese de percepções**. Edusp - SP, 235p., 1999.

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. v.8, p. 67-78, 2005.

VEIGA, I.G. **Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da baía de Todos os Santos, Bahia**. (Dissertação de mestrado em Engenharia e Exploração de Petróleo). Macaé: LENEP/UENF, 205p. 2003.

VEIGA, I.G. Hidrocarbonetos saturados em sedimentos de manguezais na área norte da Baía de Todos os Santos. In: **Avaliação de ambientes na Baía de Todos os Santos: aspectos geoquímicos, geofísicos e biológicos**. Salvador: UFBA, v. 300 p. 2008.

VIANA, F.; CORREIA, T. M. B.; MACHADO, M. I.; COSTA, C. B.; BAISCH, P. **Utilização da fitorremediação em áreas contaminadas por petróleo e seus resíduos**. 4o PDPETRO, Campinas, SP 21-24p, 2007.

XU, R.; N. L. A. LAU, K. L. NG.; J.P. OBBARD. Application of a Slow-Release Fertilizer for Oil Bioremediation in Beach Sediment. **J. Environ. Qual.** v. 33, p. 1210–1216, 2004.

YANG, S.Z.; JIN, H.J.; WEI, Z.; HE, R.X.; JI, Y.J.; LI, X.M. Bioremediation of Oil Spills in Cold Environments: A Review. **Pedosphere**. v. 19, p. 371–381, 2009.

YERGEAU, E. ; ARBOUR, M. ; BROUSSEAU, R. ; JUCK, D. ; LAWRENCE, J.R. ; MASSON, L. Microarray and Real-Time PCR Analyses of the Responses of High-Arctic Soil Bacteria to Hydrocarbon Pollution and Bioremediation Treatments. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 75, p. 6258–6267, 2009.

YUAN, S.Y.; CHANG, J.S.; CHANG, B.V. Biodegradation of phenanthrene in river sediment. **Chemosphere**. v. 43, p. 273–278, 2001;

WALTON, B.T.; GUTHRIE, E.A.; HOYLMAN, A.M. Toxicant degradation in the rhizosphere. In: Anderson, T.A., Coats, J.R. (Eds.), **Bioremediation through**

**Rhizospere Technology.** ACS Series 563, Washington DC. 11-26p, 1994.

WANG, Z.; STOUT, S.A. **Oil Spill Environmental Forensics.** Academic Press, California, 2007.

WANG, J.; ZHANG, C.B.; JIN, Z.X. The distribution and phytoavailability of heavy metal fractions in rhizosphere soils of *Paulownia fortunei* (seem) Hems near a Pb/Zn smelter in Guangdong, PR China, **Geoderma**, v. 148, p.299–306, 2009.

WEIBNER, A.; KUSCHK, P.; STOTTMEISTER, U. Oxygen release by roots of *Typha latifolia* and *Juncus effusus* in laboratory hydroponic systems. **Acta Biotechnol.** v. 1–2, p. 209–216, 2002.

WILKIE, M. L.; FORTUNA, S. **Status and trends in mangrove area extent worldwide.** FAO Working Paper FRA 63. 2003.

ZOMLEFER, W.B.; JUDD, W.S.; GIANNASI, D.E. Northernmost limit of *Rhizophora mangle* (red mangrove;Rhizophoraceae) In: St. Johns County, Florida. **Castanea.** v.23, p. 239-244, 2006.

ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons, **Bacteriol. Review**, v. 10, p. 53-67, 1946.



**ANEXOS****NORMAS DE SUBMISSÃO PARA REVISTA**  
*Environmental Pollution*



NORMAS DE SUBMISSÃO PARA REVISTA  
*Journal Hazardous Materials*

NORMAS DE SUBMISSÃO PARA REVISTA  
*Chemosphere Journal*

NORMAS DE SUBMISSÃO PARA REVISTA  
*Environmental Science and Technology*