



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

ISANA SOUZA BARRETO

**CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO DA BACIA DO
RECÔNCAVO EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL POR CONSÓRCIOS
MICROBIANOS ENCAPSULADOS**

Salvador

2018

ISANA SOUZA BARRETO

CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO DA BACIA DO
RECÔNCAVO EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL POR CONSÓRCIOS
MICROBIANOS ENCAPSULADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente (POSPETRO) da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Geoquímica do Petróleo e ambiental.

Orientadora: Prof.^a Dra. Danusia Ferreira Lima
Orientadora: Prof.^a Dra. Olívia Maria C. de Oliveira

Salvador
2018

**Avaliação da degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo
em sedimento de manguezal por consórcios microcosmos
encapsulados**

por

Isana Souza Barreto.

(Oceanógrafa - Universidade Federal da Bahia – UFBA - 2016, Salvador - BA)

Orientadora: **Profa. Dra. Danúsia Ferreira Lima**

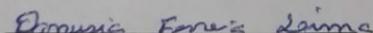
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Submetida em satisfação parcial dos requisitos do grau de
MESTRE EM GEOQUÍMICA DO PETRÓLEO E AMBIENTAL**

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

APROVAÇÃO

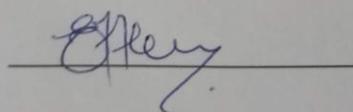
BANCA EXAMINADORA



Profa. Danúsia Ferreira Lima /NEA/IGEO/UFBA)



Profa. Sarah Adriana Rocha Soares (NEA/IGEO/UFBA)



Prof. Eddy José Francisco de Oliveira (UEFS)

Data da Defesa Pública: 07/12/2018

SALVADOR-BAHIA

DEZEMBRO/2018

AGRADECIMENTOS

Gratidão à minha orientadora Danusia, obrigada pela oportunidade, confiança, paciência e orientação.

Sou eternamente grata ao meu pai (meu grande incentivador, conselheiro e amoroso pai) e minha super madrastra Edinha; ao meu namorado Rodrigo Petterson pelo apoio; a toda minha família, minhas irmãs, minhas tias, avós e primas pelo suporte.

Agradeço de coração aos meus grandes amigos e companheiros de laboratório, Marcão, Mila, Clarinha, Mari, Lua Leoncio, Nai, Clara, Sam, Milton, a ajuda de vocês foram fundamentais.

À maravilhosa equipe do NEA, Ruy, Ilene, Sarinha, Monsieur Jam, Regina, Naná, Cícero por serem sempre solícitos e gentis.

Aos parceiros Gisele, Marcio, Gilson e Alex pelas contribuições dadas ao trabalho e a boa vontade sempre em colaborar.

Aos estagiários Lavínia, Iasmim, Caio e Airan, pela companhia, colaboração e paciência comigo.

Aos meus professores, em especial ao professor Cícero, Ângelo, Rennan, Gisele, Joil, Leonardo, por serem exemplos de dedicação e profissionalismo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço a CAPES pelo financiamento da bolsa (sem a qual seria impossível colocar em prática essa pesquisa, pois um país que não investe em ciência e tecnologia se torna dependente de países mais ricos), ao DEMPETRO, a BIOTEC e ao POSPETRO, pelo suporte financeiro e logístico fornecido para a construção deste trabalho.

E a todos que, mesmo aqui não citados, contribuíram para a terceira etapa da minha vida acadêmica.

Gratidão!

O mar é a força que moldou o planeta, é a mãe da vida.
Desde a primeira bactéria até os seres mais complexos.

Todos nasceram dessa enorme placenta marinha
e descendemos de uma mesma população
ancestral submergida nas águas primitivas.

Todos nós compartilhamos um
código genético comum.

A água é o sangue do planeta.

Sem água, não há vida.

(Documentário *Pacificum: El retorno al océano*)

“Toda criança começa como um cientista nato.

Nós é que tiramos isso delas.

Só umas poucas passam pelo sistema
com sua admiração e entusiasmo
pela ciência intactos.”

(Carl Sagan)

Ensinar não é transferir conhecimento,
mas criar as possibilidades para
a sua própria produção
ou a sua construção.

(Paulo Freire)

RESUMO

Acidentes envolvendo o derramamento de óleo em ecossistemas costeiros resultam em impactos negativos para o meio ambiente e a sociedade. A necessidade em remediar áreas poluídas por derramamentos de petróleo tem conduzido ao desenvolvimento de novas tecnologias que visam à descontaminação do ambiente. A estratégia de biorremediação aliada a bioaumentação e bioestímulo é uma alternativa que consiste na utilização da atividade biológica de microrganismos que possuem capacidade de acelerar a degradação e a mineralização dos poluentes. Nesse estudo, avaliou-se o potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo por consórcios microbianos mistos de bactérias e fungos encapsulados com polímeros naturais. Montou-se dois experimentos de simulação de derramamento de petróleo em sedimento de manguezal em sistema de mesocosmos e microcosmos, formado por ensaios em triplicata de atenuação natural (A), controle (C) e biorremediação (B). Monitorou-se os parâmetros físico-químicos, geoquímicos e microbiológicos em amostras de sedimento coletados nos tempos 1, 15, 30, 60 e 90 dias. Para o tratamento estatístico dos dados utilizou-se o programa 'R' e aplicou-se o teste de *Shapiro-Wilk*, *Kruskal-Wallis* e *Nemenyi*, todos com 95% de nível de confiança. Apesar dos resultados dos dois experimentos apresentarem desempenho semelhante em relação a degradação do óleo no tratamento A e B para o experimento 1, a razão HTP/UCM e a distribuição dos n-alcenos apontou eficiência de 12%, e redução da concentração dos n-alcenos a partir do C₁₇ ao C₃₅ para o tratamento B, contra 3% para o tratamento A. O monitoramento físico-químico mostrou uma variação entre a faixa considerada normal para um ambiente de manguezal; o monitoramento químico apresentou pequenas variações na taxa de produção e consumo dos nutrientes; e o monitoramento microbiológico exibiu um predomínio da comunidade bacteriana seguido da sucessão da comunidade fúngica indicando a contribuição da biodegradação pela atividade microbiana no processo de aceleração da degradação dos HTPs. No experimento 2 os dados do Teste Respirométrico apontaram a degradação do óleo através da produção de CO₂ igual em ambos os tratamentos.

Palavra-chave: Biorremediação, consórcios microbianos, hidrocarboneto total de petróleo (HTP), sedimento de manguezal contaminado com óleo.

ABSTRACT

Accidents involving oil spills in coastal ecosystems result in negative impacts on the environment and society. The need to remedy areas polluted by oil spills has led to the development of new technologies aimed at decontaminating the environment. The bioremediation strategy combined with bioaugmentation and biostimulation is an alternative that consists in the use of the biological activity of microorganisms that have the capacity to accelerate the degradation and the mineralization of the pollutants. In this study, was evaluated the potential of biodegradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) by mixed microbial consortia of bacteria and fungi. A simulation experiment of oil spill in mangrove sediments in the mesocosmos and microcosm system was set up, formed by triplicate natural attenuation (A), control (C) and bioremediation (B). The physico-chemical, geochemical and microbiological parameters were monitored in sediment samples collected at times 1, 15, 30, 60 and 90 days. For the statistical treatment of the data, the 'R' program was used and the Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis and Nemenyi tests were applied, all with 95% confidence level. Although the results of the two experiments show similar performance in relation to oil degradation in the A and B treatment, for experiment 1, the TPH/UCM ratio and the n-alkane distribution showed a 12% efficiency and a reduction in the concentration of n-alkanes from C₁₇ to C₃₅ for treatment B versus 3% for treatment. The physical-chemical monitoring showed a variation between the range considered normal for a mangrove environment; the chemical monitoring showed small variations in the rate of production and consumption of nutrients; and the microbiological monitoring exhibited the predominance of the bacterial community followed by the succession of the fungal community indicating the contribution of the biodegradation by the microbial activity in the process of acceleration of the degradation of the TPHs. In experiment 2 the data of the Respirometric Test pointed to the degradation of the oil through the production of CO₂ equal in both treatments.

Keywords: Bioremediation, bioaugmentation, biostimulation, microbial consortium, total petroleum hydrocarbon (TPH), oil contaminated mangrove sediment.

LISTA DE SIGLAS

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

API - Do Inglês, *American Petroleum Institute*

BTS - Baía de Todos os Santos

CG/FID - Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama

DCM - Diclorometano

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

HPAs - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HTPs - Hidrocarbonetos Totais do Petróleo

IBAMA - Instituto Nacional de Meio Ambiente

IGEO - Instituto de Geociências

KOH - Hidróxido de Potássio

NSO - Nitrogênio, Enxofre e Oxigênio

PETROBRAS - Petróleo Brasileiro S.A.

pH - Potencial Hidrogeniônico

RLAM - Refinaria Landulpho Alves de Mataripe

RPM - Rotação por Minuto

UCM - *Unresolved Complex Mixture*; Mistura Complexa Não Resolvida

US EPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

Whole oil - Óleo total, análise cromatográfica para alcanos n-C₈ a n-C₄₀, isoprenóides
Pristano, Fitano e UCM

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1	ÁREA DE AMOSTRAGEM.....	17
3.2	COLETA DE CAMPO	18
3.3	CARACTERIZAÇÃO DO SEDIMENTO, ÁGUA E ÓLEO	19
3.4	CARACTERIZAÇÃO DOS CONSÓRCIOS	19
3.5	MONTAGEM DOS EXPERIMENTOS	20
3.5.1	Experimento 1	20
3.5.2	Experimento 2	23
3.6	MONITORAMENTO DAS UNIDADES DE SIMULAÇÃO	25
3.6.1	Monitoramento microbiológico	26
3.6.2	Monitoramento físico-químico	28
3.6.3	Monitoramento geoquímico	28
4	AVALIAÇÃO DA BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL POR CONSÓRCIOS MICROBIANOS ENCAPSULADOS	31
4.1	INTRODUÇÃO	31
4.2	MATERIAL E MÉTODO	31
4.2.1	Amostragem e pré-tratamento	33
4.2.2	Caracterização do óleo e sedimento	34
4.2.3	Consórcio e imobilização dos microrganismos	36
4.2.4	Design do experimento de biorremediação	36
4.2.5	Monitoramento das unidades de simulação	37
4.2.6	Procedimento de análises laboratoriais	38
4.2.7	Tratamento estatístico	40
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.3.1	Caracterização do sedimento, água e óleo utilizado no experimento	41
4.3.2	Parâmetros físico-químicos, inorgânicos e microbiológicos	43
4.3.3	Análise temporal da biodegradação dos HTPs no sedimento	56
4.3.4	Análise da produção de CO₂ através do Respirômetro	60
4.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
5	CONCLUSÕES	65

REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE 1- CONCENTRAÇÃO DE N-ALCANOS DO ÓLEO DA BACIA DO RECÔNCAVO NO TEMPO ZERO DE EXPERIMENTO	71
APÊNDICE 2 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO EXPERIMENTO 1	72
APÊNDICE 3- PARÂMETROS INORGÂNICOS DO EXPERIMENTO 1.....	72
APÊNDICE 4- PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS DO EXPERIMENTO 1.....	73
APÊNDICE 5- PARÂMETROS GEOQUÍMICOS DO EXPERIMENTO 1	73
APÊNDICE 6- CONCENTRAÇÃO DE N-ALCANOS DO TRATAMENTO A DO T1 E T90	74
APÊNDICE 7- CONCENTRAÇÃO DE N-ALCANOS DO TRATAMENTO B DO T1 E T90	75

1 INTRODUÇÃO

O petróleo é um recurso natural largamente utilizado como fonte de energia e matéria-prima de diversas indústrias (VARJANI, 2017). Conforme a demanda por combustíveis fósseis cresce, a exploração e produção em áreas marinhas cada vez mais profundas aumenta de maneira progressiva (SKOGDALEN et al., 2011; SHEPPARD et al., 2014). O petróleo bruto é uma mistura de variedades de hidrocarbonetos, constituídos principalmente por carbono e hidrogênio (50-98% da composição total do petróleo), seguido de nitrogênio, enxofre e oxigênio; e são classificados em frações saturadas (alifáticos), aromáticos (anéis benzênicos), resinas e asfaltenos (COLWELL et al., 1977; BALBA et al., 1998; WIDDEL; RABUS, 2001; SPEIGHT, 2007; CHANDRA et al., 2013; VARJANI et al., 2015; LANG et al., 2016).

