



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

CAMILA PAIM DANTAS

UTILIZAÇÃO DE PROTÓTIPO DE BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA NA
BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL

Salvador

2016

CAMILA PAIM DANTAS

UTILIZAÇÃO DE PROTÓTIPO DE BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA NA
BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente (POSPETRO), Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia - UFBA, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Olívia Maria Cordeiro de Oliveira
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Danusia Ferreira Lima

Salvador

2016

UTILIZAÇÃO DE PROTÓTIPO DE BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA NA BIODEGRADAÇÃO DE PETRÓLEO EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL

por

Camila Paim Dantas

(Bacharela em Ciências Biológicas, Centro Universitário Jorge Amado, -2013, UNIJORGE)

Orientadora: *Profa. Dra. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira*

Coorientadora: *Profa. Dra. Danúzia Ferreira Lima*

Submetida em satisfação parcial dos requisitos do grau de

À Câmara de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal da Bahia

APROVAÇÃO



BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira (GEO/UFBA)

Profa. Dra. Danúzia Ferreira Lima (NEA/GEO/UFBA)

Profa. Dra. Regina Maria Gerá dos Santos (QI/UFBA)

Prof. Dr. Ícaro Thiago Andrade Moreira (UMFACS)

Data da Defesa Pública: 05/04/2016

SALVADOR-BAHIA

Abril/2016

AGRADECIMENTOS

Certamente palavras escritas não conseguem demonstrar com o devido merecimento toda minha gratidão por aqueles que me conduziram à conquista não somente do mestrado, mas também a sabedoria da vida. Entretanto, tudo que me resta é me expressar através da limitação de meras palavras, minha inestimável gratidão.

Agradeço a Deus por sempre escutar minhas orações, guiar meu coração, proteger os meus passos na vida e me fazer uma mulher melhor a cada dia.

Agradeço a meus pais por fazerem de tudo para me ver sorrir, acreditar na minha vitória e não medirem esforços para realizar meus desejos.

Agradeço a Prof^ª. Dra. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira pela oportunidade concedida e pelos ensinamentos. Agradeço aos meus pais da Ciência Ícaro, Danusia e Claudia por compartilhar sabedoria e estenderem a mão amiga oferecendo amparo nos momentos mais difíceis. Agradeço pelo incentivo, confiança e amizade ao longo desses dois anos. A ajuda e o apoio de vocês foram para mim de valor inestimável. Agradeço também a todos do grupo BIOTEC pelo convívio harmonioso.

Agradeço pelas pessoas que o Senhor colocou em meu caminho, meus irmãos e filhos da Ciência. A Carlito, Isana, Jenny e Wilma pela troca de experiências, sugestões, favores e risos no dia a dia. Aos alunos de iniciação científica: Isadora, Uara, Duciene, Ana Keila, Andersson, Fernanda, Isis e Leticia pela dedicação e trabalho duro. Muitos deles me inspiram, me ajudam, me desafiam a alcançar o melhor.

Agradeço aos meus amigos de pós-graduação: Lorena, Cinthia, Liliane, Karen, Jefersson, Joiciane, Gilmar, Adrielle, Saionara, Rocio e Verônica pelos almoços risonhos, por compartilhar aflições, conversas construtivas e toda a experiência que vivemos juntos.

Agradeço aos técnicos: Gisele, Jucineide, Sarah, Marcão, Rui, Regina e Jorge pela paciência, dedicação, ensinamentos e análises realizadas. Meus agradecimentos a Dra. Karina Garcia coordenadora do Laboratório de Estudos do Petróleo e ao Núcleo de Estudos Ambientais pela concessão da infraestrutura.

As minhas eternas amigas do coração Lilian e Dayse, por torcerem por mim, e escutarem meus desabafos. A Leonardo por me incentivar a inscrever neste programa de mestrado.

Agradeço aos amigos de congresso e palestras, Juliana Santos, Raphael Conti, Felipe Bellato, Renata Rocha que prestaram apoio a meu enriquecimento científico.

Agradeço aos professores do programa de Pós-graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente da Universidade Federal da Bahia pelos bons momentos de aprendizado. Aos funcionários: Alessandro, Isabel, Cicero e Naná pelo apoio administrativo e aos pedidos de ajuda, minha gratidão;

Ao projeto Newton e todos envolvidos, pela oportunidade a extensão científica. Aquele abraço especial a Júlia, Juliane, Prof. Dr. Thomas e Daiane pela troca de experiência incalculável.

Agradeço a Petrobras por disponibilizar escolta e acesso as proximidades da Refinaria Landulpho Alves de Mataripe. Aos seguranças pela guarda e apoio, meus agradecimentos.

Agradeço a FAPESB pela concessão da bolsa de mestrado e a CNPq pelo financiamento do projeto BIOTEC o qual fui acolhida.

DANTAS, C. P. **Utilização de protótipo de biorreator de imersão temporária na biodegradação de petróleo em sedimento de manguezal.** 2016. 107f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica do Petróleo e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

RESUMO

O petróleo é um líquido natural oleaginoso formado por uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Nas últimas décadas ocorreram inúmeros vazamentos de petróleo, os quais afetaram drasticamente o ecossistema manguezal. A aplicação de processos biológicos tem se mostrado favorável e vem ganhando relevância no tratamento de áreas poluídas. Neste contexto o presente trabalho objetivou avaliar a potencialidade de consórcios microbianos na degradação de petróleo em sedimento de manguezal utilizando protótipo de biorreator de imersão temporária. Bactérias de manguezal foram isoladas através da técnica de diluição seriada por microgota e selecionadas quanto a capacidade em degradar hidrocarbonetos do petróleo por meio do indicador redox 2,6-dichlorophenol indophenol. Posteriormente as cepas bacterianas foram associadas a cepas fúngicas e submetidas a testes de antagonismo. Após montagem do consórcio microbiano, as cepas foram imobilizadas com polímeros naturais e folhas de vegetação de manguezal ou fibra de coco visando estimular as atividades microbianas. Em seguida os consórcios foram adicionados em protótipos de biorreatores de imersão temporária, os quais apresentaram os seguintes tratamentos: atenuação natural; biorremediação I; biorremediação II e biorreator controle. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, totalizando 12 unidades de degradação. O experimento teve a duração de 90 dias. Amostras foram coletadas nos intervalos de 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias para análises físico-químicas, microbiológica e geoquímicas. Os resultados mostraram que através da metodologia adotada foi possível montar um consórcio microbiano com 12 cepas bacterianas e 26 cepas fungicas, os cromatogramas mostraram que petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano sofreu redução desde os hidrocarbonetos mais leves aos mais pesados em um período de 90 dias em protótipo de biorreator de imersão temporária. O processo de biorremediação demonstrou ser eficiente degradando 71,77% dos HTP no tratamento de atenuação natural, 45,14% na biorremediação I e 7,3% na biorremediação II, seguindo a ordem de eficiência de AN<BC<BF. Dessa forma fica evidente a necessidade de entendimento da interação entre os microrganismos e o meio abiótico sendo necessário aprofundar os estudos em relação a diferentes concentrações do consórcio e dos nutrientes utilizados neste experimento.

Palavras-chave: Consórcio microbiano. Biorremediação. Hidrocarbonetos totais do petróleo.

DANTAS, C. P. **Utilization of temporary immersion bioreactor prototype in oil biodegradation in mangrove sediment.** 2016. 107f. Dissertation (Masters in Geochemistry of Petroleum and Environment) - Institute of Geosciences, Federal Bahia University, Salvador, 2016.

ABSTRACT

The oil is a natural liquid oleaginous composed of a complex mixture of hydrocarbons. In recent decades there were numerous oil spills, which drastically affected the mangrove ecosystem. The application of biological processes has been shown to be favorable and is gaining importance in the treatment of polluted areas. In this context, the present study aimed to evaluate the potential of microbial consortia of oil degradation in mangrove sediments using prototype temporary immersion bioreactor. Bacteria of mangrove were isolated by serial dilution technique microdrop and selected as the ability to degrade hydrocarbons oil through indicator redox 2,6-dichlorophenol indophenol. Subsequently the bacterial strains were associated with fungal strains and subjected to antagonism tests. After assembly of the microbial consortium, the strains were immobilized with natural polymers and mangrove vegetation leaves or coconut fiber to stimulate microbial activity. Than consortia were added in prototype bioreactor, which presented the following treatments: natural attenuation; bioremediation I; bioremediation II and bioreactor control. All treatments were performed in triplicate, totaling 12 units degradation. The experiment lasted 90 days. samples were collected at 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days for physical-chemical, microbiological and geochemical. The results showed that through the methodology adopted was possible make a microbial consortium with 12 bacterial strains and 26 fungal strains, the chromatograms showed that oil from the Recôncavo Baiano basin was reduced from the lighter hydrocarbons to heavier over a period of 90 days in bioreactor prototype. the bioremediation process proved to be efficient degrading 71.77% of htp in the treatment of natural attenuation, 45.14% in bioremediation I and 7.3% in bioremediation II, following the an efficiency order AN<BC <BF. Thus it is evident the need for understanding the interaction between microorganisms and abiotic means requiring further study for different consortium concentrations and nutrients used in this experiment.

Keywords: Microbial consortium. Bioremediation. Total hydrocarbons from oil.

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das etapas metodológicas para execução da pesquisa	15
Figura 2 - Coleta de sedimento da zona de manguezal da Baía de Todos os Santos. (a) Coleta e de sedimentos com testemunhador de inox. (b) Homogeneização do sedimento coletado	16
Figura 3 - Mapa de localização da área de amostragem. a) Mapa da Baía de Todos os Santos. b) Fotografia aérea da área em destaque c) Local de coleta.	17
Figura 4 - Coleta de água do rio São Paulo. (a) Armazenamento de água em galões de 20 L. (b) Região de coleta de água no rio São Paulo	18
Figura 5 - Coleta de folhas de vegetação de manguezal nas proximidades do rio São Paulo	18
Figura 6 - Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos totais do petróleo (nC ₈ a nC ₄₀) da amostra de óleo da Bacia do Recôncavo Baiano do poço 128.....	19
Figura 7 - Isolamento de bactérias do sedimento referência. (a) Procedimento de diluição seriada. (b) Purificação por estrias múltiplas.....	21
Figura 8 - Isolamento de bactérias do óleo da Bacia do Recôncavo Baiano. (a) Distribuição do óleo com alça de Drigalski. (b) Placas com óleo após 48 h de incubação.....	22
Figura 9 - Reativação de fungos com potencialidade para degradar hidrocarbonetos do petróleo. (a) Recorte de cubos de agarose com inóculo fúngico. (b) Colônia fúngica após período de 7 dias de incubação	22
Figura 10 - Estrutura química da molécula de 2,6- diclorofenol-indofenol: forma oxidada e reduzida do DCPIP.....	23
Figura 11 - Primeira etapa do teste de oxidação. (a) Adição de suspensão bacteriana em placa multipoços. (b) Poços com indicador redox 2,6- diclorofenol-indofenol após 24 h de incubação	24
Figura 12 - Segunda etapa do teste de oxidação. (a) Agitação das colônias bacterianas por 12 h á 30 °C. (b) Diferença de coloração do DCPIP da forma oxidada para forma reduzida	24
Figura 13 - Modelo de teste de antagonismo com bactéria. (a) Distribuição de alíquota em placa de Petri. (b) Interação antagonista, halo de inibição de crescimento	25
Figura 14 - Teste de antagonismo após 7 dias de incubação. (a) Interação ecológica entre fungos. (b) Interação ecológica entre fungos e bactérias.....	26
Figura 15 - Produção de solução de consórcio microbiano misto. (a) Corte de discos de micélio. (b) Solução com consórcio microbiano	26
Figura 16 - Procedimento de coloração gram. (a) Adição de reagente em esfregação de bactéria. (b) Lavagem delâmina com água destilada	27
Figura 17 - Confeção de lâminas de microcultivo. (a) Lâminas após incubação em câmara úmida. (b) Adição de reagente azul de metileno em lâmina.....	28
Figura 18 - Preservação de microrganismos. (a) Preservação de bactérias por <i>Castellani</i> (b) Preservação de bactérias em ágar e glicerol a 10%. (c) Preservação de fungo por <i>Castellani</i> . (d) Preservação de fungo por liofilização	29
Figura 19 - Cápsulas do consórcio com folhas de manguezal.....	30
Figura 20 - Protótipo de biorreator de imersão temporária. (a) Sistema de injeção de ar por bomba a vácuo. (b) Tubos interligando frasco 1 para frasco 2. (c) Unidades de simulação	31
Figura 21 - Montagem do teste de degradação em protótipo de biorreator. (a) Adição de sedimento de manguezal no frasco 1. (b) Adição de água salina no frasco 2. (c) Adição de 1% do óleo da bacia do Recôncavo baiano. (d) Adição de cápsulas do consórcio microbiano misto	32
Figura 22 - Monitoramento do teste de degradação. (a) Mensuração dos parâmetros físico-químicos. (b) Extração sólido-líquido em <i>soxhlet</i>	33
Figura 23 - Monitoramento microbiológico. (a) Contagem de bactérias. (b) Contagem de fungos	33
Figura 24 - Esquema geral da ação dos microrganismos em um processo de biorremediação	39
Figura 25 - Localização da área de amostragem. (a) Limites da Baía de Todos os Santos; (b). Destaque para o ponto de coleta	54
Figura 26 - Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos totais do petróleo (nC ₈ a nC ₄₀) da amostra de óleo da Bacia do Recôncavo Baiano do poço 128.....	55
Figura 27 - Esquema ilustrativo do protótipo de biorreator de imersão temporária	57
Figura 28 - Valores da temperatura nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento.....	59
Figura 29 - Valores do potencial hidrogeniônico (pH) nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento.....	60
Figura 30 - Valores da potencial oxirredução (Eh) nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento.....	61

Figura 31 - Valores de oxigênio dissolvido (O.D) nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento.....	62
Figura 32 - Valores de salinidade nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento.....	63
Figura 33 - Valores de fósforo nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento	65
Figura 34 - Valores de carbono orgânico total (COT) nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento.....	65
Figura 35 - Unidade formadora de colônia de bactérias obtida em 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento	67
Figura 36 - Unidade formadora de colônia de fungos obtida em 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento	67
Figura 37 - Cromatogramas dos hidrocarbonetos totais do petróleo (nC ₈ a nC ₄₀) dos extratos das unidades de simulação no tempo 0, 30, 60 e 90 dias de experimento	70
Figura 38 - Razão Pristano/fitano nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento.....	71
Figura 39 - Razão Pristano/nC ₁₇ nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento	72
Figura 40 - Razão Fitano/nC ₁₈ nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento	72
Figura 41 - Razão HTP/UCM nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento	73
Figura 42 - Índice de biodegradação nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento.....	74
Figura 43 - Fase de biodegradação nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento.....	74
Figura 44 - Análise dos componentes principais dos parâmetros físico-químicos monitorados nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento	75
Figura 45 - Perfil de n-alcenos e isoprenoides para o petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano durante 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento.....	76
Figura 46 - Análise dos parâmetros biogeoquímicos monitorados na unidade de simulação atenuação natural nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento.....	78
Figura 47 - Análise dos parâmetros biogeoquímicos monitorados na unidade de simulação biorremediação I nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento	78
Figura 48 - Análise dos parâmetros biogeoquímicos monitorados na unidade de simulação biorremediação II nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento	79

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Procedimentos analíticos da caracterização e monitoramento do sedimento de manguezal da porção nordeste da Baía de Todos os Santos	19
Quadro 2 - Meio de cultura confeccionado para teste de antagonismo entre fungo e bactéria	26
Quadro 3 - Análises para monitoramento do teste de degradação em protótipo de biorreator de imersão temporária.....	34
Quadro 4 - Lista de gênero de microrganismos degradadores de compostos do petróleo.....	42
Quadro 5 - Diversidade de surfactantes produzidos por microrganismos.....	48
Quadro 6 - Características físicas, geoquímicas e microbiológicas do sedimento utilizado no experimento	54
Quadro 7 - Parâmetros geoquímicos da amostra de petróleo utilizado do experimento	55
Quadro 8 - Codificação dos microrganismos do consórcio.....	56
Quadro 9 - Média da temperatura e pH das unidades de simulação durante trinta dias de monitoramento	59
Quadro 10 - Características granulométrica das unidades de simulação nos tempos 0 e 90 dias de experimento	63
Quadro 11 - Média dos parâmetros monitorados na unidade de simulação C, AN, BC e BF nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento.....	93
Quadro 12 - Valores dos n-alcanos (nC_8 a nC_{40}) da amostra de petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano no tempo zero de experimento	94
Quadro 13 - Valores dos alcanos e parâmetros geoquímicos da amostra de petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano no tempo zero de experimento	95
Quadro 14 - Perfil cromatográfico dos HTP (nC_8 a nC_{40}) da amostra de óleo da Bacia do Recôncavo Baiano	95
Quadro 15 - Cepas fúngicas que compuseram o consórcio microbiano misto em meio BDA. (a) Imagem real da frente da cepa fúngica. (b) Imagem real do verso da cepa fúngica. (c) Micrografia da cepa fúngica x40	96
Quadro 16 - Cepas bacterianas que compuseram o consórcio microbiano misto em meio Agar Nutriente. (a) Imagem real da frente das estrias bacterianas. (b) Micrografia da cepa fúngica x40. (c) Característica morfológica da cepa bacteriana.....	100

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	FONTE DE LITERATURA	15
3.2	ÁREA DE AMOSTRAGEM E PROCEDIMENTO DE COLETA	16
3.3	CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ	19
3.4	ISOLAMENTOS DE BACTÉRIAS	21
3.5	SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS (TESTE DE OXIDAÇÃO)	23
3.6	SELEÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO	25
3.7	CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	27
3.8	PRESERVAÇÃO DE CEPAS	28
3.9	ENCAPSULAMENTO DO CONSÓRCIO	29
3.10	TESTE DE DEGRADAÇÃO	30
3.11	TRATAMENTO DE DADOS (ANÁLISE ESTATÍSTICA)	34
4	BIOAUMENTAÇÃO EM AMBIENTES CONTAMINADOS POR PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS - REVISÃO	35
4.2	BIOAUMENTO X BIOESTÍMULO	37
4.3	AGENTES BIOLÓGICOS REDUTORES DE PETRÓLEO	39
4.4	FATORES QUE INTERFEREM NO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO POR BIOAUMENTO	44
4.4.1	Aceptores de elétrons	44
4.4.2	Nutrientes	45
4.4.3	Umidade	45
4.4.4	Oxigênio	45
4.4.5	Biodisponibilidade de compostos orgânicos	46
4.4.6	pH	46
4.4.7	Temperatura	46
4.4.8	Tipo de solo	47
4.5	ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA BIORREMEDIAÇÃO	47
4.5.1	Surfactante	47
4.5.2	Microrganismo geneticamente modificado	48
4.5.3	Material estruturante	49
4.6	EFEITOS	49
4.7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
5	AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO PETROLÉO POR CONSÓRCIO MICROBIANO MISTO EM PRÓTOTIPO DE BIORREATOR	51
5.1	I NTRODUÇÃO	52
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	53
5.2.1	Área de coleta	53

5.2.2	Petróleo	55
4.2.3	Consórcio microbiano misto.....	56
5.2.4	BIORREMEDIAÇÃO EM PROTÓTIPO DE BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA....	56
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.3.1	Monitoramento físico-químico.....	58
5.3.2	Monitoramento microbiológico.....	66
5.3.3	Monitoramento geoquímico	67
5.3.4	Integração dos dados.....	74
5.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
6	CONCLUSÕES	80
	REFERÊNCIAS	82
	APÊNDICE 1 – MÉDIA DE TODOS OS PARÂMETROS	93
	APÊNDICE 2 – CARACTERÍSTICAS DO PETRÓLEO DA BACIA DO RECÔNCAVO	94
	APÊNDICE 3 – FUNGOS DEGRADADORES DE PETRÓLEO	96
	APÊNDICE 4 – BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO	100
	ANEXO 1 – ANÁLISE GRANULOMÉTRICA	102
	ANEXO 2 – ANÁLISE DE FÓSFORO INORGÂNICO EM SEDIMENTO.....	103
	ANEXO 3 – DESCARBONATAÇÃO PARA ANÁLISE DE COT E N.....	104
	ANEXO 4 – EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO PARA ANÁLISE DE HTP.....	105
	ANEXO 5 – CONTAGEM DE BACTÉRIAS EM SEDIMENTO	106
	ANEXO 6 – CONTAGEM DE FUNGOS EM SEDIMENTO	107

1 INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental por hidrocarbonetos de petróleo têm aumentado devido a generalizada extração, refino, processamento, transporte e utilização do petróleo ao redor do mundo (TAHHAN et al., 2011). Esta realidade resultou na intensa busca pelo desenvolvimento e aplicação de tecnologias eficientes que envolvem tempo e custo de processo reduzido, para o tratamento de ambientes contaminados por óleo cru (RIZZO et al., 2006).

Eventuais derramamentos de petróleo e seus derivados tem se tornado um problema ambiental em todo o mundo, este vem atingindo drasticamente tanto os ecossistemas marinhos, quanto a saúde das populações humanas que dependem dos seus recursos (DELLAGNEZZE et al., 2014). Os componentes do petróleo incluindo os hidrocarbonetos aromáticos, resinas e asfaltenos são poluentes recalcitrantes com efeito acumulativo que apresentam propriedades cancerígenas e mutagênicas, as quais podem gerar acentuado desequilíbrio ambiental (ROY et al., 2014).

No Brasil, vários estudos têm mostrado alterações nas condições ambientais dos manguezais da região da Baía de Todos os Santos (BTS) por conta dos acidentes com vazamento de petróleo. Dentre estes, podemos citar o trabalho realizado por Veiga (2003) e Celino e Queiroz (2006), os quais avaliaram a origem e os níveis de contaminação por hidrocarbonetos na região da BTS. Esses estudos concluíram que porção norte da BTS apresentou valores médios de concentração de hidrocarbonetos do petróleo maiores que os admitidos como limite médio pela *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA), ou seja, está região encontra-se contaminada. O manguezal é um ecossistema costeiro de interface mar-terra característico de regiões tropicais e subtropicais, sob regime das marés (QUEIROZ; CELINO, 2008). Este é um habitat tropical sensível a derramamentos de petróleo devido às dificuldades de implementação de um plano de contingência e está frequentemente exposto ao estresse da poluição (CANTAGALLO et al., 2007; NOAA, 2014). Vale salientar que, esse ecossistema apresenta condições propícias para alimentação, proteção e reprodução de muitas espécies animais de valor comercial, apresenta alta produtividade primária e diversidade funcional, expondo grande importância ecológica, econômica e social, assim sendo imprescindível a sua conservação (QUINONES, 2000; SOARES, 2006).

Atualmente existem vários métodos para remediação de ambientes contaminados por petróleo, tais como: bombeamento, oxidação química, dessorção térmica, extração de vapores, estabilização e incinerações quais têm sido habitualmente empregados no processo de

remoção de contaminantes. As constantes e elevadas taxas de contaminação fazem com que estas técnicas sejam relativamente caras e exigem posterior tratamento do local (SONAWDEKAR, 2012; TAVARES, 2013). Sendo assim, é de fundamental importância a identificação da técnica mais viável para recuperar a qualidade dos ambientes contaminados. Esta deve ser baseada nos critérios econômicos, sociais e ambientais, para mitigar os impactos negativos, acarretando crescente relevância a utilização da biorremediação (COUTINHO; BARBOSA, 2007; ALMEIDA; SILVA, 2010).

Define-se como biorremediação as tecnologias que utilizam microrganismo e/ou plantas na redução ou eliminação de resíduos orgânicos indesejáveis. Os processos de tratamento *in situ*, são aqueles aplicados no próprio local por meio de atenuação natural, bioaugmentação, bioestimulação, fitorremediação e “*landfarming*”. Já o processo *ex situ* em que o contaminante é deslocado para um lugar diferente, pode ser tratado através da compostagem ou biorreatores (JACQUES et al., 2007).

A técnica de biorremediação tem se mostrado promissora na mineralização de compostos orgânicos em regiões impactadas por atividades petrolíferas (LIMA, 2000). Dentre as estratégias da biorremediação, a aplicação isolada ou combinada do bioestímulo e do bioaumento pode conduzir a uma rápida e completa degradação de poluentes. O bioaumento consiste na inoculação de microrganismos autóctones (nativos da região) ou alóctones (de outra região) desenvolvidos em laboratório e com capacidade para degradar o contaminante alvo (SANTOS FILHO, 2014). O processo de biodegradação pode ser limitado por baixa disponibilidade de nutrientes e aceptores de elétrons, que estimulam o metabolismo e a velocidade de crescimento dos microrganismos. A adição de nutrientes em ambientes contaminados permite criar condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos e conseqüentemente potencializar a degradação do composto poluente. Este pode ser feito através da técnica de bioestimulação (MOREIRA, 2011).

O tratamento de sítios contaminados através do processo de bioestimulação e bioaugmentação ainda mantém alguns obstáculos devido ao fato de que algumas populações alóctones podem não ser capazes de degradar o mesmo poluente em diferentes regiões contaminadas e uma única espécie de microrganismo não é capaz de metabolizar todos os compostos orgânicos presentes no ambiente (PINHATIA et al., 2014). É necessário unir diferentes linhagens para potencializar o efeito desejado. Compostos recalcitrantes como por exemplo o pristano e o fitano são mais degradados quando se utiliza a união de atividade de múltiplas enzimas, neste sentido culturas mistas trazem vantagens em relação às culturas simples (MARIANO, 2006).

Os consórcios microbianos atuam como agentes potenciais para biorremediação de ambientes contaminados, desde que os microrganismos sejam previamente testados quanto a sua eficiência quando isolados e em conjunto (WANG et al., 2011; TYAGI et al., 2011). Várias pesquisas comprovam que diferentes microrganismos podem degradar os hidrocarbonetos de petróleo (ANDRADE; AUGOSTO; JARDIM, 2010). A ação conjunta desses possibilita o aumento da resistência da comunidade à substâncias tóxicas, já que alguns dos organismos podem metabolizar substâncias do meio. Enquanto uma espécie consome um componente específico, outras espécies consomem outro composto distinto até degradar completamente o produto. Então, fica evidente a necessidade de produzir um consórcio ou “pool” de microrganismos capazes de degradar todos os compostos do petróleo (LIMA; OLIVEIRA; CRUZ, 2011). No entanto os mecanismos de bioaugmentação por consórcio microbiano misto ainda carecem de compreensão e faz-se necessário avaliarem diferentes condições para conseguir resultados mais satisfatórios e permitir-lhes viabilidade para aplicação prática.

Para a utilização de ambas as técnicas citadas é de extrema importância realizar o monitoramento do ambiente contaminado, visto que a capacidade de estabelecer e manter as condições físico-químicas é um fator determinante para o sucesso da biorremediação (VENOSA; ZHU, 2006). A aplicação de tecnologias de tratamentos de ambientes contaminados vem abrindo espaço para utilização de biorreatores, visto que a utilização do mesmo permite o monitoramento contínuo do desempenho do sistema, o controle das condições ideais para o processo de biodegradação, reduz o tempo de remediação e a mão de obra (RIZZO, 2006). Os biorreatores, podem ser utilizados para diversos fins, entre eles o cultivo de fungos e bactérias. O mesmo funciona basicamente por meio de frascos de cultivo líquido, mangueiras, bomba compressora de ar, sensores de parâmetros físico-químicos essenciais ao crescimento dos organismos em questão (TEXEIRA, 2002). A utilização de biorreatores parece ser interessante, sobretudo quando se deseja avaliar a biodegradação de um composto a cada período de tempo e quando se quer investigar a influência da microbiota aclimatada nas mudanças nessas taxas ao longo do tempo (PEREIRA JR.; GOMES; SORIANO, 2009). Deste modo, a implementação das técnicas de bioaumento e bioestímulo utilizando biorreatores pode apresentar vantagens significativas no processo de biodegradação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A presente proposta tem como objetivo avaliar a potencialidade de consórcios microbianos, na degradação de petróleo em sedimento de manguezal utilizando protótipo de biorreator de imersão temporária.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar e avaliar a concentração de fósforo, nitrogênio, carbono orgânico e hidrocarbonetos totais de petróleo em sedimento de zonas de manguezal da porção nordeste da Baía de Todos os Santos.
- Isolar e selecionar microrganismos com potencialidade para degradar petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano.
- Obter consórcio microbiano misto (fungo e bactéria) capaz de mineralizar completamente os hidrocarbonetos totais de petróleo.
- Avaliar o desempenho da bioaugmentação e bioestimulação em protótipo de biorreator de imersão temporária.
- Avaliar a influência da concentração dos parâmetros físico-químicos: temperatura, potencial hidrogeniônico, potencial de oxidação/redução, oxigênio dissolvido e salinidade no processo de degradação do petróleo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO), localizado no Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia. As etapas para realização do experimento foram ilustradas na Figura 1 a seguir:

Figura 1 - Esquema das etapas metodológicas para execução da pesquisa



Fonte: Autor, 2016.

3.1 FONTE DE LITERATURA

O processo de elaboração desta pesquisa foi realizado a partir do levantamento bibliográfico baseando em artigos científicos, livros, trabalhos monográficos, dissertações e teses na temática de aplicação de microrganismos em processos de biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e derivados. Para isto foi utilizado o acervo da Biblioteca da Universidade Federal da Bahia, do portal de Periódicos da CAPES e de buscas nos bancos de dados *ScienceDirect*, *Scopus*, *Web of Science*, *Scientific Eletronic Library OnLine* (SCIELO) e Google acadêmico para construção dos métodos de tratamento de amostras em laboratório e referencial teórico sobre o tema abordado.

3.2 ÁREA DE AMOSTRAGEM E COLETA

A Baía de Todos os Santos (BTS) é uma reentrância da costa brasileira, localizada entre as coordenadas 12° 39' 4" S – 13° S de latitude e 38° 30' W – 38° 43' 30" W de longitude (LEÃO; DOMINGUEZ, 2000). Essa baía apresenta uma área aproximada de 1.233 km² de superfície e 200 km de perímetro (QUEIROZ, 1997).

A partir de 1950, a porção norte/nordeste da baía resultou em uma extensa zona industrial e hoje possui mais de 300 indústrias e uma intensa atividade portuária. Destas está incluso dois polos industriais, o Centro Industrial de Aratu e o Polo Petroquímico de Camaçari, onde está localizada a refinaria Landulpho Alves de Mataripe (RLAM) (HATJE; ANDRADE, 2009; ONOFRE et al., 2007).

Entre os municípios de São Francisco do Conde e Candeias, ao lado da Refinaria Landulpho Alves, encontra-se uma área controle sem contaminação por HTP, definida a partir de uma avaliação preliminar de estudo anterior feito por Lima (2014). A mesma é representativa do ecossistema manguezal e está localizada nas proximidades do rio São Paulo, nas coordenadas 12° 44' 26,0" S e 38° 31' 53,9" W (Figura 3, proxima pagina).

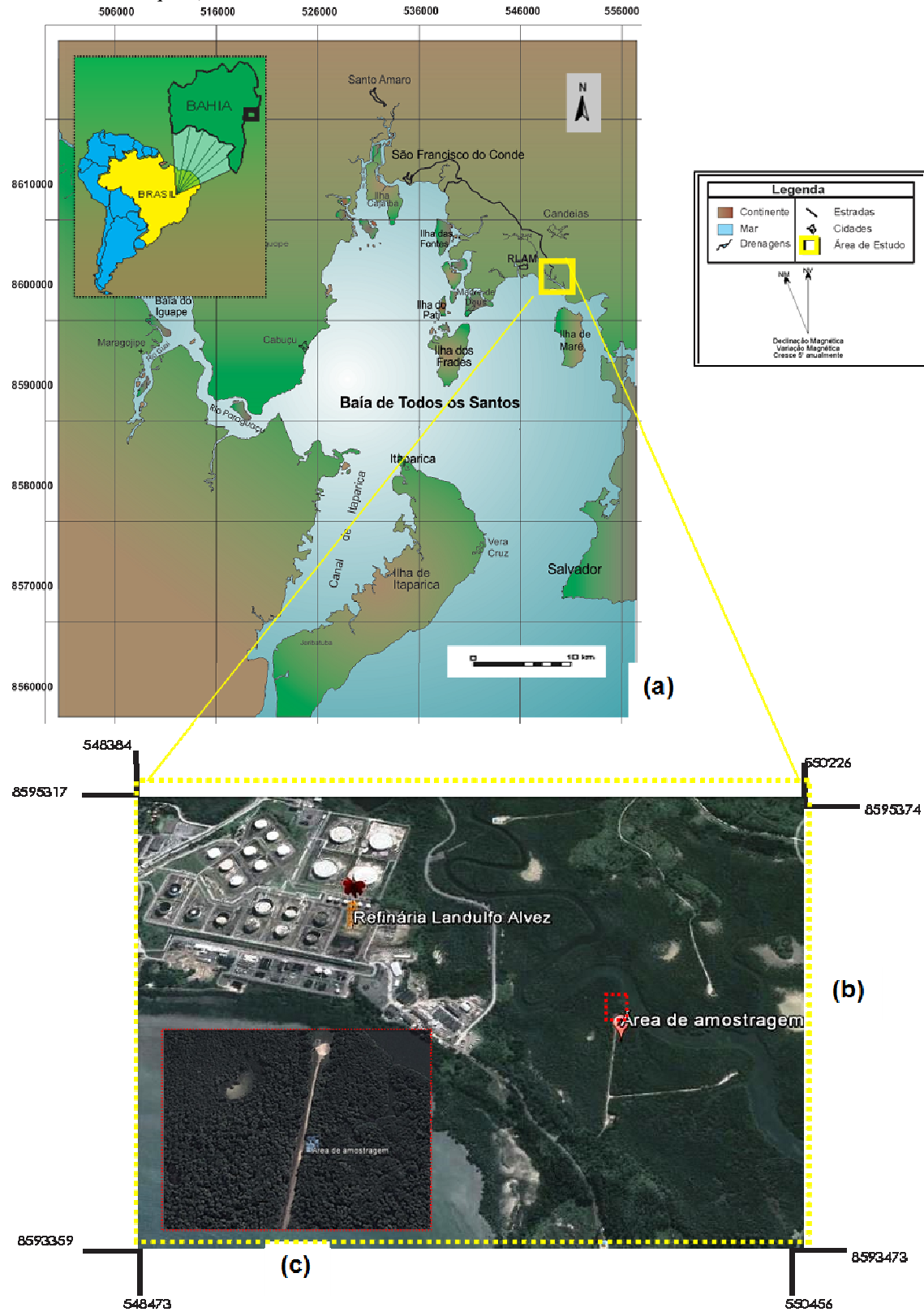
Foram coletados 10 cm da superfície do sedimento, visto que a atividade microbiológica é altamente concentrada nas primeiras camadas do solo (RIZZO et al., 2014). As amostras de sedimento foram coletadas com o auxílio de um testemunhador (Figura 2), que consta de um tubo de aço inoxidável de 10 cm de diâmetro e capacidade para coletar testemunhos de até 30 cm. Após coleta as amostras foram homogeneizadas em recipiente de inox e acondicionadas em quentinhas de alumínio mantidas sob resfriamento de 4 °C conforme método utilizado por Onofre e colaboradores (2007).

Figura 2 - Coleta de sedimento da zona de manguezal da Baía de Todos os Santos. (a) Coleta de sedimentos com testemunhador de inox. (b) Homogeneização do sedimento coletado



Fonte: Autor, 2015.

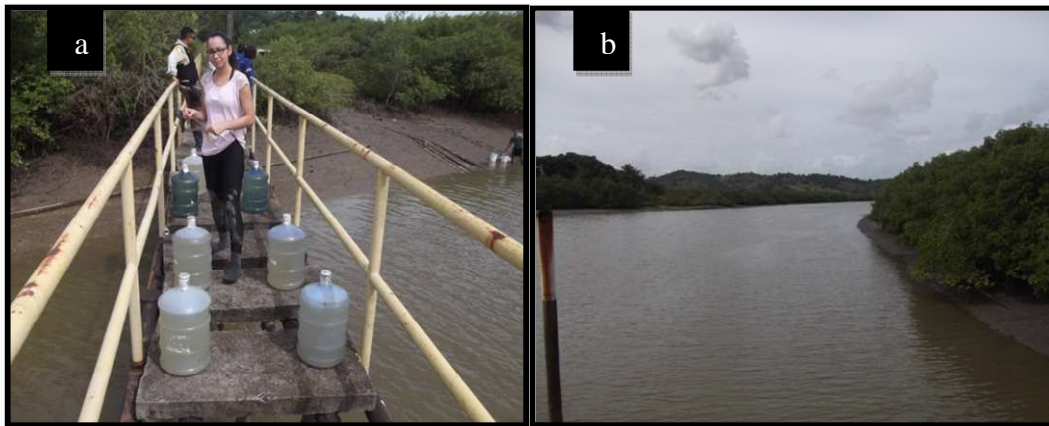
Figura 3 - Mapa de localização da área de amostragem. a) Mapa da Baía de Todos os Santos. b) Fotografia aérea da área em destaque c) Local de coleta.



Fonte: Lima, 2014.

A água do Rio São Paulo foi captada e armazenada em galões de 20 L para posterior utilização na simulação da maré (Figura 4). Com o auxílio de uma sonda multiparâmetros, HORIBA anteriormente calibrada, foram mensurados *in situ*, os parâmetros físico-químicos: temperatura, potencial hidrogeniônico (pH), potencial de oxirredução (Eh), salinidade e oxigênio dissolvido (O.D).

Figura 4 - Coleta de água do rio São Paulo. (a) Armazenamento de água em galões de 20 L. (b) Região de coleta de água no rio São Paulo



Fonte: Autor, 2015.

Folhas de vegetação de manguezal do gênero *Rhizophora*, *Avicennia* e *Laguncularia* foram coletadas aleatoriamente (Figura 5) na proporção 1:1:1. Esses gêneros foram selecionados por serem nativas e mais abundantes nesta região. Apenas folhas verdes que não apresentasse nenhuma deformidade morfológica de cor e aspecto foram coletadas para posterior confecção de cápsulas microbianas.

Figura 5 - Coleta de folhas de vegetação de manguezal nas proximidades do rio São Paulo

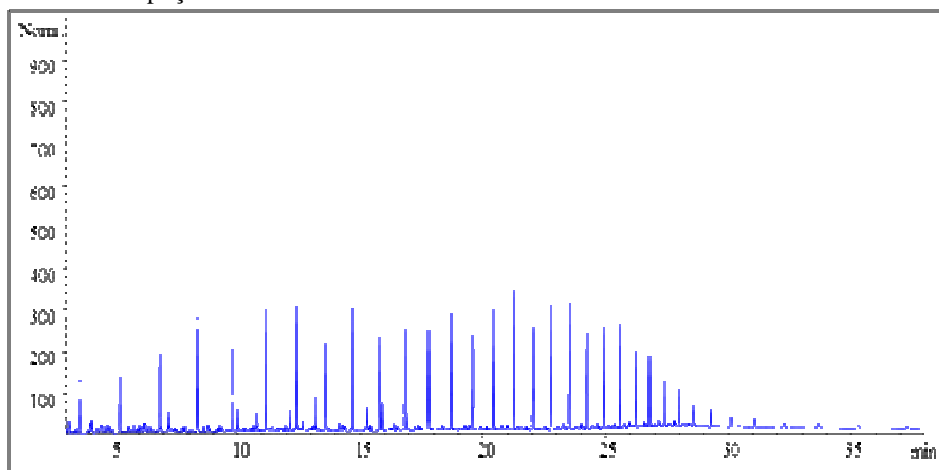


Fonte: Autor, 2015.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ

O petróleo utilizado para simulação de derrame foi o óleo da Bacia do Recôncavo Baiano, cujo perfil cromatográfico (Figura 6) foi determinado pelo método “*whole oil*”, o qual consiste na extração dos hidrocarbonetos totais do petróleo. O óleo da Bacia do Recôncavo Baiano, possui uma distribuição bimodal das *n*-parafinas, ou seja, apresenta dois picos distintos que pode ser visualizada nos tempos de retenção entre 11 a 16 minutos e 18 a 24 minutos, com maiores abundâncias nos *n*-C₁₃ ao *n*-C₁₇ e *n*-C₁₉ ao *n*-C₂₇. O óleo da Bacia do Recôncavo Baiano é classificado como óleo leve (API superior a 29,5), do tipo parafínico (presença de *n*-alcanos), com baixa proporção de compostos NSO (compostos que contem nitrogênio, enxofre e oxigênio) (GANGLIANONE; TRINDADE, 1988).

Figura 6 - Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos totais do petróleo (nC₈ a nC₄₀) da amostra de óleo da Bacia do Recôncavo Baiano do poço 128



Fonte: Autor, 2015.

No Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO) do Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia foi feita a caracterização e o monitoramento do sedimento utilizado no experimento. As técnicas e equipamentos utilizados nas análises físicas, geoquímicas e microbiológicas do experimento, assim como os cálculos utilizados para avaliar depleção do óleo foram resumidas no Quadro 1. Para o controle de qualidade das análises foram adotados 10% de branco e 10% de triplicata de bancada das amostras. As vidrarias utilizadas para as análises geoquímicas foram submetidas a solução de hidróxido de potássio (KOH) a 5%, depois mergulhadas em solução com EXTRAN neutro a 10% por 12 h. Posteriormente foram lavadas com água deionizada, secadas em estufa a 100 °C e descontaminadas com solvente Diclorometano (DCM) ultrapuro da marca MERK®. As vidrarias não volumétricas foram calcinadas a 450 °C por 4 horas antes de serem utilizadas.

Quadro 1 - Procedimentos analíticos na caracterização e monitoramento do sedimento de manguezal da porção nordeste da Baía de Todos os Santos utilizado no experimento

	PROCEDIMENTO	EQUIPAMENTO/TÉCNICA
Análise física / Tratamento	Liofilização	A umidade das amostras foi retirada através da liofilização sob alto vácuo a 45 °C em Liofilizador L101 da marca LIOTOP. Posteriormente foram peneirados em malha de 2 mm e armazenados em temperatura de 4 °C para as análises subsequentes.
	Granulometria	Foi utilizado um analisador de partículas com difração a Laser Modelo Cilas 1064 e determinado os valores através do <i>software</i> GRADISTAT V 5.0® (Anexo 1).
Análises geoquímicas	Determinação de fósforo	Foi utilizado o Espectrofotômetro <i>Agilent Cary 60 Agilent Technologies</i> com LDM de 0,50 mg/kg. As amostras foram preparadas segundo o método da EMBRAPA, 2009 (Anexo 2).
	Determinação de nitrogênio	Foi utilizado o determinador elementar, serie CHN628 da LECO Corporation com LDM de 0,10% e precisão de <1ppm. As amostras foram preparadas segundo o método da EPA NCE-C 1282/2002 (Anexo 3).
	Determinação de carbono orgânico	Foi utilizado o determinador elementar, serie CHN628 da LECO Corporation. As amostras foram preparadas segundo o método da EPA NCE-C 1282/2002 (Anexo 3).
	Extração sólido/líquido	Foi utilizado extrator <i>soxhlet</i> e rotavapor modelo R215-BUCHI segundo o método do LEPETRO/UFBA (Anexo 4).
	Determinação de perfil cromatográfico do extrato total	Foi utilizada a cromatografia gasosa, método “ <i>whole oil</i> ” adaptado no LEPETRO/UFBA.
Análises físico-químicas	Determinação de pH	Sonda portátil digital da marca HORIBA, modelo D54 com precisão de ± 0.01.
	Determinação de temperatura	Sonda portátil digital da marca HORIBA, modelo D54 com precisão de 0.1 °C.
	Determinação de oxigênio dissolvido	Sonda portátil digital com precisão de ± 0,05.
	Determinação de Eh	Sonda portátil digital da marca HORIBA, modelo D54 com precisão de ± 1mV.
	Determinação de salinidade	Foi utilizado um refratômetro manual com precisão de ± 0,5.
Análises microbiológicas	Contagem de bactérias	Através do método de diluição seriada por microgota/ <i>spread plate</i> , até diluição 10 ⁻⁸ . Resultados expressos em UFC/mL (Anexo 5).
	Contagem de fungos	Através do método de diluição seriada/ <i>pour plate</i> , até diluição 10 ⁻⁵ . Resultados expressos em UFC/mL (Anexo 6).
Cálculos de depleção	Índice de biodegradação 1	$IB_1 = \frac{nC_{10} + nC_{12} + nC_{14} + nC_{16}}{nC_{22} + nC_{24} + nC_{28} + nC_{30}}$ (WANG; FIGNAS, 1995)
	Índice de biodegradação 2	$IB_2 = \frac{\sum_{i=23}^{34} (nC_i)}{\sum_{i=11}^{22} (nC_i)}$ (KENNICUTT, 1988 citado por BARAKAT, et al., 2001)
	Fase de biodegradação 2	$FB = \frac{nC_{13} + nC_{14}}{nC_{25} + nC_{26}}$ (BARAKAT, et al., 2001)

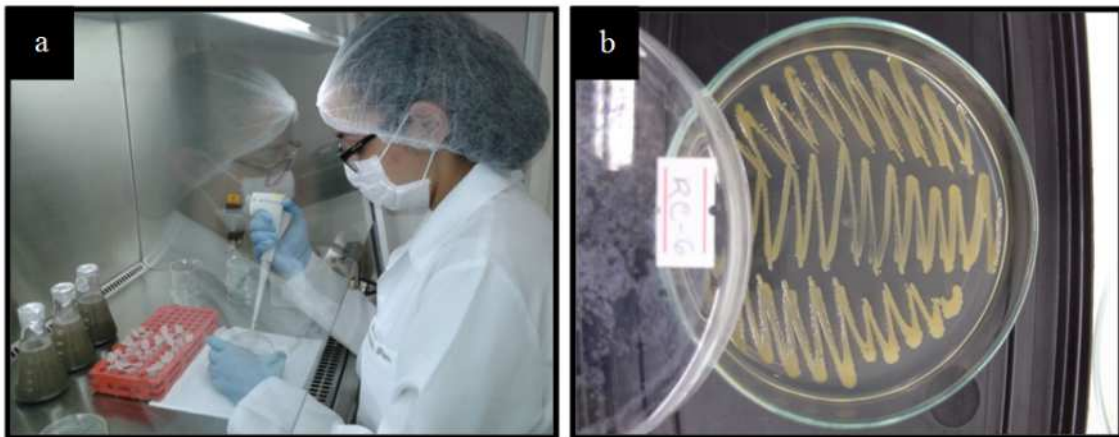
Fonte: Autor, 2015.

3.4 ISOLAMENTOS DE BACTÉRIAS

Para obtenção de bactérias foram utilizadas três matrizes em triplicata: sedimento de manguezal livre de contaminação por HTP, sedimento contaminado artificialmente por petróleo e petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano.

A extração da microbiota nativa do sedimento referência foi feita através da técnica de diluição seriada por microgota. Foram utilizados 25g da amostra de sedimento em frasco de Erlenmeyer contendo 250 mL de solução salina (2,25 g de NaCl e 0,750 mL de Tween 80), e transferidas 0,1 mL da diluição para micro tubos contendo 0,9 mL da solução e assim sucessivamente até a diluição 10^{-8} . A partir de cada diluição foram transferidas quatro alíquotas de 0,1 mL de cada diluição para placas de Petri contendo meio de cultivo ágar nutriente. As placas contendo as alíquotas das diluições foram incubadas por 48 h a 30 °C. Em 24 h foi feita a contagem de unidade formadora de colônia e ao completar 48 h as cepas foram purificadas por meio da técnica de esgotamento por estrias múltiplas, a fim de obter culturas puras (Figura 7).

Figura 7 - Isolamento de bactérias do sedimento referência. (a) Procedimento de diluição seriada. (b) Purificação por estrias múltiplas



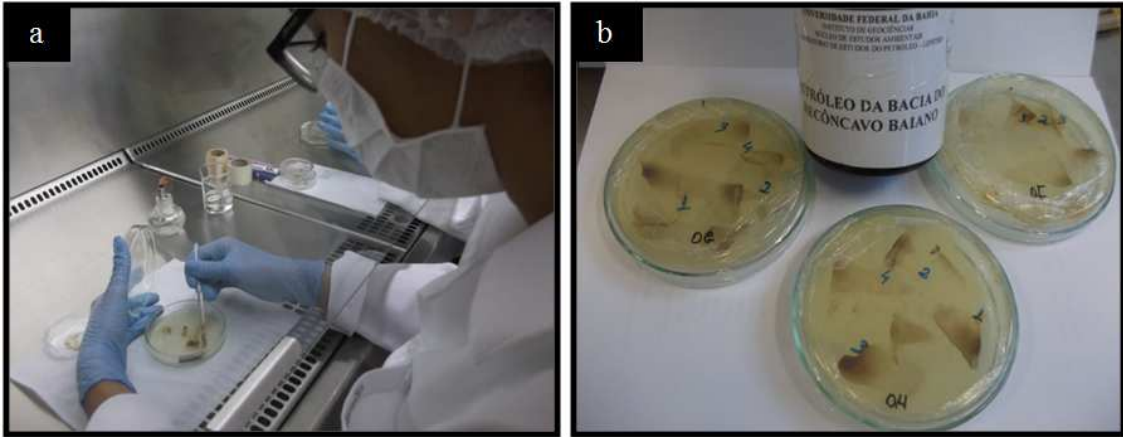
Fonte: Autor, 2015.

Em frascos de Erlenmeyer contendo 25 g do sedimento referência foi acrescentado 1% do óleo da Bacia do Recôncavo Baiano e incubado por 15 dias a 30 °C. Após período de incubação foi adicionado 250 mL de solução salina para dar sequência ao método de diluição seriada por microgota e esgotamento por estrias conforme procedimento anterior.

Com o auxílio da alça de Drigalski foi distribuído 1% do óleo da Bacia do Recôncavo Baiano na superfície das placas de Petri contendo ágar nutriente, conforme Figura 8. Em seguida, as placas foram incubadas por 48 h à 30 °C a fim de obter cepas bacterianas da

amostra do petróleo. Logo após, os inóculos foram isolados com alça de platina para proceder o método de esgotamento por estrias.

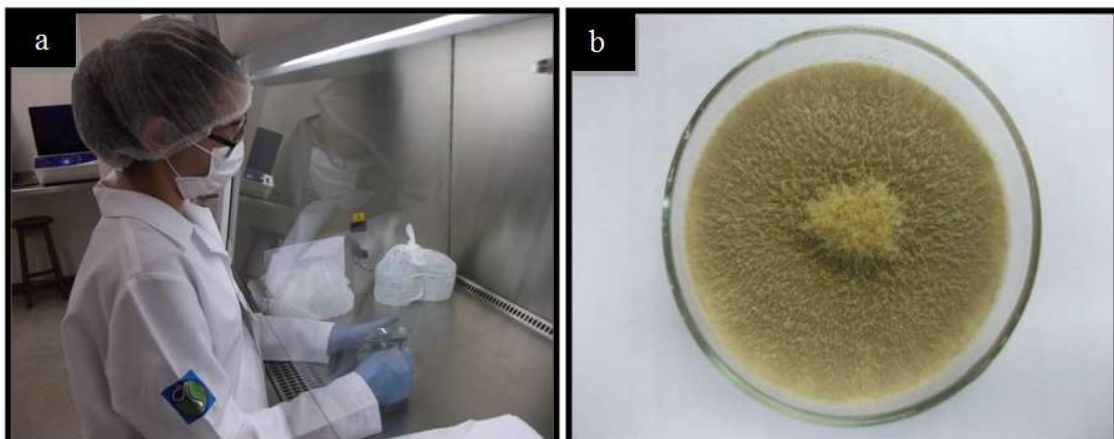
Figura 8 - Isolamento de bactérias do óleo da Bacia do Recôncavo Baiano. (a) Distribuição do óleo com alça de Drigalski. (b) Placas com óleo após 48 h de incubação



Fonte: Autor, 2015.

Para compor o experimento foram utilizados fungos da micoteca do LEPETRO, os quais foram isolados do mesmo sedimento referência. Foram reativados 26 fungos que obtiveram resultados satisfatórios na degradação de óleo da Bacia do Recôncavo Baiano no trabalho de Lima (2014). As culturas foram repicadas para reativar o metabolismo dos fungos, conforme Figura 9. Cubos de agarose contendo a cepa foram recortados com auxílio de lâmina de bisturi e foram transferidos para placa de Petri contendo agar Sabouraud glucose 4%. A seguir foram postos para crescer em câmara de germinação por 7 dias a 30 °C.

Figura 9 - Reativação de fungos com potencialidade para degradar hidrocarbonetos do petróleo. (a) Recorte de cubos de agarose com inóculo fúngico. (b) Colônia fúngica após período de 7 dias de incubação



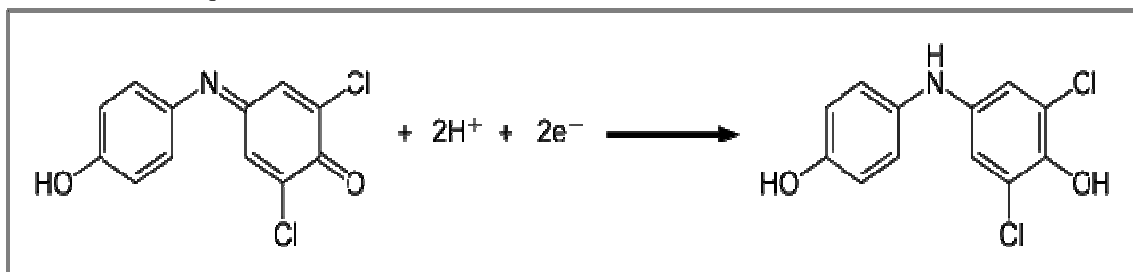
Fonte: Autor, 2015.

3.5 SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS (TESTE DE OXIDAÇÃO)

A potencialidade de degradação do óleo pelos microrganismos isolados foi feita através do teste de oxidação com o indicador redox 2,6- diclorofenol-indofenol (DCPIP) conforme metodologia descrita por Hanson e colaboradores (1993).

O teste de oxidação foi realizado em duas etapas. Na primeira, foi adicionado 250 μL de meio DifcoTM Bushnell-Haas Broth (BH), 25 μL de suspensão microbiana padronizada em 10^8 UFC/mL, 10 μL das frações do petróleo (hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO) e 5 μL do indicador DCPIP em cada poço da microplaca. Em contrapartida foram montados poços controle negativo contendo as mesmas soluções, com exceção da suspensão bacteriana. As placas foram incubadas por 48 h a 30 °C. O indicador tem a finalidade de sinalizar a ocorrência de oxidação microbiana dos hidrocarbonetos através de mudança de coloração azul para incolor (Figura 12a). Durante a reação de oxidação os elétrons são transferidos para os aceptores, neste caso o DCPIP, que muda da forma oxidada para forma reduzida (Figura 10). Dessa forma é possível verificar a capacidade dos microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato.

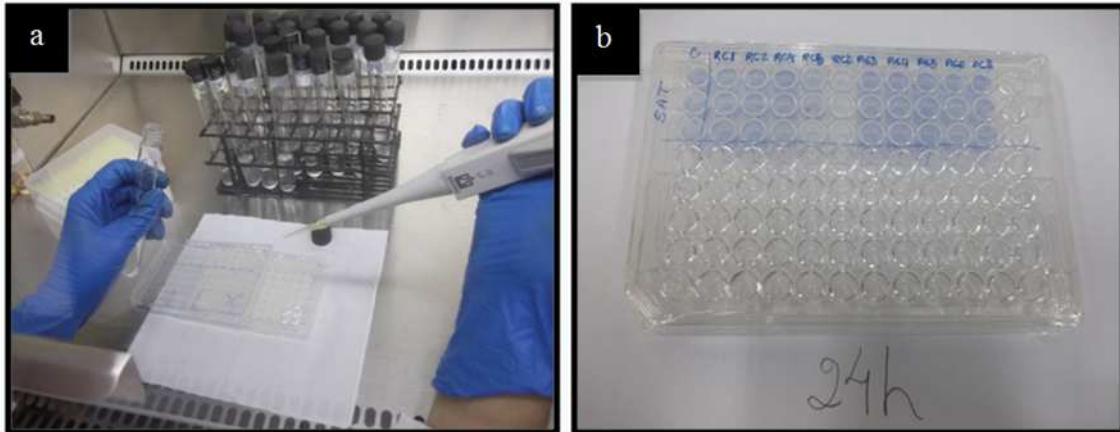
Figura 10 - Estrutura química da molécula de 2,6- diclorofenol-indofenol: forma oxidada e reduzida do DCPIP.



Fonte: Bidoia; Montagnolli; Lopes, 2010

Após 24 h e 48 h as cepas foram observadas e classificadas em 0, 25, 50, 75 e 100 % de acordo com a coloração, sendo 100 % quando incolor e 0 % quando azul (Figura 11). As cepas que obtiverem classificação acima de 50 % de oxidação foram submetidas ao teste de oxidação com agitação.

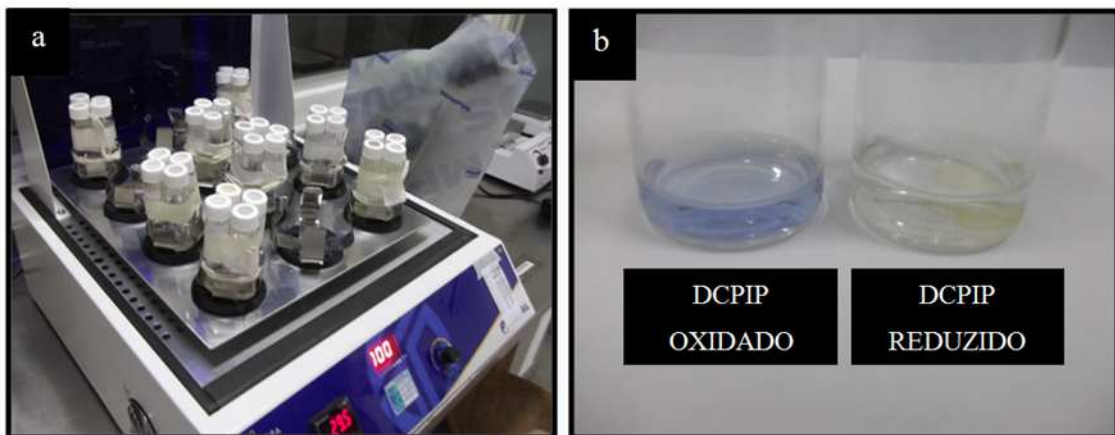
Figura 11 - Primeira etapa do teste de oxidação. (a) Adição de suspensão bacteriana em placa multipoços. (b) Poços com indicador redox 2,6- diclorofenol-indofenol após 24 h de incubação



Fonte: Autor, 2015.

A segunda etapa foi realizada em vials de 20 mL contendo 74% do meio BH, 25% do inóculo e 1% de cada fração do óleo e submetido à agitação por 12 h a 200 rpm a 30 °C, assim como na Figura 12a. Posteriormente foi adicionado o indicador redox DCPIP e incubado a 30 °C por 24 h. Os resultados de oxidação foram apurados após 12 h e 24 h da inserção do indicador, classificando conforme teste anterior.

Figura 12 - Segunda etapa do teste de oxidação. (a) Agitação das colônias bacterianas por 12 h á 30 °C. (b) Diferença de coloração do DCPIP da forma oxidada para forma reduzida



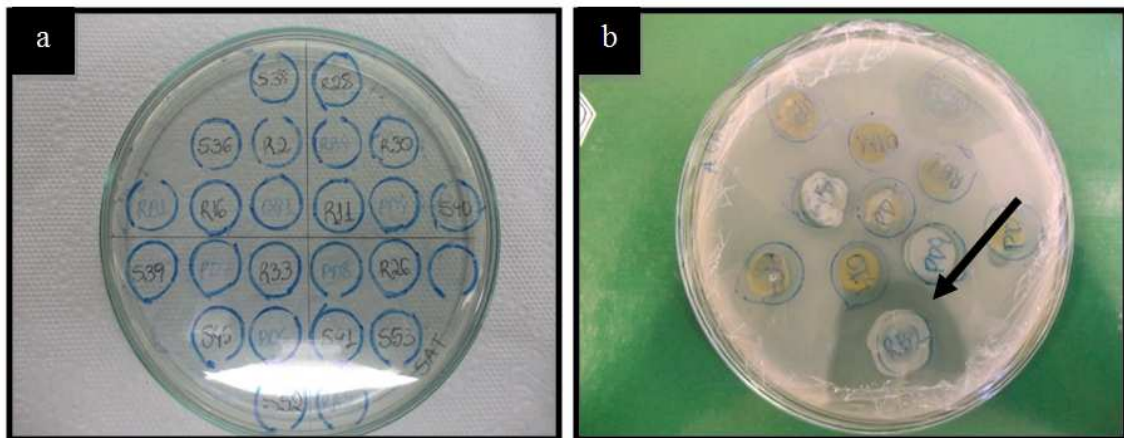
Fonte: Autor,2015.

As frações (compostos saturados, compostos aromáticos e resinas e asfaltenos) do petróleo utilizado no teste foram provenientes do acervo do LEPETRO. O óleo da Bacia do Recôncavo Baiano foi fracionado através da cromatografia líquida a vácuo (privilégio de inovação: Número do registro: PI11120000900).

3.6 SELEÇÃO DO CONSÓRCIO MICROBIANO

Inicialmente as bactérias que passaram no teste de oxidação como potenciais degradadoras de hidrocarbonetos foram submetidas ao teste de antagonismo. Uma alíquota de 10 μ L de cada suspensão bacteriana foi distribuída com distância equivalente (Figura 13a) em placas de Petri contendo ágar nutriente e incubada por 24 h e 48 h a 30 °C. Em seguida, foi observado mudanças morfológicas e as cepas que apresentaram halos de inibição de crescimento de outras cepas (Figura 13b), foram descartados na formação do consórcio. Para cada fração do óleo foi repetido o mesmo procedimento.

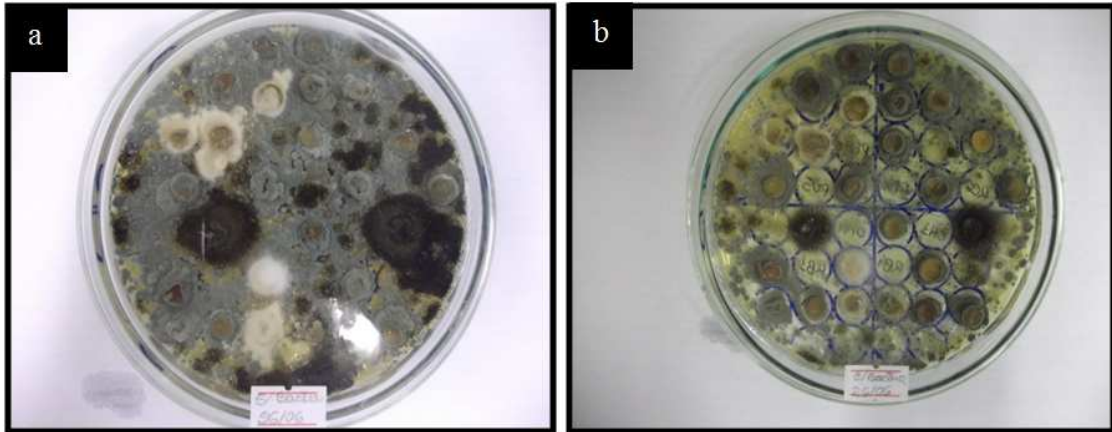
Figura 13 - Modelo de teste de antagonismo com bactéria. (a) Distribuição de alíquota em placa de Petri. (b) Interação antagônica, halo de inibição de crescimento



Fonte: Autor, 2015.

Os fungos de cada fração foram inseridos em ágar Sabouraud glucose 4%, através de discos de micélio de 2 cm e incubados por 7 dias a 30 °C. Após período de incubação, foi analisado os resultados de antagonismo e/ou sinergismo entre as cepas conforme Figura 14a. Posteriormente os microrganismos selecionados (fungos e bactérias) foram submetidos ao mesmo experimento em ágar confeccionado (descrito no Quadro 2) a partir de testes de crescimento. Os microrganismos foram incubados por 7 dias a 30 °C. Foram selecionados para compor o consórcio microbiano misto apenas os microrganismos que não apresentaram interação antagônica em nenhuma das etapas do teste.

Figura 14 - Teste de antagonismo após 7 dias de incubação. (a) Interação ecológica entre fungos. (b) Interação ecológica entre fungos e bactérias



Fonte: Autor, 2015.

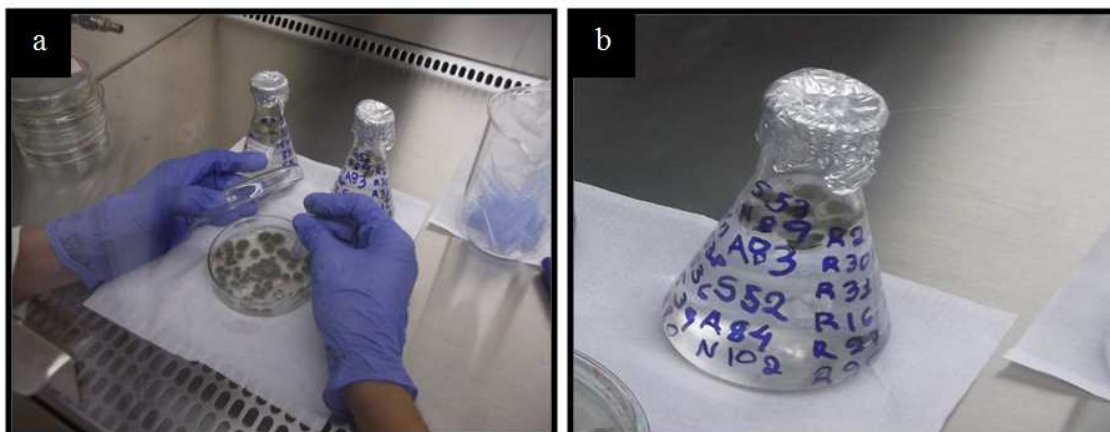
Quadro 2 - Meio de cultura confeccionado para teste de antagonismo entre fungo e bactéria

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
Peptona	10 g/l
D+ glucose	40 g/l
Digestão péptica de animal	5 g/l
Cloreto de sódio	5 g/l
Extrato de carne	1,5 g/l
Extrato de levedura	1,5 g/l
Ágar	16,5 g/l

Fonte: Modificado de ágar sabouraud glucose, 2015.

Discos de micélio de 1 cm de diâmetro de cada cepa fúngica com potencialidade para degradar petróleo e 10 μ L de suspensão de cada cepa bacteriana foram inseridos em solução salina proporção 1:100 e incubados por 7 dias a 30 °C para união do consórcio e posterior confecção de capsulas microbiana (Figura 15).

Figura 15 - Produção de solução de consórcio microbiano misto. (a) Corte de discos de micélio. (b) Solução com consórcio microbiano



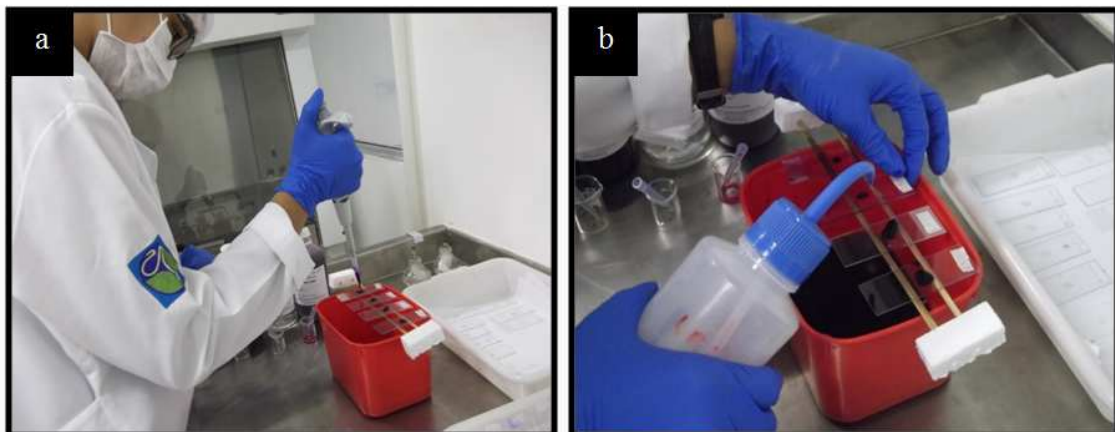
Fonte: Autor, 2015.

3.7 CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

As cepas bacterianas que constituíram o consórcio foram caracterizadas pela morfologia celular e coloração de *Gram* através da microscopia óptica.

O método de coloração de *Gram* consiste na preparação de lâminas com esfregaço bacteriano, fixado pelo calor da chama do bico de Bunsen e posterior utilização do kit Gram da Laborclin. Primeiramente as lâminas foram coradas com reagente violeta de genenciana, incubado por 1 min e lavado com água destilada. Em seguida foram submetidos ao mordente lugol fraco, incubado por 1 min e lavado com água. Depois foram descoradas com álcool absoluto por 30 segundos, lavado e corado com fuscina genicada por 30 segundos (Figura 16). A parede celular das cepas foram classificadas como gram positivo quando coradas de azul-rosa e classificadas como gram negativo quando rosa.

Figura 16 - Procedimento de coloração gram. (a) Adição de reagente em esfregaço de bactéria. (b) Lavagem delâmina com água destilada

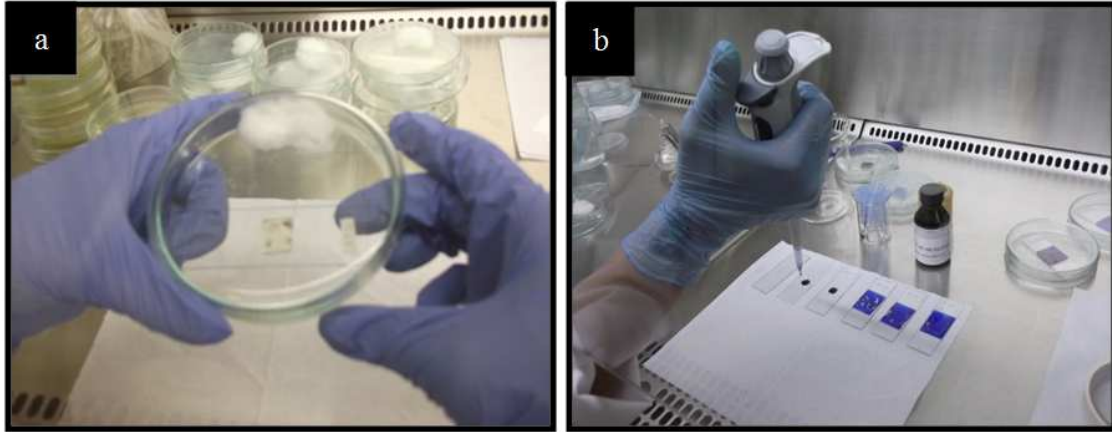


Fonte: Autor, 2015.

Para a observação microscópica dos fungos foi realizada a confecção de lâminas de microcultivo, método o qual permite uma melhor visualização do corpo de frutificação. Entre lâmina e lamínula foram aderidos quatro cubos de micélio (1 cm²) de ágar Sabouraud glucose 4%. As lâminas foram dispostas em placas de Petri juntamente com algodão umedecido com água destilada, conforme método de Ridell (1950). Após 7 dias de incubação a 30 °C foi acrescentado 5 mL de formol a 10% nas placas para interromper as atividades metabólicas do fungo. Em 24 h foi retirada a lamínula e adicionado em outra lâmina, juntamente com uma alíquota 100 µL de azul de metileno conforme Figura 17b. A posterior as lâminas foram observadas em microscópio óptico as características morfológicas macroscópicas (forma e

coloração), microscópicas (presença ou ausência de septos nas hifas e produção de esporos) e comparadas com as estruturas encontradas com as descritas em Lacaz (2002).

Figura 17 - Confeção de lâminas de microcultivo. (a) Lâminas após incubação em câmara úmida. (b) Adição de reagentes azul de metileno em lâmina



Fonte: Autor, 2015.

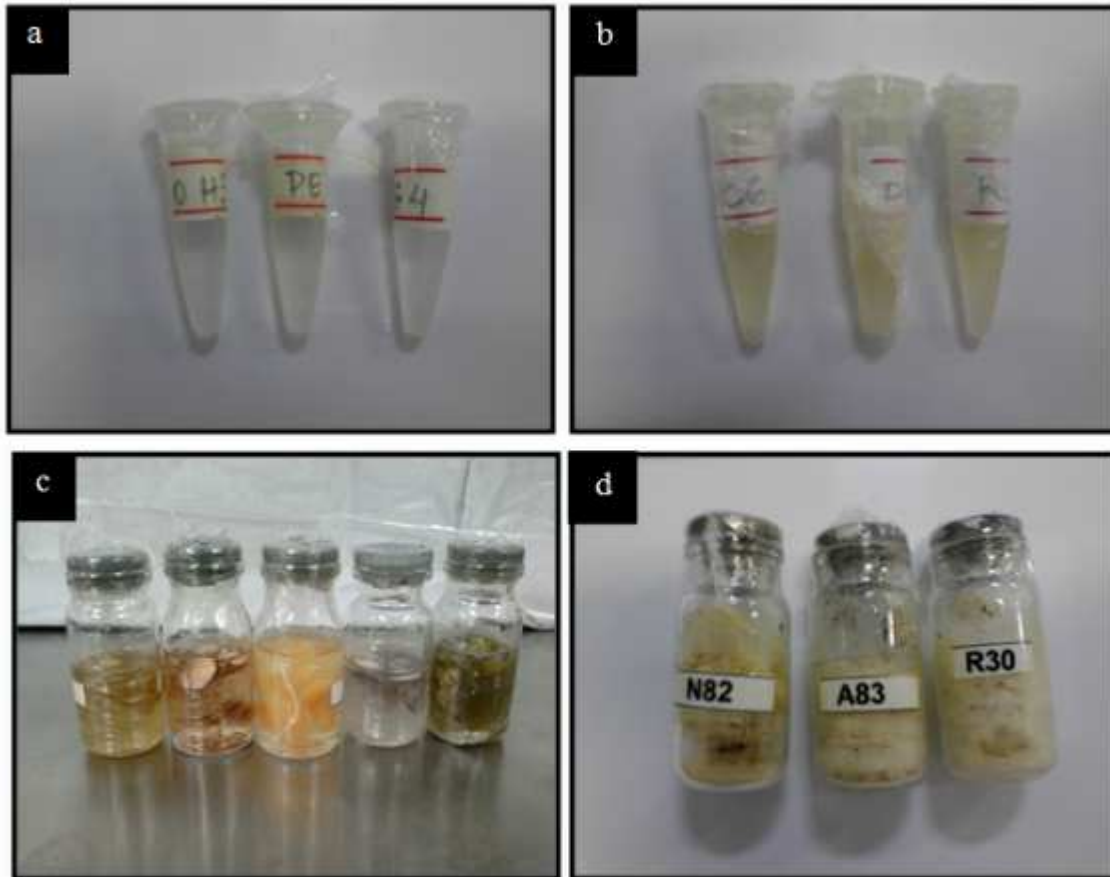
3.8 PRESERVAÇÃO DE CEPAS

As colônias de microrganismo do consórcio foram preservadas por três métodos distintos para diminuir os riscos de alterações genéticas e permitir que por longo período de tempo possam ser utilizadas em pesquisas ou para fins didáticos (Figura 18).

As bactérias foram preservadas por criopreservação (congelamento) e pelo método de *Castellani*. O meio de cultura ágar nutriente foi vertido inclinado para aumentar a superfície de contato, em micro tubos. Os tubos com ágar foram submetidos ao teste de esterilidade, onde são incubados por 24 h a 30 °C. Em seguida as cepas foram semeadas na superfície do meio de cultura, através de estrias. Após período de incubação a 30 °C por 48 h foram adicionados 1 % de glicerol a 10% e submetidas ao congelamento (Figura 18b). Na preservação por *Castellani* foi adicionado uma alíquota de 100 µL de suspensão bacteriana em 1000 µL de água esterilizada e armazenados em refrigerador a 4 °C.

Os fungos foram sujeitos a preservação por liofilização e *Castellani*. Inicialmente 4 mL de leite desnatado a 10% foi adicionado em frasco-ampola. A solução passou por autoclavagem a 121 °C por 15 min e foi adicionado 5 discos de micélio. Em seguida foram congelados e dissecados sob vácuo através da sublimação em liofilizador L101 da marca LIOTOP (Figura 18d). As ampolas foram armazenadas sob abrigo do sol em temperatura ambiente. Na preservação por *Castellani* foi adicionado 5 discos de micélio em 4 mL de água esterilizada e armazenados em refrigerador a 4 °C.

Figura 18 - Preservação de microrganismos. (a) Preservação de bactérias por *Castellani* (b) Preservação de bactérias em ágar e glicerol a 10%. (c) Preservação de fungo por *Castellani*. (d) Preservação de fungo por liofilização



Fonte: Autor, 2015.

O princípio da preservação é propiciar a viabilidade, armazenamento, pureza e estabilidade genética, ou seja, manter as características básicas da cultura original (SETTE et al., 2006). Após procedimento as colônias foram etiquetadas, fichadas e armazenadas em micoteca do LEPETRO.