As atividades ligadas à indústria petrolífera são as principais responsáveis pela liberação de grande parte do petróleo no meio ambiente (JUWARKAR et al., 2010; IEA, 2012; SARTAJ; GOMEZ, 2013). Entre os ecossistemas costeiros, o manguezal é um dos mais sensíveis e vulneráveis a vazamentos acidentais de óleo, devido principalmente, a presença de grandes complexos petroquímicos próximo desses ambientes (CURY, 2002; MONTEIRO, 2003; BRITO et al., 2009; MELO, 2010; DUKE, 2016). Os hidrocarbonetos de petróleo são considerados um dos poluentes orgânicos mais persistentes, recalcitrantes e altamente tóxicos devido à presença de componentes hemotóxicos, carcinogênicos e teratogênicos (ZHANG et al., 2011; COSTA et al., 2012; CHANDRA et al., 2013; SOUZA et al., 2014; MECKENSTOCK et al., 2016; VARJANI, 2017).

Grande parte dos derramamentos de óleo no mar acabam convergindo para costa e atingem os ecossistemas de manguezais. Quando exposto no ambiente, o óleo sofre processos intempéricos, que agem através da combinação de processos físicos, químicos e biológicos, de forma a alterar sua composição original. O espalhamento, evaporação, dispersão, emulsificação e dissolução são os processos mais importantes nos períodos iniciais de um derramamento, enquanto que, oxidação, sedimentação e biodegradação ocorrem a longo prazo. A taxa de intemperismo é variável, dependendo do tipo do óleo e das condições ambientais (AL-MAJED et al., 2012; SOUZA et al., 2014; VARJANI, 2017).

Após atingir a vegetação de manguezal o óleo pode persistir no sedimento devido à limitada ação de lavagem pelas marés, resultante da densidade da vegetação e da lenta decomposição microbiana que ocorre nos sedimentos (LEWIS, 1983; TAKETANI et al., 2009). Os hidrocarbonetos apolares (hidrófobos) possuem solubilidade limitada na água, o que favorece sua tendência de associação a partículas sólidas do sedimento. Uma vez depositado, o óleo raramente se move, adere e é adsorvido a superfícies oleofílicas de plantas e animais (DUKE, 2016). A partir daí, os processos de atenuação natural agem

através dos mecanismos de biodegradação, diluição, dispersão, estabilização, evaporação, fotoxidacão, volatilização, entre outros (FERNANDES, 1994; MORENO, 2004; MELLO, 2010).

Os manguezais possuem uma importância ecológica e econômica incalculável. Desempenham estabilização e proteção da linha costeira, visto que compreendem de 60% a 75% das costas tropicais e subtropicais do mundo (HOLGUIN et al., 2001; TAKETANI et al., 2009). Além disso, é considerado um ecossistema costeiro altamente produtivo, exportador e transformador de nutrientes em matéria orgânica, com condições propícias para alimentação, proteção e reprodução de muitas espécies animais (WIEDER et al., 1982; IPIECA, 1993; SCHAEFFER-NOVELLI, 1995; LEWIS, 2005; MELLO, 2010). Como consequência, os manguezais são potenciais geradores de bens e serviços, principalmente para pesca artesanal e sustentação de comunidades ribeirinhas (HATJE; DE ANDRADE et al., 2009).

O litoral brasileiro é uma importante zona produtora de petróleo, com uma ampla distribuição de indústrias petrolíferas localizadas próximo a ecossistemas litorâneos, como o caso da Refinaria Landulfo Alves (RLAM), em Mataripe, na Bahia, localizada dentro da Baía de Todos os Santos (BTS), região que integra Área de Proteção Ambiental (APA) (IMA, 2009; SILVA JÚNIOR, 2010). Essa localidade possui um histórico de acidentes de vazamento recorrente, que datam desde 1990, quando iniciaram as investigações a fim de determinar o grau de comprometimento ambiental em função do complexo petrolífero instalado (VEIGA, 2003).

Diversos pesquisadores (TAVARES, 1996; ORGE et al., 2000; QUEIROZ et al., 2008; HATJE; DE ANDRADE et al., 2009) relataram a evolução do histórico ambiental de contaminação na BTS. Um dos primeiros acidentes datam de 1992, quando cerca de 48.000 L de petróleo bruto foram derramados pela refinaria atingindo os manguezais entorno; em 2009, aproximadamente 2.500 L de óleo vazaram para a BTS (HATJE; DE ANDRADE et al., 2009); e o mais recente, cerca de seis meses (junho de 2018) após o campo realizado para coleta de sedimento no manguezal próximo a refinaria RLAM para a execução do experimento deste trabalho.

Desde a década de 1940 a tecnologia de biorremediação vem sendo estudada, mas apenas na década de 1980, obteve popularidade devido ao derramamento de óleo do Exxon Valdez (BRAGG et al., 1994; HOFF, 1993; LIM et al., 2016). Alguns autores a consideram como uma das tecnologias verdes para a limpeza de locais poluídos por petróleo (RAHMAN et al., 2003; VARJANI et al., 2015; VARJANI, 2017). Muitas pesquisas revelaram que a biorremediação tem sido usada em diferentes locais no mundo, com uma variedade de poluentes e uma gama de condições, com vários graus de sucesso, dando destaque a bioaugmentação e a bioestimulação (CALVOET al., 2009; COULON et al., 2010; KAUPPI et

al., 2011; ŁEBKOWSKA et al., 2011; GRACE LIU et al., 2011; SHEPPARD et al., 2011; ZHAO et al., 2011; GHALY et al., 2013; SUJA et al., 2014; SMITH et al., 2015; LIM et al., 2016; POI et al., 2017; ROY et al., 2018).

A biorremediação pode ser definida como a aplicação de microrganismos vivos para acelerar a biodegradação natural de resíduos orgânicos, seja sob condições controladas para um estado inócuo ou para níveis abaixo dos limites de concentração estabelecidos pelas autoridades reguladoras (HOFF, 1993; DUA et al., 2002; RON; ROSENBERG, 2014; LIM et al., 2016; ABATENH et al., 2017; VARJANI, 2017). Bactérias e fungos são os agentes biológicos mais utilizados para limpar locais contaminados devido a abundância (91% da biomassa microbiana total em manguezais tropicais), grande diversidade de espécies, versatilidade catabólica e anabólica, bem como a capacidade de adaptação as condições adversas do meio (ALONGI, 1988; KATAOKA, 2001; HOLGUIN et al., 2001; STRONG et al., 2008; TIAN et al., 2008; ABATENH et al., 2017).

Na técnica de biorremediação, os microrganismos são capazes de converter, modificar e utilizar os poluentes tóxicos através de suas enzimas, a fim de obter energia e biomassa (TANG et al., 2007; ABATENH et al., 2017). Por meio do metabolismo desses microrganismos, os poluentes orgânicos podem ser transformados em água e CO₂ (mineralização), além de biomassa e materiais húmicos, metano e sais inorgânicos, dependendo da toxicidade e concentração inicial do contaminante, biodegradabilidade, propriedades do sedimento contaminado e do sistema de tratamento escolhido (DINEEN et al., 1992; GROVE, 1978; THOMAS et al., 1989; GENOW et al., 1994; DIAS, 2000; MELLO, 2010).

A biorremediação pode ser realizada aumentando-se a atividade microbiana local, seja por bioaugmentação ou pela bioestimulação. De acordo com Colla et al. (2008) e Mello (2010), locais contaminados com poluentes são uma boa fonte de obtenção de microrganismos para estudos de biorremediação, uma vez que o local contaminado atua como um meio de cultivo seletivo para esses microrganismos, sendo que os que permanecem nestes locais tornam-se adaptados ao poluente, que por sua vez, pode ser utilizado como fonte de nutrientes para o crescimento.

Na bioaugmentação, a adição de microrganismos com capacidade de degradar contaminantes específicos aumenta a capacidade biodegradativa das populações microbianas indígenas na área contaminada. Para tal, microrganismos são coletados no local da remediação, cultivados, testados em laboratório e devolvidos ao local, a fim de aumentar rapidamente o crescimento da população (ABATENH et al., 2017). Diversos trabalhos de revisão destacam a eficiência da biodegradação "*in situ*" por culturas microbianas mistas, principalmente através da inoculação de consórcios microbianos enriquecidos, devido à capacidade de vários fungos e bactérias em degradar diferentes

frações de petróleo (CALVOET et al., 2009; COULON et al., 2010; KAUPPI et al., 2011; ŁEBKOWSKA et al., 2011; GRACE LIU et al., 2011; SHEPPARD et al., 2011; ZHAO et al., 2011; MIKESKOVÁ et al., 2012).

Na bioestimulação, o fornecimento de nutrientes estimula os microrganismos indígenas a degradarem os hidrocarbonetos porque permite que eles criem os requisitos básicos como, energia, biomassa celular e enzimas para degradar o poluente (SANSCARTIER et al., 2009; NAIK et al., 2012; CHANG et al., 2013; WU et al., 2016; ABATENH et al., 2017). O nitrogênio (N) é essencial para a síntese celular de proteínas e de componentes da parede celular, podendo ser utilizado também como um aceptor de elétrons alternativo; e o fósforo (P), para os ácidos nucleicos, membranas celulares e ATP. Além disso, o conteúdo de fósforo e os teores de nitrogênio em relação à matéria orgânica presente depende da eficiência dos microrganismos em obter energia para síntese, a partir das reações bioquímicas de oxidação do substrato orgânico (BAKER et al., 1994; COSTA, 2009).

A velocidade da biodegradação dos hidrocarbonetos também é influenciada pelos parâmetros físico-químicos do meio (temperatura, pH, salinidade e a presença de oxigênio) (SMITH et al., 2015; ABATENH et al., 2017). Essas variáveis influenciam, direta ou indiretamente, no metabolismo dos microrganismos, e, por conseguinte, no crescimento das espécies microbianas, afetando a eficiência do processo (MACEDO et al., 2002; MELLO, 2010). As bactérias são consideradas as mais eficientes na degradação de contaminantes orgânicos presentes no sedimento, entretanto os fungos são os mais resistentes as mudanças de condições ambientais, tais como o pH e a salinidade (MELO, 2010). Por este motivo, o monitoramento das condições ambientais torna-se fundamental para otimizar o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos (BAKER et al., 1994; COSTA, 2009).

As bactérias são consideradas degradadores primários do óleo derramado no ambiente e algumas até são conhecidas por se nutrirem exclusivamente de hidrocarbonetos (RAHMAN et al. 2003; YAKIMOV et al., 2007; BROOIJMANS et al., 2009; LANG et al., 2016). Algumas bactérias são listadas com maior frequência em trabalhos de biorremediação por contaminação de hidrocarbonetos de petróleo: *Firmicutes*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Bacteroidetes* (HEAD et al., 2014; ROY et al., 2018). Os fungos também são microrganismos importantes na biodegradação de hidrocarbonetos, principalmente pela capacidade de interagir fisicamente com o poluente e crescer sob condições ambientais de estresse (JONES et al., 1968; ROSATO, 1998; MOLLEA et al., 2005; ATAGANA, et al., 2006). Estudos de biorremediação por fungos destacam os gêneros *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Penicillium* e *Cunninghamella*, isolados de ambiente estuarino, e, capazes

de utilizar o petróleo como fonte exclusiva de carbono e energia (CERNIGLIA; PERRY, 1973; MELLO, 2010).

A biorremediação *“in situ”* para a recuperação de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo surgiu como uma prática atrativa por causa da simplicidade de manutenção, aplicação em grandes áreas, baixo custo e da possibilidade de reduzir o contaminante no local, de forma menos agressiva ao meio ambiente e a mais adequada à manutenção do equilíbrio ecológico, visto que, é um sistema que estimula os processos naturais de remediação (RAHMAN et al., 2002; BENTO et al., 2005; MELLO, 2010). No entanto, a avaliação do local é importante para prever respostas aos impactos e orientar ações de conservação e/ou restauração de ecossistemas impactados (EVANS; FURLONG, 2003; SINGH; WARD, 2004; SINGH et al., 2009; DE FREITAS; PEREIRA, 2012; COLARES, 2014).

Apesar de inúmeras pesquisas realizadas no Brasil na área da biorremediação como ferramentas para a remediação de ambientes contaminados, os teste e aplicação *“in situ”* ainda são bastante limitados. No entanto, já existem no mercado alguns produtos biotecnológicos que são comercializados e utilizados em tratamentos *“ex sito”* por algumas empresas privadas. A Resolução 31 do CONAMA, assinada e publicada em outubro de 2012, visa disciplinar o registro de produtos com a finalidade de biorremediar solos afetados por vazamentos de petróleo e seus derivados, sendo esta uma opção viável: *“Seus benefícios, desde que utilizados de forma correta, recuperam ecossistemas contaminados, auxiliam no tratamento de resíduos e efluentes, bem como, na desobstrução e limpeza de dutos e equipamentos. Já, se utilizado de forma inadequada ou não sendo observados suas peculiaridades pode desequilibrar o ecossistema e danificar o meio ambiente.”* Esta Resolução estabelece que os remediadores devem ser registrados no IBAMA, para que possam ser produzidos, importados, comercializados e utilizados, ficando dispensados de registro àqueles que se destinam a pesquisa e experimento necessitando da aprovação do órgão. Em caso de não cumprimento, o infrator sujeitar-se-á as penas previstas em legislação pertinente (CONAMA, 2002; MELLO, 2010).

O potencial da biorremediação possui algumas limitações, dentre elas pode-se destacar os compostos que não são biodegradáveis, como as frações mais pesadas do óleo; alguns produtos da biodegradação que podem ser mais persistentes ou mais tóxicos do que o composto original; e geralmente leva mais tempo do que outras opções de tratamento, sendo dessa forma, um processo a longo prazo (ABATENH et al., 2017). Além disso, pode-se destacar a limitada microflora indígena e/ou a escassez de microrganismos nativos especializados em degradar diferentes frações de hidrocarbonetos em locais poluídos (RON; ROSENBERG, 2014; VARGANI, 2017). Ainda assim, as vantagens são

maiores que as desvantagens, visto o crescente interesse por pesquisadores em desenvolver trabalhos nessa área (LIM et al., 2016).

Nesse contexto, faz-se necessário investigar a eficiência da biorremediação estimulada pelo bioestímulo e bioaumento de consórcios mistos de bactérias e fungos em degradar o petróleo no sedimento de manguezal contaminado. Para isso, foram desenvolvidos dois experimentos para avaliar o potencial biotecnológico dos consórcios microbianos mistos encapsulados, utilizando a técnica de bioestímulo e bioaumento na biodegradação de HTPs em sedimento de manguezal. O experimento 1 contou com a simulação de um derramamento de óleo em mesocosmos, formado por tratamento controle, atenuação natural e biorremediação; monitoramento realizado ao longo de 90 dias, com medição dos parâmetros físico-químicos e coleta de sedimento pra análises microbiológicas e geoquímicas. O experimento 2 foi montado em sistema de microcosmo para análise da atividade microbiana heterotrófica aeróbica através de ensaios de respirometria.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de consórcios mistos de bactérias e fungos encapsulados em degradar HTPs em sedimento de manguezal utilizando o bioestímulo e bioaumento

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a- Montar um sistema em mesocosmos semiaberto e em microcosmos fechado, simulando um derramamento de petróleo em um ecossistema de manguezal;

b- Caracterizar a composição físico-química da água e do sedimento de manguezal;

c- Correlacionar a ocorrência dos microrganismos (fungos e bactérias) com os fatores ambientais (granulometria, temperatura, pH, salinidade, nitrato e amônio, fosforo assimilável, carbono orgânico total) através do monitoramento do sistema em mesocosmos;

d- Testar a eficiência de consórcios mistos de fungos e bactérias, utilizando a bioaugmentação e bioestimulação, em degradar HTPs através da técnica de cromatografia gasosa.

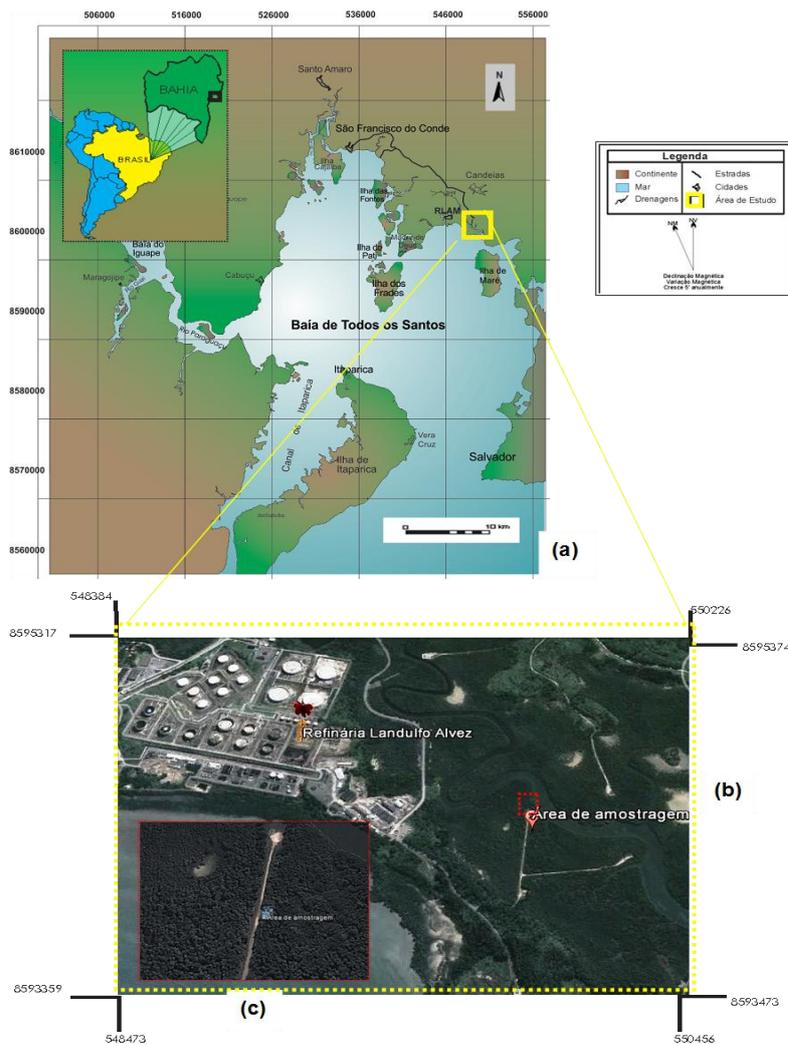
3 MATERIAIS E MÉTODOS

Seguem informações sobre a área de amostragem, coleta, caracterização, montagem dos experimentos e monitoramento das unidades de simulação deste estudo.

3.1 ÁREA DE AMOSTRAGEM

A área de amostragem está localizada no estuário do rio São Paulo, entre os municípios de São Francisco do Conde e Candeias, nas coordenadas $12^{\circ} 44' 26,0''$ (S) e $38^{\circ} 31' 53,9''$ (W) (Figura 1). Nesta região está localizada a refinaria Landulpho Alves de Mataripe (RLAM), uma área marcada pelas atividades ligadas à indústria petrolífera, como campos de exploração, produção e refinaria (ONOFRE et al., 2007; HATJE; DE ANDRADE et al., 2009; DOMINGUEZ, et al, 2011; DANTAS, 2016).

Figura 1- Mapa de localização da área de coleta. a) Mapa da Baía de Todos os Santos. b) Imagem aérea da área em destaque. c) Local de coleta



Fonte: Lima, 2014.

3.2 COLETA DE CAMPO

O sedimento e a água utilizada nos experimentos foram coletados no campo realizado em 12 de dezembro de 2017. A coleta foi feita em uma área visivelmente isenta de indício de hidrocarbonetos, onde foi selecionado um ponto em local de deposição lamosa, na parte do manguezal mais próxima às zonas marginais inundáveis.

Foram coletados 40 kg de sedimento de manguezal controle, a 10 cm da superfície de sedimento lamoso com o auxílio de um testemunhador de tubo de aço inoxidável, visto que a atividade microbiológica é altamente concentrada nas primeiras camadas do solo (RIZZO et al., 2014; DANTAS, 2016). As amostras foram homogeneizadas em bacias de alumínio e encaminhadas para o laboratório (Figura 2).

A coleta das amostras de água foi realizada no estuário do rio São Paulo em garrafões de polietileno de 20 L para serem armazenados em garrafões adaptados para utilização da simulação da subida e descida da maré nas unidades de simulação (Figura 2). Os parâmetros físico-químicos da água do rio (oxigênio dissolvido, temperatura, potencial hidrogeniônico (pH) e salinidade) foram medidos, *in situ*, com o auxílio de uma sonda multiparâmetros (HORIBA, U50).

Figura 2- Campo realizado no manguezal para coleta de sedimento e água. a) Coleta de sedimento em local de deposição lamosa com o auxílio de um testemunhador inox. b) Coleta de água no píer próximo ao ponto de coleta do sedimento



Fonte: Autora, 2017.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO SEDIMENTO, ÁGUA E ÓLEO

A caracterização do sedimento e da água utilizada no experimento foi realizada utilizando as técnicas e equipamentos para as análises físico-químicas, geoquímicas e microbiológicas, descritas na metodologia do item 3.6.1 e 3.6.2 e listados na Tabela 3 do item 4.3.1 para os Resultados e Discussão.

A caracterização do sedimento foi feita através das análises inorgânicas da metodologia da EMBRAPA (2009); as análises microbiológicas pela metodologia de diluição seriada por microgota de Romeiro (2011) e Gerba et al. (2004); e as análises geoquímicas através da metodologia de Ultrassom *METHOD 3550C*, adaptado pela LEPETRO/UFBA e cromatografia a gás (CG/FID). A caracterização da água do rio estuário foi realizada através da medição dos parâmetros físico-químicos e pela cromatografia líquido-líquido da U.S. EPA 3510C.

A caracterização do óleo utilizado para a simulação do derramamento de petróleo dos experimentos de biorremediação foi procedente da Bacia do Recôncavo Baiano, Campo Água Grande, cedido pela empresa PETROBRÁS. O extrato do óleo foi analisado para a determinação dos parâmetros e do perfil cromatográfico dos HTPs através do método “*whole oil*”, utilizando o cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG/FID, modelo 7890B, Agilent Technologies, Califórnia, USA), como listados na Tabela 1 do item 4.3.1 para os Resultados e Discussão.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS CONSÓRCIOS

Os consórcios microbianos utilizado no experimento foram formados por bactérias e fungos pré-selecionados dos trabalhos de Lima (2014) e Dantas (2016). Os microrganismos escolhidos foram coletados na mesma área de amostragem desse trabalho e passaram por testes de potencial de oxidação/redução, que comprovaram a capacidade de degradação das diferentes frações do petróleo da Bacia do Recôncavo Baiano. O critério de escolha foi o melhor desempenho em utilizar o carbono (C) como fonte de energia.

O encapsulamento das cepas bacterianas e fúngicas foi realizado segundo a metodologia modificada por Lima (2014) (Figura 3). Utilizou-se uma alíquota de suspensão microbiana do consórcio, formada por substratos naturais. Um dos substratos naturais utilizados, além de ter uma função absorviva, estrutural e aeração ativa, é também uma matéria-prima barata e de fácil acesso. O outro substrato natural é composto principalmente por fósforo e nitrogênio, que funcionam como aditivo nutricional, e através do processo de degradação, esses nutrientes voltam a estar disponíveis para serem consumidos pelos microrganismos.

A aplicação dos substratos naturais teve como objetivo bioestimular os consórcios imobilizados através da liberação lenta de nutrientes e suporte estrutural para promover a biodegradação do óleo pelos microrganismos indígenas. Além disso, utilizou-se matéria prima econômica e acessível para aperfeiçoar a técnica, torná-la mais eficiente e viável financeiramente.

Figura 3- Consórcios microbianos encapsulados à base de polímeros naturais



Fonte: Lima, 2014.

Nesse experimento a imobilização microbiana através do encapsulamento teve a finalidade de fornecer suporte físico para a formação de biofilme e liberação lenta de células microbianas no meio, resultando em uma maior capacidade de suporte a fatores ambientais estressantes, diminuindo o dano na membrana celular, além de proteger os microrganismos da predação e competição.