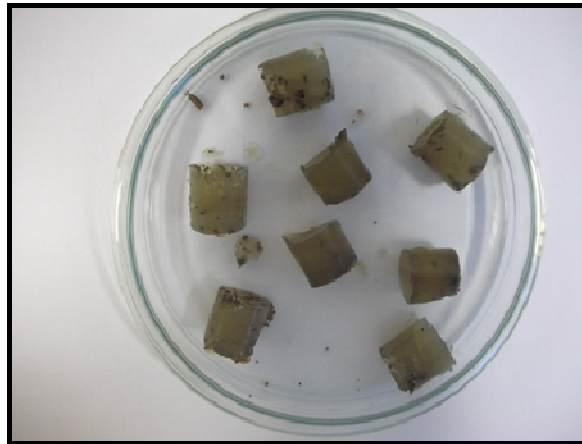
3.9 ENCAPSULAMENTO DO CONSÓRCIO

Os consórcios microbianos foram encapsulados para melhorar a aplicabilidade em ambientes contaminados, maior controle na disposição, aumentar a taxa de sobrevivência na superfície do solo e aumentar a umidade relativa requerida por um tempo prolongado para iniciar o desenvolvimento no local a ser remediado.

A utilização conjunta de nutrientes na forma de matéria orgânica tem sido proposta (SANHUEZA; MELO, 2007). Partindo desse princípio, folhas de manguezal do gênero

Rhizophora, *Avicennia* e *Laguncularia* foram liofilizadas, maceradas em gral e peneiradas para compor as cápsulas. Uma alíquota de suspensão microbiana do consórcio foi encapsulada a um polímero natural, juntamente com o farelo de folhas de manguezal segundo metodologia modificada por Lima (2014) (Figura 19). Cápsulas com fibra de coco em pó também foram produzidas com a mesma metodologia. A fibra de coco atua com material estruturante onde sua adição possibilita o aumento da permeabilidade, aumento da aeração e facilitar o contato da água e dos nutrientes com os microrganismos. Desta forma, a utilização do material estruturante intensifica a atividade microbiana (SANTOS, 2007).

Figura 19 - Cápsulas do consórcio com folhas de manguezal



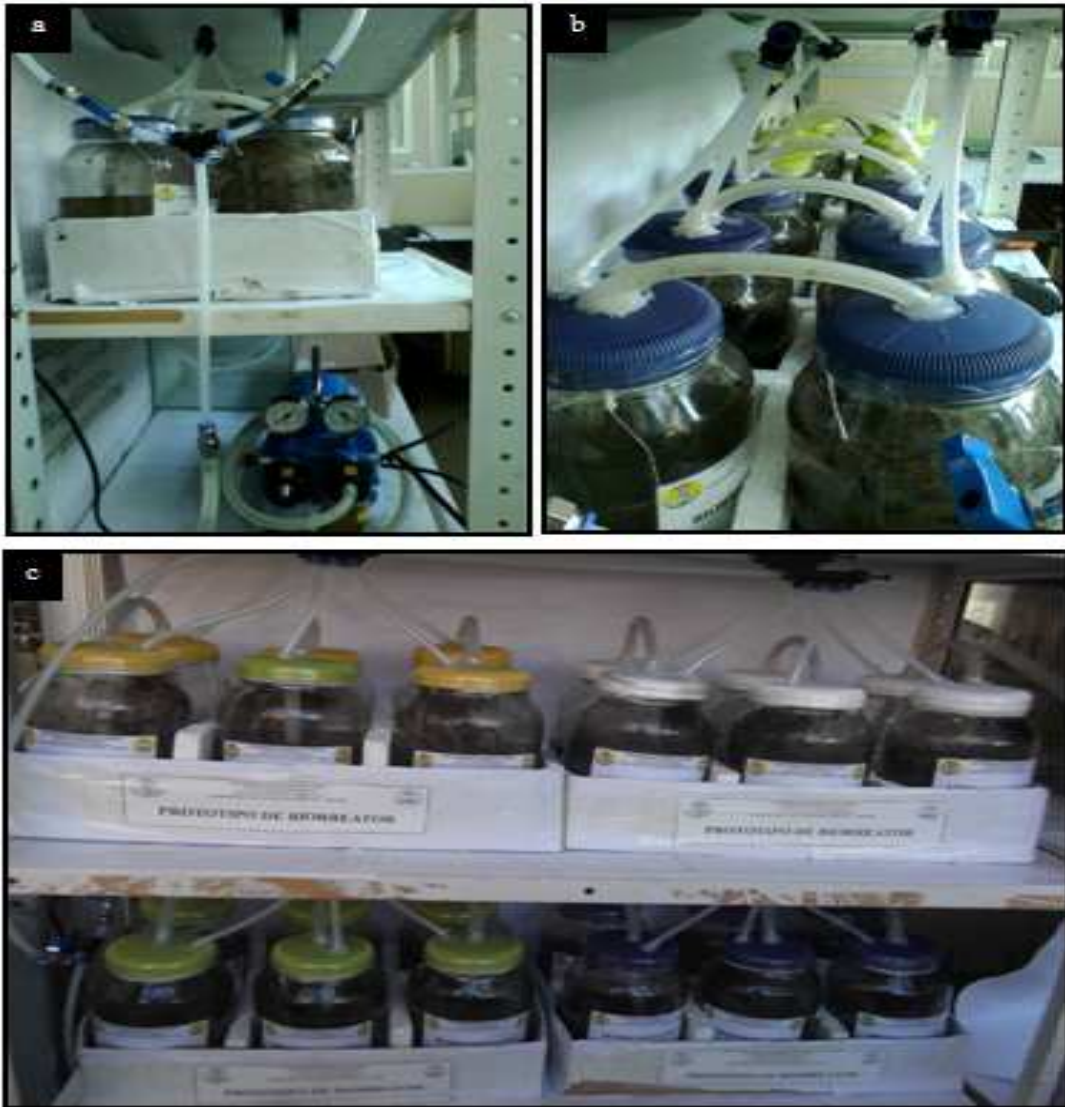
Fonte: Autor, 2015.

3.10 TESTE DE DEGRADAÇÃO

O teste de degradação foi realizado em um sistema de biorreatores de imersão temporária modificado a partir do protótipo elaborado por Lima (2014) (Figura 20). Os biorreatores foram constituídos por dois frascos de vidro hermeticamente fechados com capacidade para 2 litros, interligados entre si por tubos flexíveis através das tampas, contendo água em um dos frascos e sedimentos de manguezal no outro, ambos acoplados a uma bomba de vácuo.

O processo de imersão foi realizado através do sistema de injeção de ar forçado, injetado com auxílio de uma bomba. Quando a bomba era acionada, o ar entra no frasco 1 e, com o aumento da pressão, transfere o meio líquido para o frasco 2 através dos tubos interligados, simulando a maré alta. Durante essa fase, o ar que entra no sistema provoca a formação de bolhas suprindo a demanda de oxigênio requerida pelos microrganismos. Terminada a fase de imersão, a bomba era ativada no sistema oposto e a água migrava do compartimento 2 para 1 pelo mesmo tubo, simulando o processo de descida da maré.

Figura 20 - Protótipo de biorreator de imersão temporária. (a) Sistema de injeção de ar por bomba a vácuo. (b) Tubos interligando frasco 1 para frasco 2. (c) Unidades de simulação



Fonte: Autor, 2015.

Para a avaliação do potencial de degradação de hidrocarbonetos totais do petróleo foram montados três modelos de remediação e um controle (triplicatas de quatro ensaios: atenuação natural, biorremediação I, biorremediação II; e controle), todos em triplicata. Conforme o seguinte delineamento:

Atenuação natural monitorada (biorremediação intrínseca): três biorreatores compostos por sedimento referência e a adição de 1% de óleo da Bacia do Recôncavo Baiano; biorremediação I: três biorreatores compostos por sedimento referência com a adição de 1% de óleo da Bacia do Recôncavo Baiano e consórcio microbiano misto encapsulado com fibra de coco; biorremediação II; três biorreatores compostos por sedimento referência com a adição de 1% de óleo da Bacia do Recôncavo Baiano e consórcio microbiano misto

encapsulado com folhas de manguezal; e controle: composto por três biorreatores com sedimento referência sem adição de óleo, totalizando 12 unidades de simulação.

Os frascos de vidro foram autoclavados a 121 °C por 15 min. Logo após, em câmara de fluxo laminar foi adicionado o sedimento e 1 % do óleo da Bacia do Recôncavo Baiano e posteriormente homogeneizado. Em seguida foi adicionado 1 cápsula para cada 100 g de sedimento. No frasco 2 do biorreator foi acrescentado água do rio São Paulo em uma proporção que pudesse cobrir o sedimento do frasco oposto conforme Figura 21.

Figura 21 - Montagem do teste de degradação em protótipo de biorreator. (a) Adição de sedimento de manguezal no frasco 1. (b) Adição de água salina no frasco 2. (c) Adição de 1% do óleo da bacia do Recôncavo baiano. (d) Adição de cápsulas do consórcio microbiano misto

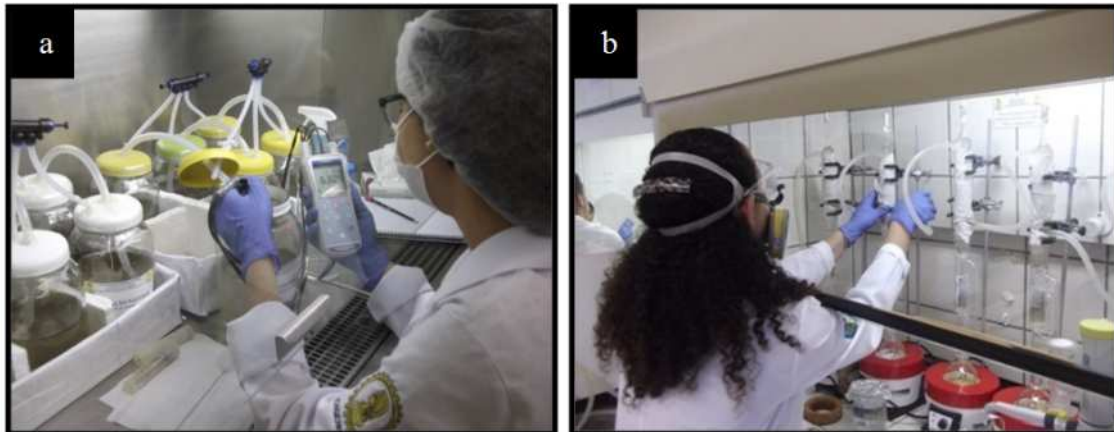


Fonte: Autor, 2015.

O monitoramento dos parâmetros físico-químico consistiu na análise de salinidade, oxigênio dissolvido (OD), potencial de oxirredução (Eh), potencial de hidrogênio (pH) e

temperatura da água sendo os dois últimos mensurados diariamente por um mês (Figura 22). O monitoramento geoquímico consistiu na extração da fração orgânica em *soxhlet* e posterior análise por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

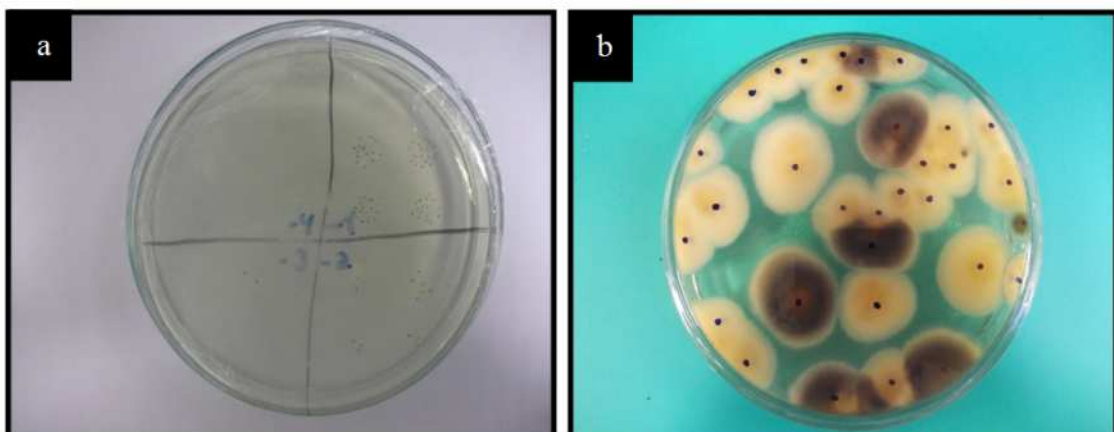
Figura 22 - Monitoramento do teste de degradação. (a) Mensuração dos parâmetros físico-químicos. (b) Extração sólido-líquido em *soxhlet*



Fonte: Autor, 2016.

O monitoramento químico consistiu na determinação dos teores de nitrogênio, fósforo e carbono orgânico total. O monitoramento microbiológico consistiu na contagem de bactérias e fungos pelo método de diluição seriada, após 24 h e 48 h respectivamente. Após período de incubação foi feita a contagem das unidades formadoras de colônia (resultados expressos em UFC/mL).

Figura 23 - Monitoramento microbiológico. (a) Contagem de bactérias. (b) Contagem de fungos



Fonte: Autor, 2015.

As amostras de sedimento foram coletadas nos intervalos de 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, conforme Quadro 3. A coleta consistiu na amostragem de 170 g de sedimento, onde essa amostra foi homogeneizada em um recipiente de inox e separada em frações para o monitoramento dos parâmetros físico-químico, geoquímico e microbiológico.

Quadro 3 - Análises para monitoramento do teste de degradação em protótipo de biorreator de imersão temporária

Tempo	ANÁLISES
0° dia	Compostos inorgânicos; Compostos orgânico; Determinação de perfil cromatográfico; microbiologia; parâmetros físico-químicos.
8° dia	Compostos inorgânicos; Compostos orgânico; Determinação de perfil cromatográfico microbiologia; parâmetros físico-químicos.
15° dia	Compostos inorgânicos; Compostos orgânico; Determinação de perfil cromatográfico microbiologia; parâmetros físico-químicos.
30° dia	Compostos inorgânicos; Compostos orgânico; Determinação de perfil cromatográfico; microbiologia; parâmetros físico-químicos.
45° dia	Compostos inorgânicos; Compostos orgânico; Determinação de perfil cromatográfico; microbiologia; parâmetros físico-químicos.
60° dia	Compostos inorgânicos; Compostos orgânico; Determinação de perfil cromatográfico; microbiologia; parâmetros físico-químicos.
75° dia	Compostos inorgânicos; Compostos orgânico; Determinação de perfil cromatográfico microbiologia; parâmetros físico-químicos.
90° dia	Compostos inorgânicos; Compostos orgânico; Determinação de perfil cromatográfico; microbiologia; parâmetros físico-químicos.

Fonte: Autor, 2015.

3.11 TRATAMENTO DE DADOS (ANÁLISE ESTATÍSTICA)

Após geração dos dados, foi feita a tabulação em Excel 2007, produção de gráficos de barras e posteriormente a comparação com os resultados da literatura.

Os resultados também foram submetidos a tratamento estatístico, utilizando o *software Statistica for Windows*, versão 7.0 da *Statsoft Inc*. Para verificar a existência de padrões de associação entre as variáveis foi utilizada a Análise dos Componentes Principais (ACP).

4 BIOAUMENTAÇÃO EM AMBIENTES CONTAMINADOS POR PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS-REVISÃO

RESUMO

A técnica de bioaumentação corresponde a adição de microrganismos em locais contaminados por resíduos orgânicos indesejáveis. O presente artigo tem como objetivo unir informações a respeito dos diferentes aspectos da utilização da técnica de bioaumentação, bem como os fatores interferentes ao processo de biodegradação. As bactérias, fungos e algas têm demonstrado grande potencial para a remediação de poluentes do petróleo, sendo os principais gêneros utilizados com sucesso: *Pseudomonas*, *Aspergillus* e *Chlorella* respectivamente. Neste contexto é necessário que o microrganismo apresente capacidade de degradar os contaminantes, alto nível de atividade enzimática, não apresentar patogenicidade, estabilidade genética, além de não poder produzir substâncias tóxicas. Mesmo apresentando essas características, fatores físico-químicos também irão interferir no processo de biodegradação, são eles: nutrientes, oxigênio, pH, temperatura, aceptores de elétrons, tipo de solo, entre outros. Apesar de ser uma tecnologia limpa de baixo custo, os produtos biotecnológicos não devem ser interpretados como a solução de todos os problemas de contaminação. Os mesmos devem ser submetidos a avaliações criteriosas na seleção adequada de microrganismos, assim como o monitoramento e manutenção dos fatores físico-químicos do ambiente para obter sucesso na mineralização do poluente.

Palavras-chave: Biorremediação. Bioaumentação. Consórcio. Biodegradação

BIOAUGMENTATION IN ENVIRONMENTS POLLUTED PER OIL AND DERIVATIVES-REVIEW

ABSTRACT

The bioaugmentation technique corresponds to the addition of microorganisms in areas contaminated by undesirable organic waste. This article aims to unite information about the different aspects of the use of bioaugmentation technique, as well as interfering factors to biodegradation process. Bacteria, fungi and algae have shown great potential for the remediation of oil pollutants, the main genres successfully used: *Pseudomonas*, *Aspergillus* and *Chlorella* respectively. In this context it is necessary that the microorganism present ability to degrade contaminants, high level of enzyme activity, not pathogenic, genetic stability, and can not produce toxic substances. Even with these characteristics, physico-chemical factors will also interfere with the biodegradation process, they are: nutrients, oxygen, pH, temperature, electron acceptors, soil type, among others. Despite being a low-cost clean technology, biotechnology products should not be interpreted as the solution of all problems of contamination. They must be subjected to careful evaluations in the proper selection of microorganisms, as well as monitoring and maintenance of physical-chemical factors of the environment for success in the mineralization of the pollutant.

Keywords: Bioremediation. Bioaugmentation. Consortium.

4.1 INTRODUÇÃO

A aplicação de processos biológicos tem se destacado por ser uma tecnologia limpa, de baixo custo e que utiliza a capacidade fisiológica que alguns organismos apresentam em degradar compostos (MACIEL; TAKAKI; GUSMÃO, 2010). A biorremediação envolve a utilização de microrganismos na mineralização de resíduos indesejáveis, podendo ser realizada no local da contaminação, por meio de atenuação natural, bioaugmentação, bioestimulação, fitorremediação e “*landfarming*”, ou fora do local, com a compostagem e biorreatores (JACQUES et al., 2007). De modo geral as diversas estratégias têm por finalidade acelerar o processo de biodegradação natural.

Diversas catástrofes envolvendo derramamentos de petróleo têm trazido ameaças consideráveis e tem causado grandes danos ao ambiente marinho costeiro, dentre estes a mortalidade da fauna e flora circundante, redução significativa na população de muitos organismos e impactos ambientais a longo prazo, além de trazer sérios riscos para a pesca local, vida selvagem, à saúde pública e ao turismo (VENOSA; ZHU, 2006). Em episódios envolvendo a contaminação por petróleo, deve-se levar em consideração as propriedades do solo, pois a mesma influencia na quantidade de contaminante que é perdida por volatilização. O decréscimo da volatilização pode ser visto em solos com alto teor de matéria orgânica onde os componentes de óleo cru são absorvidos com maior vigorosidade.

Os microrganismos agentes da biorremediação atuam na degradação dos hidrocarbonetos por meio de três diferentes processos: fermentação, respiração aeróbia e respiração anaeróbia, sendo os processos aeróbios mais indicados para remediação de solos, sedimentos e água contaminados por óleo (SILVA, 2007; FURUKAWA; SANTOS, 2014). Entretanto a intervenção humana no meio ambiente, afeta o equilíbrio ecológico principalmente de duas formas: através da eliminação ou o excesso de elementos da cadeia alimentar, acarretando na acumulação de resíduos potencialmente perigosos e proliferação de organismos patogênicos. Esse desequilíbrio pode ser devido à sobrecarga, alterações bruscas de pH, concentrações excessivas de detergentes, produtos químicos, pesticidas e fertilizantes sintéticos, causando reduções nas populações microbianas e queda da atividade biológica (UENF, 2014).

Desde 1960 a bioaugmentação tem sido desenvolvida, porém frente as dificuldades de registrar apropriadamente os resultados e principalmente a falta de compreensão dos mecanismos biológicos básicos, foi considerada pouco científica. Gradualmente essa tecnologia começou a ganhar destaque com as otimizações realizadas por empresas de

aditivos bioquímicos. Ao surgir novos conceitos em relação à manipulação de microrganismos em laboratório e sua posterior aplicação em processos de tratamento, a visão tradicional sobre a ação dos microrganismos autóctones serem mais eficientes na biodegradação dos compostos orgânicos começou a ser contestada, visto que sua eficácia está sujeita a relação de nutrientes (JONES, 2014). Além disso, deve-se considerar que dentro desta população nativa, há microrganismos desejáveis, capazes de biodegradar os compostos orgânicos poluentes, e a população não-desejável, sem capacidade de biodegradação e que ainda competem entre si por oxigênio, carbono, nitrogênio e fósforo necessários para seu crescimento (DORS, 2006).

Ao adicionar microrganismos selecionados para degradação de altas taxas orgânicas o equilíbrio existente na população nativa se rompe e então a interação entre eles permite maior eficiência na degradação dos compostos orgânicos poluentes, posto que havia coibição do potencial degradativo dos microrganismos, devido ao equilíbrio entre as populações presentes no meio. Outra possibilidade de aplicação da bioaugmentação é introduzir novos microrganismos no processo e manter um novo equilíbrio no “mix populacional” através da adição constante e suficiente, de populações desejadas, para superar as tendências de modificações resultantes dos diferentes fatores que afetam seu equilíbrio como por exemplo a redução da população devido ao choque de carga orgânica ou adição de produtos tóxicos, com a consequente redução na remoção da carga orgânica do meio, ficando a natureza e a população sujeitas a focos de contaminação e poluição (JONES, 2014).

Partindo do princípio que a aplicação de microrganismos pode reduzir os riscos associados a contaminação de ambientes por petróleo (SUJA et al., 2014), a bioaugmentação é uma técnica em potencial para tratamentos à longo prazo, quando aplicada de forma adequada. Assim sendo, o presente artigo tem como objetivo unir informações a respeito dos diferentes aspectos da utilização da técnica de bioaumentação, bem como os fatores interferentes ao processo de biodegradação.

4.2 BIOAUMENTO *x* BIOESTÍMULO

Bioaumentação ou bioaugmentação é uma estratégia da biorremediação, a qual incorpora microrganismos em locais contaminados por resíduos indesejáveis, a fim de aumentar a comunidade microbiana e consequentemente acelerar a metabolização dos compostos alvo (MROZIK; PIOTROWSKA-SEGET, 2010). No entanto, vários critérios devem ser avaliados antes de empregar essa estratégia.

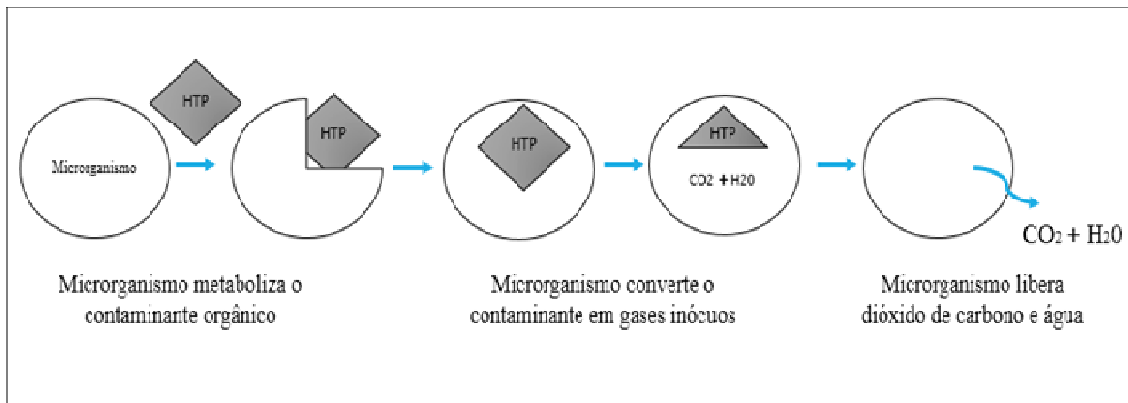
Os microrganismos podem ser de ocorrência natural, cultivados ou microrganismos geneticamente modificados. Pesquisadores afirmam que a ação dos microrganismos autóctones (nativos), são mais eficientes do que os alóctones, visto que os nativos são capazes de resistir a variações das condições ambientais e sua atividade sobre o contaminante é mais adversa (OLIVEIRA, 2011). Por outro lado, os alóctones podem gerar alterações nos padrões ecológicos por conta da bioinvasão, e conseqüentemente contribuir com a perda da biodiversidade, entretendo há controversas na sua utilização.

Recentemente em 2007 foi autorizado pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), a prática do bioaumento para a remediação de ambientes contaminadas no Brasil. A aprovação da bioaugmentação como estratégia de biorremediação depende de vários fatores, dentre os quais: o local contaminado deverá ser devidamente caracterizado; o produto biotecnológico deverá ser devidamente avaliado e liberado pelo órgão competente de controle ambiental; os microrganismos aplicados devem ser avaliados caso a caso, devendo atuar em sinergismos com as espécies indígenas do local (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

As bactérias, fungos, algas e cianobactérias são agentes responsáveis pela transformação do carbono na natureza (PULROLNIK, 2009). Esses microrganismos passam a utilizar o composto orgânico poluente como fonte de carbono e energia, e o seu crescimento ao longo do tempo, resulta numa mineralização da matéria orgânica transformando em gás carbônico e água (Figura 24), contudo também pode-se obter substâncias desagradáveis como por exemplo a amônia. De modo geral, um composto orgânico, quando é oxidado, perde elétrons para um aceptor final de elétrons, que é reduzido (ganha elétrons). O oxigênio atua comumente como aceptor final de elétrons, sendo chamada de respiração aeróbia. No entanto, quando os microrganismos usam compostos orgânicos ou íons inorgânicos diferentes do oxigênio como aceptores finais de elétrons, trata-se de respiração anaeróbia (DEON et al., 2012; PEREIRA; FREITAS, 2012).

Para que esse processo ocorra é necessário a disponibilidade de nutrientes como nitrogênio e fósforo, além de um agente oxidante para atuar como receptor de elétrons. Assim sendo, o crescimento de microrganismos autóctones e alóctones pode ser estimulada a través da adição de oxigênio, nutrientes, substâncias para correção do pH do meio e receptores de elétrons, técnica denominada bioestímulo (CETESB, 2004).

Figura 24 - Esquema geral da ação dos microrganismos em um processo de biorremediação



Fonte: Modificado de Andrade, Augusto e Jardim, (2010).

Grande parte dos estudos são baseados na aplicação de nutrientes sob a forma de fertilizantes de compostos inorgânicos e compostos inorgânicos simples, como por exemplo, NPK, composto por fosfato de monoamônio $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cloreto de potássio (KCl) e farelo de algodão, osmocote com a mesma composição, porém com liberação dos nutrientes de forma lenta (LIMA et al., 2011) além da utilização de esterco (LIU et al., 2010), NH_4Cl e NaH_2PO_4 como fontes de N e P (ABED et al., 2014), uréia e KH_2PO_4 , resina uréia-formaldeído e lictina de soja (OLIVEIRA, 2011), cloreto de potássio, super fosfato simples e uréia (CAVELHÃO, 2011), uréia $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ e extrato de levedura (OLIVEIRA; LEMOS, 2005) entre outros. Segundo Furukawa e Santos (2014), é recomendado a utilização de uréia para correção do teor de nitrogênio do solo, tendo em vista que a mesma mostrou-se mais adequada quando comparada com o nitrato de sódio, aumentando a remoção de hidrocarbonetos, sendo que a eficiência na adição de nutrientes muda de acordo com a razão do nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) apropriada para cada condição.

Várias pesquisas estudam diferentes proporções de ajustes do C:N:P:K, entre elas estão a razão 100:10:10:10 (SANTANA et al., 2010), 100:10:1:1 (CAVELHÃO, 2011) e a razão 100:7:5:1 (DEYEMO, 2013), evidenciando a necessidade de se fazer estudos preliminares para adquirir a relações C: N:P mais adequada, já que cada ambiente apresenta características e deficiências distintas.

4.3 AGENTES BIOLÓGICOS REDUTORES DE PETRÓLEO

O emprego de microrganismos na degradação de contaminantes tóxicos, é uma técnica que tem se mostrado promissora na recuperação de áreas contaminadas. Toda via, é

necessário que os microrganismos apresentem características desejáveis como: capacidade de degradar a maior parte dos contaminantes, estabilidade genética, alto nível de atividade enzimática, capacidade de competir com a população intrínseca do solo, não podem ser patogênicos e não devem produzir substâncias tóxicas durante o processo de biodegradação (LEAHY; COLWELL, 1990).

Diversos microrganismos têm sido utilizados na remoção de metais pesados de efluentes industriais e do ambiente. Grande parte dos compostos ligantes de metais, tais como os ácidos orgânicos simples, álcoois e macromoléculas, polissacarídeos, ácidos húmicos e fúlvico, são produzidos por estes microrganismos e ainda podem adsorver estes metais a componentes presentes na superfície da parede celular (biossorção), bioacumulá-los em organelas ou ligá-los a proteínas de seu interior celular (PEREIRA; FREITAS, 2012).

A maior parte dos trabalhos desenvolvidos em processos de biorremediação são com bactérias. Diversos gêneros bacterianos hidrocarbonoclasticos habitam sedimentos de manguezais, entre eles estão *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Dietziae*, *Gordonia* (BRITO et al., 2006). Os gêneros mais utilizados como biorremediadores são *Pseudomonas* e *Bacillus*. Ambos os gêneros são capazes de metabolizar compostos em situações anaeróbias, no entanto crescem mais lentamente quando comparados aos organismos aeróbios (TORTORA et al., 2005). Algumas espécies de *Pseudomonas* são capazes de degradar compostos do petróleo, incluindo hidrocarbonetos aromáticos e hidrocarbonetos cíclicos. A cepa bacteriana da espécie *Pseudomona sputida*, foi a primeira a ser geneticamente construída e patenteada para esta finalidade. Outra espécie conhecida por metabolizar derivados de petróleo é a *Pseudomonas aeruginosa*, a qual utiliza alcanos como fonte de carbono para seu crescimento por meio de oxidação. A *P. putida* apresenta a capacidade de metabolizar quatro hidrocarbonetos de petróleo bruto: cânfora, octano, xileno e naftaleno (WEBER; SANTOS, 2013; STRIEBICH et al., 2014).

Os fungos basidiomicetos apresentam capacidade adaptativa que lhes permitem crescer em condições ambientais prejudiciais e capacidade de degradação da lignina, além de apresentarem habilidade em degradar uma ampla gama de poluentes ambientais devido seu potencial de oxidação-redução. Por este motivo são grandes atrativos para as aplicações biotecnológicas e industriais (LEE et al., 2014; BEHNOOD; NASERNEJAD; NIKAZAR, 2014).

Os fungos de podridão branca têm se mostrado uma alternativa promissora nas pesquisas da atualidade, como por exemplo o fungo *Lasiodiplodia theobromaeo* qual

apresentou 53,3% de taxa de remoção total de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em solo (WANG et al., 2014), o fungo *Pleurotus ostreatus* eficaz na descontaminação de solo arenoso por compostos orgânicos (ROCHA et al., 2014). Outro exemplo bem sucedido em escala de campo foi com o inóculo fúngico *Phanerochaete velutina* que degradou 94% dos HPAs em solo (WINQUIST et al., 2014). Outros fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Penicillium* e *Aspergillus* também são eficientes na degradação de contaminantes orgânicos e são bastante citados na literatura desde 1992 (LIMA, 2011).

A capacidade em degradar hidrocarbonetos não é restrita a apenas aos fungos e as bactérias. Alguns gêneros de algas e cianobactérias também possuem essa habilidade. A capacidade das algas para degradar poluentes orgânicos é a razão para o seu crescimento na presença de poluentes. O mecanismo de remoção dos metais pesados pelas algas está associado a presença de carga elétrica superficial negativa, levando a uma afinidade para os metais pesados que se apresentam como cátions.

No trabalho realizado por El-Skeekh, Hamouda e Nizam (2013) evidenciou a capacidade das microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Chorella vulgaris* decrescer sob condições heterotróficas utilizando petróleo como única fonte de carbono e assim degradar n-alcenos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Os autores concluíram que a utilização de microalgas para degradar poluentes de petróleo bruto é considerada a melhor técnica e um método economicamente viável, que poderia ser utilizada em grande escala. Outra alga que apresenta capacidade na degradação de n-alcenos e i-alcenos bem como hidrocarbonetos aromáticos, foi a alga *Prototheca zopfii* (EL-SKEEKH; HAMOUDA; NIZAM, 2013). Podemos citar também os gêneros *Oscillatoria*, *Microcoleus*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Ulva* como degradadores de compostos petrolíferos (ATLAS, 1981 citado por MARIANO, 2006).

Os principais gêneros de agentes biorredutores que obtiveram sucesso na degradação de compostos do petróleo estão descritos no Quadro 4. No entanto o efeito esperado dos microrganismos depende da seleção específica para cada tipo de contaminante assim como sejam dadas as condições adequadas para seu desenvolvimento.

A adição de microrganismos pode ser efetuada com culturas puras ou consórcios microbianos, de diferentes reinos, gêneros e espécies. Entretanto há relatos de que adição de consórcios seja mais eficiente (WANG et al., 2011; TYAGI et al., 2011) partindo do princípio de que existe uma diversidade de compostos e uma única linhagem não é eficaz na metabolização de todos os contaminantes presentes no ambiente.

Quadro 4 - Lista de gênero de microrganismos degradadores de compostos do petróleo

MICROORGANISMO	GÊNERO	REFERÊNCIAS
BACTÉRIAS	<i>Achromobacter, Acidovorans, Acinetobacter, Agrobacterium, Alcaligenes, Aeromonas, Arthrobacter, Beijemickia, Burkholderia, Bacterium, Bacillus, Comomonas, Corynebacterium, Cycloclasticus, Flavobacterium, Gordonia, Kocuria, Klebsiella, Microbacterium, Moraxella, Mycobacterium, Micrococcus, Neptunomonas, Nocardia, Ochrobactrum, Paracoccus, Pasteurella, Polaromonas, Proteus, Pseudomonas, Ralstonia, Rhodococcus, Staphylococcus, Sphingomonas, Stenotrophomona, Spirillum, Vibrio, Xanthomonas</i>	Wetler-Tonini, R. M. C. et al., 2010; Jacques et al., 2007; Mariano, 2006.
FUNGOS	<i>Aspergillus, Bjerkandera, Candida, Chrysosporium, Cunninghamella, Curvularia, Drechslera, Fusarium, Lasiodiplodia, Mucor, Penicillium, Peniophora, Phanerochaete, Phlebia, Pleurotus, Prototheca, Rhizopus, Rhodosporidium, Rhodotorula, Saccharomyces, Sporobolomyces, Trichosporum, Trametes, Trichoderma,</i>	Behnood; Nasernejad; Nikazar, 2014; Balaji; Arulazhagan; Ebenezer, 2014; Lee et al., 2014; Mariano, 2006.
ALGAS E CIANOBACTÉRIAS	<i>Agmenellum, Amphora, Anabaena, Aphanocapsa, Cyndrotheca, Chlorella, Chlamydomonas, Dunaliella, Eudorina, Microcoleus, Nostoc, Oscillatoria, Porphyridium, Petalonia, Ulva</i>	Atlas, 1981 citado por Mariano, 2006; Dinis; Monteiro; Boaventura; El-Skeekh; Hamouda; Nizam, 2013;
CONSÓRCIOS MICROBIANOS	Consórcio fungo-bactéria: <i>Trichoderma asperellum, Aspergillus nomius, Aspergillus flavus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella sp. e Stenotrophomonas maltophilia;</i> Consórcio fungo-bactéria: <i>Mortierella, Variovorax, Arthrobacter globiformis;</i> Consórcio fúngico: <i>Penicillium chrysogenum, Mucor racemosus e Lasiodiplodia theobromae;</i> Consórcio bactéria-levedura-fungo: <i>Nocardia nova, Geotrichum candidum, Penicillium griseofulvum</i> Consórcio bacteriano: <i>Gordona, Rhodococcus, Exiguobacterium, Arthrobacter e Bacillus</i>	Zafra, 2014; Ellegaard-Jensen et al., 2014; Balaji; Arulazhagan; Ebenezer, 2014; Almeida et al., 2012.; Yum et al., 2008.

Fonte: Autor, 2015.

Para decomposição de alguns compostos recalcitrante é necessário a união de atividade de múltiplas enzimas, neste sentido cultura mista trazem vantagens em relação a culturas simples. Estudos realizados mostram que a ação conjunta dos microrganismos na degradação de contaminantes possibilita aumentar a resistência da comunidade á substâncias tóxicas, já que alguns dos organismos possam detoxificar o meio. Enquanto uma espécie

consome um componente específico a outra espécie consome outro composto distinto até degradar completamente o produto (GRADY, 1985). Consórcios agem como candidatos potenciais para biorremediação de ambientes contaminados, desde que sejam previamente testadas, pois o crescimento de um pode ser inibitório ao outro, sendo necessário avaliar competição, predação e antagonismo entre eles.

No México um estudo foi realizado com os microrganismos *Trichoderma asperellum*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus flavus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* sp., e *Stenotrophomonas maltophilia*, os quais cresceram usando HPAs como única fonte de carbono e apresentaram uma tolerância extremamente alta, até 6.000 mg L⁻¹. Deste modo os autores concluíram que o consórcio microbiano estudado apresentou um elevado potencial para a biorremediação e pode ser útil para o tratamento de locais contaminados com HPAs devido à sua elevada tolerância ao elevado peso molecular e a sua capacidade de utilizá-los como fonte de energia (ZAFRA, 2014), por outro lado a associação de bactéria, levedura e fungo composto por *Nocardia nova*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium griseofulvum* é indicado para aplicações em processos de biorremediação de ambientes contaminados com o combustível bunker (ALMEIDA et al., 2012). Outro exemplo de aplicação consórcios fúngico-bacteriano foi a utilização de *Mortierella* sp., *Variovorax* sp., *Arthrobacter globiformis* na remediação de áreas contaminadas por pesticidas (ELLEGAARD-JENSEN et al., 2014).

Na China, cinco gêneros bacterianos, *Gordona*, *Rhodococcus*, *Exiguobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus* formaram um consórcio capaz de metabolizar compostos aromáticos em sedimento de manguezal. Com aproximadamente dois meses de incubação, foi possível atingir 32,8% de degradação, desta forma os autores concluíram que estes gêneros podem metabolizar compostos aromáticos e tornar-se dominante em sedimentos de ambientes contaminados (YUM et al., 2008).

Angelim e colaboradores (2013) desenvolveram uma estratégia de biorremediação para sedimentos de manguezais contaminados com óleo a partir de um consórcio imobilizado, composto por 17 isolados de 12 gêneros diferentes. Os resultados obtidos revelaram que o consórcio imobilizado em cápsulas de quitosana apresentam efeito estimulante na comunidade bacteriana, além de servir como proteção na aplicação *in situ*. Desta forma a estratégia proporcionou bioestimulação e bioaumento simultaneamente.

Sete cepas bacterianas provenientes do sedimento da Baía de Todos os Santos com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo formaram 2 consórcios (consórcio A e B). O consórcio A foi capaz de degradar completamente todos os compostos acima do C₂₈,

porém, para os demais compostos, as melhores taxas de degradação foram presenciadas após 30 dias. O consórcio B atuou de forma semelhante na degradação de compostos acima do C₂₀ após 7 e 15 dias de experimento, com níveis de degradação superiores a 81% (FIORAVANTI, 2013).

Silva e colaboradores (2007) realizaram uma pesquisa cujo objetivo foi detectar microrganismos redutores de Fe através de análises moleculares e microbiológicas. A partir do estudo foram isoladas 11 linhagens aeróbicas da área de proteção ambiental Diogo Lopes, as quais foram capazes de reduzir Fe (III) e crescer na presença dos diversos hidrocarbonetos constituintes do petróleo. Sendo assim sugere-se que as demais bactérias nativas de ambientes virgens podem ser úteis em eventuais experimentos de biorremediação.

Apesar dos consórcios podem ser aplicados com diferentes tipos de organismo, gêneros e/ou espécies, muitos estudos têm sido realizados envolvendo o crescimento de um único microrganismo por conta da grande dificuldade de análise de misturas complexas.

4.4 FATORES QUE INTERFEREM NO PROCESSO DE BIODEGRADAÇÃO POR BIOAUMENTO

Os processos biológicos não os únicos fatores que estão envolvidos na biodegradação, mas também, processos físicos e químicos podem ser responsáveis pela redução da concentração do poluente (DEON et al., 2012). Entre as razões citam-se: aceptor de elétrons, nutrientes, umidade, oxigênio, pH, biodisponibilidade de compostos orgânicos, temperatura e tipo de solo, os quais serão discutidos nos itens a seguir:

4.4.1 Aceptores de elétrons

De modo geral a biodegradação do contaminante depende de atividade aeróbia dos microrganismos, ainda que existam microrganismos anaeróbios. Neste sentido, os contaminantes podem servir como doadores ou aceptores de elétrons nas reações bioquímicas redox, podendo ser parcialmente transformados ou mineralizados. Devido a maior quantidade de energia produzida durante o processo de respiração aeróbia, o oxigênio é o aceptor de elétrons preferido, quando presente. Quando o oxigênio livre se torna limitante, os microrganismos passam a usar o oxigênio proveniente do nitrato (NO⁻³) e depois continuam a usar outras formas de oxigênio que estejam presentes na região (SO₄⁻²) (MESQUITA, 2004).

4.4.2 Nutrientes

Para sobreviver, os microrganismos, necessitam de fontes de nutrientes. Nitrogênio, fósforo e potássio são, por sua vez, os principais nutrientes inorgânicos adicionados, se necessário, durante os processos de biorremediação (RIZZO et al., 2006). O carbono é essencial para a síntese de todos os compostos orgânicos necessários para a viabilidade celular, sendo considerado elemento estrutural básico para os seres vivos. A síntese de proteína, de DNA e de RNA necessita grandes quantidades de nitrogênio e fósforo, assim como para síntese de ATP, responsável pelo armazenamento e pela transferência de energia química dentro da célula (TORTORA, 2005).

4.4.3 Umidade

Durante o processo de biorremediação o solo deve apresentar teor de umidade suficiente para estimular o crescimento de microrganismos degradadores. A água funciona como veículo de transporte no qual matéria orgânica e nutrientes atravessam a parede celular dos microrganismos e leva os subprodutos do metabolismo para fora da célula. Por outro lado, teores excessivos de umidade limitam o transporte de oxigênio no solo. O nível de umidade do solo influencia os tipos de microrganismo presentes e os processos de volatilização. Normalmente os teores de água no solo devem ser mantidos entre 50-80% da capacidade de campo do solo, dependendo do tipo de solo e de contaminante. A água está presente no solo sob três formas: livre, aquela que pode se mover livremente através do solo; capilar, aquele presente nos poros da matriz do solo quando o solo não está saturado e higroscópica, a água que está interagindo com a superfície da matriz do solo (MESQUITA, 2004; RIZZO et al., 2006; SEABRA, 2008).

4.4.4 Oxigênio

Grande parte dos organismos, devido seu metabolismo, necessitam de oxigênio para respiração aeróbia. O oxigênio é utilizado pelos microrganismos não só comoceptor final de elétrons na respiração aeróbia, mas também como substrato nas reações biodegradativas catalisadas pela enzima oxigenase. Os átomos de hidrogênio que são removidos dos compostos orgânicos combinam com o oxigênio para formar água. Esse processo tem a vantagem de produzir grande quantidade de energia e simultaneamente neutralizar um gás potencialmente tóxico (RIZZO et al., 2006; TORTORA, 2005).

4.4.5 Biodisponibilidade de compostos orgânicos

A baixa disponibilização dos contaminantes encontrados em solos para os microrganismos é um dos principais fatores que interferem no processo de biodegradação. A baixa solubilidade destes contaminantes podem influenciar no crescimento microbiano. Em geral, quanto maior a solubilidade do contaminante em água, mais biodegradável esse será. Outro fator importante é emulsificação dos hidrocarbonetos, caso seja inadequada irá resultar em pequenas áreas superficiais para contato com as células microbianas (RIZZO et al., 2006).

4.4.6 pH

A solubilidade dos nutrientes e a atividade microbiana estão diretamente ligadas ao pH do solo. A maioria das bactérias vive na faixa de pH de 5 a 9, sendo que a biodegradação de um contaminante é tipicamente acelerada no pH neutro. As mudanças de pH podem causar alterações na comunidade microbiana. Em casos de pH muito ácido existe a necessidade de neutralizar a acidez com a adição de cal, e em pH muito alcalino utiliza-se sulfato de amônia ou sulfato de alumínio, de modo a elevar o pH próximo à neutralidade. Contudo é preciso levar em consideração outros fatores como: textura, quantidade de matéria orgânica e capacidade de troca catiônica. Os dois fatores mais influenciam na diversidade microbiana, em geral, são o pH e a capacidade de tamponamento do solo (MESQUITA, 2004; SEABRA, 2008).

4.4.7 Temperatura

A temperatura do solo é um dos fatores mais importantes no controle da atividade microbiana e das taxas de biodegradação da matéria orgânica, já que as velocidades das reações metabólicas aumentam com aumento de temperatura. Para as reações enzimáticas, a elevação além de uma certa temperatura reduz drasticamente a velocidade da reação. Pode-se dizer que a temperatura ótima para maioria das bactérias é entre 35 °C e 40 °C, sendo que com a redução dessa taxa ocorre a desnaturação das enzimas e assim perda da atividade microbiana (TORTORA, 2005). A temperatura também pode influenciar indiretamente na mudança de propriedade física, composição química ou toxicidade do contaminante (SEABRA, 2008). Além de estar relacionada com a diminuição do contaminante pelo processo de evaporação. A solubilidade dos contaminantes aumenta com o aumento de

temperatura, e a solubilidade do oxigênio diminui com o aumento de temperatura (ATLAS, 1981; SONG et al., 1990 citado por MESQUITA, 2004).

4.4.8 Tipo de solo

No caso do tratamento biológico de solos contaminados, deve-se levar em consideração a textura do solo, posto que a textura afeta a permeabilidade, a umidade, e a densidade. A metabolização e a biodegradação de muitos poluentes podem ser limitadas pela sorção (adsorção ou absorção) dos compostos aos componentes do solo. A sorção é responsável pelo “aprisionamento” dos contaminantes, removendo-os do estado dissolvido. Se os compostos encontram-se fortemente sorvidos, eles podem se apresentar indisponíveis aos microrganismos, limitando assim a sua biodegradação. Por outro lado, a sorção pode reduzir/minimizar alguns dos efeitos tóxicos dos poluentes no solo através da baixa disponibilização dos mesmos. Desta forma, o comportamento dos contaminantes no solo é influenciado pela competição dos processos de biodegradação e sorção (PROVIDENTI et al., 1993 citado RIZZO, 2006).

4.5 ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA BIORREMEDIAÇÃO

Expresso o potencial da técnica de biorremediação, algumas estratégias de foram desenvolvidas a fim de aperfeiçoar os processos de degradação dos contaminantes. Atualmente as mais usadas são: a adição de surfactantes, de microrganismo geneticamente modificados e material estruturante.

4.5.1 Surfactante

Uma tentativa de incremento da metabolização e da possibilidade de biodegradação de hidrocarbonetos contaminantes é aumentar a solubilização do substrato empregando-se, por exemplo, surfactantes e emulsificantes (RIZZO et al., 2006). Por meio da adição de surfactantes ocorre a metabolização de contaminantes, principalmente de hidrocarbonetos, facilitando seu transporte para o interior da célula.

Os principais fatores que devem ser considerados na escolha de um tensoativo na lavagem de solo são: eficiência na remoção do contaminante, custo, biodegradabilidade do composto e dos produtos de degradação, baixa dispersão no solo, efeitos tóxicos em seres humanos, animais e plantas e reciclagem (MESQUITA, 2004). Os surfactantes apresentam

em sua composição porções hidrofílicas e hidrofóbicas, fator o qual, aumenta a solubilidade dos compostos, tornando-os disponíveis aos microrganismos e por consequência facilita a biodegradação (PIEPER; REINEKE, 2000; RIZZO et al., 2008).

A cultura de *Pseudomonas aeruginosa*, pode ser citada como produtora de biossurfactantes, porém pode não apresentar bom desempenho quando matérias primas alternativas (óleo diesel) são utilizadas (MARIANO, 2006). Uma das principais vantagens do emprego dos bioemulsificantes ou biossurfactantes é a sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e elevada eficácia, principalmente quando empregado em associação com tecnologias de tratamento *ex situ* de solos contaminados. Por outro lado, em tecnologias de tratamento *in situ* pode causar a lixiviação dos poluentes hidrofóbicos para o lençol freático devido ao aumento da mobilidade dos mesmos (RIZZO et al., 2006). Os principais microrganismos produtores de surfactante mais conhecidos estão listados no Quadro 5.

Quadro 5- Diversidade de surfactantes produzidos por microrganismos

MICROORGANISMO PRODUTOR	BIOSURFACTANTE
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Emulsan; Biodispersan
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Alasan
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Glicolípido
<i>Arthrobacter sp.</i>	Glicolípido; glicopeptídeo; heteropolisacarídeo
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipopeptídeo
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactina
<i>Candida bombicola</i>	Soforolípido
<i>Candida lipolytica</i>	Soforolípido
<i>Clostridium sp.</i>	Lípídeos neutros
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Fosfolípido
<i>Norocardia</i>	Lípídeos; ácidos graxos; dimicolatas; polisacarídeos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Raminolípido
<i>Pseudomonas florences</i>	Lipopeptídeo
<i>Rhodococcus rubber</i>	Glicolípido
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trealosetetraester
<i>Torulopsis bombicola</i>	Soforolípídeos

Fonte: Mulligan et al., 2005; Mesquita, 2004; Bueno; 2008.

4.5.2 Microrganismo geneticamente modificado

Os organismos geneticamente modificados (OGMs) são organismos cuja estrutura genética sofreu algum tipo de recombinação em laboratório através de técnicas avançadas que permite alterar sua estrutura genética pela introdução de um gene modificado ou de um gene pertencente a uma outra variedade ou espécie, obtendo características específicas (SUZUKI,

2006). O uso desses microrganismos tem por objetivo aumentar a taxa de degradação dos contaminantes, uma das principais limitações do processo de biorremediação (SILVA, 2010).

4.5.3 Material estruturante

O emprego de material estruturante ou *bulking agents* melhora algumas das propriedades importantes do solo tais como: reduz a densidade, aumenta a porosidade e a permeabilidade, resultando na facilidade de difusão de oxigênio entre as partículas solidas, ou seja, altera a capacidade de retenção de água no solo. Esses fatores aumentam a aeração do sistema solo contaminante durante o processo de biorremediação. Dentre os materiais estruturantes podem ser empregados matérias de origem orgânica como, por exemplo, casca de coco, palha, cavaco de madeira, serragem e farelo de trigo ou matérias de origem inorgânica, tais como argila calcinada, a vermiculita, areia, perlita e cascalho (RIZZO et al., 2006; RAIMUNDO et al., 2004).

4.6 EFEITOS

Um dos maiores benefícios na utilização das técnicas de bioaumento é a utilização de agentes naturais parabiodegradar substâncias perigosas ao invés de transferir o contaminante de um meio para outro. Mas nem sempre seus efeitos serão benéficos.

Outras vantagens da técnica é o fato de ser mais econômica comparativamente a outras técnicas de remediação, pode ser executada no próprio sítio de contaminação, apresenta mínima intervenção, é mais fácil de aplicar em larga escala, além de permitir associação com outros métodos biológicos, químicos e/ou físicos de tratamento. Todavia há diversas possibilidades na aplicação desta estratégia não contribuir com o efeito desejado, principalmente pela seleção de estirpes inapropriadas. Sendo assim, além do tempo prolongado para descontaminação da área, ainda exige um período de pré-tratamento para selecionar os microrganismos necessários.

A fim de auxiliar o tratamento de solos contaminados por petróleo e seus derivados, são lançados diversos produtos no mercado mundial. Alguns produtos apresentam microrganismos exógenos em sua composição, outros apresentam nutrientes e surfactantes para aumentar o potencial biorredutor dos microrganismos (WEBER; SANTOS, 2013). Contudo o lançamento indiscriminado dos mencionados pode trazer riscos ao meio ambiente.

Em particular, a utilização de OGMs pode trazer graves consequências. Uma vez aplicados no ambiente, dificilmente serão eliminados e podem gerar competição com a microbiota nativa e conseqüentemente levá-las a extinção; pode ocorrer a troca de material genético e levar a perda da variabilidade genética dos autóctones; existe a possibilidade de introdução de fatores de patogenicidade e/ou resistência a antibióticos; sem falar no desequilíbrio da estrutura da comunidade (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005). Em geral o objetivo da biorremediação é mineralizar os poluentes orgânicos, libertando apenas substâncias inertes, como dióxido de carbono, a água e a biomassa celular, porém a adição de nutrientes, surfactantes ou OGMs podem produzir substâncias indesejáveis ao ambiente. Isto posto, devem ser submetidas a avaliações muito mais criteriosas para serem validados (MENEGETTI, 2007).

4.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de produtos biotecnológicos não deve ser interpretada como a solução de todos os problemas de contaminação, visto que muitas pesquisas cujos os resultados são promissores a biorremediação foi testada em escala laboratorial e ainda estão em um estágio de desenvolvimento.

Não existe um padrão de microrganismos que reflita eficiência tanto *ex situ* e *in situ* em qualquer tipo de ambiente contaminado por resíduos de petróleo, pois cada caso é único e vários fatores devem ser considerados. É importante ressaltar que tratamento bem sucedido depende da seleção adequada de microrganismos, assim como o monitoramento e manutenção dos fatores físico-químicos do ambiente.

Apesar de vários gêneros de fungos, bactérias e algas terem se destacado pela capacidade de degradação compostos orgânicos de origem petrolífera, uma só espécie não é apta na mineralização de todos os componentes presentes no ambiente contaminado. Portanto, a produção de consórcios microbianos mistos capazes de degradar todos os compostos do petróleo, torna-se um dos focos principais da biorremediação. Sendo necessário avaliar sinergismo e antagonismo entre eles, assim como testar diferentes combinações e concentrações de inóculos para elucidar a eficiência destas colônias por bioaugmentação em ambientes contaminados por petróleo e seus derivados.

Por fim, é preciso criar um banco de dados sobre a capacidade de diferentes consórcios mistos para cada ecossistema e para cada tipo de petróleo e derivados, como o propósito de criar um protocolo eficiente na biorremediação de sítios contaminados.

5 AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DO PETROLÉO POR CONSÓRCIO MICROBIANO MISTO EM PRÓTIPO DE BIORREATOR

RESUMO

Visando investigar o potencial biotecnológico de consórcio microbiano na biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo em manguezais e fornecer ideias para a melhoria do método de biorremediação foi montado um consórcio misto e testado em protótipo de biorreator de imersão temporária. A avaliação consistiu em quatro ensaios em triplicata: atenuação natural, biorremediação I, biorremediação II; e controle. Desses foram coletadas amostras de sedimento nos intervalos de 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento para o monitoramento das análises geoquímica, físico-química e microbiológica. Os resultados mostraram que os consórcios são capazes de degradar os HTP da Bacia do Recôncavo Baiano. Entretanto a atenuação natural apresentou maior degradabilidade de HTP representada por 71,77% enquanto que a biorremediação I e II foram responsáveis por 45,14% e 7,3% respectivamente. Este fato indica a necessidade de ajustes na concentração dos microrganismos e nutrientes adicionados a fim de obter melhores resultados no processo de biorremediação de manguezais contaminados por óleo e promover sua aplicabilidade em larga escala.

Palavras-chave: Biorremediação. Bioaumento. Bioestímulo. Microrganismos.

EVALUATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS BIODEGRADATION FOR MICROBIAL MIXED CONSORTIUM IN BIOREACTOR PROTOTYPE

ABSTRACT

In order to investigate the biotechnological potential of microbial consortium in the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in mangroves and provide ideas for improving the bioremediation method was taken consortium and tested in prototype of temporary immersion bioreactor. The evaluation consisted of four experiments in triplicate: natural attenuation, bioremediation I, bioremediation II and control. These sediment samples were collected at 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 and 90 days of experiment for monitoring of geochemical analysis, physico-chemical and microbiological. The results showed that consortia are able to degrade the TPH of the Recôncavo Basin. However, the natural attenuation showed higher degradability TPH represented by 71.77% while the bioremediation I and II accounted for 45.14% and 7.3% respectively. This indicates the need for adjustments in the concentration of microorganisms and nutrients added in order to obtain better results in the process of bioremediation of mangroves contaminated by oil and promote its application on a large scale.

Keywords: Bioremediation. Bioaugmentation. Biostimulation. Microorganisms.

5.1 INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos tem sido empregada como uma tecnologia de remediação *in situ* a fim de reduzir os efeitos de compostos orgânicos indesejáveis (tal como petróleo) no meio ambiente (WANG et al., 2014). A biorremediação é uma técnica economicamente viável na recuperação de áreas poluídas e tem gerado crescente relevância na sua utilização (COUTINHO; BARBOSA, 2007).

A biorremediação envolve a aplicação de microrganismos, os quais utilizam compostos orgânicos como fonte de carbono e energia, e transformam em dióxido de carbono e água (DEON et al., 2012). Esta técnica ainda pode ser empregada de diversas maneiras, tais como: através do bioaumento, bioestímulo, biorremediação intrínseca, entre outras (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010). Geralmente os métodos de aplicação visam aumentar a população microbiana criando condições favoráveis ao seu desenvolvimento (SILVA et al., 2004).

O sucesso da técnica de bioaumento depende da inserção de microrganismos com capacidade para degradar o poluente alvo (CHI et al., 2013). Embora vários estudos tenham utilizado a bioaugmentação no tratamento de sítios contaminados por petróleo, esse método apresenta limitações. Uma única espécie de microrganismo não é capaz de metabolizar todos os compostos orgânicos presentes no ambiente. Desta forma a técnica requer a união de espécies diferentes de microrganismos com o propósito de degradar todos os compostos do petróleo (PINHATIA et al., 2014). Diversos benefícios podem ser citados na utilização de consórcios, uma vez que eles possibilitam a amplificação de processos bioquímicos na degradação completa de compostos recalcitrantes e/ou tóxico do substrato, assim sendo o uso de consórcios tem se mostrado eficaz na remoção de poluentes, em comparação com o uso de uma única cepa (FESTA; COPPOTELLI; MORELLI, 2016).

A deficiência nutricional dos ambientes contaminados para dar suporte ao crescimento dos microrganismos pode ser um grande problema. Tendo em vista a necessidade de adicionar nutrientes e/ou oxigênio para estimular o metabolismo e o desenvolvimento dos microrganismos utiliza-se a bioestimulação (BISOGNIN, 2012). Isto posto, a utilização do bioaumento assistida por bioestimulação (BAB) integra a eficácia de ambas as tecnologias e apresenta uma vantajosa abordagem para a biorremediação (WANG et al., 2014).

Sistemas de biorremediação simples podem apresentar fatores restritivos ao processo de biodegradação. Geralmente essas limitações estão relacionadas a disponibilidade de

nutrientes, oxigênio ou a falta de condições relativamente homogêneas, ou seja, dificuldade no controle e manutenção de condições ideais para proliferação dos microrganismos (VAN HAMME; SINGH; WARD, 2003). Biorreatores são sistemas fechados que permitem controlar os fatores físico-químicos tais como pH, temperatura, Eh, O.D, sendo ajustados para a máxima produção de biomassa, controlar a degradação, controlar a geração de resíduos, possibilitam a incorporação de aditivos e oxigenação, além da possibilidade de automação do sistema (RIZZO et al., 2006). Via de regra a utilização de biorreatores tem demonstrado altas taxas biodegradação, já que é acessível o controle sobre fatores abióticos e bióticos no interior do biorreator, o que resulta na redução do período de tratamento (JACQUES et al., 2007).

A necessidade de monitoramento representa uma importante justificativa para a implementação de um processo de biorremediação mais otimizado, que amplifique a biodegradação do poluente alvo. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial biotecnológico do consórcio microbiano misto em protótipo de biorreator para aplicação na biodegradação de hidrocarbonetos totais de petróleo em manguezais e fornecer ideias para a melhoria do método de biorremediação.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Área de coleta

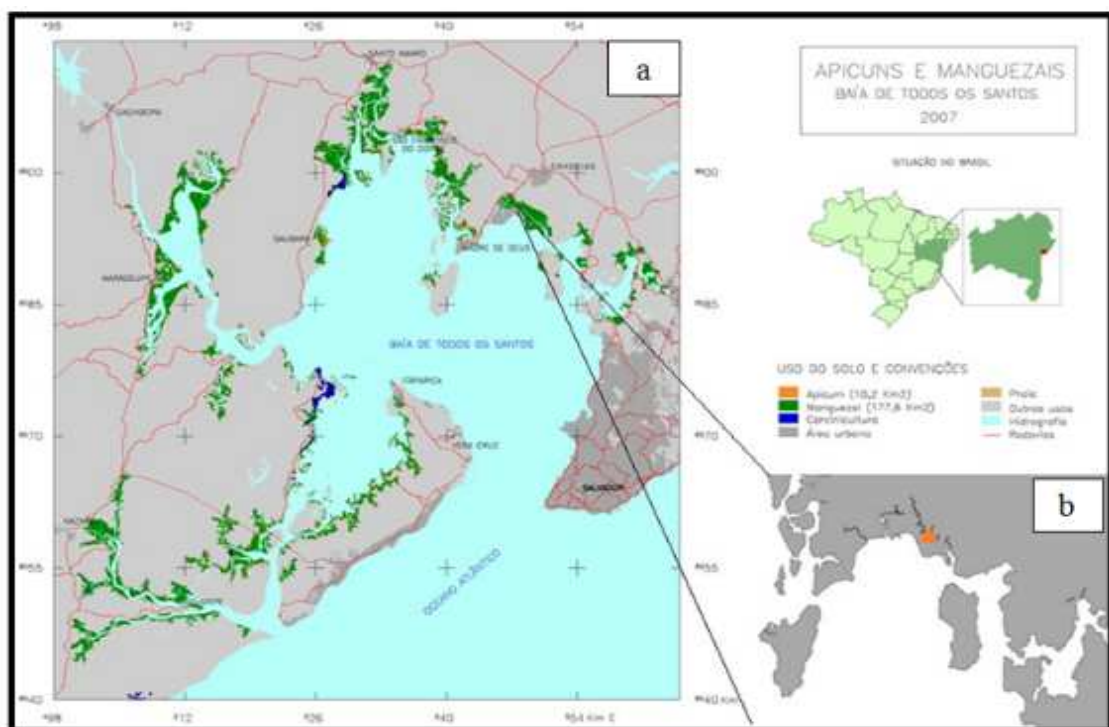
A Baía de Todos os Santos (BTS) é uma reentrância da costa brasileira, localizada entre as coordenadas 12° 39' 4" S – 13° S de latitude e 38° 30' W – 38° 43' 30" W de longitude (LEÃO; DOMINGUEZ, 2000). Essa baía apresenta uma área aproximada de 1.233 km² de superfície e 200 km de perímetro (QUEIROZ, 1997).

A porção norte/nordeste da baía possui mais de 300 indústrias e uma intensa atividade portuária. Destas está incluso dois polos industriais, o Centro Industrial de Aratu e o Polo Petroquímico de Camaçari, onde está localizada a refinaria Landulpho Alves de Mataripe (RLAM) (HATJE; ANDRADE, 2009; ONOFRE et al., 2007).

Entre os municípios de São Francisco do Conde e Candeias, ao lado da Refinaria Landulpho Alves, encontra-se uma área controle sem contaminação por HTP's, definida a partir de uma avaliação preliminar de estudo anterior (LIMA, 2014). A mesma é representativa do ecossistema manguezal e está localizada nas proximidades do rio São Paulo, nas coordenadas 12° 44' 26,0" (S) e 38° 31' 53,9" (W) (Figura 25).

Os dez primeiros centímetros do sedimento foram coletados com auxílio de um testemunhador de aço inoxidável de 10 cm de diâmetro, homogeneizados em recipiente de inox e armazenados em quentinhas sob refrigeração a 4°C. A caracterização física, geoquímica e microbiológica (Quadro 6) do sedimento foi realizada no Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO) do Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Figura 25 - Localização da área de amostragem. (a) Limites da Baía de Todos os Santos; (b). Destaque para o ponto de coleta



Fonte: Modificado de Hadlich (2014).

Quadro 6- Características físicas, geoquímicas e microbiológicas do sedimento utilizado no experimento

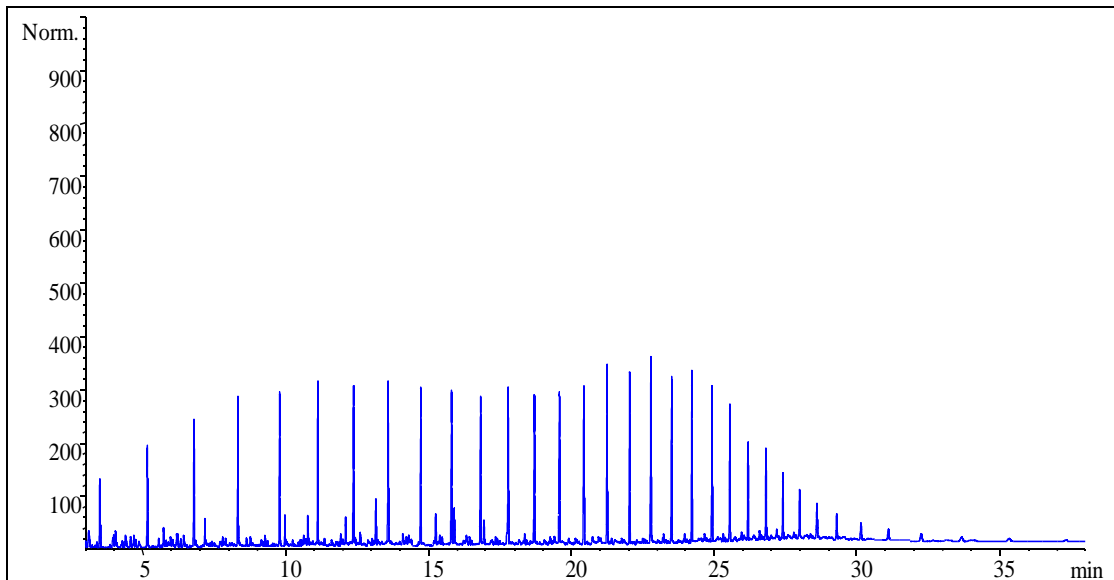
PARAMETROS		CONCENTRAÇÃO
Granulometria (%)	Areia grossa	13,15
	Areia média	50,04
	Areia fina	5,46
	Areia muito fina	8,63
	Silte	21,3
	Argila	1,69
N (%)		<0,1
COT (%)		2,12
P (mg Kg ⁻¹)		56,87
Bactéria (UFC/mL)		0,3 x 10 ⁵
Fungo (UFC/mL)		1,85 x 10 ⁵

Fonte: Autor, 2015.

5.2.2 Petróleo

O petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano foi utilizado para simulação de derrame no experimento em questão (Figura 26). Este óleo possui uma distribuição bimodal das *n*-parafinas, que pode ser visualizada nos tempos de retenção entre 11 a 24 minutos, com maiores abundâncias nos picos *n*-C₁₃ ao *n*-C₁₇ e *n*-C₁₉ ao *n*-C₂₇. O mesmo é classificado como óleo leve, do tipo parafínico com baixa proporção de compostos NSO (GANGLIONANE; TRINDADE, 1988). Os parâmetros geoquímicos do óleo podem ser observados no Quadro 7.

Figura 26 - Perfil cromatográfico dos hidrocarbonetos totais do petróleo (nC₈ a nC₄₀) da amostra de óleo da Bacia do Recôncavo Baiano do poço 128



Fonte: Autor, 2015.

Quadro 7 - Parâmetros geoquímicos da amostra de petróleo utilizado do experimento

PARAMETROS GEOQUÍMICO	CONCENTRAÇÃO (mg k)
Pristano	2235,63
Fitano	1570,96
HTP	325418,94
UCM	72042,57
Pristano/Fitano	1,423
Pristano/n-C ₁₇	0,2964
Fitano/n-C ₁₈	0,2257
HTP/UCM	4,517036869

Fonte: Autor, 2015.

4.2.3 Consórcio microbiano misto

Para obtenção de bactérias foram utilizadas três matrizes em triplicata: sedimento de manguezal livre de contaminação por HTP's, sedimento contaminado artificialmente por petróleo e petróleo da bacia do Recôncavo Baiano.

A extração da microbiota nativa foi através da técnica de diluição seriada por microgota. As cepas isoladas foram submetidas ao teste de oxidação das frações do petróleo (hidrocarbonetos saturados, aromáticos e compostos NSO) utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) conforme metodologia de Hanson et al., (1993). Para compor o experimento foram utilizados fungos da micoteca do LEPETRO, os quais foram isolados do mesmo sedimento referência. Foram reativados 26 fungos que obtiveram resultados satisfatórios na degradação de óleo da Bacia do Recôncavo no trabalho de Lima (2014).

A partir da seleção dos microrganismos foi feita a junção dos principais degradadores e observado as interações sinérgicas ou antagônicas para formação do consórcio, totalizando 26 fungos e 12 bactérias (Quadro 8). A posteriori, o consórcio microbiano foi encapsulado com folha de manguezal e outro com fibra de coco utilizando-se polímeros naturais segundo metodologia modificada por Lima (2014).

Quadro 8 - Codificação dos microrganismos do consórcio

MICROORGANISMO	CÓDIGO
FUNGO	R2, R11, R16, R26, R27, R28, R30, R31, R33, S36, S38, S39, S40, S41, S45, S52, S53, A79, A80, A83, A84, N82, N89, N96, N101, N102(Apêndice 3)
BACTÉRIA	RA2, RB1, RB4, RC5, RC6, PD4, PD5, PD6, PD7, PD8, OH1, OH4(Apêndice 4)

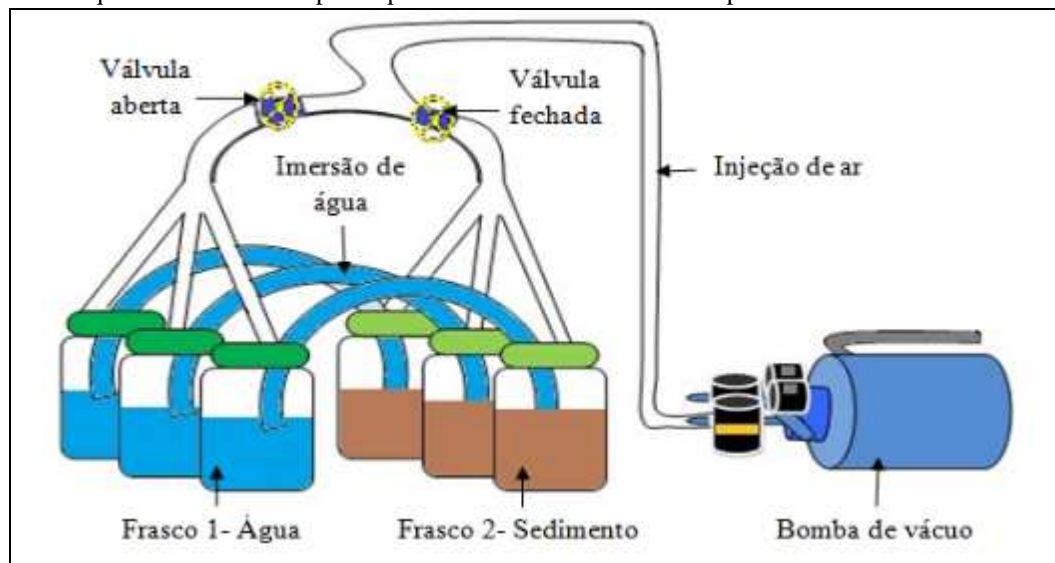
Fonte: Autor, 2015.

5.2.4 BIORREMEDIAÇÃO EM PROTÓTIPO DE BIORREATOR DE IMERSÃO TEMPORÁRIA

Foi montado um sistema de biorreatores de imersão temporária modificado a partir do protótipo elaborado por Lima (2014), conforme Figura 27. Os biorreatores foram constituídos por dois frascos de vidro hermeticamente fechados com capacidade para 2 foram litros, interligados entre si por tubos flexíveis através das tampas, contendo água em um dos frascos e sedimento no outro, ambos acoplados a uma bomba de vácuo, a fim de suprir a demanda de oxigênio requerida pelos microrganismos e simular a maré através da imersão de água de tempos em tempos.

Quando a bomba era acionada, a injeção de ar no frasco 1 aumentava a pressão do sistema e transferia o meio líquido para o frasco 2 através dos tubos interligados. Desta forma a injeção de ar provocava a formação de bolhas suprimindo a demanda de oxigênio requerida pelos microrganismos e a água imersa simulava a maré alta. Terminada a fase de imersão, a bomba era ativada no sistema oposto e a água migrava do compartimento 2 para 1 pelo mesmo tubo, simulando o processo de descida da maré.

Figura 27 - Esquema ilustrativo do protótipo de biorreator de imersão temporária



Fonte: Autor, 2015.

Para a avaliação do potencial de degradação dos consórcios foram realizados quatro ensaios em triplicata: atenuação natural, biorremediação I, biorremediação II; e controle.

Atenuação natural monitorada (biorremediação intrínseca) – Três biorreatores compostos por sedimento referência e a adição de 1% de óleo da Bacia do Recôncavo Baiano; biorremediação I– Três biorreatores compostos por sedimento referência com a adição de 1% de óleo da Bacia do Recôncavo Baiano e consórcio microbiano misto encapsulado com fibra de coco; biorremediação II– Três biorreatores compostos por sedimento referência com a adição de 1% de óleo da Bacia do Recôncavo Baiano e consórcio microbiano misto encapsulado com folhas de manguezal; e controle- composto por três biorreatores com sedimento referência sem adição de óleo, totalizando 12 unidades de simulação.

O sedimento foi homogeneizado e adicionado as cápsulas do consórcio com fibra de coco (biorremediação I) outro com folha de manguezal (biorremediação II). Em seguida foi adicionado 1% de óleo da Bacia do Recôncavo Baiano ao sedimento.

Para avaliar o processo de degradação, foram coletadas amostras de sedimento nos intervalos de 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento. A coleta consistiu na

amostragem de 170g de sedimento, onde essa amostra foi homogeneizada em um recipiente de inox e separada em frações para o monitoramento geoquímico e microbiológico.

Durante o experimento foi realizado o monitoramento dos parâmetros físico-químico através da sonda portátil digital da marca HORIBA, modelo D54 e um refratômetro manual com precisão de $\pm 0,5$. Neste foram mensurados os valores de salinidade, oxigênio dissolvido (O.D), potencial redox (Eh), potencial de hidrogênio (pH) e temperatura da água, sendo os dois últimos mensurados diariamente por um mês.

O monitoramento geoquímico consistiu na extração da fração orgânica de 10 g de sedimento em extrator *soxhlet* e posterior análise do perfil cromatográfico por meio da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas através do método “*whole oil*”.

O monitoramento químico ocorreu através da determinação dos teores de fósforo, nitrogênio total e carbono orgânico total (COT). O fósforo foi determinado seguindo o método da EMBRAPA, 2009 e analisado em Espectrofotômetro *Agilent Cary 60 - Agilent Technologies*. Para determinação de COT e nitrogênio total foi utilizado o determinador elementar, serie CHN628 da LECO Corporation e as amostras foram preparadas conforme o método da EPA NCE-C 1282/2002.

O monitoramento microbiológico consistiu na contagem de bactéria pelo método de diluição seriada por microgota/ *spread plate*, até diluição 10^{-8} e diluição seriada/ *pour plate*, até diluição 10^{-5} para contagem de fungos. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia (UFC/mL). O experimento e as análises geoquímicas, físico-química e microbiológica foram realizados no Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO) do Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do experimento foram demonstrados em relação ao monitoramento geoquímico, físico-químico e microbiológico em 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento. Foi adotado C para representar as amostras do controle, AN para atenuação natural, BC para biorremediação I e BF para biorremediação II.

5.3.1 Monitoramento físico-químico

Vários fatores influenciam a taxa de biodegradação dos compostos presentes no petróleo, dentre eles estão o pH, temperatura, umidade, potencial redox, oxigênio dissolvido, nutrientes, teores de matéria orgânica, entre outros (SEABRA, 2008). Sobretudo a atividade

microbiológica é afetada pelo valor do pH e pela temperatura (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

Nos primeiros 30 dias de monitoramento, a temperatura média de todos os tratamentos foi $\pm 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Quadro 9). Durante os 90 dias de monitoramento obteve-se como temperatura mínima de $21,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e máxima de $26,3\text{ }^{\circ}\text{C}$, entretanto não houve diferença significativa entre as médias. A Figura 28 permite visualizar de forma clara que a temperatura procedeu similar independentemente do tipo de tratamento empregado.