3.5 MONTAGEM DOS EXPERIMENTOS

A montagem dos experimentos foi realizada no laboratório do LEPETRO. Todas as vidrarias utilizadas foram previamente descontaminadas com solvente diclorometano (DCM) recuperado, solução alcoólica de hidróxido de potássio (KOH) a 5% (5 m v^{-1}), depois mergulhadas em solução com EXTRAN neutro a 10% (10 v v^{-1}) por 24 horas e por último, lavada com água destilada e seca em estufa a $100 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.5.1 Experimento 1

O experimento 1 foi formado por 9 unidades de simulação (aquários de vidro), contendo cada um, 24 provetas de vidro, sustentadas por um suporte de madeira. Foi feito o revestimento das provetas com sacos de algodão para evitar a grande incidência de

luminosidade e para que o sedimento sempre permanecesse em contato com a água (Figura 4).

O sedimento coletado no campo foi homogeneizado e adicionado 10 cm de testemunho, equivalente a 140 g, em cada proveta forrada com saco de algodão. O sedimento não passou por processo de esterilização para que a simulação do derramamento de óleo no meio fosse o mais próximo do que ocorre em condições reais no manguezal.

Durante a montagem da simulação de derramamento de óleo no sedimento foi feita a introdução das cápsulas através de um furo no centro da superfície do sedimento da proveta e coberto com o petróleo cru sobre as cápsulas e o sedimento. Além disso, foi feita uma homogeneização do mesmo, com o intuito de aumentar a superfície de contato das cápsulas com o óleo.

O sistema de simulação da maré foi realizado durante 90 dias de experimento utilizando a água coletada no estuário do rio São Paulo. Este modelo consistiu em controlar o nível mínimo e máximo em que a água estaria em contato com as provetas contendo sedimento, simulando o nível de maré baixa e alta, respectivamente.

As unidades de simulação foram acopladas a estruturas de mangueiras, uma ligada à bomba dentro do aquário, onde a água era bombeada para um galão de 20 L (simulando a descida da maré), e outra ligada ao aquário, onde a água era deslocada do galão para preencher o aquário por força de gravidade (subida da maré), gerando dessa forma, um ciclo de duas enchentes e duas vazantes diariamente.

As bombas foram ligadas a um relógio digital (*Timer*), que controlou os ciclos de marés através do relógio digital programado para ligar e desligar no horário aproximado da descida da maré. Este sistema foi uma adaptação do sistema de simulação de flutuação de marés de VERANE (2016).

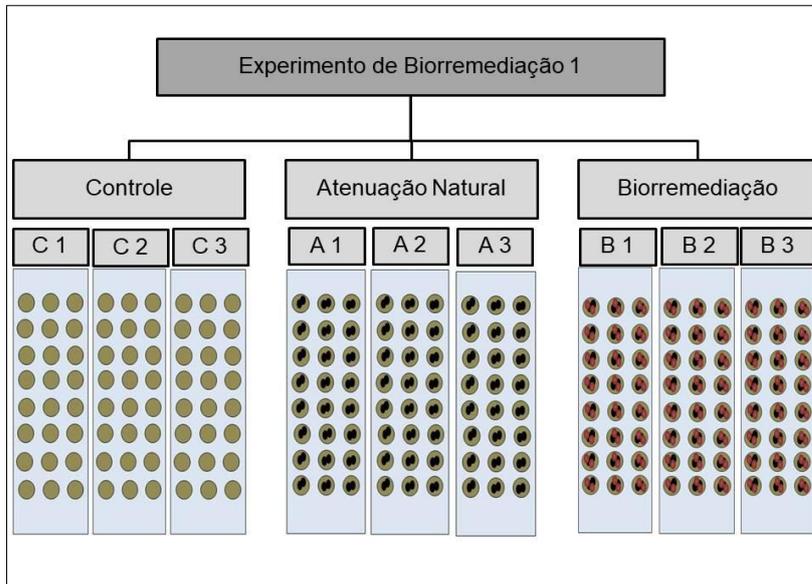
Durante os tempos de coletas, também foram realizadas medições dos parâmetros físico-químicos (salinidade, pH e T°) utilizando uma sonda multiparâmetros (*HORIBA, D-54*):

Figura 4- (a) Experimento 1 de biorremediação em sistema de mesocosmos montado na bancada de laboratório formado por garrafões de 20 L contendo água coletada no rio São Paulo ligado as unidades de simulação com sistema automático de simulação de marés (b) Preenchimento das provetas com sedimento, consorcio microbiano encapsulado e óleo (c) Unidade de simulação com provetas de vidro



Fonte: Autora, 2017.

O experimento em mesocosmos montado na bancada do laboratório foi constituído por três unidades de simulação: a triplicata atenuação natural (biorremediação intrínseca)(A), formada pelo sedimento referência e adição de petróleo da Bacia do Recôncavo; a triplicata controle (C), por sedimento referência sem adição de petróleo; e a triplicata biorremediação (B), por sedimento referência com adição de petróleo da Bacia do Recôncavo e consórcio microbiano misto encapsulado com polímeros naturais (Figura 5 e Quadro 1).

Figura 5- Delineamento ilustrativo do experimento 1 em mesocosmos

Fonte: Autora, 2017.

Quadro 1- Descrição dos ensaios do experimento 1 em mesocosmos

Mesocosmos	Tratamento	Descrição
C1, C2 e C3	Controle	140 g de sedimento referência
A1, A2 e A3	Atenuação natural	140 g de sedimento referência + 1,4 g óleo
B1, B2 e B3	Biorremediação (bioaumento e bioestímulo)	140 g de sedimento referência + 1,4 g óleo + 4,2 g consórcio microbiano misto encapsulado com substratos naturais

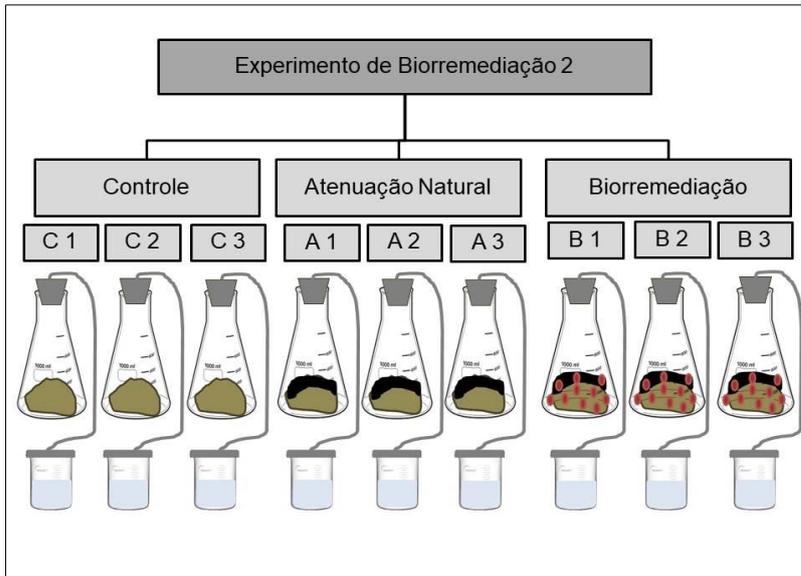
A montagem das provetas com o sedimento homogeneizado foi realizada dentro da capela de fluxo laminar. Foram montado os ensaios C1, C2 e C3 apenas com sedimento referência; posteriormente os ensaios A1, A2 e A3, com sedimento referência mais o óleo da Bacia do Recôncavo, equivalente a 1% da massa de sedimento (1,4 g de óleo bruto); e os ensaios B1, B2 e B3, formado por sedimento referência, 1,4 g de óleo bruto e as cápsulas, equivalente a 3% da massa do sedimento referência (4,2 g).

3.5.2 Experimento 2

O experimento 2 foi realizado segundo uma adaptação da norma L3650 da CETESB (1999) “Solos - Determinação da Biodegradação de Resíduos - Método respirométrico de Bartha”. Esta norma utiliza a quantificação de gás carbônico (CO₂) pelos microrganismos do sedimento através da reação entre a solução KOH com o CO₂ liberado pela biodegradação do substrato.

O modelo do respirômetro foi montado em um sistema fechado, constituído por duas câmaras, um erlemeyer de 500 mL e um frasco de vidro interligado por uma mangueira (Figura 6).

Figura 6- Delineamento ilustrativo do experimento 2 em microcosmos



Fonte: Autora, 2017.

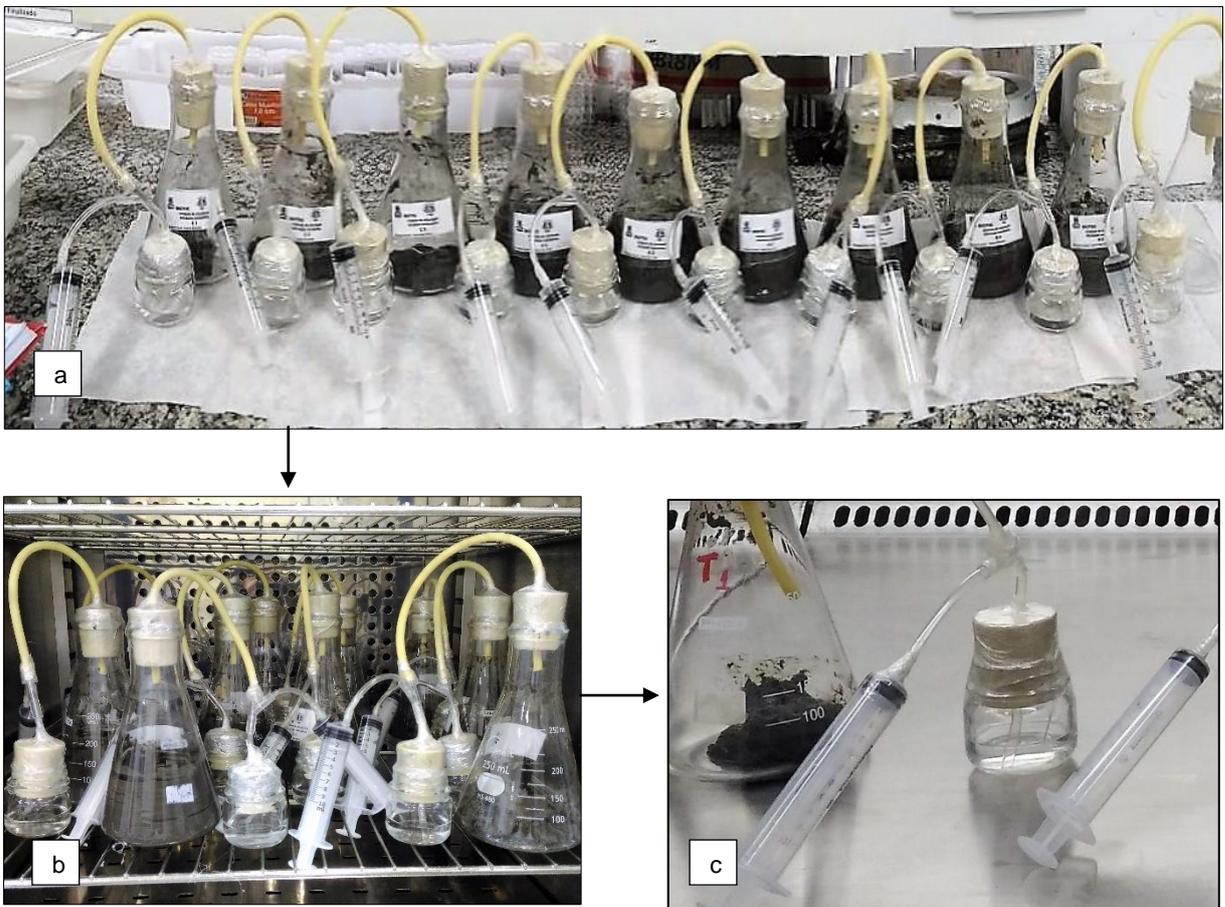
Para o preparo do método respirométrico foram utilizados tratamentos similares ao experimento 1: atenuação natural, controle, biorremediação e o branco do sistema (Quadro 2). A incubação foi realizada durante 90 dias e as coletas foram realizadas nos tempos 0, 1, 30, 60 e 90 dias.

Quadro 2- Descrição dos ensaios do experimento 2 em microcosmos

Microcosmos	Tratamento	Descrição
C1, C2 e C3	Controle	50 g de sedimento referência
A1, A2 e A3	Atenuação natural	50 g de sedimento referência + 0,5 g óleo
B1, B2 e B3	Biorremediação (bioaumento e bioestímulo)	50 g de sedimento referência + 0,5 g óleo + 1,5 g consórcio microbiano misto encapsulado com polímeros naturais
BS	Branco do sistema	-

Nos tratamentos em triplicata foram empregados 50 g de sedimento em cada erlemeyer e nos frascos de vidro 10 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio (KOH) a 0,2 N. Posteriormente, os frascos foram lacrados com cola adesiva e papel filme para impedir o contato com o meio externo e infiltração de CO₂ dentro do sistema, restando apenas, a ligação entre as duas câmeras que proporcionaram a transferência de gases entre eles (Figura 7). O experimento foi disposto dentro de uma câmara incubadora a 28 °C durante o período de 90 dias de experimento.

Figura 7- (a) Experimento 2 de biorremediação em sistema de microcosmos formado por erlemeyer e frasco de vidro interligado por uma mangueira (b) Respirômetros adaptados em incubadora a 28° C (c) Frasco de vidro contendo solução KOH



Fonte: Autora, 2018.

3.6 MONITORAMENTO DAS UNIDADES DE SIMULAÇÃO

O monitoramento das unidades de simulação do experimento 1 consistiu no monitoramento dos parâmetros físico-químicos, microbiológico e geoquímico.

A coleta das amostras de sedimento foi realizada nos intervalos de 0, 1, 15, 30, 60 e 90 dias (T0, T1, T15, T30, T60 e T90) (Quadro 3). Em cada amostragem foram retiradas 3 provetas de sedimento, homogêneas em um recipiente de alumínio e separadas em frações dentro de frascos de vidro para determinação dos analitos (Figura 8). Um total de 46 amostras de sedimento foram coletadas em 6 dias de amostragens e analisadas nos laboratórios do LEPETRO.

Quadro 3- Cronograma de amostragem do experimento 1

Cronograma de amostragem					
Tempo (T)	T1	T15	T30	T60	T90
Ensaio/Data	09/01/18	23/01/18	06/02/18	09/03/18	09/04/18
A1, A2 e A3	X	x	x	x	X
C1, C2 e C3	X	x	x	x	X
B1, B2 e B3	X	x	x	x	X

Figura 8- Coleta das amostras de sedimento dentro do fluxo laminar nos dias de amostragem

Após as coletas, as amostras foram congeladas e depois liofilizadas sob alto vácuo a temperatura de $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ em liofilizador. Posteriormente, desagregadas e peneiradas em malha de 2 mm.

3.6.1 Monitoramento microbiológico

As análises tiveram como objetivo avaliar o crescimento microbiano em sedimento de manguezal contaminado com óleo da Bacia do Recôncavo através de métodos quantitativos e qualitativos.

Os procedimentos experimentais de biodegradação deram suporte para a avaliação do crescimento da comunidade microbiana associada à degradação dos hidrocarbonetos de petróleo. Para a medida qualitativa, foi estimado o aumento da atividade microbiana no sedimento através do método respirométrico de Bartha, e a medida quantitativa foi avaliada através do número de microrganismos por diluição seriada por microgota ou número mais provável (*Pour-plate*).

3.6.1.1.Método de Número Mais Provável (NMP)

Para as bactérias foi utilizada a metodologia de diluições seriadas por microgota até a diluição 10^{-8} de Romeiro (2011). Pesou-se uma alíquota de 25 g de sedimento em um erlenmeyer contendo 250 mL de solução salina (2,25 g de NaCl e 0,750 mL de *Tween* 80), transferidas 0,1 mL da diluição para microtubos contendo 0,9 mL da solução e assim sucessivamente até a diluição 10^{-8} . A partir de cada diluição foi transferido quatro alíquotas de 0,1 mL de cada diluição para placas de petri contendo meio de cultivo Ágar Nutriente (*NEOGEN*, Brasil). As placas contendo as alíquotas das diluições foram incubadas por 24 horas a 30 °C na incubadora e posteriormente foi feita a contagem das UFCs com o auxílio do contador de colônias manual.

Para os fungos foi utilizada a metodologia de diluições seriadas até a diluição 10^{-5} de Gerba et al. (2004). Pesou-se uma alíquota de 10 g de sedimento em um erlenmeyer contendo 250 mL de solução salina (0,95 g de NaCl e 95 mL), transferidas 1 mL da diluição para *vials* contendo 9 mL da solução e assim sucessivamente até a diluição 10^{-5} . A partir de cada diluição foi transferido uma alíquota de 1 mL de cada placa de petri e depois completado com meio de cultivo Ágar *Sabouraud Dextrose* 4% (*NEOGEN*, Brasil) e 0,1 g cloranfenicol diluído em 10 mL de álcool. As placas contendo as alíquotas das diluições foram incubadas por 5 dias a 30° C e posteriormente foi feita a contagem das UFCs com o auxílio do contador de colônias manual.

3.6.1.2.Respirômetro de Bartha

A quantificação de CO_2 foi feita periodicamente pela retirada da solução KOH residual através de uma seringa conectada ao sistema para impedir a entrada de CO_2 externo. Seguidamente, o KOH foi disposto em um erlemeyer de 150 mL, adicionado 1 mL de cloreto de bário (1N) e 2 gotas de fenolftaleína, como indicador ácido-base. A solução foi submetida a uma titulação com solução padronizada de ácido clorídrico (0,1N) e anotada a quantidade utilizada para alcançar a viragem do indicador na solução alcalina.

Também foi realizada uma solução controle recém-preparada na hora da titulação para servir de branco e averiguar se houve infiltração de gás no sistema. Este frasco foi considerado a solução controle, cujo valor foi comparado com as leituras efetuadas nos outros tratamentos (CETESB, 1999). Dessa forma, esperou-se que a biodegradação dos compostos orgânicos pelos microrganismos encapsulados produzisse CO_2 e que este fosse capturado pela solução alcalina KOH.

3.6.2 Monitoramento físico-químico

Os parâmetros físico-químicos (pH, temperatura e salinidade) foram obtidos através de uma sonda portátil digital (*HORIBA*, D-54). Objetivou-se com estes parâmetros monitorar as características da água em contato com o sedimento durante o experimento.

A análise granulométrica foi realizada para caracterização do tamanho granulométrico do sedimento, de acordo com a metodologia de peneiramento mecânico, pesagem e classificação da EMBRAPA (2011). Pesou-se uma alíquota de 1,5 g de sedimento peneirado em malha de 500 μm , adicionou-se 1 mL de H_2O_2 e aguardou sessar a reação. Posteriormente foi colocado em bloco digestor à 60 °C por 3 horas, adicionado 20 mL de solução de hexametáfosfato de sódio à 0,1 mol^{-1} e colocado em mesa agitadora por 4 horas.

A caracterização do tamanho granulométrico do sedimento foi realizada através do analisador de partículas com difração a laser (Cilas 1064) e as classificações foram feitas segundo Folk et al. (1957), usando software estatístico. A classificação textural dos sedimentos foi baseada na porcentagem relativa das diferentes faixas de tamanhos das frações: <4 μm fração argila; 4-63 μm silte; 63-2000 μm areia.

3.6.3 Monitoramento geoquímico

Foram realizadas análises dos compostos inorgânicos e orgânicos com o objetivo de avaliar a biodegradação dos compostos no sedimento ao longo do tempo.

3.6.3.1. Determinação de carbono orgânico total

Para a determinação do COT foi utilizada a metodologia da EMBRAPA (2011). Pesou-se uma alíquota de 0,1 g de sedimento de granulometria 80 *mesh* em barcas porosas, adicionou-se 10 mL de HCl à 1 mol L^{-1} e aguardou sessar a reação. Posteriormente foi adicionado água destilada à 80° C para a retirada do HCl, colocado em placas aquecedoras à 60 °C e em estufa por 2 horas para secagem das amostras. As barcas foram colocadas em dissecador por 30 minutos e depois foram pesadas em balança analítica. Por último, foi utilizado um analisador elementar (*LECO-CN 628*) para determinação do COT.

3.6.3.2 Determinação de nitrato e amônio

Para determinação do nitrato e amônio foi utilizada a metodologia da EMBRAPA (2011). Pesou-se uma alíquota de 10 g de sedimento, adicionou-se 100 mL de cloreto de

potássio (KCl) 1M e colocado em mesa agitadora por 1 hora. Para a determinação do amônio (NH_4^+) foi adicionado à 30 mL do sobrenadante 0,2 g de óxido de magnésio (MgO), 5 mL de solução indicadora de ácido bórico (H_3BO_3) à 2% clorado e colocado para destilar por 3 minutos no *Kjeldhal* com destilador arraste de vapor. Para a determinação do nitrato (NO_3^-) foi adicionado à 30 mL do sobrenadante 0,2 g de liga de dervada, 5 mL de H_3BO_3 2% clorado e colocado para destilar por 3 minutos no *Kjeldhal*. Posteriormente foi feita uma titulação com H_2SO_4 0,005 (M) para a determinação do nitrato e amônio.

3.6.3.3 Determinação de fósforo

Para determinação do fósforo assimilável foi utilizada a metodologia da EMBRAPA (2011). Pesou-se uma alíquota de 0,4 g de sedimento, adicionou-se 10 mL de ácido clorídrico (HCl) à 1 M e colocou em mesa agitadora por 16 horas. Posteriormente foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm, retirada uma alíquota de 1 mL, adicionado 0,8 mL de solução ácida de molibdato e tartarato (0,025g/mL), 10 mL de água deionizada e 0,2 mL de ácido ascórbico à 25 mg L⁻¹. Após 10 minutos foi realizada a determinação em espectrofotômetro (*Agilent Cary 60*) em 880 nm utilizando uma cubeta de quartzo de 3,5 mL com duas faces opacas e duas faces polidas.

3.6.3.4 Extração, análise cromatográfica e controle de qualidade

A extração das amostras foi realizada através do método de extração por ultrassom *METHOD 3550C*, adaptado LEPETRO/UFBA. Pesou-se 3 g de sedimento, adicionou-se 50 µL do padrão subrogado (*P-terphenyl* D14, 2000 µg L⁻¹), 25 mL da mistura de *n*-hexano (*MERK, Darmstadt, Alemanha*) e diclorometado (*MERK, Darmstadt, Alemanha*) (1:1, V:V). Posteriormente, as amostras foram colocadas em aparelho ultrassom com frequência 35 Hz por 15 minutos e em seguida as amostras foram filtradas em sulfato de sódio anidro (pré-calcinado a 400 °C por 4 h). O mesmo procedimento foi realizado por 3 vezes consecutivas, utilizando um total de 75 mL da mistura de solventes. Foram adicionados aos extratos, cobre ativado para remover o enxofre elementar, depois as amostras foram concentradas em um evaporador rotativo à vácuo, a um volume inferior a 500 µL. Os extratos foram transferidos para *vials* e avolumados a 1000 µL com DCM (*MERK, Darmstadt, Alemanha*) para serem injetados em um cromatógrafo movido a gás, com coluna capilar DB 5 e detector de ionização de chama (CG/FID, modelo 7890B, *Agilent Technologies, Califórnia, USA*) para a determinação dos HTPs (pristano, fitano, HTP e UCM).

Para garantir que não houve fonte de contaminação do laboratório durante as análises, em cada lote de nove amostras foi realizado uma amostra branco (10% de branco), onde esta foi submetida aos mesmos procedimentos analíticos das amostras reais. Também foram feitas réplicas de bancada para garantir a precisão do método. Além disso, foi realizada a fortificação de amostras controle de sedimento para garantir a extração total dos HTPs das amostras através da adição de uma amostra de referência que continha o analito de interesse. Para isso foi adicionado uma quantidade conhecida de alcanos (C8 – C40) referência em duplicata e as amostras fortificadas foram analisadas da mesma forma que as amostras do monitoramento. Dessa forma foi possível avaliar a exatidão e precisão do método de extração.

Nas amostras de água do experimento foi aplicado o método de extração líquido-líquido da U.S. EPA 3510C. Mediu-se 750 mL de amostra da água em um funil de filtração, adicionou-se 30 mL de DCM (*MERK, Darmstadt, Alemanha*) e foi feita agitação por 3 minutos. Após espera da separação das fases polar (água) e apolar (óleo e DCM) a torneira foi aberta para a retirada do óleo e DCM em um balão. O mesmo procedimento foi feito três vezes. Em seguida, houve a concentração deste extrato com o auxílio de um rotovaporador, transferidos para micro *vials*, avolumados para 60 µL e encaminhados para leitura no cromatógrafo gasoso.