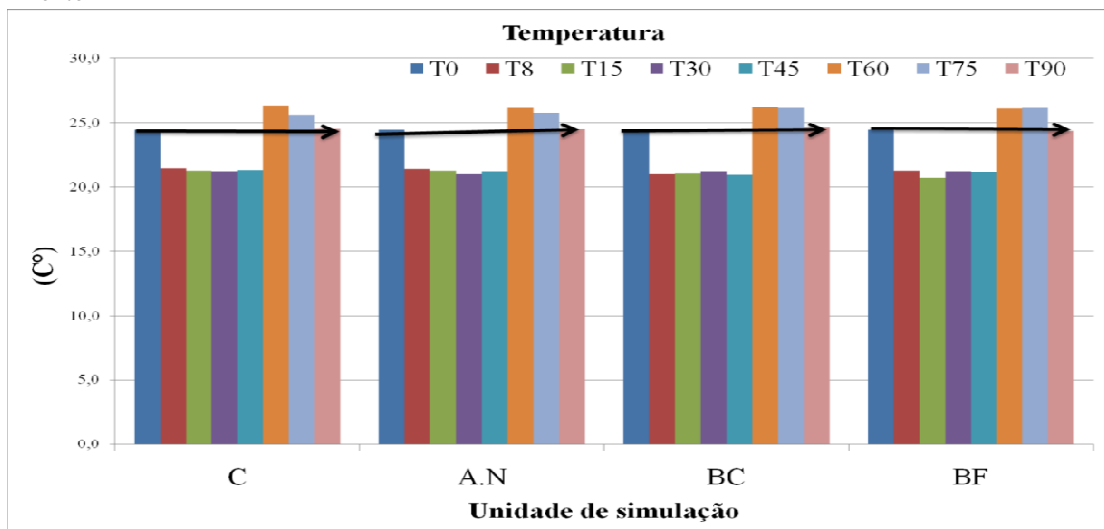
Quadro 9 - Média da temperatura e pH das unidades de simulação durante trinta dias de monitoramento

UNIDADES DE SIMULAÇÃO	pH	TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)
Controle	6,99	22,20
Atenuação natural	7,11	22,15
Biorremediação I	6,89	22,05
Biorremediação II	7,17	22,0

Fonte: Autor, 2016.

Temperaturas abaixo de $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ resultam na degradação lenta dos hidrocarbonetos, sendo o ideal de temperatura para o desenvolvimento dos microrganismos e degradação dos HPAs uma faixa de temperatura entre $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (LEAHY; COLWELL, 1990). Por outro lado, temperatura acima do valor ótimo desnaturam e inativa proteínas, enzimas e ácidos nucleicos dos microrganismos (MARIANO, 2006). O experimento apresentou valores de temperatura próximos da faixa ideal de desenvolvimento, este fato pode não ter explorado o potencial de biodegradação do substrato.

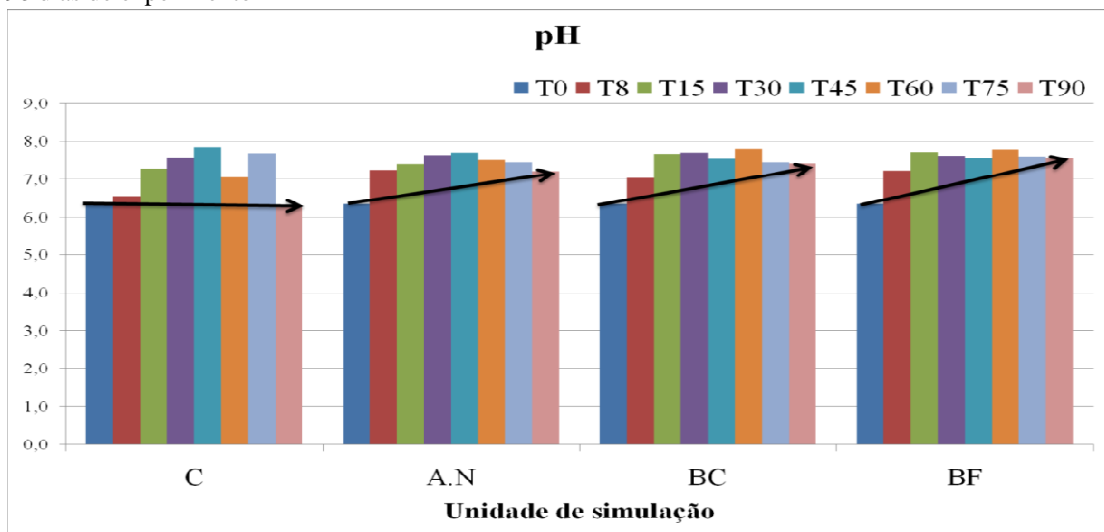
Figura 28 - Valores da temperatura nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

Os valores de pH afetam a atividade dos microrganismos através dos efeitos dos íons H^+ na permeabilidade celular e na atividade enzimática, exercendo influência na disponibilidade de macro e micronutrientes (JACQUES et al., 2007). O pH se manteve próximo a neutralidade (Figura 29), contribuindo positivamente para a realização do experimento, já que o pH condiz com a média entre 6,0 e 8,0 apresentada como ideal para a atividade dos microrganismos (LEAHY; COLWELL, 1990; ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

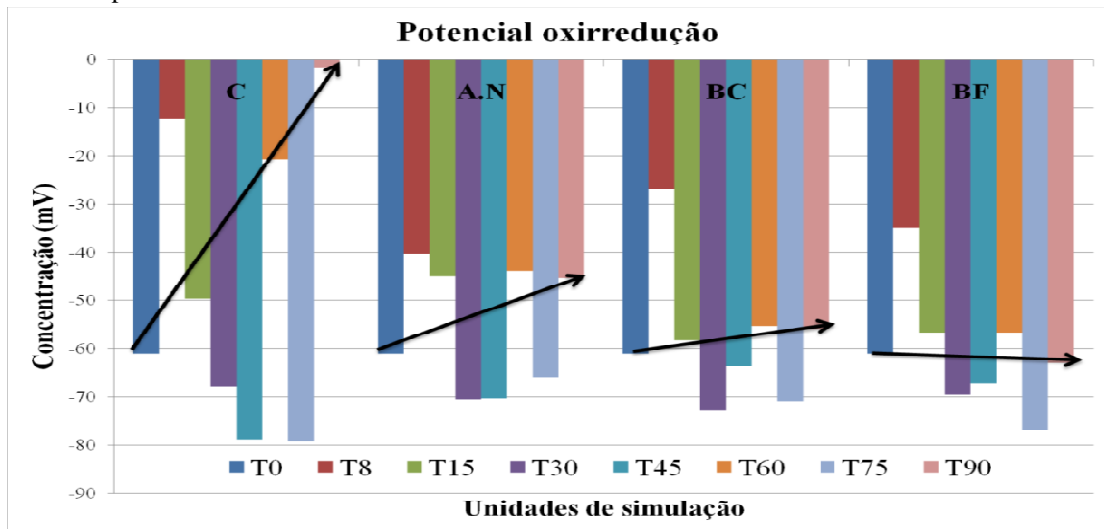
Figura 29 - Valores do potencial hidrogeniônico (pH) nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

O potencial de oxirredução pode ser utilizado como um indicador do grau de oxidação dos sedimentos. A biodegradação de hidrocarbonetos é essencialmente uma reação de oxirredução onde o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétrons) e um aceptor de elétrons é reduzido (MARIANO, 2006). Conforme Figura 30 pode-se observar que o sedimento de todos os tratamentos está em redução, uma vez que valores de Eh em 800 mV, indica sedimento altamente oxidado, a -400 mV, indica sedimentos altamente reduzida, ou seja acima de zero é oxidação, e menor do que zero, o meio está em redução (SUTHERSAN, 1996). O Eh variou entre -1,67 mV a -79,30 mV, sendo o T8, T60 e T90 os maiores valores em todos os tratamentos, corroborando com a reação do oxigênio o qual foi menor em T8 e T60 (Figura 28). Possivelmente esses foram os tempos onde ocorreu maior consumo de oxigênio pelos microrganismos.

Figura 30 - Valores da potencial oxirredução (Eh) nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento

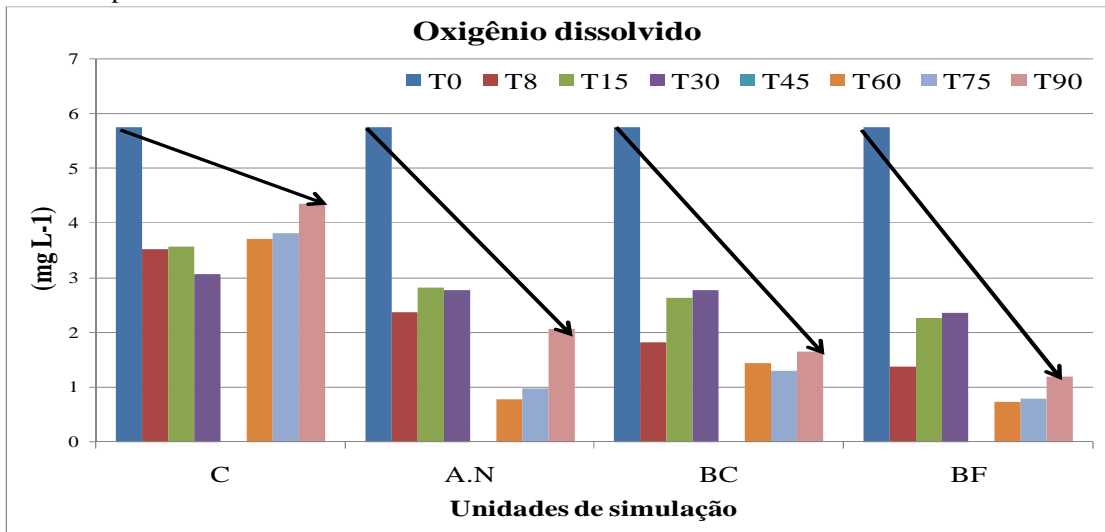


Fonte: Autor, 2016.

O oxigênio é um requisito básico para a biodegradação, pois é o principal acceptor de elétrons na degradação da matéria orgânica e contaminantes (MESQUITA, 2002). Na sua ausência, o potencial redox se torna um fator limitante na degradação de contaminantes oleosos. Isto decorre uma vez que a transformação aeróbica dos hidrocarbonetos no solo leva frequentemente a um rápido esgotamento do oxigênio dissolvido (KARTHIKEYAN; BHANDARI, 2001). Sedimentos aquáticos são anóxicos exceto para uma camada fina na superfície do sedimento. A disponibilidade de oxigênio no solo é dependente das taxas de consumo de oxigênio microbiana, do tipo de solo, se o solo está encharcado, e a presença de substratos utilizáveis o que pode conduzir a depleção de oxigênio (ATLAS, 1984).

A taxa de oxigênio iniciou em $5,75 \text{ mg L}^{-1}$ e reduziu ao longo do experimento de forma similar em todos os tratamentos. O experimento controle foi o qual apresentou os maiores valores de oxigênio dissolvido, provavelmente por não ter sido submetido a nenhum aditivo nutricional para estimular o crescimento microbiano (Figura 31). A concentração de oxigênio durante os 90 dias de monitoramento foi considerada baixa em relação a taxa necessária de $3,1 \text{ mg mL}$ de oxigênio para a degradação de 1 mg mL hidrocarbonetos para as bactérias aeróbicas, sem tomar em consideração a massa total de bactérias (SONAWDEKAR, 2012). O T45 não possível mensurar os valores de O.D devido problemas operacionais na sonda.

Figura 31 - Valores de oxigênio dissolvido (O.D) nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento

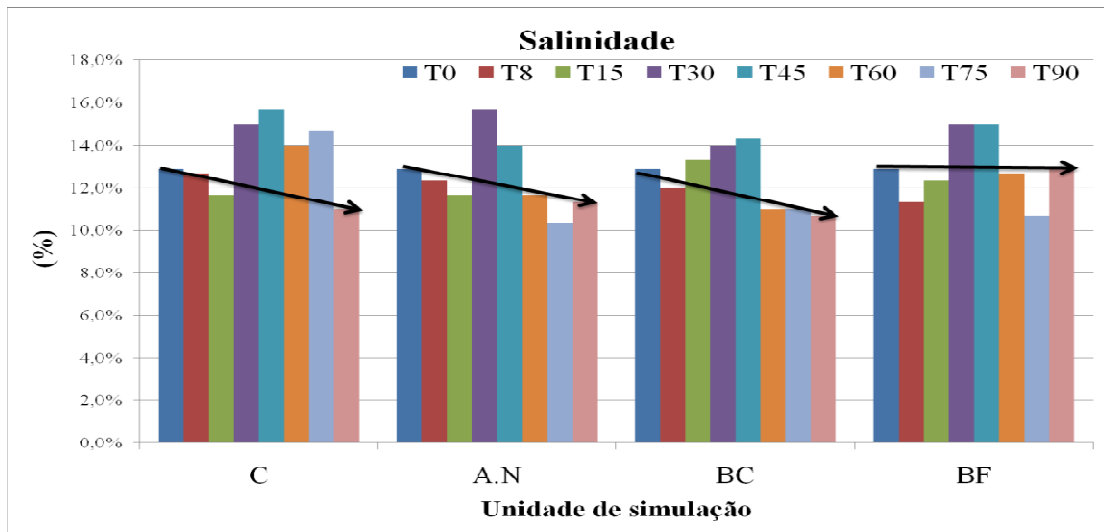


Fonte: Autor, 2016.

A taxa de salinidade é considerada um dos parâmetros para a determinação da extensão da biodegradação. Nos manguezais a salinidade pode variar de 0,5 a 30,0 variando de acordo com a proximidade ao rio e á vegetações (WETLER, 2006). Elevados teores osmóticos alteram a solubilidade ou sorção dos contaminantes pelos microrganismos inibindo as taxas de degradação de compostos orgânicos (QIN et al., 2012). Assim sendo, o aumento da salinidade pode afetar a fisiologia da população microbiana e conseqüentemente reduzir as taxas de degradação de hidrocarbonetos de petróleo (ADELAJA; KESHAVARZ; KYAZZE; 2015; TEHRANI; MINOUI; HERFATMANESH, 2009).

Os valores de salinidade variaram entre 10,33 e 15,67 (Figura 32) o que não exerce efeito negativo para o processo de biorremediação, uma vez que valores < 2 são considerados inapropriados para o desenvolvimento de microrganismos isolados (ATLAS, 1984). A diferença entre os valores ao longo do experimento não demonstrou diferença significativa.

Figura 32 - Valores de salinidade nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

A metabolização e a biodegradação de contaminantes também pode ser limitada pela capacidade do solo de adsorver ou absorver compostos. Entretanto, o comportamento desses parâmetros depende da textura do solo e sua quantidade e tipo de frações, tais como areia, silte e argila, além dos teores de matéria orgânica presentes neste solo (RIZZO, 2006).

Neste sentido, a argila apresenta capacidade de adsorver elementos químicos e trocáveis por outros elementos, ou seja, possui capacidade de troca de cátions (CTC). O número total de cátions trocáveis é referente à soma de elementos de carga positiva, (cálcio, magnésio, potássio, sódio, alumínio e hidrogênio), que são adsorvidos pelas cargas negativas da argila. Desta forma, quanto mais alta a CTC de um solo, mais cátions ele pode reter (BISOGNIN, 2012). O percentual de argila aumentou nos tratamentos com exceção da biorremediação II como pode ser visto no Quadro 10. Em contrapartida, a biorremediação I obteve menores teores de argila, entretanto não demonstrou diferença significativa nas taxas de oxigenação dos tratamentos.

Quadro 10 - Características granulométrica das unidades de simulação nos tempos 0 e 90 dias de experimento

UNIDADES DE SIMULAÇÃO	GRANULOMETRIA	T0	T90
Controle	Areia	77,28%	72,65%
	Silte	21,3%	25,57%
	Argila	1,69%	1,79%
Atenuação Natural	Areia	76,20%	62,60%
	Silte	22,04%	35,06%
	Argila	1,36%	2,34%
Biorremediação I	Areia	73,06%	65,97%
	Silte	25,52%	32,32%
	Argila	1,42%	1,71%
Biorremediação II	Areia	74,88%	64,22%
	Silte	23,20%	34,04%
	Argila	1,93%	1,75%

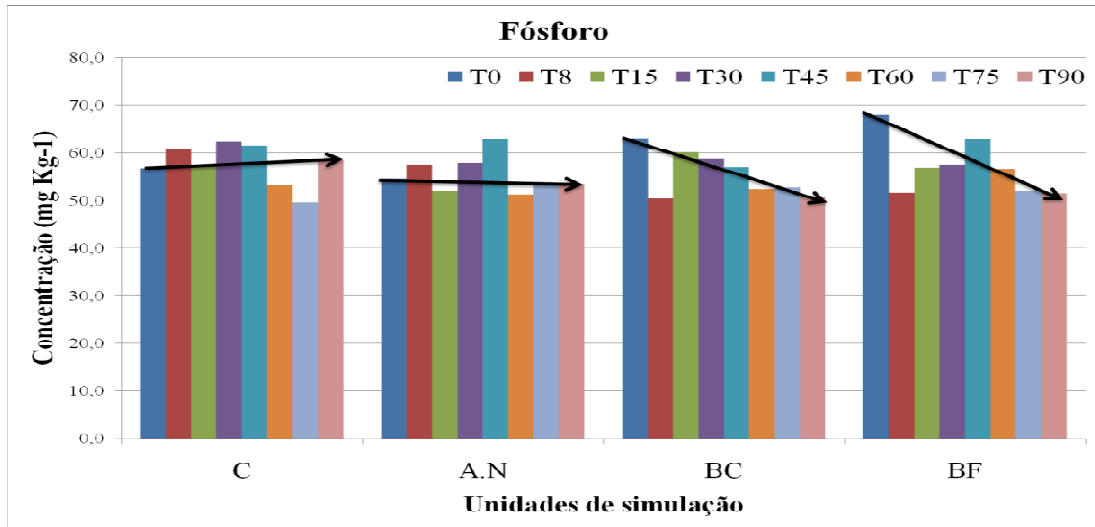
Fonte: Autor, 2016.

Alguns nutrientes são essenciais ao crescimento celular dos microrganismos, esses podem ser classificados como macro ou micronutrientes de acordo com a demanda de energia exigida para o desenvolvimento microbiano. Os macronutrientes são o nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e os micronutrientes: ferro, zinco, manganês, os quais são necessários em menor quantidade (MARIANO, 2006). Destaca entre os micronutrientes o fósforo e o nitrogênio, os quais devem estar balanceados, propiciando uma boa relação com o carbono (SIQUEIRA et al., 1994).

O fósforo ocorre na natureza na forma de fosfatos inorgânicos sendo muito utilizados no crescimento microbiano (SIQUEIRA et al., 1994). O fósforo é necessário na produção de ATP para funções metabólicas, além de constituir ácidos nucleicos, fosfolípidos e ácidos tecóicos (REGINATTO; COLLA; THOMÉ, 2011). A Figura 33 representa a média dos valores de fósforo durante os tempos amostrais. O T0 na biorremediação I e II apresentaram os maiores valores e ao decorrer do experimento foi decaindo. Provavelmente a queda do fósforo esteja relacionada ao consumo do mesmo pelos microrganismos. No gráfico também é possível notar que a presença de aditivos que compuseram as cápsulas (fibra de coco e folha de manguezais) favoreceu a concentração inicial de fósforo nos tratamentos respectivos. Em contrapartida, o controle e a atenuação natural os quais não receberam estímulo de nutrientes, as concentrações mantiveram se similares ao longo do tempo.

A produção de proteínas e ácidos nucleicos ocorre a partir da disponibilidade de nitrogênio no meio. O nitrogênio é absorvido principalmente como amônia e nitratos pelos microrganismos decompositores (SIQUEIRA et al., 1994). Através do Analisador Elementar não foi possível determinar as concentrações exatas de nitrogênio total nas unidades de simulação em função dos valores estarem abaixo do limite de detecção do equipamento. Adotou-se como valor de nitrogênio $<0,1$ em todo o período amostral. Dessa forma não foi possível observar as variações da concentração do nitrogênio entre os tempos amostras e entre os tratamentos experimentais. A partir desse fato supoe-se que o sedimento utilizado no experimento seja pobre em nitrogênio assim como a concentração da adição da folha de manguezal como aditivo foi insuficiente para exercer influência no aumento de nitrogênio.

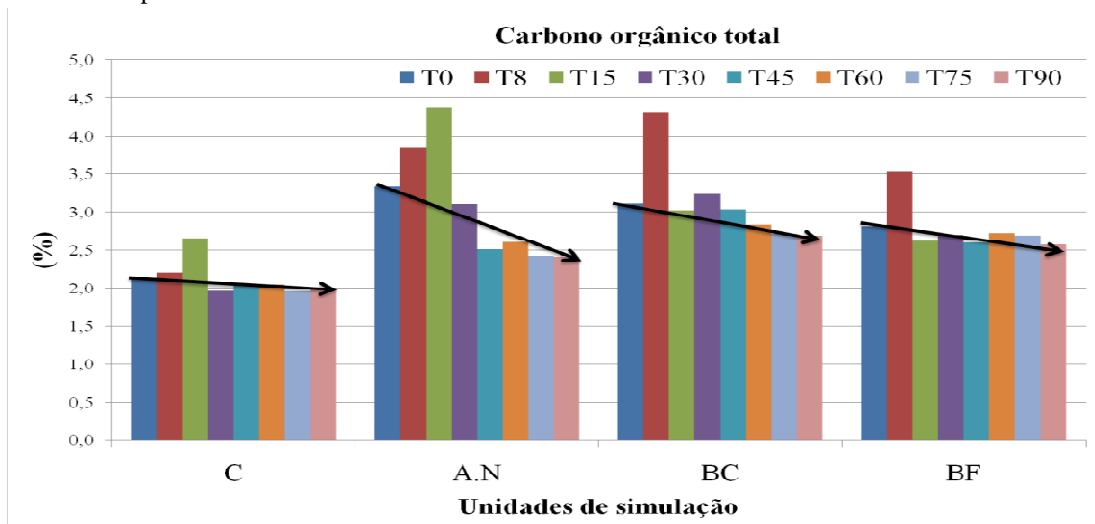
Figura 33 - Valores de fósforo nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

O carbono é a principal fonte de nutrientes da célula microbiana, constituindo 47% da matéria seca, sendo suas fontes as mais diversas, como aminoácidos, ácidos graxos, açúcares e compostos aromáticos (SIQUEIRA et al., 1994). Observando a Figura 34 nota-se que os maiores valores apresentados foram em 8 dias de experimento. Esses teores podem ser relacionados com o aumento da biomassa de fungos e bactérias em T8 (Figura 35 e 36). Em T15 também ocorreu aumento da concentração nas unidades de simulação controle e na atenuação natural. Em seguida houve redução gradual da concentração de COT. A biorremediação I apresentou o maior pico, onde também apresentou o maior UFC's bacteriana. Ressaltando a importância do carbono para a biorremediação, conforme descrito por Siqueira e colaboradores (1994) como nutriente limitante ao crescimento microbiano.

Figura 34 - Valores de carbono orgânico total (COT) nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



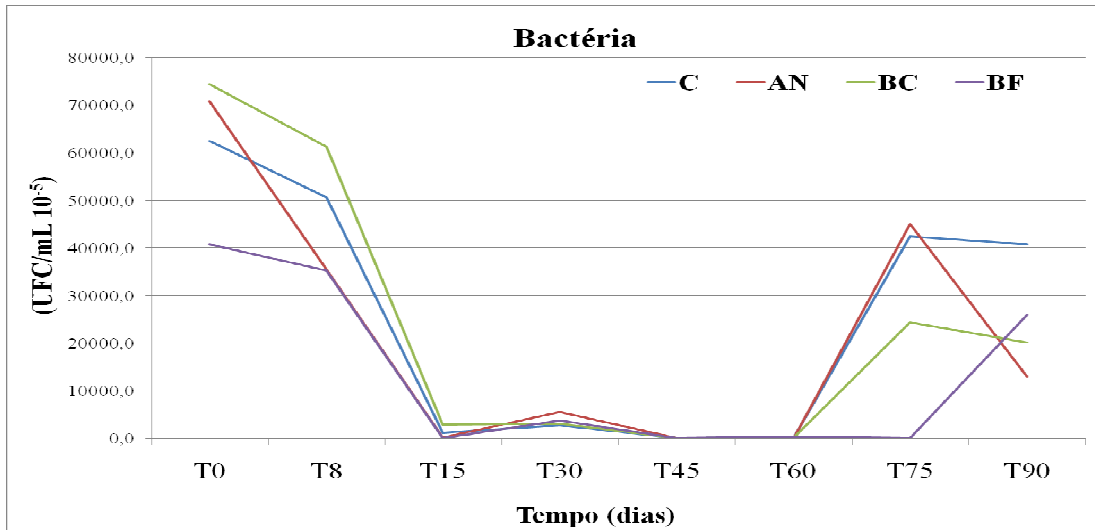
Fonte: Autor, 2016.

5.3.2 Monitoramento microbiológico

Na Figura 35, nota-se o número de células viáveis bacterianas, onde obteve maior pico de unidade formadora de colônias no início do experimento. Em T15 houve redução brusca de UFC's provavelmente devido ao período de aclimatação dos microrganismos, onde a competição entre os microrganismos e toxicidade dos compostos do petróleo tenham influência na diminuição da biomassa bacteriana. Segundo Scherr e colaboradores (2007) a composição química do substrato e a poluição por hidrocarbonetos exerce impacto sobre as populações microbianas, levando a seleção e aclimatação. Posteriormente observou-se o aumento de UFC's em T60 para C, AN e BC e T75 para BF. Em seguida foi observada redução das UFC's em T75, com exceção da biorremediação II sugerindo que a adição de folha de manguezal possa ter gerado efeito positivo no desenvolvimento das colônias bacterianas. A partir dos últimos valores de UFC' supõe-se que as bactérias mantiveram-se ativas após 90 dias. O T45 do gráfico foi adotado como zero visto que obteve-se valores infinitos de UFC's. O aparecimento desses valores pode ser relacionado com a possibilidade de contaminação através do manuseio inadequado do método de isolamento por micro gota.

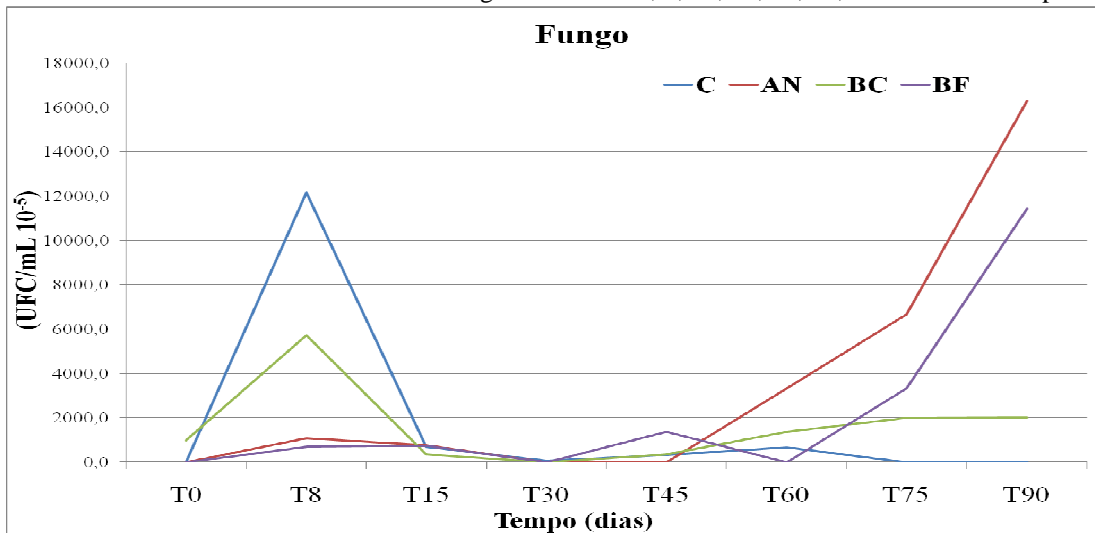
No início do experimento foi observado que a quantidade de colônias fúngica foi inferior aos demais tempos amostrais (Figura 36). Nas amostras controle e biorremediação I foi observado aumento da taxa de UFC's após 8 dias de experimento. Levando em consideração que os fungos levam em média 8 dias para se desenvolver, provavelmente esse foi o período onde houve o pico de crescimento das cepas e pode estar relacionado com a concentração de compostos menos recalcitrantes presentes em grande quantidade no sedimento, corroborando com os IB1 e FB2, os quais obtiveram menor valor em T8. Em seguida observou-se decréscimo das populações em T15, supostamente devido à depleção dos nutrientes inorgânicos disponíveis resultantes do consumo de fontes de carbono (CHAGAS-SPINELLI, 2007). A partir de 45 dias elevou-se a biomassa fúngica nas amostras de atenuação natural e biorremediação II. Ao final do experimento notou-se que o número de células viáveis foi maior que em T0. A biorremediação II, tanto para fungos quanto para bactérias obtiveram os maiores picos em 90 dias, presumindo que a adição de folha de manguezal tenha sido vantajosa no desenvolvimento de ambos os microrganismos. Apesar de T0 a T90 ter reduzido o número de células viáveis, essas ainda permaneceram ativas até o final do experimento.

Figura 35 - Unidade formadora de colônia de bactérias obtida em 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

Figura 36 - Unidade formadora de colônia de fungos obtida em 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

5.3.3 Monitoramento geoquímico

Através da análise de hidrocarbonetos totais do petróleo por cromatografia gasosa é possível observar as alterações composicionais que ocorrem com os diferentes compostos do petróleo. A Figura 37 corresponde aos perfis cromatográficos dos hidrocarbonetos totais do petróleo das amostras de sedimentos das unidades de simulação controle, atenuação natural, biorremediação I e biorremediação II no tempo 0, 30, 60 e 90 dias de experimento. O perfil de hidrocarbonetos de origem biogênica encontrado no sedimento de manguezal é relativo a Figura 37a, visto que o sedimento controle corresponde a uma amostra livre de contaminação por hidrocarbonetos do petróleo, como discutido em outras pesquisas de Moreira (2011) e

Lima (2014). Através da altura dos picos dos perfis é possível observar a redução dos hidrocarbonetos leves (nC_{10} a nC_{17}) em relação ao tempo 0 ao tempo 90 dias nas unidades de simulação.

O biorreator é um sistema fechado e pode reduzir a vulnerabilidade da amostra de óleo ao intemperismo físico e químico quando comparado a um sistema diretamente exposto a evaporação, chuva e grande variação de temperatura. Neste sentido, a diminuição dos compostos de baixo massa molecular pode estar associada a presença de microrganismos, visto que podem afetar significativamente a composição molecular e as propriedades físicas do petróleo bruto, e em razão dos compostos saturados serem os mais suscetíveis à processos intempéricos (CRUZ; MARSAIOLI, 2012; SOUZA, TRUIGÜIS, 2006).

Por outro lado, os compostos mais pesados não apresentam o mesmo comportamento. Nota-se que os n-alcenos de cadeias longas (nC_{20} a nC_{30}) apresentaram uma leve diminuição. Supõe-se que esta pequena redução foi em virtude do tempo experimental ser insuficiente para observar grandes mudanças, levando-se em consideração a grande estabilidade química destes compostos. A permanência dos compostos de elevada massa molecular foi observada em todos os perfis cromatográficos, isso se deve ao fato de que resinas e os asfaltenos possuem propriedades similares, sendo ambos considerados os grupos mais estáveis aos processos de evaporação e biodegradação (CRUZ; MARSAIOLI, 2012). Mediante essas observações, nota-se que as diferentes classes de hidrocarbonetos apresentam condições de biodegradação distinta e os compostos NSO são metabolizados de forma mais lenta.

Na Figura 37 ainda foi possível observar que entre os tratamentos experimentais a atenuação natural (AN) foi a que apresentou melhor resultado de degradação. No experimento AN houve uma redução de 71,77% dos hidrocarbonetos totais do petróleo, enquanto BC foi de 45,14% e BF de 7,3% de degradação em 90 dias. Este acontecimento foi oposto ao experimento de Li e colaboradores (2009), o qual utilizaram consórcios microbianos formado por cinco fungos e três bactérias autóctones de solo contaminado por petroderivados e obtiveram taxa de degradação de hidrocarbonetos maior quando adicionados consórcios microbianos, visto que resultou em 40,7% para bioaugmentação e 35% para atenuação natural durante a incubação por 64 dias.

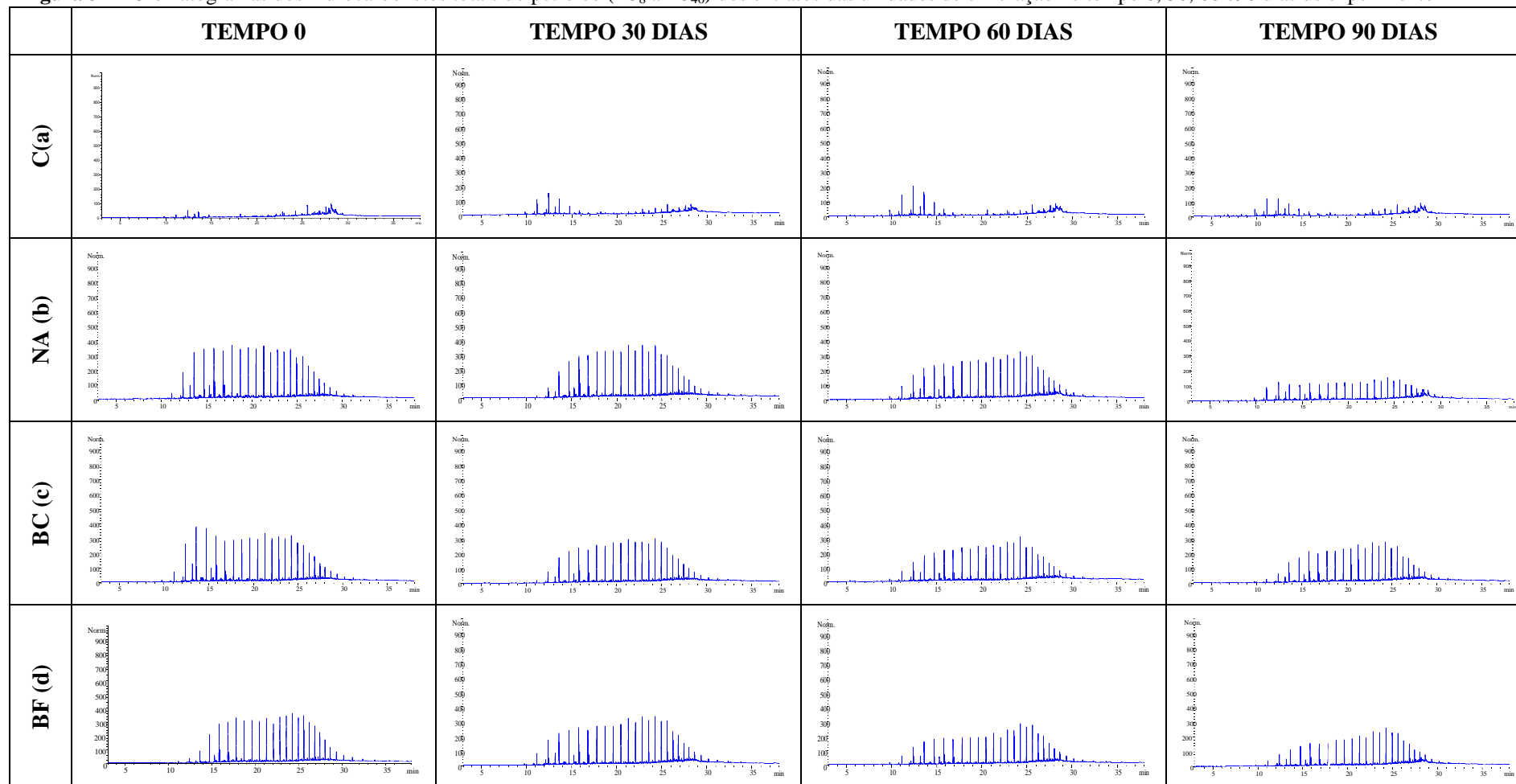
Comparando os tratamentos BC e BF observa-se que o tratamento com fibra de coco a média do HTP foi de 5265,4 mg Kg em T0 e foi para 2888,9 mg Kg em T90, mostrando-se mais eficiente do que o tratamento que utilizou folha de manguezal, onde a média de HTP foi de 3337,5 mg Kg para 3093,9 mg Kg. Isto pode estar atrelado a função absorptiva da fibra de coco, o que possivelmente facilitou o acesso dos microrganismos ao óleo (LIMA, 2014). Já a

liberação dos nutrientes por meio das cápsulas com folha de manguezal supostamente proporcionou proliferação e competição entre os microrganismos prejudicando a taxa de biodegradação. O sedimento controle também sofreu modificações em 90 dias de experimento. Esse fato pode ser justificado pela presença de microrganismos no sedimento, os quais podem ter consumido a matéria orgânica do solo e conseqüentemente levou a alteração do perfil cromatográfico.

A razão entre pristano e fitano pode ser utilizado como parâmetro indicativo de origem e degradação, uma vez que valores > 1 são indicativos de origem biogênica e valores < 1 sugerem contribuição petrogênica, entretanto outros parâmetros como a relação Pristano/n-C₁₇, Fitano/n-C₁₈ e HTP/UCM podem ser utilizados em paralelo para confirmar a degradação (STEINHAUER; BOEHM, 1992).

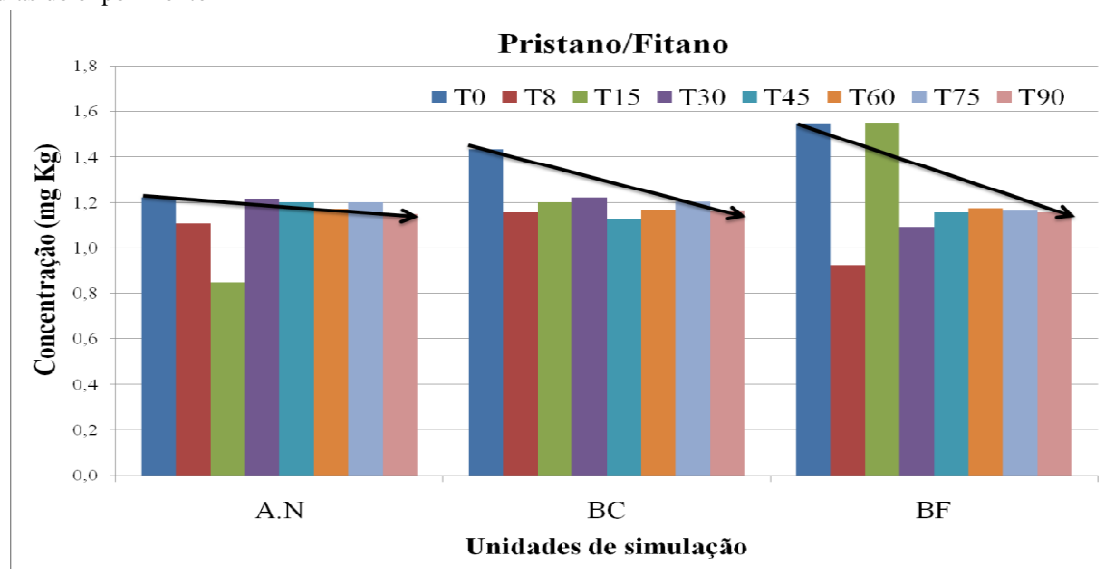
A relação Pristano/Fitano na Figura 38 apresentou redução ao longo do experimento nos três tratamentos. A alteração da relação P/F pode ser notada através da mudança na média da concentração do pristano e fitano indicando que o óleo da Bacia do Recôncavo Baiano foi degradado. Os valores de P/F na AN foram de 34,7/28,4 no T0 para 9,9/8,6 no T90, na BC foram de 26,4/18,4 para 14,3/12,2, na BF foram de 29,6/19,1 para 16,5/14,3. A média dos valores nos três tratamentos de biorremediação mostra que houve preferência de degradação pelo pristano. Uma vez comparadas às unidades de simulação é perceptível através das concentrações iniciais e finais dos isoprenóides que a atenuação natural se destacou das demais visto que apresentou maior degradabilidade. Em T15 da unidade BF a relação Pristano/Fitano aumentou, provavelmente devido à quebra dos compostos aromáticos e/ ou dos compostos NSO gerando novos compostos como ácidos saturados, aromáticos, cíclicos, acíclicos e fenóis, moléculas as quais são menores e mais fáceis de serem degradadas (CRUZ; MARSAIOLI, 2012).