4 BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL POR CONSÓRCIOS MICROBIANOS ENCAPSULADOS

RESUMO

Uma simulação de derramamento de petróleo no sedimento de manguezal foi realizada através do sistema em mesocosmos para avaliar o potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo, por meio do bioaumento e do bioestímulo, utilizando consórcios microbianos de bactérias e fungos encapsulados com polímeros naturais. Após 90 dias de experimento o monitoramento dos parâmetros físico-químicos, geoquímicos e microbiológicos em amostras de sedimento indicaram que a biorremediação (B) não aumentou significativamente a biodegradação de HTPs em comparação com a atenuação natural (A). A razão HTP/UCM e a distribuição dos n-alcenos apontou uma pequena eficiência de 12% e redução da concentração dos n-alcenos a partir do C₁₇ ao C₃₅ para o tratamento B, contra 3% para o tratamento A. O predomínio da comunidade bacteriana seguido da sucessão da comunidade fúngica indicou a contribuição da atividade microbiana na biodegradação no processo de aceleração da degradação dos HTPs.

Palavras-chave: Biorremediação, bioaugmentação, bioestimulação, consórcios microbianos, hidrocarboneto total de petróleo (HTP), sedimento de manguezal contaminado com óleo.

ABSTRACT

A simulation of oil spill in the mangrove sediment was carried out through the mesocosmos system to evaluate the potential for biodegradation of petroleum hydrocarbons through bioaugmentation and biostimulation using microbial consortia of bacteria and fungi encapsulated with natural polymers. After 90 days of the experiment the monitoring of the physical-chemical, geochemical and microbiological parameters in sediment samples indicated that bioremediation (B) did not significantly increase the biodegradation of TPH in comparison to natural attenuation (A). The TPH/UCM ratio and the n-alkane distribution indicated a small efficiency of 12% and reduction of the concentration of the n-alkane from the C₁₇ to the C₃₅ for treatment B versus 3% for treatment A. The predominance of the bacterial community followed by the succession of the fungal community indicated a contribution of microbial activity to biodegradation in the process of acceleration of degradation of TPH.

Keywords: Bioremediation, bioaugmentation, biostimulation, microbial consortium, total petroleum hydrocarbon (TPH), oil contaminated mangrove sediment.

4.1 INTRODUÇÃO

Ecossistema de manguezal é considerado um dos ambientes mais susceptíveis a acidentes envolvendo derramamento de petróleo, que ocorrem principalmente durante a exploração, o transporte e o refino (CURY, 2002; MONTEIRO, 2003; WU et al., 2016; TAM; WONG, 2008; LANG et al., 2016). Os impactos do derramamento de óleo podem persistir por décadas, devido a natureza hidrofóbica e sua recalcitrância no ambiente (DUKE, 2016; ROY et al., 2018). Diversos pesquisadores (TANG et al., 2011; HENTATI et al., 2013; EL-

SHESHTAWY et al., 2014; KANARBIK et al., 2014; MA et al., 2014; GAO et al., 2015) pelo mundo todo tem alertado sobre os efeitos negativos da poluição por hidrocarbonetos na saúde humana e no meio ambiente (LIM et al., 2016; WU et al., 2016).

Após atingir os manguezais, os hidrocarbonetos de petróleo tendem a se depositar e se associar as partículas do sedimento devido à limitada ação de lavagem pelas marés e da pouca solubilidade em água (LEWIS, 1983; TAKETANI et al., 2009). Uma vez adsorvido as superfícies oleofílicas do sedimento, das plantas e animais, torna-se difícil e custoso a retirada desse tipo de contaminante (DUKE, 2016). A biorremediação é uma das biotecnologias verdes, alternativa aos procedimentos convencionais de descontaminação, e é considerada uma técnica eficiente, econômica e ambientalmente correta (FARHADIAN et al., 2008; CHANDRA et al., 2013; ABATENH et al., 2017; WU et al., 2017; VARJANI, 2017). O processo de biodegradação de poluente através de microrganismos envolve uma série de etapas utilizando diferentes enzimas que atuam como biocatalizadores e facilitam o processo das reações bioquímicas, transformando os contaminantes orgânicos em CO₂, água e biomassa (mineralização), ou reduzindo a concentração dos poluentes em níveis não detectáveis, não tóxicos ou aceitáveis pelas agências de controle ambiental (LITCHFIELD, 2005; ABBASIAN et al., 2015).

Estudos recentes de Wu et al. (2016) e Wu et al. (2017), indicaram que a inoculação de microrganismos (bioaumento) e o fornecimento de nutriente (bioestímulo) são métodos eficazes para estimular e aumentar a velocidade da biorremediação. A bioestimulação e o bioaumento para a degradação de hidrocarbonetos no sedimento contaminado já tem sido utilizada por outros pesquisadores, principalmente com bactérias e fungos indígenas, isolados nos locais contaminados por óleo, visto que estes podem facilmente adaptar-se e aclimatar-se no mesmo ambiente (SUJA et al., 2014; DUEHOLM et al., 2015; WU et al., 2017; GHOREISHI et al., 2017; SARKAR et al., 2017; ROY et al., 2018). Outro fator importante que contribui para a aceleração da degradação microbiológica são os parâmetros físico-químicos, como a temperatura, pH, salinidade e a presença de oxigênio, visto que influenciam o metabolismo e, por conseguinte, no crescimento das espécies microbianas (MELLO, 2010; MACEDO et al., 2002; SMITH et al., 2015; ABATENH et al., 2017).

O litoral brasileiro é uma importante zona produtora de petróleo, com uma ampla distribuição de indústrias petrolíferas localizada próximo a ecossistemas litorâneos. Acidentes decorrentes do vazamento de óleo, especialmente nas áreas de manguezais, geraram impacto negativo bastante significativos na Baía de Todos os Santos (BTS), na Bahia, Brasil (SILVA JÚNIOR, 2010). Alguns trabalhos realizados na região, como o de TAVARES (1996); ORGE et al. (2000); CELINO et al. (2008); HATJE; DE ANDRADE et al. (2009), relataram a evolução do histórico de contaminação ambiental, que datam desde 1992, quando cerca de 48.000 L de petróleo bruto foram derramados pela refinaria Landulfo

Alves (RLAM), em Mataripe, na Bahia, atingindo os manguezais entorno; em 2009, aproximadamente 2.500 L de óleo vazaram para a BTS (HATJE; DE ANDRADE et al., 2009); e o mais recente, cerca de seis meses (junho de 2018) após o campo realizado para coleta de sedimento no manguezal próximo a refinaria RLAM, para a execução do experimento deste trabalho.

Neste estudo, montou-se um experimento em mesocosmos simulando um derramamento de óleo em sedimento de manguezal para testar a eficiência de consórcios de bactérias e fungos encapsulados em degradar os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs), utilizando a combinação de bioestímulo e bioaumento. Os objetivos foram (1) correlacionar a ocorrência dos microrganismos (fungos e bactérias) com os fatores ambientais (granulometria, temperatura, pH, salinidade, nitrato e amônio, fósforo assimilável, carbono orgânico total), e (2) testar a eficiência dos consórcios mistos de fungos e bactérias quanto à capacidade em degradar HTPs através da técnica de cromatográfica gasosa. Neste artigo, foram apresentados os resultados experimentais para a avaliação do desempenho da bioaugmentação e bioestimulação em um experimento em mesocosmos.

4.2 MATERIAL E MÉTODO

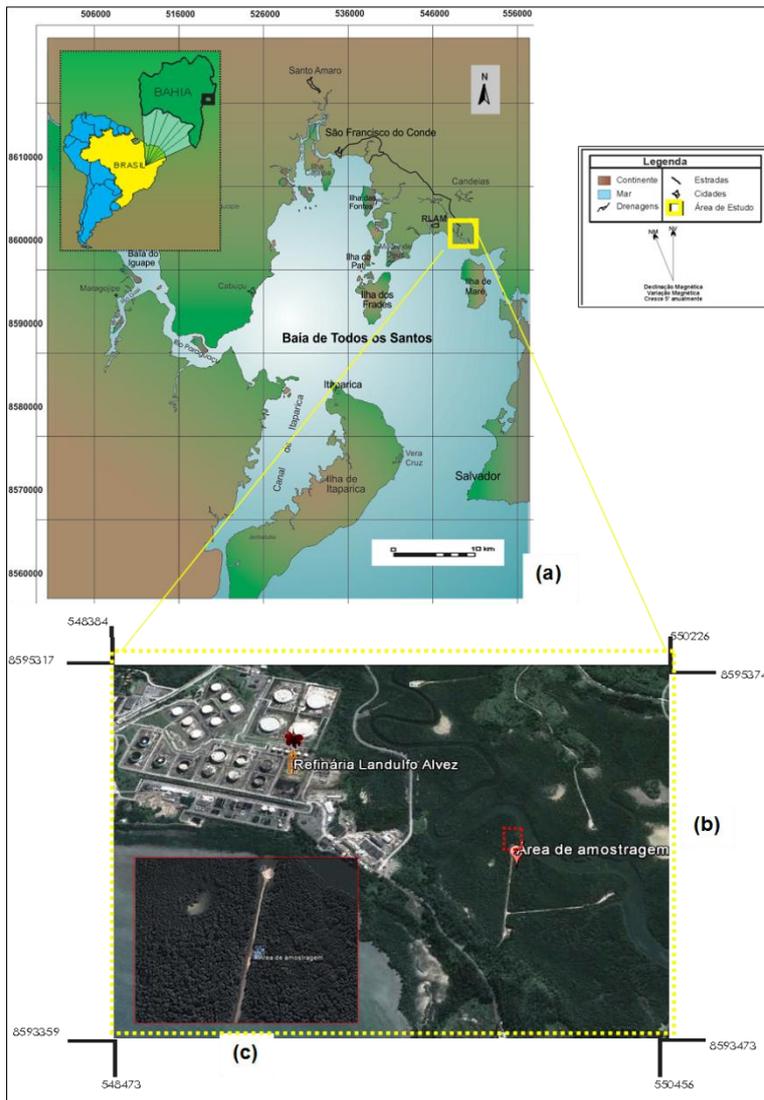
Seguem informações sobre a área de amostragem, coleta, caracterização, montagem dos experimentos e monitoramento das unidades de simulação deste estudo.

4.2.1 Amostragem e pré-tratamento

As coletas de sedimento e água utilizada nos experimentos foram realizadas em 12 de dezembro de 2017, em uma área localizada no estuário do rio São Paulo, entre os municípios de São Francisco do Conde e Candeias, nas coordenadas 12° 44' 26,0" (S) e 38° 31' 53,9" (W) (Figura 9). Nesta região está localizada a refinaria RLAM, uma área marcada pelas atividades ligadas à indústria petrolífera, como campos de exploração, produção e refinaria (ONOFRE et al., 2007; HATJE; DE ANDRADE et al., 2009; DOMINGUEZ, et al., 2011; DANTAS, 2016).

A coleta do sedimento foi realizada em um ponto visivelmente isento de indício de hidrocarbonetos em local de deposição lamosa, na parte do manguezal mais próxima às zonas marginais inundáveis. Foram coletados 40 kg de sedimento de manguezal controle em bacias de alumínio, a 10 cm da superfície de sedimento lamoso com o auxílio de um testemunhador de tubo de aço inoxidável, visto que a atividade microbológica é altamente concentrada nas primeiras camadas do solo (RIZZO et al., 2014).

Figura 9- Mapa de localização da área de coleta do sedimento e água utilizados no experimento. a) Mapa da Baía de Todos os Santos. b) Imagem aérea da área em destaque. c) Local de coleta



Fonte: Lima, 2014.

A coleta de água foi realizada em garrações de polietileno de 20 L. Com o auxílio de uma sonda multiparâmetros (*HORIBA, U50*), foram feitas medições “*in situ*” da água para os parâmetros físico-químicos: temperatura, potencial hidrogeniônico (pH) e salinidade.

4.2.2 Caracterização do óleo e sedimento

O óleo utilizado para a simulação do derramamento de petróleo nos experimentos foi procedente da Bacia do Recôncavo Baiano, Campo Água Grande, cedido pela empresa PETROBRÁS, Brasil. Os óleos desta bacia são de origem lacustre de água doce e são caracterizados como óleo leve (API superior a 29,5), do tipo parafínico (> presença de n -

alcanos), com baixa proporção de compostos NSO (GANGLIONE et al., 1988; REYES, 2015).

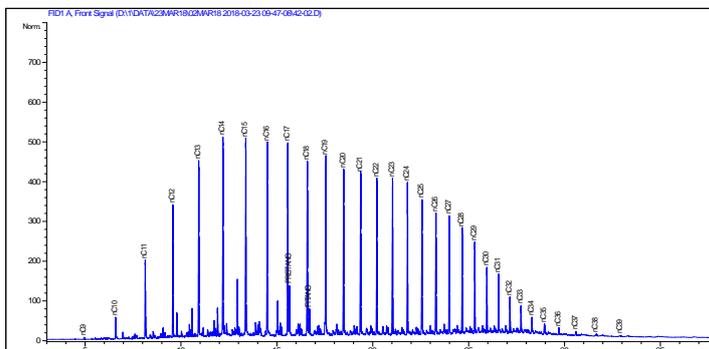
Analisou-se o extrato do óleo para a determinação dos parâmetros e do perfil cromatográfico dos HTPs através do método “*whole oil*” adaptado no LEPETRO/UFBA, utilizando um detector de ionização de chama (CG/FID, modelo 7890B, Agilent Technologies, Califórnia, USA). O densímetro apontou grau °API 36, classificado como óleo leve e densidade 0,8149 a 20 °C. A cromatografia líquida do óleo apontou uma porcentagem de 81,6% de compostos saturados, 8,9% de compostos aromáticos e 9,6% de compostos NSO (Tabela 1).

Tabela 1- Perfil, parâmetros e razões geoquímicas do óleo da Bacia do Recôncavo Baiano, Campo Água Grande

Perfil geoquímico	Valor	Parâmetro	Concentração (mg/Kg ⁻¹ = ppm)	LQM (ppm)
API (°API)	36	PRISTANO	3,50	0,08
DENSIDADE a 20 °C	0,8149	FITANO	2,19	0,10
SATURADO	81,6%	HTP	441,78	N.A.
AROMÁTICO	8,9%	UCM	116,79	N.A.
NSO	9,6%	PRISTANO/FITANO	1,60	N.A.
		PRISTANO/n-C ₁₇	0,19	N.A.
		FITANO/n-C ₁₈	0,15	N.A.

O óleo da Bacia do Recôncavo apresenta um cromatograma com elevada abundância molecular dos alcanos n-C₈ a n-C₄₀ em relação aos isoprenóides pristano e fitano (Tabela 1 e Figura 10).

Figura 10- Perfil cromatográfico dos HTPs (n-C₈ a n-C₄₀) do óleo da Bacia do Recôncavo Baiano, Campo Água Grande; onde o eixo y, representa a abundância e o eixo x, o tempo de retenção em minutos



As propriedades químicas e microbiológicas do sedimento e da água coletados em campo para este estudo foram listadas na Tabela 2.

Tabela 2- Propriedades físico-químicas e microbiológicas da matriz sedimento e água coletada no campo para montagem do experimento em mesocosmos

Matriz	Parâmetro	Concentração	
Sedimento	Granulometria	Areia grossa	10,03%
		Areia média	0%
		Areia fina	2,69%
		Areia muito fina	18,73%
		Silte	59,99%
		Argila	8,57%
	UFC bactéria	$0,71 \times 10^9 \text{ UFC g}^{-1}$	
	UFC fungo	$0,11 \times 10^9 \text{ UFC g}^{-1}$	
	Nitrato e amônio	11,67 e 5,84 mg kg ⁻¹	
	COT	2,86%	
Fósforo	0,072 mg kg ⁻¹		
HTPs	359,04 mg kg ⁻¹		
Água	pH	8,17	
	T°	29,58 °C	
	Salinidade	36,2 ‰	
	HTPs	1431,50 mg L ⁻¹	

4.2.3 Consórcio e imobilização dos microrganismos

Os consórcios microbianos foram formados por bactérias e fungos pré-selecionados dos trabalhos de Lima (2014) e Dantas (2016). Os microrganismos selecionados foram coletados na mesma área de amostragem desse trabalho, cultivados, isolados e passaram por testes de potencial de oxidação/redução que comprovaram sua alta capacidade de biodegradação das diferentes frações do óleo da Bacia do Recôncavo Baiano. O critério de escolha foi o melhor desempenho em utilizar hidrocarbonetos como fonte de energia (fonte de carbono).

O encapsulamento das cepas bacterianas e fúngicas foram realizados segundo metodologia modificada por Lima (2014). A aplicação dos substratos naturais teve como objetivo bioestimular os consórcios imobilizados através da liberação lenta de nutrientes e suporte estrutural para promover a biodegradação do óleo pelos microrganismos indígenas. Além disso, utilizou-se matéria prima econômica e acessível para aperfeiçoar a técnica, torná-la mais eficiente e viável financeiramente.

4.2.4 Design do experimento de biorremediação

A simulação do derramamento de petróleo em sedimento de manguezal no sistema em mesocosmos foi formada por unidades experimentais que consistiram em 9 unidades de simulação (aquários), contendo em cada um, 24 provetas de vidro de 10 cm, sustentado por um suporte de madeira e revestido com sacos de algodão (Figura 11).

As unidades de simulação foram realizadas em triplicata: atenuação natural (A1, A2 e A3), formada pelo sedimento referência, equivalente a 1% da massa de sedimento (1,4 g

de óleo bruto), e adição de petróleo da Bacia do Recôncavo; controle (C1, C2 e C3), por sedimento referência sem adição de petróleo; e biorremediação (B1, B2 e B3), por sedimento referência com adição de petróleo da Bacia do Recôncavo e consórcio microbiano misto encapsulado com polímeros naturais, equivalente a 3% da massa do sedimento referência (4,2 g) (Quadro 4).

Figura 11- Experimento de biorremediação em sistema de mesocosmos



Fonte: Autora, 2017.

Quadro 4- Delineamento ilustrativo do experimento em mesocosmos

Mesocosmos	Tratamento	Descrição
C1, C2 e C3	Controle	140 g de sedimento referência
A1, A2 e A3	Atenuação natural	140 g de sedimento referência + 1,4 g óleo
B1, B2 e B3	Biorremediação (bioaumento e bioestímulo)	140 g de sedimento referência + 1,4 g óleo + 4,2 g consórcio microbiano misto encapsulado com substratos naturais

O sistema de simulação da maré foi realizado durante 90 dias de experimento utilizando a água coletada no estuário do rio São Paulo. Este modelo consistiu em controlar o nível mínimo e máximo em que a água estaria em contato com as provetas contendo sedimento, simulando o nível de maré baixa e alta, através de estruturas de mangueiras ligadas às bombas dentro das unidades de simulação, gerando dessa forma, um ciclo de duas enchentes e duas vazantes diariamente.

4.2.5 Monitoramento das unidades de simulação

As amostragens foram realizadas nos intervalos de 0, 1, 15, 30, 60 e 90 dias. Em cada amostragem retirou-se três provetas de sedimento, homogeneizou e separou em frascos de vidro para determinação dos analitos. O monitoramento das unidades de

simulação do experimento consistiu no monitoramento geoquímico, a partir da extração da fração orgânica e cromatografia gasosa; químico, a partir das análises químicas para determinação dos teores de nitrato, amônio, carbono orgânico total (COT) e fósforo; microbiológico, a partir da avaliação quantitativa de bactérias e fungos; e o monitoramento dos parâmetros físico-químicos, a partir da medição da salinidade, pH e temperatura.

4.2.6 Procedimento de análises laboratoriais

As amostras de sedimento foram armazenadas no freezer a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para preservação, posteriormente liofilizadas sob alto vácuo e temperatura de $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, maceradas, desagregadas e peneiradas em malha de 2 mm.

Para a determinação da granulometria do sedimento utilizou-se a metodologia da EMBRAPA (2011). Pesou-se uma alíquota de 1,5 g de sedimento peneirado em malha de 500 μm , adicionou-se 1 mL de H_2O_2 e aguardou sessar a reação. Posteriormente foi colocado em bloco digestor a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 horas, adicionado 20 mL de solução de hexametáfosfato de sódio a $0,1\text{ mol L}^{-1}$ e colocado em mesa agitadora por 4 horas. Por fim, utilizou-se o analisador de partículas com difração a laser (*Cilas 1064*) para determinar a granulometria do sedimento.

Para a determinação do COT foi utilizada a metodologia da EMBRAPA (2011). Pesou-se uma alíquota de 0,1 g de sedimento de granulometria 80 *mesh* em barcas porosas, adicionou-se 10 mL de HCl a 1 mol L^{-1} e aguardou sessar a reação. Posteriormente foi adicionada água destilada a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a retirada do HCl, colocado em placa aquecedora à $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em estufa por 2 horas para secagem das amostras. As barcas foram colocadas em dissecador por 30 minutos e depois foram pesadas em balança analítica. Por último, foi utilizado um analisador elementar (*LECO-CN 628*) para determinação do COT.

Para determinação do nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) foi utilizada a metodologia da EMBRAPA (2011). Pesou-se uma alíquota de 10 g de sedimento, adicionou-se 100 mL de KCl 1 mol (M) e colocado em mesa agitadora por 1 hora. Para a determinação do amônio foi adicionado a 30 mL do sobrenadante 0,2 g de MgO, 5 mL de H_3BO_3 2% clorado e colocado para destilar por 3 minutos no *Kjeldhal*. Para a determinação do nitrato foi adicionado à 30 mL do sobrenadante 0,2 g de liga de dervada, 5 mL de H_3BO_3 2% clorado e colocado para destilar por 3 minutos no *Kjeldhal*. Posteriormente foi feito uma titulação com H_2SO_4 0,005 (1M) para a determinação do nitrato e amônio.

Para determinação do fósforo foi utilizada a metodologia da EMBRAPA (2011). Pesou-se uma alíquota de 0,4 g de sedimento, adicionou-se 10 mL de HCl a 1 mol L^{-1} e colocou em mesa agitadora por 16 horas. Posteriormente foi centrifugado por 15 minutos à 3000 rpm e retirada uma alíquota de 1 mL, adicionado 0,8 mL de solução ácida de

molibdato e tartarato, 10 mL de água deionizada e 0,2 mL de ácido ascórbico a 25 mg L⁻¹. Após 10 minutos foi realizada a determinação do fósforo em espectrofotômetro (*Agilent Cary 60*) em 880 nm.

Para a quantificação dos microrganismos no sedimento utilizou-se o método de número mais provável (NMP), uma técnica popular para a contagem de populações microbianas em laboratório (WU et al., 2013; WU et al., 2016). Para isto, realizou-se a extração da microbiota nativa através da metodologia de diluições seriadas por microgota até a diluição 10⁻⁸, de acordo com Romeiro (2011). Pesou-se uma alíquota de 25 g de sedimento em 250 mL de solução salina (2,25 g de NaCl e 0,750 mL de *Tween 80*), transferiu-se 0,1 mL da diluição para microtubos contendo 0,9 mL da solução e assim sucessivamente até a diluição 10⁻⁸. A partir de cada diluição foi transferido quatro alíquotas de 0,1 mL de cada diluição para a placa de petri contendo meio de cultivo *Ágar Nutriente (NEOGEN, Brasil)*. As placas contendo as alíquotas das diluições foram incubadas por 24 horas à 30 °C e posteriormente feita a contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFCs).

Para a quantificação dos fungos foi utilizada a metodologia de diluições seriadas até a diluição 10⁻⁵, de acordo com Gerba et al. (2004). Pesou-se uma alíquota de 10 g de sedimento em erlenmeyer contendo 250 mL de solução salina (0,95 g de NaCl e 95 mL), transferiu-se 1 mL da diluição para os vials contendo 9 mL da solução e assim sucessivamente até a diluição 10⁻⁵. A partir de cada diluição foi transferido uma alíquota de 1 mL para cada placa de petri, depois completado com meio de cultivo *Ágar Sabouraud Dextrose 4% (NEOGEN, Brasil)* e 0,1 g cloranfenicol diluído em 10 mL de álcool. As placas contendo as alíquotas das diluições foram incubadas por 5 dias à 30 °C e posteriormente foi feita a contagem das UFCs.