Figura 37 – Cromatogramas dos hidrocarbonetos totais do petróleo (nC_8 a nC_{40}) dos extratos das unidades de simulação no tempo 0, 30, 60 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

Figura 38 - Razão Pristano/Fitano nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



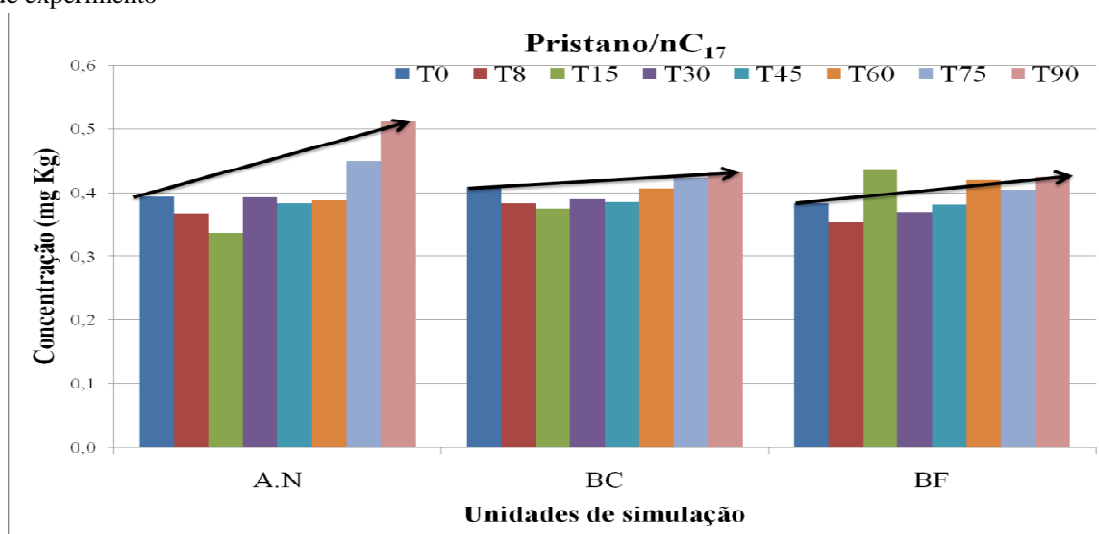
Fonte: Autor, 2016.

O pristano e o fitano são considerados recalcitrantes à biodegradação uma vez que alcanos de cadeia ramificada tendem a apresentar degradabilidade inferior, quando comparados aos n-alcanos (PEREIRA; GOMES; SORIANO, 2009), resultando num aumento significativo das proporções de Pristano/ n-C₁₇ e Fitano/ n-C₁₈ nas amostras (WANG et al., 2013). Dessa maneira as relações P/n-C₁₇ e F/n-C₁₈ têm sido amplamente utilizadas como índices de biodegradação (OVERTON et al, 1981; KENNICUTT, 1988; DIDYK; SIMONEIT, 1989; BARAKAT et al., 2001).

Na Figura 39 podemos observar que entre o T0 e o T90 a concentração da razão P/nC₁₇ aumentou em todas as unidades de simulação. Na atenuação natural houve um aumento significativo da razão Pristano/nC₁₇ em 90 dias de experimento, já a biorremediação I teve seu pico em 15 dias de experimento. Essas mudanças na relação isoprenoide/n-alcano confirmara ocorrência do processo de biodegradação. O aumento da razão pode ser justificado através da inclinação dos microrganismos presentes no sedimento em consumir nC₁₇ e conservar pristano, já que hidrocarbonetos não ramificados são mais fáceis de serem biodegradados.

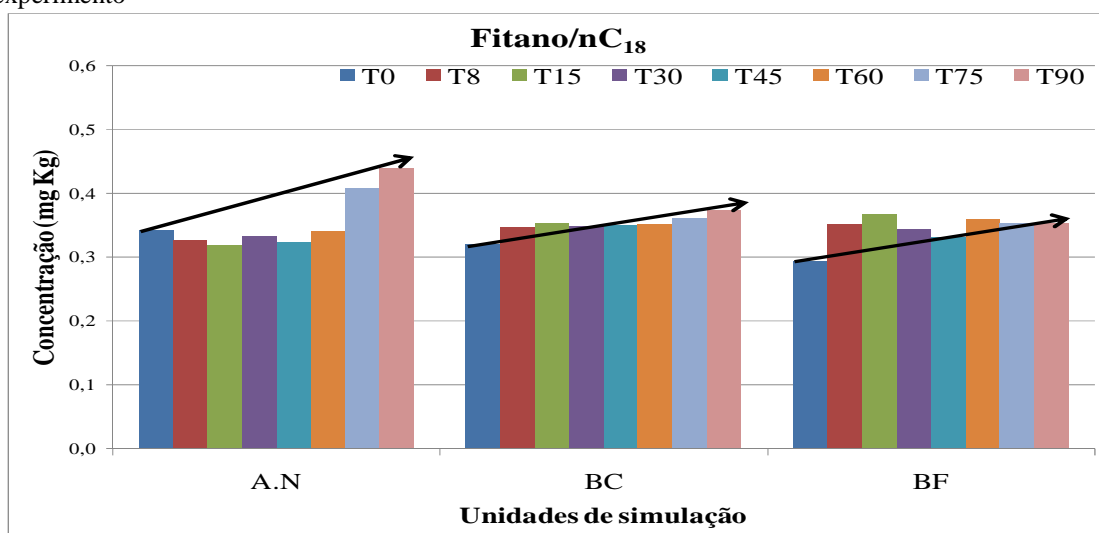
Assim como na razão P/nC₁₇, a razão F/nC₁₈ aumentou ao longo do experimento em todas as unidades de simulação. Portanto a relação comprova que ocorreu degradação em 3 meses de experimento (Figura 40). Comparando o T0 com o T90 verificou-se que o aumento da razão Fitano/nC₁₈ foi maior na unidade de simulação AN. O acréscimo da razão retrata que houve preferência pelo nC₁₈ ao invés do Fitano.

Figura 39 - Razão Pristano/ nC_{17} nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

Figura 40 - Razão Fitano/ nC_{18} nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento

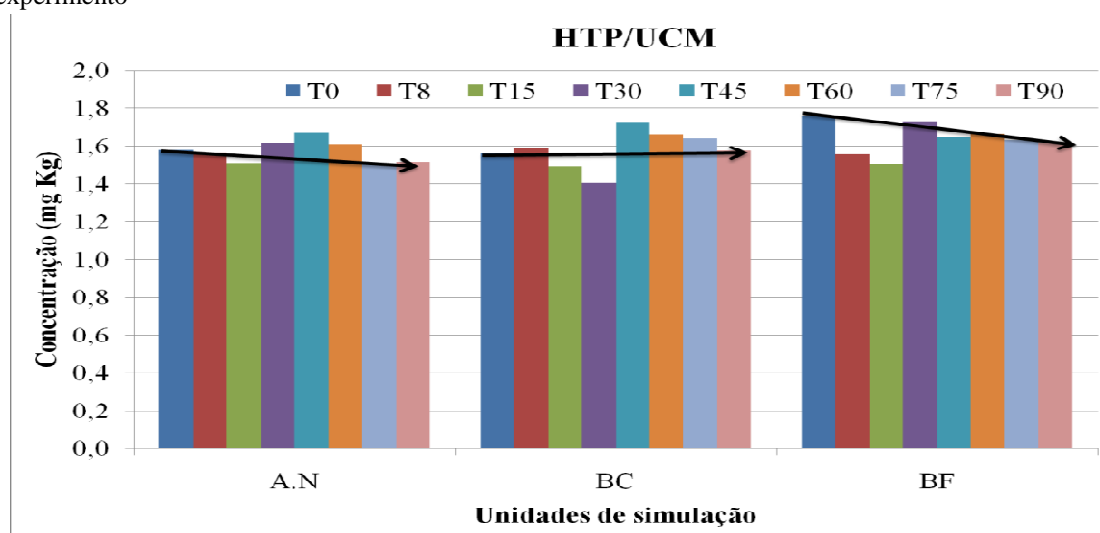


Fonte: Autor, 2016.

Ao observar a Figura 41 verifica-se que a razão HTP/UCM obteve valores similares ao longo do experimento. O tratamento AN apresentou concentração inicial de HTP e de UCM de 6894,8 e 4369,1 respectivamente e concentração final de 1946,4 e 1283,0, já o BC foi de 5265,4 e 3376,6 para 2888,9 e 1874,4, o tratamento BF obteve 3337,5 e 1897,6 para 3093,9 e 1888,1 evidenciando que a concentração de ambos os parâmetros sofreu alteração ao longo de 90 dias em todos os tratamentos. Deste modo a diferença entre as concentrações iniciais e finais dos parâmetros são representadas como AN>BC>BF.

Levando em consideração que os hidrocarbonetos mais leves são preferencialmente removidos durante a biodegradação inicial, espera-se o aparecimento de *unresolved complex mixture* (UCM) e conseqüentemente a redução da razão HTP/UCM. Todavia compostos contendo enxofre, nitrogênio e oxigênio também podem ser biodegradados, (CRUZ; MARSAIOLI, 2012). visto que são macronutrientes essenciais para o desenvolvimento dos microrganismos. O comportamento da razão pode ser justificada pelo fato de que os diferentes microrganismos presentes no sedimento possam ter capacidade de quebrar tanto as moléculas de hidrocarbonetos leves quanto dos compostos NSO e conseqüentemente contribuir na similaridade da razão ao longo do tempo experimental.

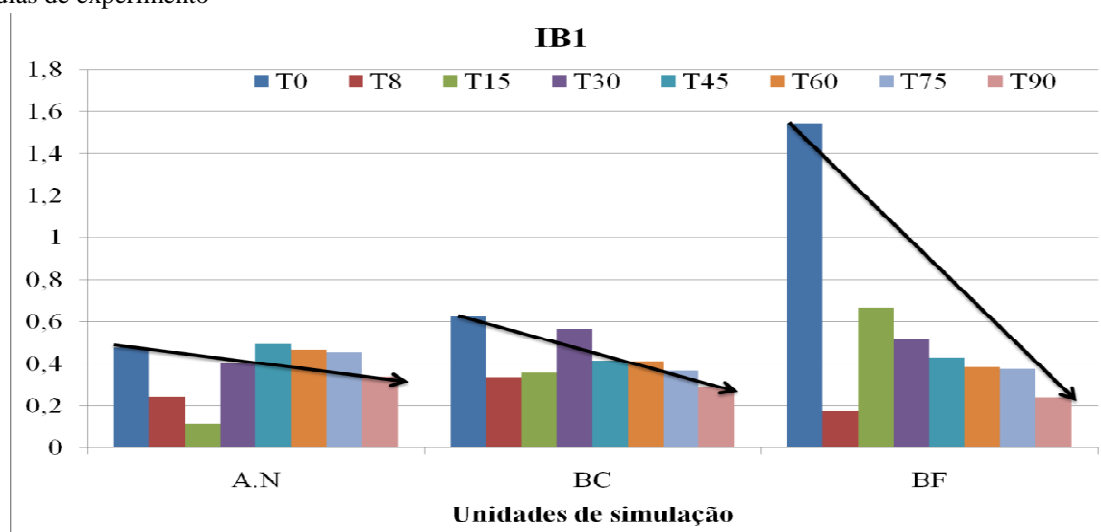
Figura 41 - Razão HTP/UCM nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

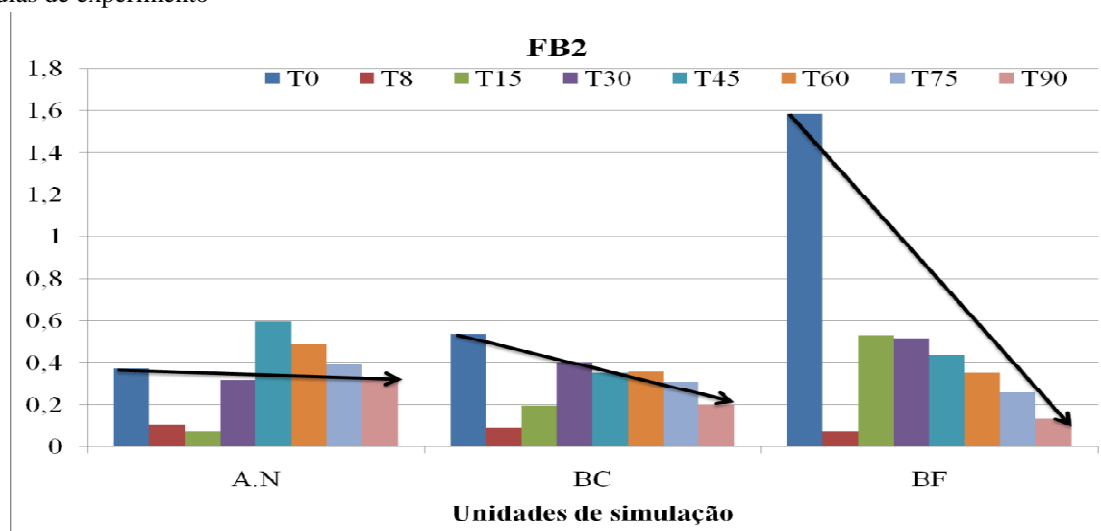
Os índices IB1 (índice de biodegradação) e FB2 (fase de biodegradação) são comumente utilizados para avaliar intemperismo do petróleo conforme sugerido por Barakat e colaboradores (2001) e Reyes (2015). Desprezando o intemperismo físico e químico por ser relativamente menor ao biológico no sistema de biorreator, pode-se avaliar a biodegradação. A relação par-ímpar entre n-alcenos leves e pesados representados na Figura 42 e 43 demonstra processo de biodegradação. Cujos valores diminuíram ao longo do tempo em todas as unidades. Ambos os índices agiram de forma similar, retificando a preferência dos compostos mais leves principalmente no período inicial de exposição ao petróleo (T8). A biorremediação II (BF) apresentou a maior diferença entre os tratamentos em ambos os índices.

Figura 42 - Índice de biodegradação nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

Figura 43 - Fase de biodegradação nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

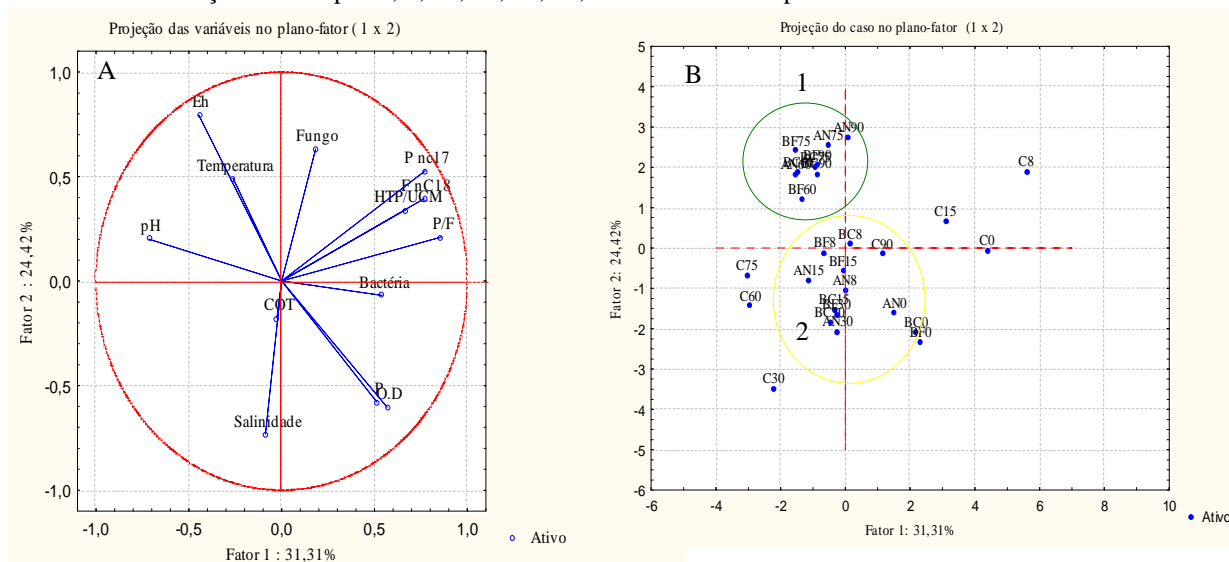
5.3.4 Integração dos dados

A integração dos dados obtidos com o monitoramento dos parâmetros físico-químicos, geoquímicos e microbiológicos utilizando a análise de componentes principais (ACP) podem ser explicados por 55,73 % de variância entre dois fatores. A primeira componente é responsável por explicar 31,31 % da variância e a segunda componente é responsável por explicar 24,42 % da variabilidade dos dados (Figura 44a e 44b). No gráfico de pesos PC1 a maioria das variáveis tendem a se localizar a direita do diagrama, mostrando que estão correlacionadas positivamente, exceto o COT e a salinidade (Figura 44a). Analogamente pH, Eh, temperatura, fungo, P/F, P/nC₁₇, F/nC₁₈

e HTP/UCM estão correlacionados positivamente entre si e negativamente com as variáveis bactéria, P, salinidade, O.D e COT pois essas variáveis tendem a se localizar na parte inferior, enquanto que a maioria tende a localizar-se na parte superior.

A Figura 44b mostra o gráfico dos escores nas duas primeiras componentes. Na primeira componente (31,31% da informação) podem ser observados dois grupos. No grupo 1 nota-se que os tempos 45, 60, 75 e 90 estão correlacionados positivamente entre si, com exceção da unidade de simulação controle. Esses tempos foram influenciados principalmente pela temperatura e pelo Eh, ou seja, quando um aumenta o outro aumenta também. No grupo 2 estão os tempos 0, 8 e 15 sendo influenciados pela mudança dos valores de COT, P, O.D e salinidade.

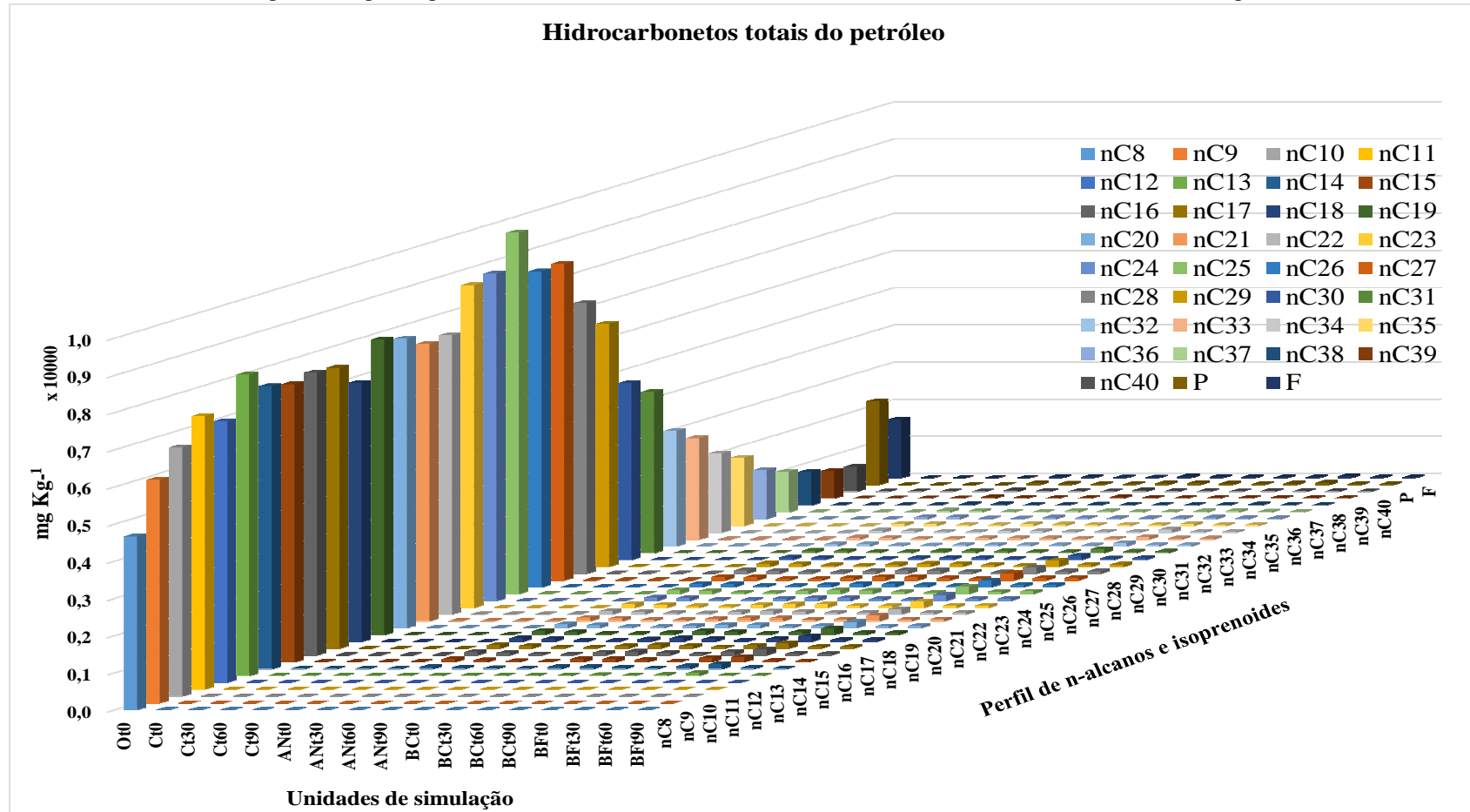
Figura 44 - Análise dos componentes principais dos parâmetros físico-químicos monitorados nas unidades de simulação nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

Na Figura 45 encontra-se o perfil de n-alcenos e isoprenoides para o petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano durante 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento. Este exibe elevada depleção para os compostos monitorados. Os alcanos nC_8 , nC_9 , nC_{10} , nC_{11} , nC_{12} , nC_{36} , nC_{37} , nC_{38} , nC_{39} e nC_{40} mostraram concentrações abaixo do limite de quantificação (LDQ) ao longo do experimento. O Pristano e o Fitano exibiram redução da sua concentração de 0 a 90 dias indicando degradação do óleo.

Figura 45 - Perfil de n-alcenos e isoprenoides para o petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano durante 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

A biodegradação do Pristano e do Fitano ocorre na natureza, se mostrando apenas lenta quando comparada à taxa de consumo de alcanos lineares que apresentam tempos de retenção em colunas cromatográficas semelhantes (nC_{17} e nC_{18}). Estudos relatam que sua mineralização por espécies de *Brevibacterium*, *Corynebacterium* e *Rhodococcus* pode ocorrer por β ou ω -oxidação desde que o carbono β esteja disponível para o ataque (PEREIRA; GOMES; SORIANO, 2009).

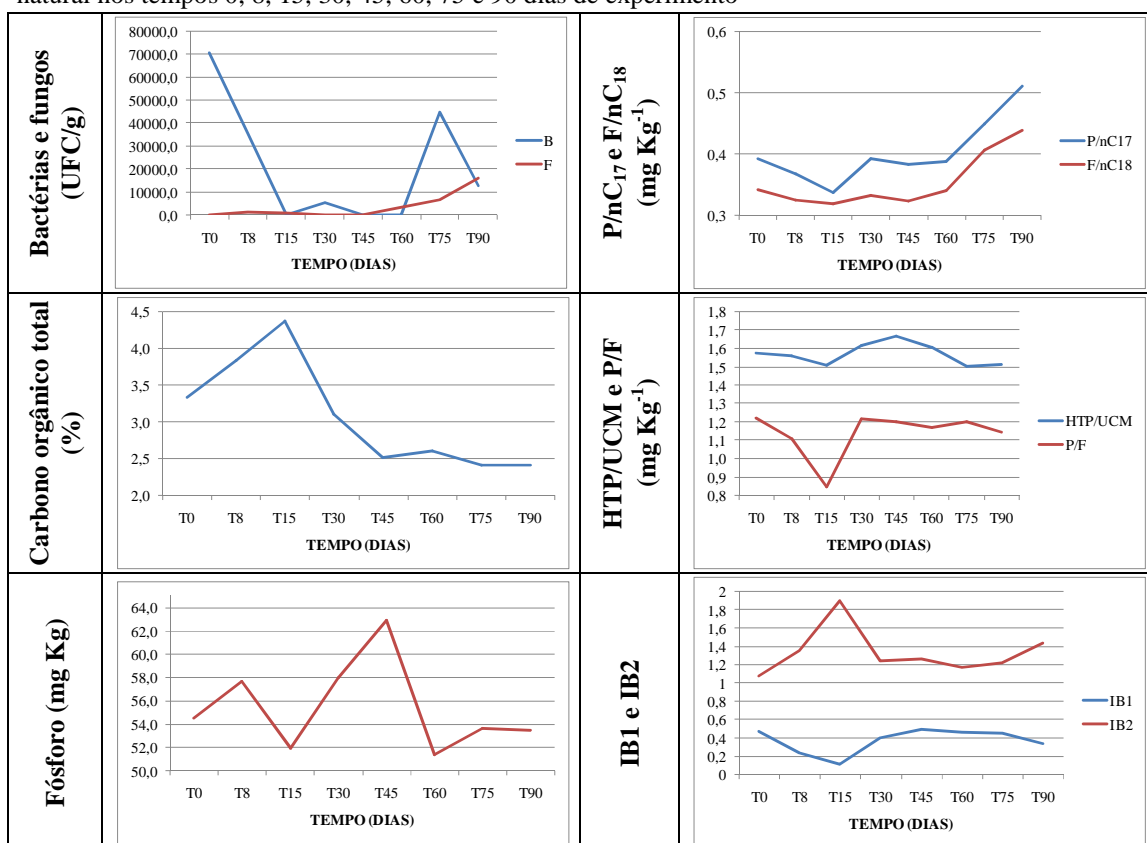
Na Figura 46 estão plotados os dados da unidade de simulação atenuação natural. As concentrações de COT e fósforo obtiveram resposta inversamente proporcional em 45 dias de experimento. Neste sentido a taxa de fósforo apresentou o maior pico em T45 e os valores de COT decaíram. A quantidade de UFCs de fungos manteve-se praticamente constante até T45, onde iniciou aumento. Provavelmente estes estavam em processo de ajuste a mudanças em seu habitat devido derrame do petróleo (aclimatização). Em contrapartida, houve redução drástica da UFCs de bactérias em 15 dias de experimento. Possivelmente estes sejam mais sensíveis ao contaminante.

As razões P/nC_{17} e F/nC_{18} apresentaram resposta similar aumentando ao longo de 90 dias. Assim sendo demonstra que houve degradação preferencial dos alcanos lineares nC_{17} e nC_{18} . A razão HTP/UCM não obteve diferença significativa. Já a razão P/F apresentou maior redução em T15 e posterior aumento.

A relação P/nC_{17} e F/nC_{18} foi uniforme ao longo do experimento, indicando que houve preferência dos microrganismos na mineralização dos compostos mais leves. O aumento da razão HTP/UCM ocorreu em T45. Provavelmente nos primeiros 30 dias de experimento os microrganismos quebram as moléculas de carbono gerando compostos mais leves e conseqüentemente houve o aumento da razão HTP/UCM em T45. O índice de biodegradação II corrobora com a afirmação anterior, visto que a razão entre n-alcanos leve e pesados diminui em T30. Em seguida aumenta e mantém-se em regressão, indicando a ocorrência de degradação (Figura 47).

As razões P/F e HTP/UCM diminuiu ao longo de 90 dias, sugerindo a ocorrência do processo de biodegradação. Por outro lado, as razões P/nC_{17} e F/nC_{18} aumentou sendo indicativo também de biodegradação. Com 75 dias observou-se um aumento de UFCs e diminuição dos teores de fósforo. O crescimento dos microrganismos ao final do experimento supõe que ao processo de degradação possa dar continuidade. Os índices B1 diminuiu e B2 aumentou ao longo do experimento. Este episódio esteve em concordância com o processo de biodegradação (Figura 48).

Figura 46 - Análise dos parâmetros biogeoquímicos monitorados na unidade de simulação atenuação natural nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

Figura 47 - Análise dos parâmetros biogeoquímicos monitorados na unidade de simulação biorremediação I nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento

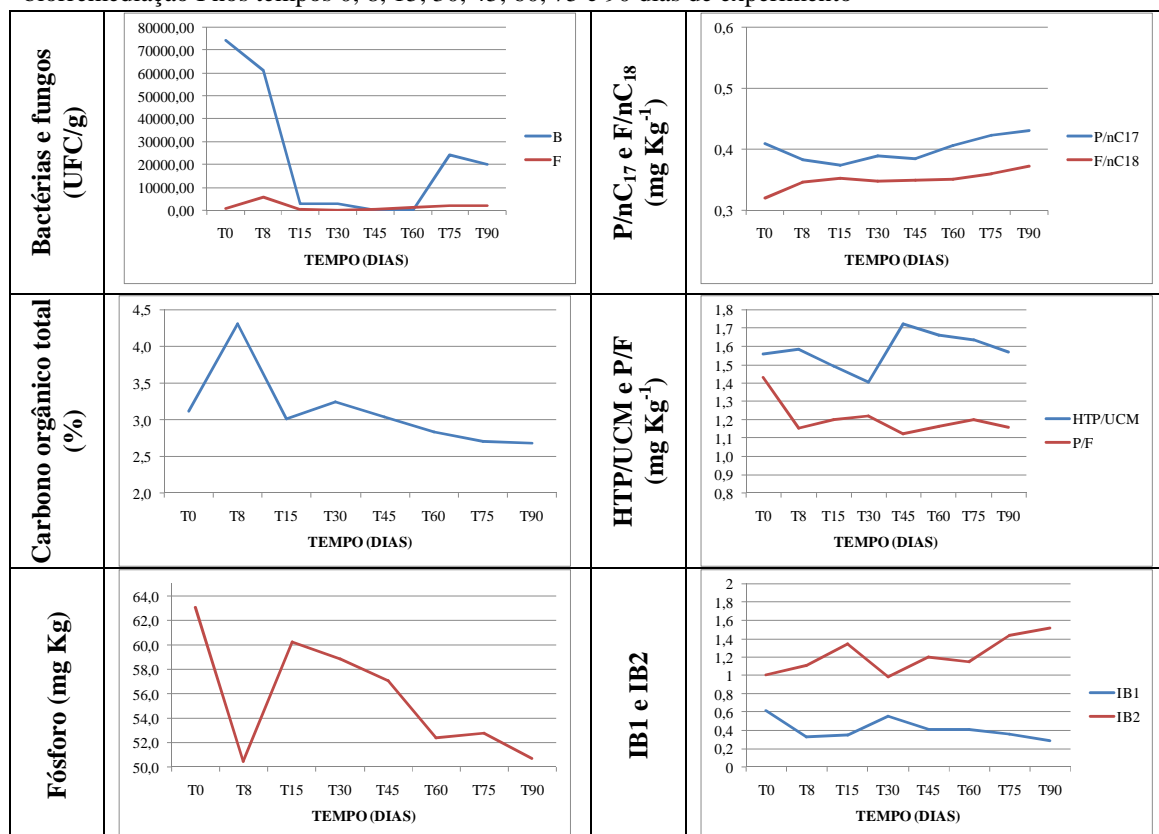
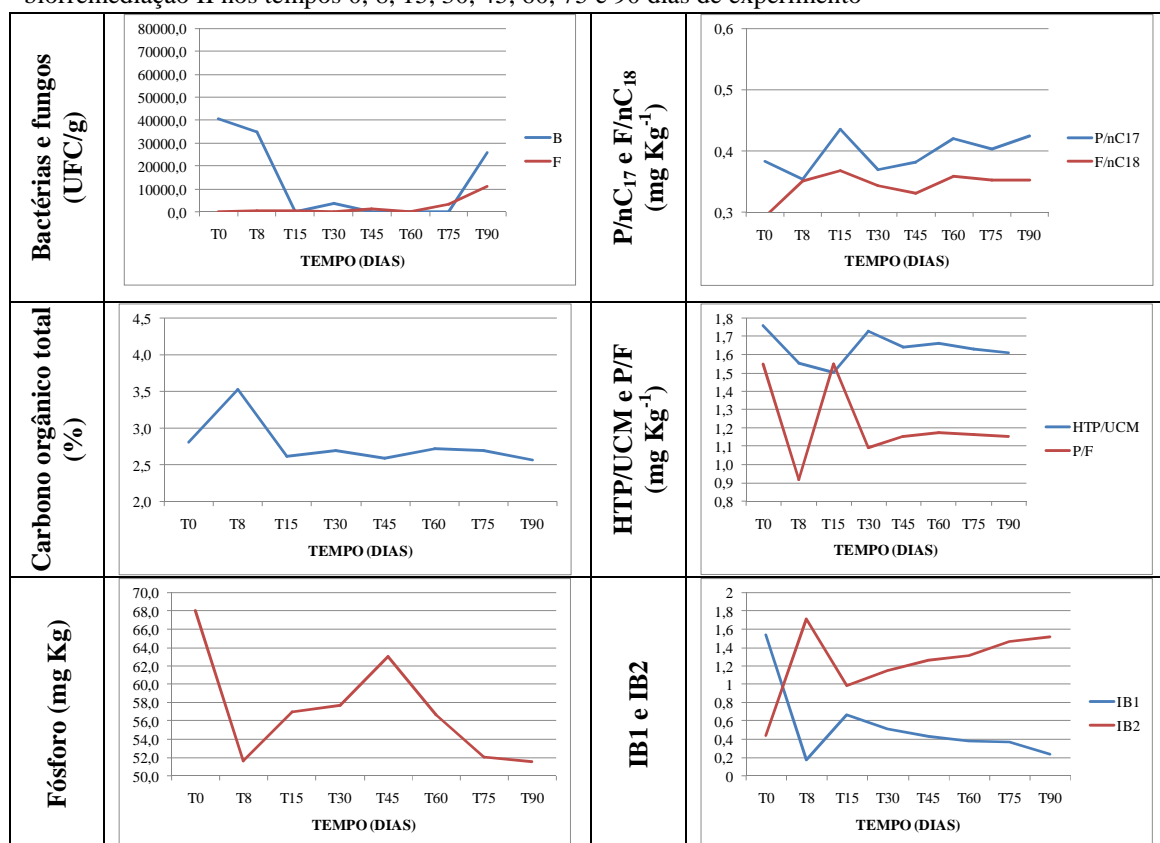


Figura 48 - Análise dos parâmetros biogeoquímicos monitorados na unidade de simulação biorremediação II nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento



Fonte: Autor, 2016.

5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da visualização dos cromatogramas foi possível observar que o petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano sofreu modificações ao longo de 90 dias de experimento. Apresentou redução desde os alcanos mais leves até uma fração dos hidrocarbonetos mais pesados. A relação dos parâmetros geoquímicos: P/F, Pristano/nC₁₇, Fitano/nC₁₈, HTP/UCM, IB1, IB2 e FB comprovaram a biodegradação do óleo.

Em geral os resultados apontam que ambos os consórcios são capazes de degradar os HTP do óleo da Bacia do Recôncavo Baiano. Entretanto a atenuação natural apresentou maior degradabilidade de HTP representada por 71,77% enquanto que a biorremediação I e II foram responsáveis por 45,14% e 7,3% respectivamente. Provavelmente a adição de microrganismos e nutrientes ao sistema estudado possa ter aumentado a competição e consequentemente alterado o processo de degradação. Assim sendo, fica evidente a necessidade de ajustes na concentração dos mesmos para promover sua aplicabilidade em processo de biorremediação de manguezais contaminados por óleo.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos durante o experimento de biorremediação em sedimento de manguezal contaminado com óleo da Bacia do Recôncavo Baiano através da bioestimulação e bioaugmentação de microrganismos autóctones, chegaram-se as seguintes conclusões.

O processo de biorremediação demonstrou ser eficiente degradando 71,77% dos HTP no tratamento de atenuação natural, 45,14% na biorremediação I e 7,3% na biorremediação II. Apesar de não ter alcançado remoção total do petróleo a aplicação da mesma em manguezais contaminados pode ser favorável a remediação.

Os testes de oxidação utilizando o indicador redox DCPIP mostraram a potencialidade metabólica dos microrganismos em degradar hidrocarbonetos por meio da descoloração do indicador, reafirmando a eficácia do método. O método permitiu selecionar diferentes microrganismos com preferência distinta quanto oxidação da fração do petróleo e quanto o período de oxidação mais rápido.

Por meio do teste de antagonismo foi possível observar que 12 cepas bacterianas e 26 cepas fúngicas podem viver de forma harmônica quando submetidas a testes *in vitro*. Através das etapas metodológicas foi possível montar um consórcio contendo fibra de coco em pó e outro com folhas de manguezais, ambos com 38 cepas de microrganismos de diferentes espécies e gêneros. Os demais apresentaram eficiência distinta, entretanto mostraram-se promissores para biorremediação em manguezal contaminado.

Os cromatogramas mostraram que petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano sofreu modificações desde os hidrocarbonetos mais leves aos mais pesados em um período de 90 dias. O resultado das relações entre os isoprenoides utilizados como biomarcadores, o pristano e fitano e os n-alcenos nC_{17} e nC_{18} demonstram que ocorreu degradação biológica em todos os tratamentos, assim como comprovando a eficácia da ação microbiana no experimento.

O comportamento das concentrações de HTP ao longo de 90 dias demonstraram a capacidade dos microrganismos em degradar esse tipo de contaminante sendo que a eficiência dos tratamentos em escala laboratorial seguiram a seguinte ordem AN<BC<BF. A maior taxa de remoção de HTP através da atenuação natural evidencia a necessidade de entendimento da interação entre os microrganismos e o meio abiótico

sendo necessário aprofundar os estudos em relação a diferentes concentrações do consórcio e dos nutrientes utilizados neste experimento.

A junção das técnicas de bioaumento e bioestímulo podem favorecer a degradação e reduzir o tempo de tratamento desde que sejam utilizados da forma correta. Sugere-se estudos mais detalhados em relação a combinação das técnicas de bioaumento e bioestímulo, além de avaliar possível geração de co-produtos tóxicos ao ecossistema manguezal na aplicação das cápsulas. É necessário realizar a identificação molecular dos microrganismos que compuseram o consórcio e isolar as enzimas responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos, a fim de obter melhores interpretações a respeito do processo de biodegradação.

REFERÊNCIAS

- ABED, R. M. M.; Al-SABAHI, J.; Al-MAQRASHI, F.; Al-HABSI, A.; Al-HINAI, M. Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated sediments in the Sultanate of Oman and evaluation of bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, p. 58–66, 2014.
- ADELAJA, O.; KESHAVARZ, T.; KYAZZE, G. The effect of salinity, redox mediators and temperature on anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in microbial fuel cells. **Journal of Hazardous Materials**, v.18, p. 283-211. 2015.
- ALMEIDA, D.G.; CAVALCANTE, J. P. C. M.; CAVALCANTI, D. L.; SILVA, M. G. C.; SOUSA, M.F.V.Q. Estudo comparativo da biodegradação de combustível de navegação entre dois consórcios microbianos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 52. 2012, Recife. **Anais...Pernambuco**, 2012.
- ALMEIDA, L. V.; SILVA, J. J. M. C. Principais técnicas de biorremediação in situ utilizadas na recuperação de áreas contaminadas por derivados de petróleo. In: MOSTRA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA, 5. 2010, Goiânia. **Anais... Goiânia: Ciência para o Desenvolvimento Sustentável**. Editora da PUC Goiás, p. 20, 2010.
- ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de Solos contaminados por Petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.
- ANGELIM, A. L.; COSTA, S. P.; FARIAS, B. C. S.; AQUINO, L. F.; MELO, V. M. M. An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosanbeads. **Journal of Environmental Management**, v. 127, p. 10 – 17, 2013.
- ATLAS, R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 4–12, p.178–182, 1995.
- ATLAS, R. M. **Petroleum microbiology**. New York: Macmillan Publishing Co.1984.
- BALAJI, V.; ARULAZHAGAN, P.; EBENEZER, P. Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. **Journal of Environmental Biology**, v.35, n. 3, p. 521-529, 2014.
- BARAKAT, A. O.; QIANB, Y.; KIMB, M.; KENNICUTT, M. C. Chemical characterization of naturally weathered oil residues in arid terrestrial environment in Al-Alamein, Egypt. **Environment International**, v. 27, n. 4, p. 291–310, 2001.
- BARBOSA, N. P. da S.; NASCIMENTO, I. de O.; SILVA, P. B. R.; CAVALCANTE, D. L. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo manejado com herbicidas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 8. 2013. Porto Alegre. **Resumo...Rio Grande do Sul: Cadernos de Agroecologia**, v. 8, n. 2, 2013.

BEHNOOD.M.; NASERNEJAD, B.; NIKAZAR, M. Biodegradation of crude oil from saline waste water using white rot fungus *Phanerochaete techrysosporiu*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 1879–1885, 2014.

BIDOIA, E.D, MONTAGNOLLI, R.N., LOPES, P.R.M. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. **Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, p. 1277-1288, 2010.

BISOGNIN, R. P. **Análise do potencial microbiano de uma biopilha na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos**. 2012. 140f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) - Universidade de Santa Cruz do Sul, 2012.

BRITO, E. M. S.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; PEYRUSE, A. R.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M. A. WASSERMAN, J. C. A.; DURAN, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**, v.157, p. 752–762, 2006.

BUENO, S. M. **Bactérias produtoras de biossurfactantes: isolamento, produção, caracterização e comportamento num modelo**. 2008. 99f. Tese (Doutorado em engenharia e ciências dos alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2008.

CANTAGALLO, C; MILANELLI, J. C. C.; BRITO, D.D. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 1-12, 2007.

CAVELHÃO, G. **Biorremediação de resíduo contaminado com diesel proveniente do beneficiamento de geodos de ágata**. 2011. 57f. Trabalho de conclusão de curso (graduação em engenharia ambiental) - Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, 2011.

CELINO, J. J.; QUEIROZ, A. F. Fonte e grau da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da baía de Todos os Santos, Bahia. **Revista Escola de Minas**, Ouro Preto, v. 59, n. 3, 2006.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Investigação para biorremediação In: CETESB. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas**. São Paulo: CETESB, 2004. Disponível em: < <http://areascontaminadas.cetesb.sp.gov.br/manual-de-gerenciamento/>> Acesso em:03 jun 2015.

CHAGAS-SPINELLI, A. C. O. **Biorremediação de solo argiloso contaminado por hidrocarbonetos poliáromáticos provenientes de derrame de óleo diesel**. 2007, 184f. Tese (Doutorado em Geociências) - Universidade Federal de Pernambuco, 2007.

CHI, X. Q.; ZHANG, J. J.; ZHAO, S.; ZHOU, N. Y. Bioaugmentation with a consortium of bacterial nitrophenol-degraders for remediation of soil contaminated with three nitrophenol isomers. **Environmental Pollution**, v. 172, p. 33-41, 2013.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M. de; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciências e agrotecnologia**, v.32, n. 3, 2008.

COUTINHO, H. D.; BARBOSA, A. R. **Fitorremediação**: considerações gerais e características de utilização. Lisboa. Portugal, v. 15, n. 1, p. 103 - 117, 2007.

CRUZ, G. F. da; MARSAIOLI, A. J. Processos naturais de biodegradação do petróleo em reservatórios. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 8, 2012.

DELLAGNEZZE, B. M.; SOUSA, G. V. DE; MARTINS, L. L.; DOMINGOS, E. E. G. L.; VASCONCELLOS, S. P. DE; CRUZ, G. F. da; OLIVEIRA, V. M. Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. **Marine Pollution Bulletin**, v. 89, n 1–2, p. 191–200, 2014.

DEON, M. C.; ROSSI, A. de; DAL’MAGRO, C; REINEHR, C. O.; COLLA, L. M. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural. Semina: **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 73-82, 2012.

DEYEMO, A. J. **Bioremediation of brazilian soils contaminated with used lubricating oil**. 2013. 108f. Tese (Doutorado em solos e nutrição de plantas) – Departamento de solos, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2013.

DIAS, F.G. **Utilização de consorcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo**. 2007. 106f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo Campinas, 2007.

DIDYK, B.M; SIMONEIT, B.R. Hydrothermal oil of Guaymas Basin and implications for petroleum formation mechanisms. **Nature**, v. 342, p 65– 70, 1989.

DINIS, M. A.; MONTEIRO, A.; BOAVENTURA, R. Tratamento de águas residuais: o papel das microalgas. **Revista da Faculdade de Ciência e Tecnologia**, v. 1, p. 41-54, 2004.

DORS, G. **Hidrólise enzimática e biodigestão de efluentes da indústria de produtos avícolas**. 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

ELLEGAARD-JENSEN ,L.; KNUDSEN, B.E.; JOHANSEN, A.; ALBERS, C.N.;AAMAND, J; ROSENDAHL, S. Fungal-bacterial consortia increase diuron degradation in water-unsaturated systems. **Science of Total Environment**, n. 466-467, p.699-705, 2014.

EL-SHEEKH; M. M.; HAMOUDA, R. A.; NIZAM, A. A. Biodegradation of crudeoil by *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris* growing under heterotrophic conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 82, p. 67–72, 2013.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas do solo, plantas e fertilizantes**. 2ª ed. Brasília – DF: Embrapa informação Tecnológica. 2009. 627 p.

FESTA S.; COPPOTELLI, B.M.; MORELLI, I.S. Comparative bioaugmentation with a consortium and a single strain in a phenanthrene-contaminated soil: Impact on the bacterial community and biodegradation. **Applied Soil Ecology**, v.98, p. 8–19, 2016.

FIORAVANTI, K. L. **Seleção de consórcios microbianos de sedimentos de manguezais com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo**. Salvador, Bahia, 2013. 148f. Tese (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2006.

FURUKAWA, G. G.; SANTOS, R. de M. Estudo da aplicação de material estruturante e bioestímulo na biorremediação de solos contaminados por petróleo. In: JORNADA DO PROGRAMA DE CAPACITAÇÃO INSTITUCIONAL, 1. 2007. **Anais...** Centro de Tecnologia Mineral, 2007,11 p.

GAGLIANONE, P. C., TRINDADE, L. A. F. Caracterização Geoquímica dos óleos da Bacia do Recôncavo. **Geochimica Brasiliensis**, v. 2, n. 1, p. 15-39, 1988.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M; de L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biociência & Desenvolvimento**, n. 34, p. 36-43, 2005.

GRADY, C. P. L. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 660-674, 1985.

HADLICH, G. M. Mapeamento de apicuns e manguezais na Baía de Todos os Santos. Disponível em:<http://www.nea.ufba.br/apicum/MAPA_APICUNS%20BTS.jpg> Acesso em: 16 jun. 2014.

HANSON, K. G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v.7, n.10, p. 745-748, 1993.

HATJE, V.; ANDRADE, J. B. de. Introdução In: HATJE, V.; ANDRADE, J. B. de (Org.) **Baía de Todos os Santos: Aspectos Oceanográficos**. EDUFBA, Salvador, 2009, 304 p.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. de O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciências Rural**, v. 37 n. 4, 2007.

JONES, C. M. A bioaugmentação pode ajudar os sistemas de tratamento de efluentes. 21 p. Disponível em:<http://www.tratamentodeagua.com.br/r10/Lib/Image/bib__17056251>

72_A%20Bioaumenta%C3%A7%C3%A3o%20pode%20ajudar%20os%20Sistemas%20de%20Tratamento%20de%20Efluentes.pdf> Acesso em: 20 nov 2014.

KARTHIKEYAN, K.; BHANDARI, A. Anaerobic biotransformation of aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in soil microcosms: a review. **Journal of Hazardous Substance Research**, v.3, n. 3, p. 1-19, 2001.

KENNICUTT, M.C. The effect of biodegradation on crude oil bulk and molecular composition. **Oil Chemical Pollution**. n. 4, p. 89– 112, 1988.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCAU, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier. 2002. 1104 p.

LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, n.3, 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.

LEE, H.; JANG, Y.; CHOI, Y. S.; KIM, M. J.; LEE, J.; LEE, H.; HONG, J. H.; LEE, Y. M.; KIM, G. H.; KIM, J. J. Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs. **Journal of Microbiological Methods**, v. 97, p. 56–62, 2014.

LI, X. J.; LIN, X.; LI, P. J; LIU, W.; WANG, L.; CHUKWUKA, K. S. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. **Journal Hazard Mater**, v.172, n. 2-3, p. 601-605, 2009.

LIMA, D. F. **Avaliação de processos geoquímicos e da eficiência de consórcio fúngico em testes de simulação da biorremediação em sedimento de manguezal contaminado com óleo**. 2014. 224f. Tese (Doutorado em Geologia) - Universidade Federal da Bahia. Salvador, Bahia, 2014.

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, D. F.; OLIVEIRA, O. M. C. de; CRUZ, M. J. M. Utilização dos fungos na biorremediação de substratos contaminados por petróleo: estado da arte. **Cadernos de Geociências**, Salvador, v. 8, n. 2, 2011.

LIU, W; LUO, Y; TENG, Y; LI, Z; MA, L.Q. Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. **Environmental Geochemistry and Health**, v.32, p. 23-29, 2010.

MACIEL, C. C. S.; TAKAKI, G. M. C.; GUSMÃO, N. B. Potencialidade de fungos filamentosos em degradar óleos lubrificantes. **Revista Eclesiástica Brasileira**, Petrópolis, v. 3, n. 1, p. 58-64, 2010.

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

MENEGHETTI, L. R. R. **Biorremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. 2007. 113f. Dissertação (Mestrado em Engenharia)-Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo. 2007.

MESQUITA, A. C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. 2004. 171f. Dissertação (Doutorado em Ciências em Engenharia Civil) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

MOREIRA, I.T.A. **Avaliação da eficiência de modelos de remediação aplicados em sedimentos de manguezal impactados por atividades petrolíferas**. 2011. 163f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio ambiente) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia. Salvador, Bahia, 2011.

MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. **Microbiological Research**, v. 165, n. 5, p. 363–375, 2010.

MULLIGAN, C. N. Environmental Applications for Biosurfactants. **Environmental Pollution**. v. 133, p. 183-198, 2005.

NOAA - NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION. Environmental Sensitivity Index for Coastal Areas. 2014. Disponível em: <<http://response.restoration.noaa.gov/esi>> Acesso em: 20 nov 2014.

OLIVEIRA, C. G. B de. **Utilização de fontes liofílicas de nitrogênio e fosforo para biorremediação de petróleo em areia de praia**. 2011. 48 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade de Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, 2011.

OLIVEIRA, S. D.; LEMOS, J. L. S. Biodegradação de Petróleo de solo areno-argiloso por fungo filamentosos. In: XIII JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL. Rio de Janeiro, RJ, 2005. **Anais eletrônicos...** Rio de Janeiro, 2005.

ONOFRE, C. R. de E.; CELINO, J. J.; NANO, R. M. W.; QUEIROZ, A. F. de S. Biodisponibilidade de metais traços nos sedimentos de manguezais da porção norte da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, 2007.

OVERTON, E. B.; MCFALL, J. A.; MASCARELLA, S.W.; STEELE, C.F.; ANTOINE S.A.; POLITZER JR, LASETER JL. Identification of petroleum sources after a fire and oil spill. In: International Oil Spill Conference Proceedings, 1981. **Proceedings...** v. 1981, n. 1, p. 541-546, 1981.

PEREIRA JR., N; GOMES, E. DE B.; SORIANO; A. U. **Biodegradação de hidrocarbonetos**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Escola de Química. 2009. 76p. v.3.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. de. Uso de microrganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 995 – 1006, 2012.

PINHATIA, F. R.; AGUILAB, E. M. D.; TÔRRES, A. R.; SOUSA, M. P. de; SANTIAGO, V. M. J.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. **Química Nova**, v. 37, n. 8, p. 1269-1274, 2014.

PULROLNIK, K. Transformações do carbono no solo. Documentos 264. Embrapa cerrados. Planaltina, Distrito Federal, p. 20-26, 2009. Disponível em:< file:///C:/Users/Info/Downloads/Transformacoes-do-Carbono-no-Solo.pdf > Acesso em: 08 jun. 2014.

QIN, X. TANG, J. C; LI, D. S; ZHANG, Q. M. Effect of salinity on the bioremediation of petroleum hydrocarbons in a saline-alkaline soil. **Letters in applied microbiology**, v. 55, p. 210-217, 2012.

QUEIROZ, A. F. S. ; PEIXOTO, J. A. S. ; OLIVEIRA, O. M. C. ; CARVALHO, F. M. ; AGRA FILHO, S. S. ; TAVARES, T. M. . Introdução. In: GERMEN/UFBA. (Org.) **Baía de Todos os Santos: Diagnóstico sócio-ambiental e subsídios para a gestão**. 1 ed. Salvador, BA: GERMEN/UFBA-NIMA, 1997, 244 p.

QUEIROZ, A. F. de S.; CELINO, J.J. Manguezais e ecossistemas estuarinos da Baía de Todos os Santos. . In: QUEIROZ, A. F. de S.; CELINO, J.J. **Avaliação de ambientes na Baía de Todos os Santos: aspectos geoquímicos, geofísicos e biológicos**. 1 ed. Salvador: EDUFBA, 2008, Cap 1, v. 1, p. 39-58.

QUINÕES, E. M. **Relações água-solo no sistema ambiental do estuário de Itanhaém**. 2000. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2000.

RAIMUNDO, R. S.; MACEDO, R. C.; RIZZO, A. C. L. Tratamento de solo contaminado por petróleo empregando material estruturante. In: 44º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 90, 2004, Fortaleza,. **Anais...** Ceará: CETEM. 2004.

REGINATTO, C.; COLLA, L. M.; THOMÉ, A. Biorremediação de resíduos oleosos em solos. **Ciências Exatas Aplicadas e Tecnológicas**, Passo Fundo, v.3, n. 2, p.19-31, 2011.

REYES, C. Y. **Simulação do intemperismo em mesocosmos para petróleos brasileiros**. 2015. 288f. Tese (Doutorado em Geologia) - Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia. 2015.(no prelo).

RIDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v.42, p.265-270, 1950.

RIZZO, A. C. de L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; SANTOS, R. L. C. dos; SOBRAL, L. G. dos S. Estratégias de aumento da eficiência dos processos de biorremediação.in: RIZZO, A. C. de L.; LEITE, S. G. F.; SORIANO, A. U.; SANTOS, R. L. C. dos; SOBRAL, L. G. dos S (Org). **Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores**. Série Tecnologia Ambiental. Centro de tecnologia mineral. cap 4 e 5, v. 37, 2006. 77 p.

RIZZO, A. C.; SISINNO, C. L. S.; CUNHA, Cláudia D.; SALGADO, A. M.; BARROCAS, P. R. G.; TAKETANI, R. G.; GIESE, E. C. **Aplicação de ensaios biológicos na avaliação da biodisponibilidade de hidrocarbonetos de petróleo em Solos Impactados**. 1. ed. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, 2014. v. 1. 55p.

ROCHA, I., PINTO, E., FERREIRA, I.M.P.L.V.O., DA SILVA, M.V., OLIVEIRA, R.S. Influence of mixtures of acenaphthylene and benzo[a]anthracene on their degradation by *Pleurotus ostreatus* in sandy soil. **Journal of Soils and Sediments**, v. 14, n. 4, p. 829-834, 2014.

ROY, A. S; BARUAH, R.; BORAH, M.; SINGH, A.K.; BORUAH, H. P. D.; SAIKIA, N.; DEKA, M.; DUTTA, N.; BORA, T. C. Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 94, p. 79–89, 2014.

SANHUEZA, R. M. V.; MELO, I. S. de. Encapsulamento de microrganismos. In: VALDEBENITO SANHUEZA, R. M.; MELO, I. S. de. (Ed.). **Métodos usados no biocontrole de fitopatógenos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p. 103-107, 2007.

SANTANA, R. C.; OLIVEIRA, O. M. C. de; TRIGUIS, J. A.; QUEIROZ, A. F. de S.; CRUZ, M. J. M. Procedimentos de Biorremediação Aplicados na Limpeza de Substrato de Manguezal Impactados por Petróleo. **Plurais**, Salvador, v. 1, n. 1, p. 159-177, 2010.

SANTOS, R. da M. dos. **Avaliação da adição do pó da casca de coco verde como material estruturante na biorremediação de solo contaminado por petróleo**. 2007.156f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ – Brasil, 2007.

SANTOS FILHO, E. A. dos. **Efeito do Bioestímulo e do Bioaumento sobre a Biodegradação de Paclobutrazol em Solos**. 2014. 64f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SCHERR, K.; AICHBERGER, H.; BRAUN, R.; LOIBNER, A. P. Influence of soil fractions on microbial degradation behavior of mineral hydrocarbons. **European Journal of Soil Biology**, v.43, p.341-350, 2007.

SEABRA, P. N. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. **Microbiologia ambiental**. 2 ed. Jaguariúna, São Paulo: Embrapa, 2008, 647p.

SETTE, L. D.; CUPOLILO, E.; TIGANO, M. S.;VAZOLLER, R. F.;CANHOS, V. P. Recomendações para Operação e Gerenciamento de Coleções de Culturas de Microrganismos. Sociedade Brasileira de Microbiologia. 2006. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos/sbmgerenciamentocolecoeseculturas.pdf>> Acesso em: 1 jan 2016.

SILVA, E.; FIALHO, A.M.; SA-CORREIA, I.; BURNS, R.G.; SHAW, L.J. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine. **Environmental Science & Technology**, n. 2, v. 38, p. 632-637, 2004.

SILVA, G. **Bioestímulo e bioaumento na remediação de solo contaminado com óleo lubrificante usado- escala piloto**. 2010. Tese (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade do Estado Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

SIQUEIRA, J. O; MOREIRA, F. M. S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental**. Brasília: Embrapa, 1994. 142 p.

SOARES, M. L. G.; CARLOS-JUNIOR, M. G. da S.; CAVALCANTI, V. F.; ALMEIDA, P. M. M. de; MONTEIRO, A. de S.; CHAVES, F. de O.; ESTRADA, G. C. D.; BARBOSA, B. Regeneração de floresta de mangue atingida por óleo na baía de guanabara (rio de janeiro, brasil): resultados de 5 anos de monitoramento. **Geochemica Brasiliensis**, v. 20, n. 1, p. 038-061, 2006.

SONAWDEKAR, S. Bioremediation: A boon to hydrocarbon degradation. **International Journal of Environmental Sciences**, v.2, n.4, 2012.

SOUZA, E. S. de; TRIGÜIS, J. A. Avaliação da degradação de um óleo leve em ambiente marinho costeiro - simulação em mesoescala. **Geochemica Brasiliensis**, v.20, n.1, p. 026-037, 2006.

STEINHAEUER, M. S.; BOEHM, P. D. The composition and distribution of saturated and aromatic hydrocarbons in nearshore sediments, river sediments, and coastal peat of Alaska Beaufort Sea: implications for detecting anthropogenic hydrocarbons input. **Marine Environmental Research**, v. 33, p. 223-253, 1992.

STRIEBICH, R. C.; SMART, C. E.; GUNASEKERA, T. S.;MUELLER, S. S.; STROBEL, L. M.; MCNICHOLS, B. W.; RUIZ, O. N. Characterization of the F-76 diesel and Jet-A aviation fuel hydrocarbon degradation profiles of *Pseudomonas aeruginosa* and *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 93, p. 33-43, 2014.

SUJA, F.; RAHIM, F.; TAHA, M. R.; HAMBALI, N.; RAZALI, M. R.; KHALID, A. HAMZAH, A. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil

based on laboratory and field observations. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 90, p. 115–122, 2014.

SUTHERSAN, S. S. **Remediation Engineering: Design Concepts In situ** bioremediation. Boca Raton: Lewis Publishers, 1996, 351 p.

SUZUKI, G. B. OGM: aspectos polêmicos e a nova lei de biossegurança. Jus Navigandi, Teresina, ano 11, n. 997, 2006. Disponível em: <<http://jus.com.br/artigos/8148/ogm-aspectos-polemicos-e-a-nova-lei-de-biosseguranca#ixzz35m1GP6S0>> Acesso em: 26 jun. 2014.

TAHHAN, R.A.; AMMARI, T.G.; GOUSSOUS, S.J.; AL-SHDAIFAT, H.I. Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified bioaugmentation strategy. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 130–134, 2011.

TAVARES, S. R de L. Técnicas de remediação. In: TAVARES, S. R de L. **Remediação de solos e águas contaminadas por metais pesados**. 1ª ed, Rio de Janeiro, 2013, 147p.

TEHRANI, D. N.; MINOUI, S.; HERFATMANESH, A. Effect of salinity on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs) of heavy crude oil in Soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n.2, p 179-184. 2009.

TEXEIRA, J. B. Biorreatores para células, tecidos e órgãos vegetais - Produção de mudas em larga escala. **Biociência & Desenvolvimento**, n. 24, p. 36- 41, 2002.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8ª.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, Cap 5 e 6, 2005.

TYAGI, M.; FONSECA, M. M. R. da; CARVALHO, C. C. C. R. de. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v. 22, ed. 2, p 231-241, 2011.

UENF. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Biorremediação. 2014. Disponível em: <http://www.uenf.br/uenf/centros/cct/qambiental/ef_biorremediacao.html> Acesso em: 15 nov 2014. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.

VEIGA, G. I. **Avaliação da origem dos hidrocarbonetos em sedimentos superficiais de manguezais da região norte da Baía de Todos os Santos/BA**. 2003, 205 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Reservatório e de Exploração) – Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense. Macaé, Rio de Janeiro, 2003.

- VENOSA, A. D.; ZHU, X. Guidance for the Bioremediation of Oil Contaminated Wetlands, Marshes, and Marine Shorelines. In. FRIGERMAN, M.; NAGABHUSHAMAM, R. **Bioremediation of aquatic and terrestrial ecosystem**. New Orleans: Science Publishers. 2006, 415p.
- WANG, C.; LIU, H.; LI, J.; SUN, H. Degradation of PAHs in soil by *Lasiodiplodia theobromae* and enhanced benzo[a]pyrene degradation by the addition of Tween-80. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, p. 10614-10625, 2014.
- WANG, Q.; ZHANG, S.; LI, Y.; KLASSEN, W. Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution. **Journal of Environmental Protection**, v.2, p. 47-55, 2011.
- WANG, T.; SUN, H; JIANG, C.; MAO, H.; ZHANG, Y. Immobilization of Cd in soil and changes of soil microbial community by bioaugmentation of UV-mutated *Bacillus subtilis* 38 assisted by biostimulation. **European Journal of Soil Biology**, v.65, p. 62-69, 2014.
- WANG, Z.; FINGAS, M. Differentiation of the source of spilled oil and monitoring of the oil weathering process using gas chromatography-mass Spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 712, p. 321-343, 1995.
- WEBER, B. D.; SANTOS, A.A. Utilização da biorremediação como ferramenta para o controle da degradação ambiental causada pelo petróleo e seus derivados. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal , v. 10, n. 1 , p. 114-133, 2013.
- WETLER, R. M. C. **Prospecção de microrganismos responsáveis pela degradação de compostos de petróleo em sedimento de um manguezal localizado no Sul da Bahia (Brasil)**. 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, 2006.
- WETLER-TONINI, R. M. C. et al. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: Revisão. **Oecologia Australis**. v. 14, ed. 4, p. 1010-1020, 2010.
- WINQUIST, E.; BJÖRKLÖF, K.; SCHULTZ, E.; RÄSÄNEN, M.; SALONEN, K.; ANASONYE, F.; CAJTHAML, T.; STEFFEN, K.T.; JØRGENSEN, K.S.; TUOMELA, M. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi - from laboratory to field scale. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 86, p. 238-247, 2014.
- YUN, T.; YUAN-RONG, L.; TIAN-LING, Z.; LI-ZHE, C.; XIAO-XING, C.; CHONG-LING, Y. Contamination and potential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments of Xiamen, China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, p. 1184-1191, 2008.
- ZAFRA, G., ABSALÓN, Á.E., CUEVAS, M.A.D.C., CORTÉS-ESPINOSA, D.V. Isolation and selection of a highly tolerant microbial consortium with potential for PAH biodegradation from heavy crude oil-contaminated soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 225, ed. 2, p. 1826-1844, 2014.

APÊNDICE 1

Quadro 11 – Médias dos parâmetros monitorados nas unidades de simulação C, AN, BC e BF nos tempos 0, 8, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de experimento

Parâmetros	O ₀	C ₀	C ₈	C ₁₅	C ₃₀	C ₄₅	C ₆₀	C ₇₅	C ₉₀	AN ₀	AN ₈	AN ₁₅	AN ₃₀	AN ₄₅	AN ₆₀	AN ₇₅	AN ₉₀	BC ₀	BC ₈	BC ₁₅	BC ₃₀	BC ₄₅	BC ₆₀	BC ₇₅	BC ₉₀	BF ₀	BF ₈	BF ₁₅	BF ₃₀	BF ₄₅	BF ₆₀	BF ₇₅	BF ₉₀	
nC ₈ (mg Kg ⁻¹)	4658,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
nC ₉ (mg Kg ⁻¹)	5997,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
nC ₁₀ (mg Kg ⁻¹)	6689,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
nC ₁₁ (mg Kg ⁻¹)	7347,0	0,1	0,7	0,8	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	1,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2	1,0	0,0	0,2	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	1,6	0,0	0,6	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
nC ₁₂ (mg Kg ⁻¹)	7027,9	0,3	5,6	7,6	0,8	325,2	0,6	0,2	0,6	2,4	1,6	0,7	2,1	234,1	2,4	1,1	0,7	3,0	0,6	2,4	1,1	1,3	2,9	1,8	0,8	3,4	0,5	4,8	10,2	2,3	1,8	0,6	0,4	
nC ₁₃ (mg Kg ⁻¹)	8093,8	1,6	37,9	41,1	4,2	1430,4	2,4	0,6	2,0	12,8	8,4	8,4	13,5	980,6	11,6	7,2	5,8	14,1	6,4	10,6	12,0	14,2	16,7	10,7	4,7	19,0	8,9	19,7	66,2	15,6	11,1	8,2	3,7	
nC ₁₄ (mg Kg ⁻¹)	7604,2	3,6	74,5	68,9	5,0	1258,7	3,0	0,4	2,3	50,6	22,8	16,7	33,0	1296,8	20,3	16,5	11,1	52,2	18,7	27,5	56,8	43,5	40,4	23,9	13,1	68,6	18,4	50,1	119,4	29,8	24,7	25,1	11,7	
nC ₁₅ (mg Kg ⁻¹)	7469,3	2,9	82,2	70,6	3,1	685,1	2,2	0,1	1,8	80,4	52,4	20,1	48,8	1345,5	25,9	20,7	14,8	82,1	80,7	63,0	86,5	61,5	54,2	31,3	21,3	108,3	40,6	84,1	135,7	36,1	33,9	36,6	23,7	
nC ₁₆ (mg Kg ⁻¹)	7598,8	1,1	52,7	46,5	1,3	160,4	1,2	0,1	1,1	88,2	96,5	48,0	61,2	1411,2	28,0	24,2	18,1	73,1	145,2	84,2	98,5	66,6	63,6	37,8	28,2	92,1	92,3	95,7	153,7	39,6	37,6	42,3	32,2	
nC ₁₇ (mg Kg ⁻¹)	7543,8	0,4	22,3	24,0	0,6	0,3	0,7	0,1	0,8	88,3	138,7	99,4	65,6	1384,7	28,9	24,2	19,7	64,4	184,2	88,6	93,6	69,2	68,6	39,8	33,1	77,2	136,8	81,8	143,9	40,6	39,5	44,8	39,0	
nC ₁₈ (mg Kg ⁻¹)	6961,9	0,2	7,0	9,6	0,5	0,1	0,3	0,0	0,4	83,2	141,7	123,7	64,2	1317,9	28,3	22,5	19,8	57,4	175,5	81,3	85,9	67,3	68,0	39,0	32,9	65,1	149,9	66,5	141,4	40,5	39,5	44,4	40,7	
nC ₁₉ (mg Kg ⁻¹)	7935,0	0,2	2,5	4,4	0,4	0,1	0,2	0,1	1,3	99,1	160,7	148,3	70,3	1534,2	32,6	27,3	24,7	58,2	187,1	99,0	92,9	74,3	78,2	34,6	28,0	65,7	168,7	69,8	162,9	44,2	45,0	51,3	48,6	
nC ₂₀ (mg Kg ⁻¹)	7773,3	0,2	0,6	1,5	0,3	0,0	0,1	0,1	1,4	92,1	152,2	153,4	68,8	1492,5	28,9	24,1	23,3	59,5	176,3	91,4	86,2	73,3	72,8	43,2	36,2	50,8	184,2	65,7	158,2	43,8	41,6	43,7	48,7	
nC ₂₁ (mg Kg ⁻¹)	7458,3	0,2	0,1	0,8	0,3	0,0	0,2	0,1	0,4	89,9	155,9	154,0	69,4	1378,6	29,7	24,1	22,6	59,7	165,5	91,3	80,1	73,0	75,5	41,8	37,8	46,1	179,0	62,7	150,1	44,9	45,1	48,1	48,2	
nC ₂₂ (mg Kg ⁻¹)	7501,7	0,2	0,7	0,9	0,4	0,1	0,2	0,1	1,5	84,3	147,2	148,0	64,3	1344,7	28,1	22,8	20,8	58,0	147,6	88,6	77,3	70,4	71,0	41,0	36,0	37,2	170,4	62,0	140,9	41,3	42,8	46,4	46,0	
nC ₂₃ (mg Kg ⁻¹)	8669,3	0,6	0,6	0,6	0,6	198,0	0,6	0,6	1,1	92,4	160,7	165,2	72,8	1503,1	31,1	24,9	22,7	64,9	156,6	98,8	84,0	76,3	80,5	47,3	40,6	34,2	186,3	66,9	159,7	47,9	49,2	53,3	52,1	
nC ₂₄ (mg Kg ⁻¹)	8796,1	0,3	0,4	0,4	0,6	163,0	0,4	0,4	0,7	81,8	138,8	151,5	69,1	1613,7	28,1	24,9	21,5	57,4	136,9	88,1	78,3	73,6	72,2	46,0	39,0	27,0	170,3	62,2	151,9	44,9	43,9	51,8	49,7	
nC ₂₅ (mg Kg ⁻¹)	9713,5	2,2	1,6	1,4	1,7	576,0	1,7	1,9	1,7	93,1	164,3	186,3	79,8	2034,9	34,9	32,0	27,9	67,5	156,3	107,3	92,2	88,6	86,4	58,2	47,0	30,6	202,5	70,9	192,8	55,2	55,1	68,5	61,5	
nC ₂₆ (mg Kg ⁻¹)	8487,8	0,4	1,0	0,5	1,0	266,8	0,8	0,7	0,9	78,3	136,0	162,7	66,9	1795,1	30,9	28,6	25,6	56,8	128,4	89,0	74,9	76,7	74,3	53,2	42,1	24,6	172,6	60,9	166,9	49,0	47,7	62,3	53,7	
nC ₂₇ (mg Kg ⁻¹)	8506,0	1,9	1,7	1,3	1,8	596,8	1,7	1,8	2,1	86,5	144,7	178,4	72,5	2229,7	35,8	31,4	29,6	61,4	137,2	96,0	87,4	85,5	83,5	60,1	48,4	28,3	187,1	63,4	188,2	55,2	53,8	72,3	61,6	
nC ₂₈ (mg Kg ⁻¹)	7265,2	0,8	1,2	0,8	1,4	373,9	1,1	1,2	0,9	74,0	125,7	157,8	62,2	1785,6	30,7	26,5	26,5	51,4	117,4	82,7	72,9	73,9	69,9	51,7	41,4	23,8	164,1	59,7	155,2	46,8	48,1	39,1	52,8	
nC ₂₉ (mg Kg ⁻¹)	6528,6	3,2	3,4	3,6	3,5	948,1	3,0	3,0	2,3	77,1	141,5	178,1	62,2	1916,2	31,4	25,5	27,2	53,9	138,3	96,8	72,7	72,9	67,9	50,8	41,7	25,8	199,1	63,5	158,6	48,0	47,2	62,5	53,5	
nC ₃₀ (mg Kg ⁻¹)	4750,7	0,6	1,1	0,7	1,1	248,5	1,0	0,9	0,9	56,3	90,7	118,1	45,2	1232,5	22,6	18,2	20,0	39,1	91,0	62,2	49,4	51,4	46,3	35,1	30,2	18,5	132,6	41,7	106,0	35,2	33,4	45,2	37,7	
nC ₃₁ (mg Kg ⁻¹)	4329,0	1,1	1,9	1,9	2,1	505,1	1,5	1,6	1,1	54,4	95,1	122,5	45,9	1157,3	20,7	16,0	18,4	38,1	97,7	67,8	45,6	47,2	41,9	31,7	27,0	19,0	145,5	44,9	100,8	31,4	31,6	40,0	33,9	
nC ₃₂ (mg Kg ⁻¹)	3091,6	0,7	1,6	1,3	2,3	286,3	1,4	1,4	1,3	44,7	96,7	121,3	45,1	858,5	15,9	13,0	14,8	31,1	100,2	69,8	35,2	37,7	30,8	24,6	21,1	15,9	152,7	46,4	77,5	23,9	24,2	30,9	25,3	
nC ₃₃ (mg Kg ⁻¹)	2713,8	0,3	2,3	2,5	1,9	313,8	0,3	0,8	0,9	45,5	92,6	115,7	38,8	607,2	14,4	11,0	13,3	32,4	98,0	69,8	28,9	31,0	26,7	20,6	18,7	17,1	147,6	44,9	58,1	21,6	21,7	26,3	21,7	
nC ₃₄ (mg Kg ⁻¹)	2123,6	0,7	2,0	2,9	3,5	670,1	1,8	1,3	2,5	49,8	69,3	88,3	35,2	577,2	13,0	9,7	12,8	36,1	74,1	52,0	36,4	27,7	22,7	18,3	16,8	18,9	110,9	32,9	76,1	19,4	20,4	21,8	18,5	
nC ₃₅ (mg Kg ⁻¹)	1826,7	0,1	1,7	2,5	1,8	262,6	0,7	1,0	0,6	50,8	118,9	147,9	45,6	375,3	12,7	9,1	10,1	40,0	128,5	92,3	28,6	25,2	20,1	16,5	16,6	18,0	189,8	57,7	47,6	18,1	19,5	21,2	15,6	
nC ₃₆ (mg Kg ⁻¹)	1313,1	0,1	0,0	0,0	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	37,0	86,2	113,8	41,6	277,1	8,0	5,2	7,2	31,2	96,3	69,8	18,9	20,6	12,7	11,8	10,6	14,0	148,6	41,7	30,7	12,0	13,3	13,4	10,0	
nC ₃₇ (mg Kg ⁻¹)	1075,4	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,2	0,2	0,0	36,2	65,9	95,1	32,4	190,9	7,1	4,5	5,6	29,9	78,7	60,1	18,4	16,0	10,6	10,2	8,9	16,4	119,8	32,4	25,8	11,3	11,8	12,1	7,9	
nC ₃₈ (mg Kg ⁻¹)	891,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	21,4	29,4	49,6	27,6	190,6	4,0	3,2	4,1	16,5	39,2	33,8	10,9	13,9	6,5	5,6	4,9	9,8	63,2	15,8	18,8	7,0	6,7	7,4	4,9	
nC ₃₉ (mg Kg ⁻¹)	737,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	30,6	26,5	54,9	16,9	10,1	4,2	0,0	3,2	30,4	39,1	35,6	14,3	8,3	6,1	5,8	4,5	16,0	57,5	12,6	17,7	8,7	8,9	8,8	3,4	
nC ₄₀ (mg Kg ⁻¹)	660,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	29,0	14,8	43,5	18,6	8,1	2,8	0,0	0,0	29,2	30,0	33,8	14,3	10,4	2,4	4,5	0,0	15,1	29,0	0,0	12,5	6,9	6,4	5,2	0,0	
Pristano (mg Kg ⁻¹)	2235,6	0,3	13,8	12,5	0,2	0,1	0,3	0,0	0,4	34,7	50,0	33,5	25,7	520,4	11,3	11,4	9,9	26,4	71,1	33,7	36,5	27,2	28,0	16,9	14,3	29,6	48,6	37,2	49,9	15,7	16,5	18,0	16,5	
Fitano (mg Kg ⁻¹)	1571,0	0,3	4,5	4,7	0,1	0,0	0,1	0,0	0,3	28,4	45,8	39,6	21,4	415,6	9,7	9,3	8,6	18,4	60,3	28,6	29,6	23,4	23,6	14,0	12,2	19,1	53,6	24,4	48,3	13,4	14,1	15,7	14,3	
HTP	325418,9	253,7	982,9	1067,7	455,8	96770,0	335,0	314,6	328,8	6894,8	10418,3	12320,1	5654,8	108449,8	2222,8	1986,3	1946,4	5265,4	11289,2	8204,4	3497,3	4526,4	4549,6	3097,9	2888,9	3337,5	13547,4	5976,7	9177,9	3125,2	3080,2	3477,7	3093,9	
UCM	72042,6	197,6	449,9	540,5	358,3	74402,2	268,2	262,2																										

APÊNDICE 2

Quadro 12 - Valores dos n-alcenos (nC₈ a nC₄₀) da amostra de petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano no tempo zero de experimento

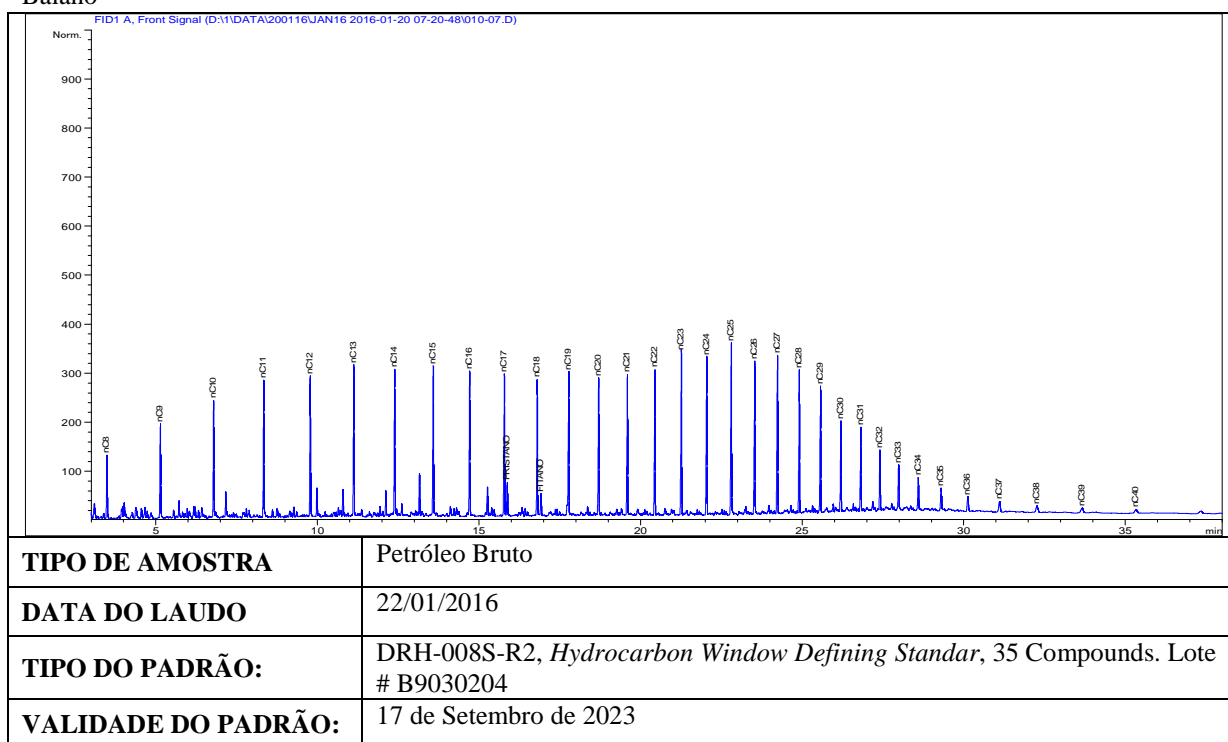
n-ALCANOS	CONCENTRAÇÃO		
	mg Kg	µg Kg	ppb
n-C ₈	4658,59	4658585	4,16
n-C ₉	5997,055	5997055	4,17
n-C ₁₀	6689,91	6689908	5,08
n-C ₁₁	7347,03	7347027	5,32
n-C ₁₂	7027,85	7027850	4,46
n-C ₁₃	8093,82	8093816	4,07
n-C ₁₄	7604,24	7604236	3,56
n-C ₁₅	7469,31	7469306	2,57
n-C ₁₆	7598,85	7598849	2,26
n-C ₁₇	7543,78	7543783	2,34
n-C ₁₈	6961,87	6961868	2,76
n-C ₁₉	7934,95	7934954	3,07
n-C ₂₀	7773,33	7773328	3,43
n-C ₂₁	7458,35	7458349	3,67
n-C ₂₂	7501,73	7501732	3,74
n-C ₂₃	8669,31	8669314	3,70
n-C ₂₄	8796,07	8796072	3,53
n-C ₂₅	9713,47	9713467	3,24
n-C ₂₆	8487,83	8487833	2,95
n-C ₂₇	8505,99	8505993	2,71
n-C ₂₈	7265,25	7265245	2,58
n-C ₂₉	6528,65	6528646	2,65
n-C ₃₀	4750,66	4750658	2,66
n-C ₃₁	4329,02	4329017	3,55
n-C ₃₂	3091,64	3091639	2,99
n-C ₃₃	2713,83	2713826	2,65
n-C ₃₄	2123,56	2123557	2,54
n-C ₃₅	1826,70	1826698	2,96
n-C ₃₆	1313,07	1313066	2,82
n-C ₃₇	1075,43	1075429	3,30
n-C ₃₈	891,39	891385,16	2,40
n-C ₃₉	737,83	737830,27	3,81
n-C ₄₀	660,75	660750,15	4,02

Quadro 13 - Valores dos alcanos e parâmetros geoquímicos da amostra de petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano no tempo zero de experimento

ALCANOS E PARÂMETROS	CONCENTRAÇÃO		
	mg Kg	µg Kg	ppb
PRISTANO	2235,63	2235626,00	2,29
FITANO	1570,96	1570961	2,90
HTP	325418,94	3254189,44	N.A.
UCM	72042,57	72042570,00	N.A.
PRISTANO/FITANO	1,423	1,423	N.A.
PRISTANO/n-C ₁₇	0,2964	0,2964	N.A.
FITANO/n-C ₁₈	0,2257	0,2257	N.A.
HTP/UCM	4,517036869	4,517036869	N.A.

* HTP: Hidrocarbonetos Totais do Petróleo, UCM: *Unresolved Complex Mixture*, Misturas Complexas não Resolvidas



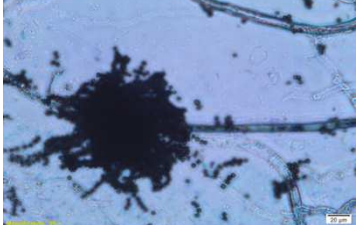


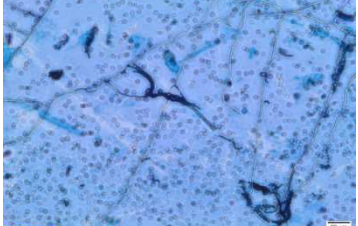

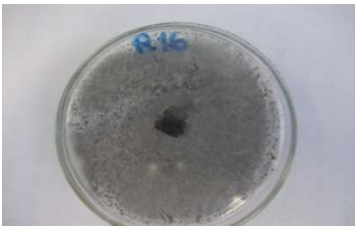



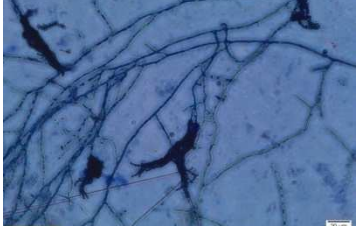


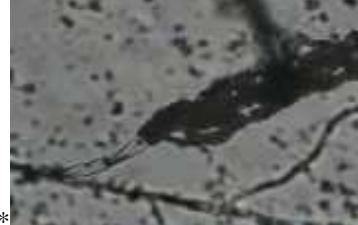



Quadro 14 - Perfil cromatográfico dos HTP (nC₈ a nC₄₀) da amostra de óleo da Bacia do Recôncavo Baiano



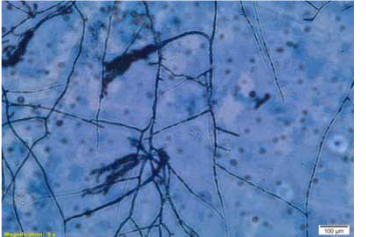



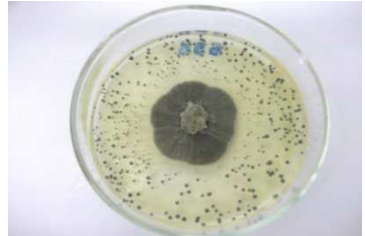



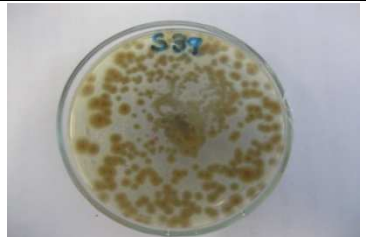
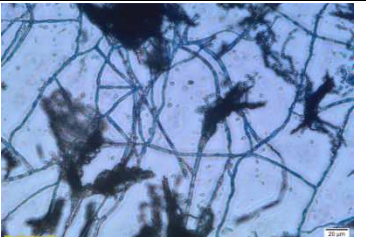
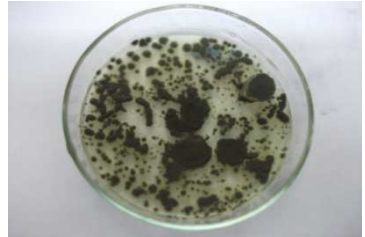





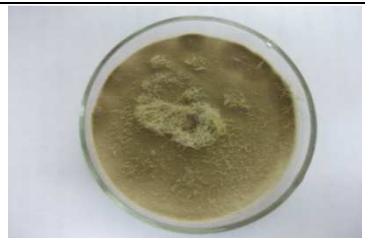




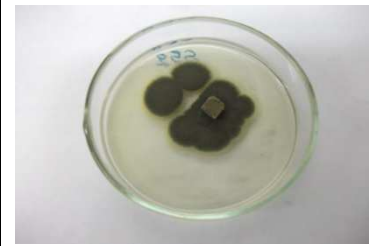


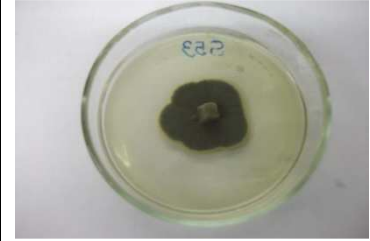


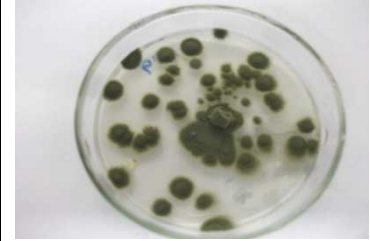
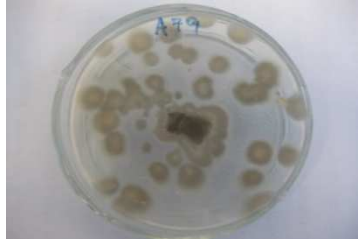

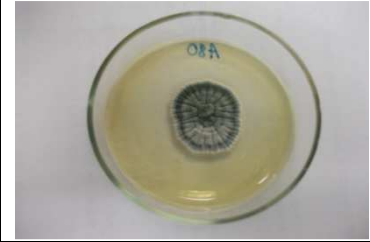


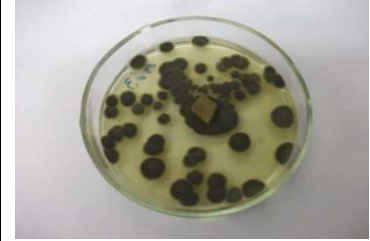



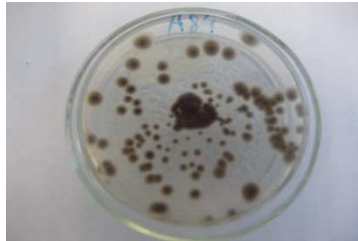


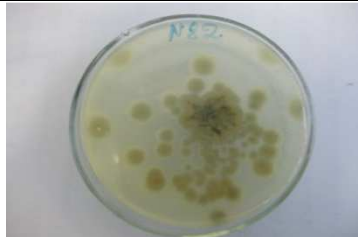
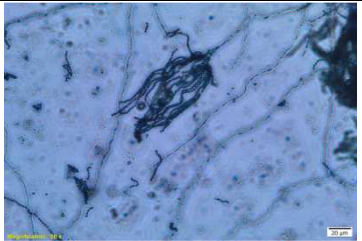
Fonte: Autor, 2016.

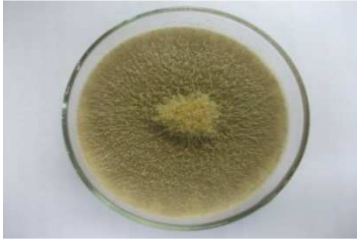
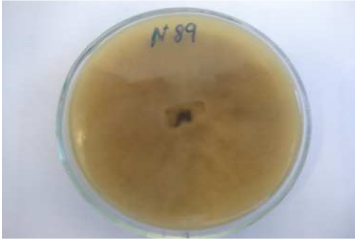
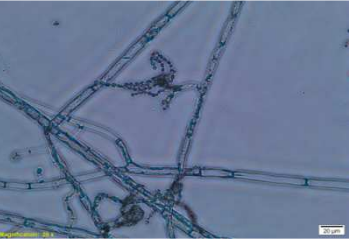









APÊNDICE 3

Quadro 15 - Cepas fúngicas que compuseram o consórcio microbiano misto em meio BDA. (a) Imagem real da frente da cepa fúngica. (b) Imagem real do verso da placa. (c) Micrografia da cepa fúngica x40

FUNGOS DEGRADADORES DO PETRÓLEO DA BACIA DO RECÔNCAVO BAIANO			
CODIGO	FRENTE (a)	VERSO (b)	MICROCULTIVO (c)
R2			
R11			
R16			
R26			
R28			
R30			

FUNGOS DEGRADADORES DO PETRÓLEO DA BACIA DO RECÔNCAVO BAIANO			
CODIGO	FRENTE (a)	VERSO (b)	MICROCULTIVO (c)
Continuação do Quadro 15			
R31			
R33			 *
S38			 *
S39			
S40			 *
S41			 *
S45			


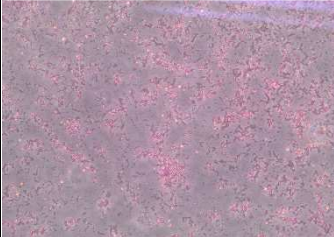

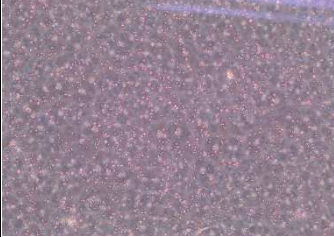








FUNGOS DEGRADADORES DO PETRÓLEO DA BACIA DO RECÔNCAVO BAIANO			
CODIGO	FRENTE (a)	VERSO (b)	MICROCULTIVO (c)
Continuação Quadro 15			
S52			
S53			
A79			
A80			
A83			
A84			
N82			








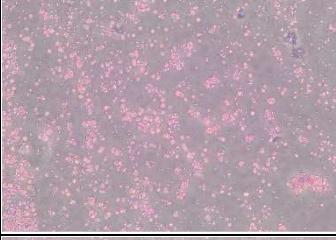




FUNGOS DEGRADADORES DO PETRÓLEO DA BACIA DO RECÔNCAVO BAIANO			
CODIGO	FRENTE (a)	VERSO (b)	MICROCULTIVO (c)
Continuação Quadro 15			
N89			
N96			
N101			
N102			

Fonte: *Modificado de Lima (2014).

APÊNDICE 4

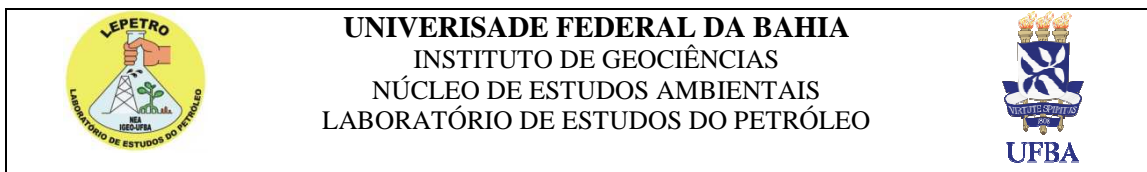
Quadro 16 - Cepas bacterianas que compuseram o consórcio microbiano misto em meio agar nutriente. (a) Imagem real da frente das estrias bacterianas. (b) Micrografia da cepa bacteriana x40. (c) Característica morfológica da cepa bacteriana

BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO BACIA DO RECÔNCAVO BAIANO			
CODIGO	ESTRIA (a)	GRAM (b)	MORFOLOGIA (c)
RA2			Bacilos
RB1			Cocos
RB4			Cocos
RC5			Cocobacilos
RC6			Bacilos
PD4			Bacilos

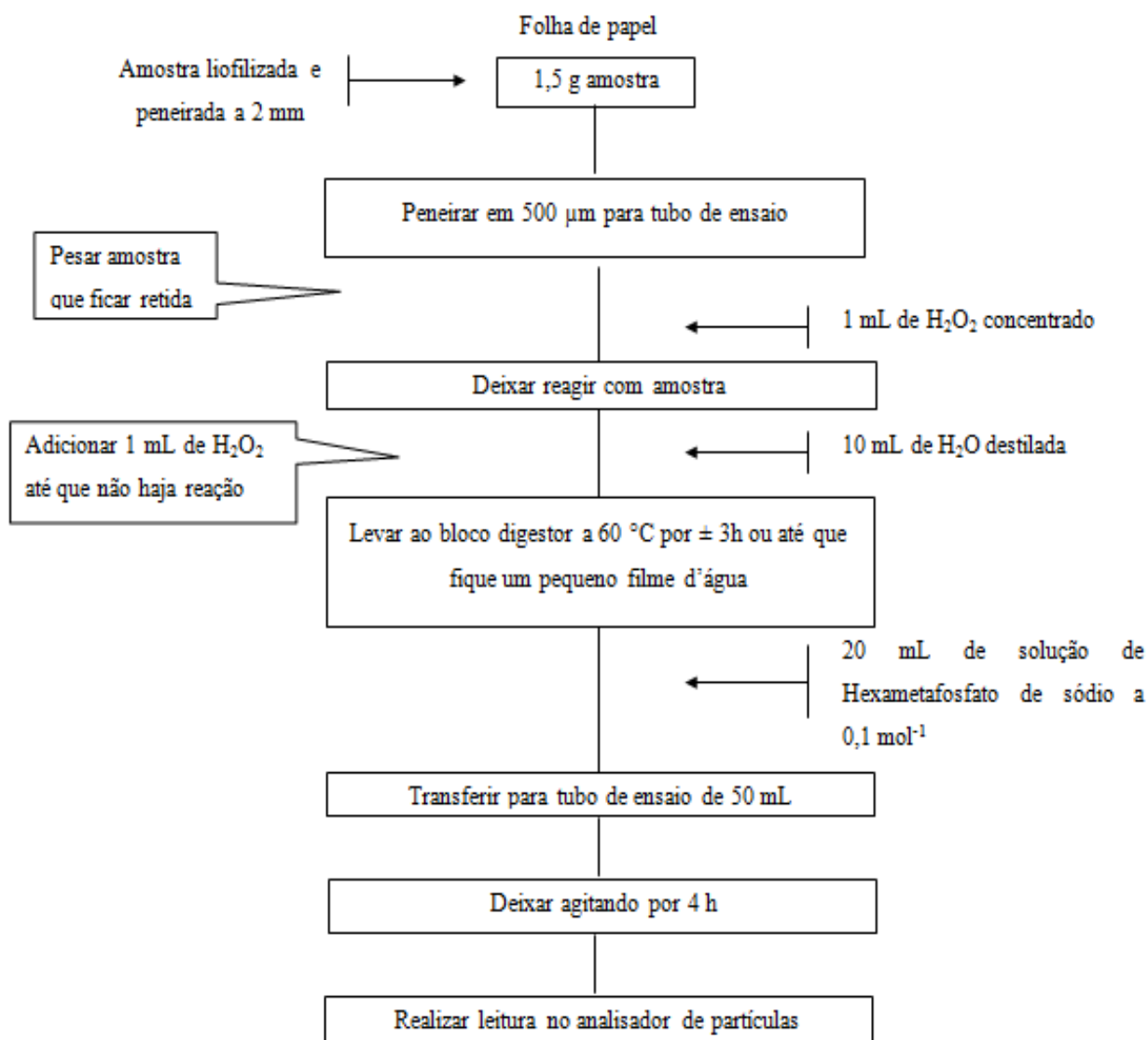
BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE PETRÓLEO BACIA DO RECÔNCAVO BAIANO			
CODIGO	ESTRIA (a)	GRAM (b)	MORFOLOGIA (c)
Continuação do Quadro 16			
PD5			Bacilos
PD6			Bacilos
PD7			Cocos
PD8			Bacilos
OH1			Cocos
OH4			Diplococos

Fonte: Autor, 2015.

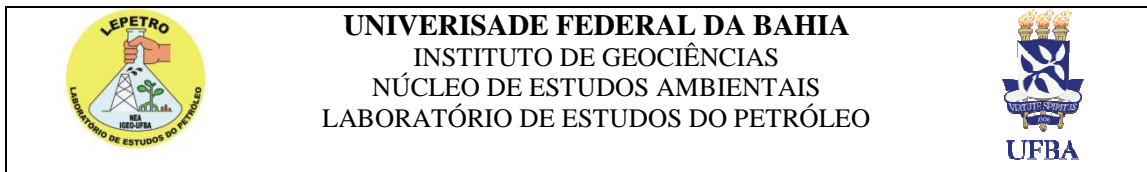
ANEXO 1



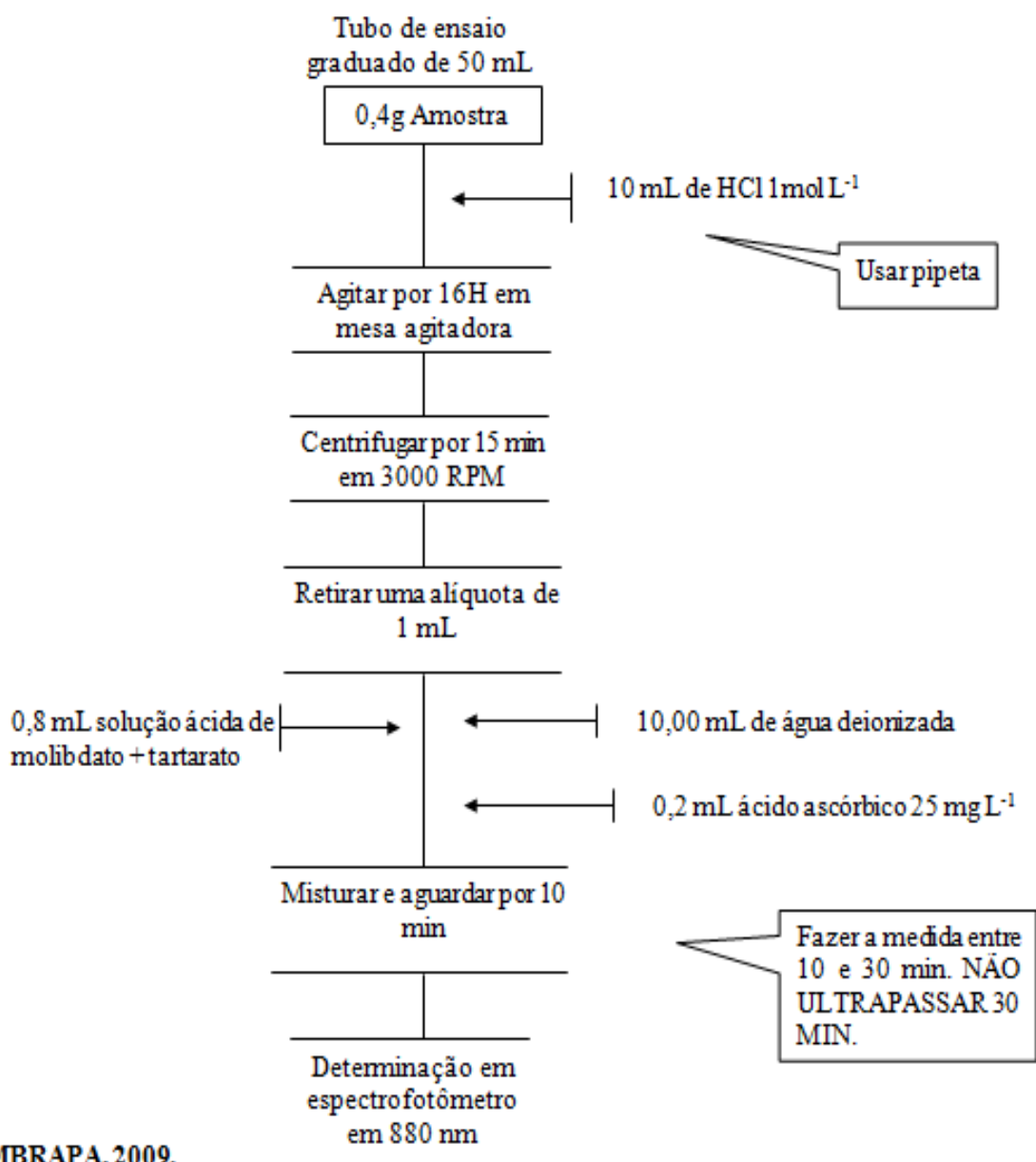
ANÁLISE GRANULOMÉTRICA



ANEXO 2

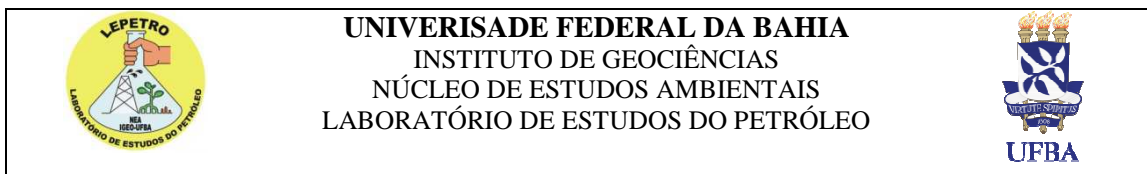


ANÁLISE DE FÓSFORO INORGÂNICO EM SEDIMENTO

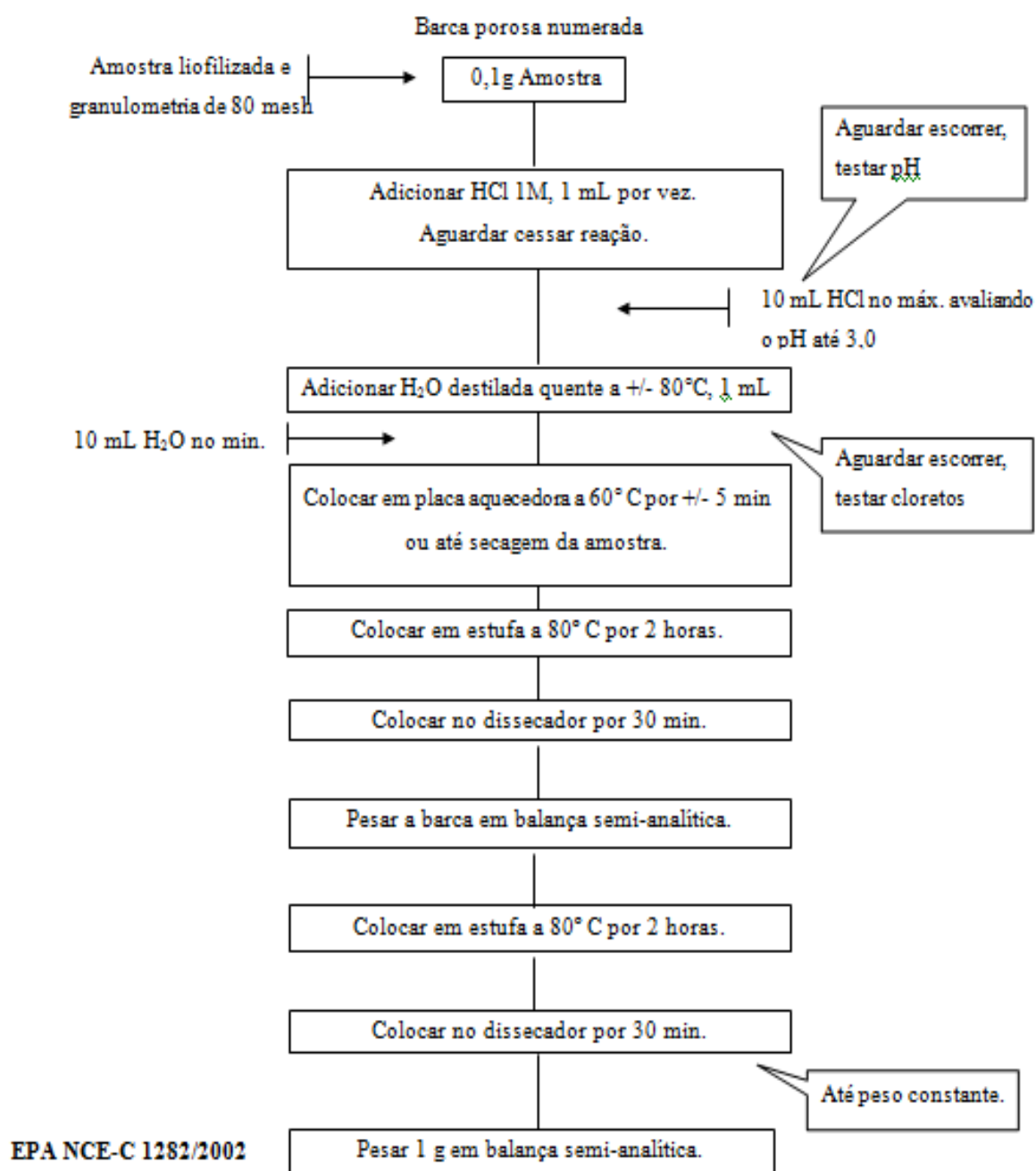


EMBRAPA, 2009.

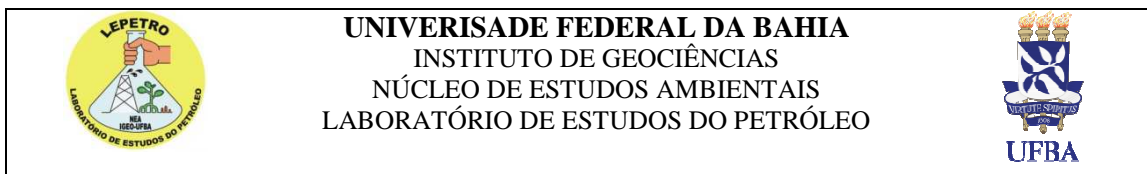
ANEXO 3



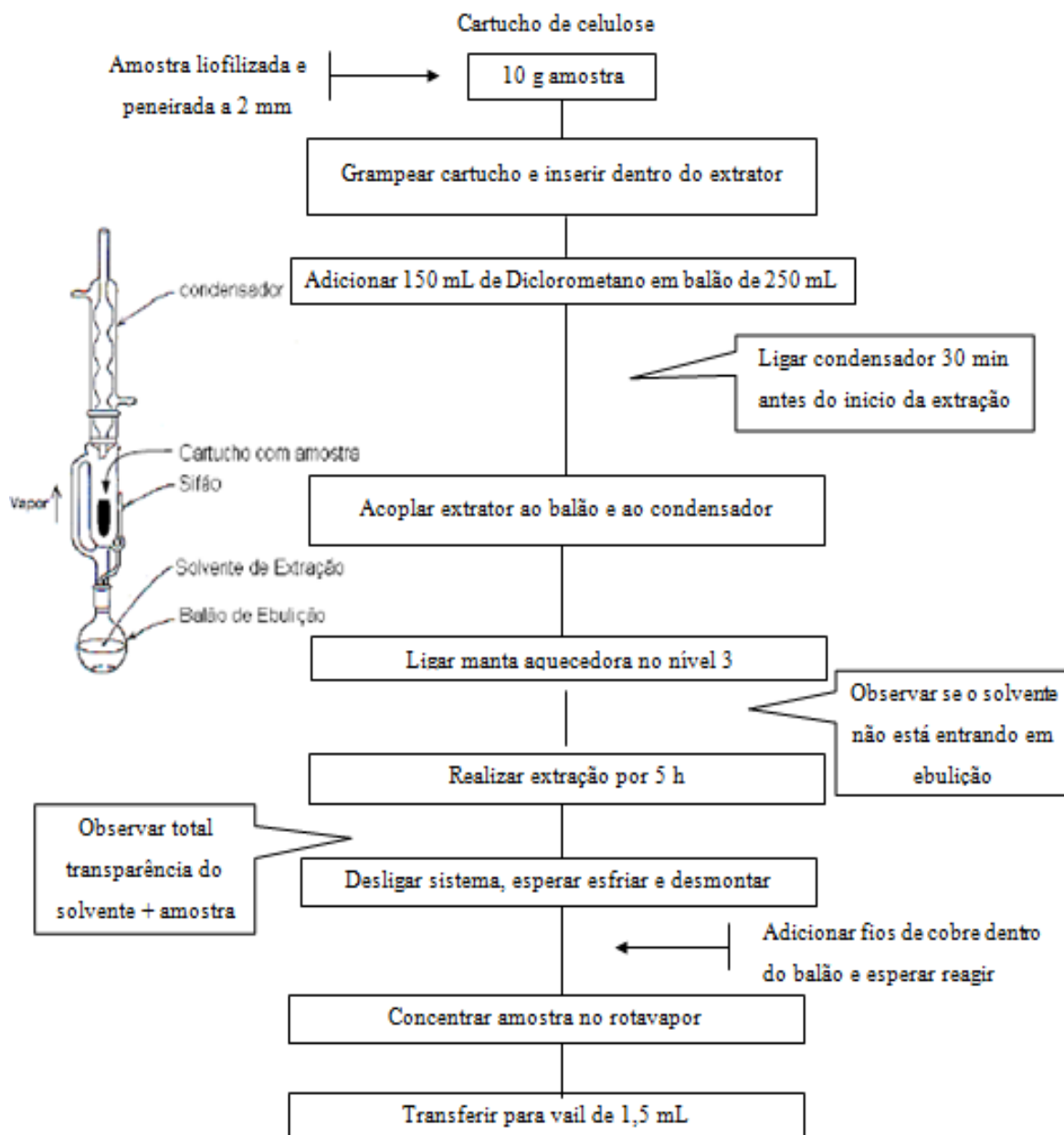
DESCARBONATAÇÃO PARA ANÁLISE DE COT E N



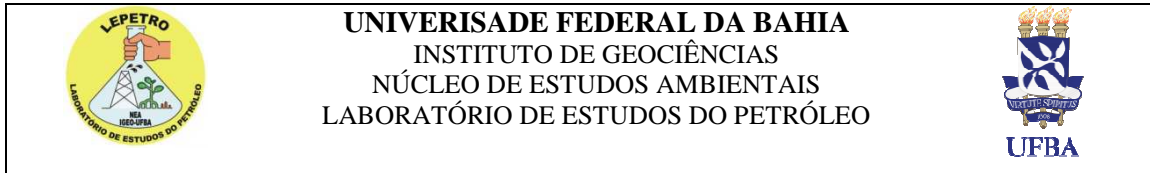
ANEXO 4



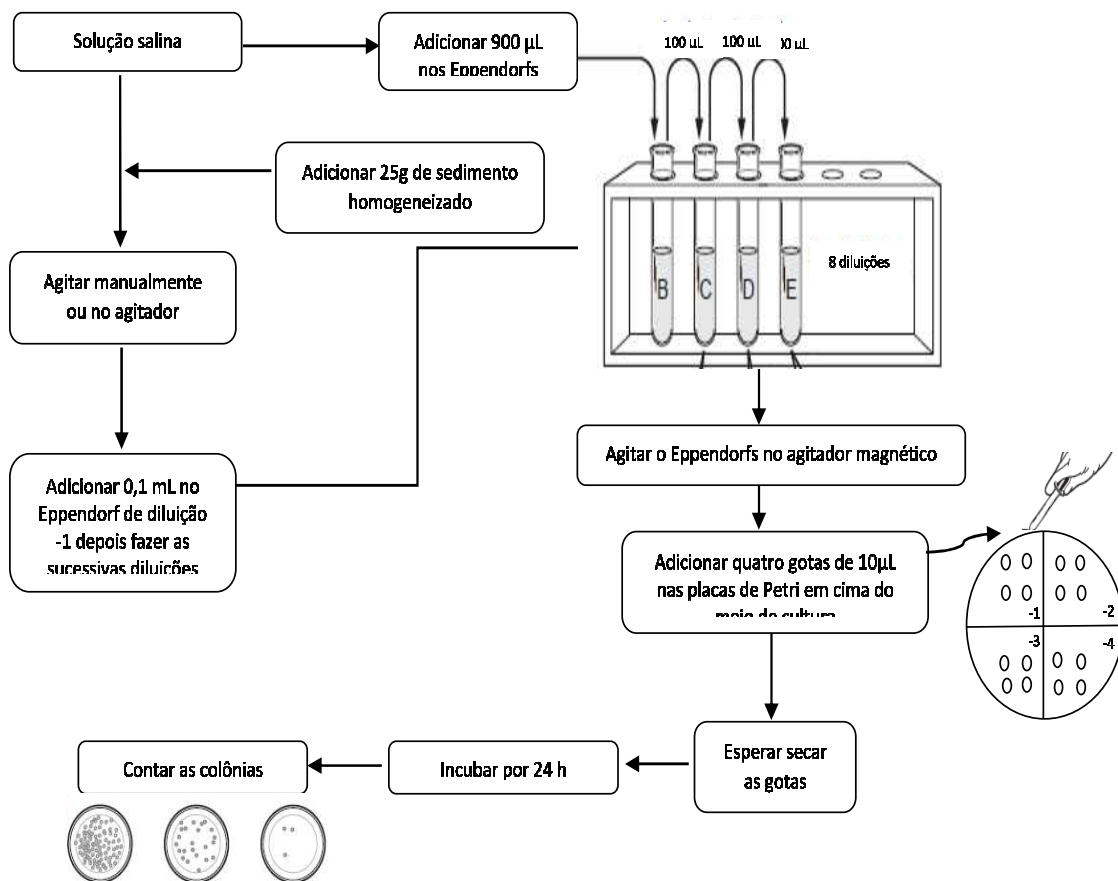
EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO PARA ANÁLISE DE HTP





ANEXO 5



CONTAGEM DE BACTÉRIAS EM SEDIMENTO



ANEXO 6

	UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS NÚCLEO DE ESTUDOS AMBIENTAIS LABORATÓRIO DE ESTUDOS DO PETRÓLEO	
---	--	---

CONTAGEM DE FUNGOS EM SEDIMENTO