A extração do óleo das amostras de sedimento foi realizada através do método de extração por ultrassom *METHOD 3550C*, adaptado do LETRO/UFBA. Pesou-se 3 g de sedimento, adicionaram-se 50 µL do padrão subrogado (*P-terphenyl D14*, 2000 µg L⁻¹) e 25 mL da mistura de *n*-hexano e diclorometano (1:1, V:V). Posteriormente, as amostras foram colocadas em aparelho ultrassom com frequência 35 Hz por 15 minutos e filtradas em sulfato de sódio anidro (pré-calcinado a 400 °C por 4 h). O mesmo procedimento foi realizado por três vezes consecutivas, utilizando um total de 75 mL da mistura de solventes. Foram adicionados aos extratos cobre ativado para remover o enxofre elementar e depois as amostras foram concentradas em um evaporador rotativo à vácuo a um volume inferior a 500 µL. Os extratos foram transferidos para *vials* e avolumados à 1 µL com diclorometano para serem injetados em um cromatógrafo movido a gás chama (*CG/FID, modelo 7890B, Agilent Technologies, Califórnia, USA*), para a determinação dos HTPs (pristano, fitano, HTP e UCM).

Para garantir que não houve fonte de contaminação do laboratório durante as análises, em cada lote de nove amostras foi realizado uma amostra branco (10% de branco), onde esta foi submetida aos mesmos procedimentos analíticos das amostras reais. Também foram feitas réplicas de bancada para garantir a precisão do método. Além disso, foi realizada a fortificação de amostras controle de sedimento para garantir a extração total dos HTPs das amostras através da adição de uma amostra de referência que continha o analito de interesse. Para isso foi adicionado uma quantidade conhecida de alcanos (C8 – C40) referência em duplicata e as amostras fortificadas foram analisadas da mesma forma que as amostras do monitoramento. Dessa forma foi possível avaliar a exatidão e precisão do método de extração.

Para as amostras de água foi aplicado o método de extração líquido-líquido da U.S. EPA 3510C. Utilizou-se 750 mL de água em um funil de extração, adicionaram-se 30 mL de diclorometano e agitou por três minutos. A diferença de fase entre os dois líquidos imiscíveis foi separada e recolhida em um funil contendo sulfato de sódio calcinado para um balão. O mesmo procedimento foi realizado por três vezes consecutivas, utilizando um total de 90 mL de solventes. Em seguida, houve a concentração deste extrato com o auxílio de um rotovaporador, transferidos para *microvials*, avolumado para 100 µL e encaminhados para leitura no cromatógrafo gasoso movido a gás (GC-FID) para a determinação dos HTPs.

4.2.7 Tratamento estatístico

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizada a Versão do 'R' 3.5.1. Os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e geoquímicos foram analisados para avaliar a normalidade através do teste de *Shapiro-Wilk* (SW). O Teste de *Kruskal-Wallis* verificou se houve diferença entre as médias num conjunto de dados não-paramétricos. O Teste de *Nemenyi* consistiu em fazer comparações em pares com o intuito de verificar qual dos fatores diferiram entre si. Todos os procedimentos estatísticos foram empregados com nível de 95% de confiança.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seguem informações sobre os resultados obtidos através das análises das matrizes sedimento, água e óleo deste estudo.

4.3.1 Caracterização do sedimento, água e óleo utilizado no experimento

O sedimento e a água coletado no campo foram analisados em laboratório e suas propriedades foram listadas na Tabela 3.

Tabela 3- Propriedades físico-químicas, microbiológicas e geoquímicas da matriz sedimento e água coletada no campo para montagem do experimento em mesocosmos

Matriz	Parâmetro	Concentração	
Sedimento	Granulometria	Areia grossa	10,03%
		Areia média	0%
		Areia fina	2,69%
		Areia muito fina	18,73%
		Silte	59,99%
		Argila	8,57%
	UFC bactéria	$0,71 \times 10^5 \text{ UFC g}^{-1}$	
	UFC fungo	$0,11 \times 10^5 \text{ UFC g}^{-1}$	
	Nitrato e amônio	11,67 e 5,84 mg kg ⁻¹	
	COT	2,86%	
Fósforo	0,072 mg kg ⁻¹		
HTPs	359,04 mg kg ⁻¹		
Água	Ph	8,17	
	T°	29,58 °C	
	Salinidade	36,2 ppt	
	HTPs	1431,50 mg L ⁻¹	

O sedimento de manguezal apresentou uma predominância de silte (59,9%), pouca areia muito fina (18,73%) e areia grossa (10,03%). A predominância de sedimentos de granulometria fina está relacionada à vegetação de manguezal, que cria um ambiente pantanoso abrigado, com baixa energia, o que facilita a deposição desse tipo de sedimento, geralmente enriquecidos com nutrientes, metais e minerais (COLARES, 2014). Essas características únicas dos manguezais, com a alta produtividade primária, rico em carbono orgânico, granulometria fina e condições anóxicas/ redutoras, fazem do ambiente um local mais propício ao acúmulo de HTPs, devido à grande capacidade adsortiva das fácies sedimentares finas, além da sua preservação (BERNARD et al., 1996; OROS; ROSS, 2004; TIAN et al., 2008; LANG et al., 2016).

As concentrações de hidrocarbonetos determinado no sedimento foram baixos (359,04 mg kg⁻¹), levando em conta a proximidade de uma zona com atividades petrolíferas. Celino et al. (2008), aponta que os hidrocarbonetos estocados nos sedimentos da BTS são provenientes, principalmente da vegetação superior representada pelo manguezal (origem biogênica), e a vinculada a aportes acidentais de óleo e efluentes de esgotos industriais da região (origem antropogênica). Para diferenciar a origem dos hidrocarbonetos saturados são calculadas razões entre as concentrações dos compostos, estabelecendo-se índices diagnósticos, como o índice preferencial de carbono (IPC). Este índice é obtido pela razão do somatório dos n-alcanos ímpares sobre o somatório dos n-alcanos pares, quando há

predominância de material originado de plantas terrestres, o ICP fica entre 4-7 e, quando de origem petrogênica, o ICP apresenta valor próximo de 1 (CLARK; BLUMER, 1967; COLOMBO et al, 1989; WAGENER, 2007). Dessa forma, o ICP encontrado para o sedimento utilizado no experimento foi próximo de 1 ($\pm 1,21$), que corresponde a origem petrogênica.

A comunidade microbiana exibiu valores relativamente alto de UFCs, tanto para fungos ($0,11 \times 10^5$ UFC g^{-1}) quanto para bactérias ($0,71 \times 10^5$ UFC g^{-1}). De acordo com Brock (2016), na natureza as células microbianas tendem a crescerem mais lentamente que suas velocidades máximas observadas em laboratório. Isso devido às condições e os recursos necessários para seu crescimento serem mais controlados em laboratório e que não estão presentes no habitat natural. Contudo, é sabido, que os manguezais possuem uma comunidade microbiana altamente rica e diversificada, que resulta em um potencial metabólico variado que permite que os isolados bacterianos cresçam sob diferentes condições ambientais (HOLGUIN et al., 2001; PEIXOTO et al., 2011).

Os valores medidos “*in situ*” da água do estuário do rio São Paulo estão entre as faixas dos valores obtidos pelas diretrizes classificatória da Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005: pH: 6,5 – 8,5; T °C: 44 - 45 °C e salinidade: > 30‰. O pH apresentou valores dentro da faixa de acordo com o padrão de qualidade. No momento da coleta, a água apresentou valores altos de salinidade, classificada como água salina, devido ao aumento do nível da água do mar no momento da medição. Os valores de O.D. estavam abaixo do limite estabelecido pela resolução, o que pode estar relacionado com a grande quantidade de matéria orgânica existente em sedimentos de manguezal.

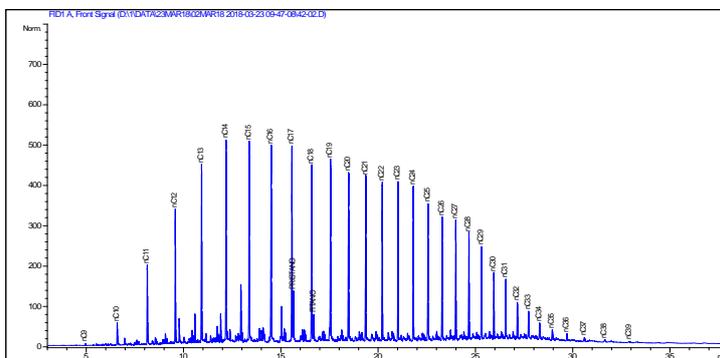
O óleo utilizado no experimento foi proveniente da Bacia Sedimentar do Recôncavo Baiano. Este tipo de óleo é caracterizado como de origem lacustre de água doce, óleo leve (API superior a 29,5), do tipo parafínico (> presença de *n*-alcanos), com baixa proporção de compostos NSO (GANGLIONE et al., 1988; REYES, 2015). A análise do extrato do óleo apresentou grau °API 36, classificado como óleo leve; densidade 0,8149 a 20 °C, e uma porcentagem de 81,6% de compostos saturados, 8,9% de compostos aromáticos e 9,6% de compostos NSO (Tabela 4). Resultados detalhados encontram-se no APÊNDICE 1.

Tabela 4- Perfil, parâmetros e razões geoquímicas do óleo da Bacia do Recôncavo Baiano, Campo Água Grande

Perfil geoquímico	Valor	Parâmetro	Concentração (mg/Kg= ppm)	LQM (ppm)
API (°API)	36	PRISTANO	3,50	0,08
DENSIDADE a 20 °C	0,8149	FITANO	2,19	0,10
SATURADO	81,6%	HTP	441,78	N.A.
AROMÁTICO	8,9%	UCM	116,79	N.A.
NSO	9,6%	PRISTANO/FITANO	1,60	N.A.
		PRISTANO/ <i>n</i> -C ₁₇	0,19	N.A.
		FITANO/ <i>n</i> -C ₁₈	0,15	N.A.

As análises de *fingerprint* do extrato de óleo foram utilizadas para a caracterização do petróleo por meio da cromatografia gasosa, devido a sua aplicabilidade em separar, identificar e quantificar espécies químicas, em especial os compostos orgânicos (WANG; FINGAS, 2003). O perfil cromatográfico óleo da Bacia do Recôncavo apresentou um cromatograma com elevada abundância molecular dos alcanos n-C₈ a n-C₄₀, em relação aos isoprenóides pristano e fitano, os quais fazem parte do grupo dos biomarcadores do petróleo (Figura 12).

Figura 12- Perfil cromatográfico dos HTPs (n-C₈ a n-C₄₀) do óleo da Bacia do Recôncavo Baiano, Campo Água Grande; onde o eixo y, representa a abundância e o eixo x, o tempo de retenção em minutos



Toda prática de biorremediação baseada em processos de degradação de contaminantes orgânicos deve ser baseada em um levantamento físico-químico, geoquímico e microbiológico da área contaminada, pois as condições do local são essenciais para a determinação da cinética da biodegradação. Essas informações conduzem a uma adequação da técnica de biorremediação a fim de obter uma maior eficácia no processo.

4.3.2 Parâmetros físico-químicos, inorgânicos e microbiológicos

Os parâmetros físico-químicos (temperatura, pH e salinidade) medido na água durante o monitoramento do experimento em mesocosmos foram apresentados em gráficos (Figura 13,14 e 15). Resultados detalhados encontram-se no APÊNDICE 2.

No gráfico da temperatura é possível observar que a variação nos tratamentos C, A e B, tiveram uma tendência similar (Figura 13). Verificou-se também um aumento no T15 e T60 (29,5 a 31 °C; 30,5 a 31,5 °C), que pode estar relacionado às condições físicas da sala de experimentos laboratoriais: sala fechada, com janelas em apenas um dos lados da sala, portanto pouca circulação de vento. Além disso, a montagem do experimento foi realizada no período do verão (dezembro a março), com início do experimento em janeiro e término em abril. A temperatura média em Salvador nesse período varia entre 31 e 25 C° (NOAA,

2014), mas em ambientes fechados e com entrada de raios solares, a sensação térmica do ambiente pode aumentar.

Figura 13- Valores de temperatura medido durante o monitoramento do experimento

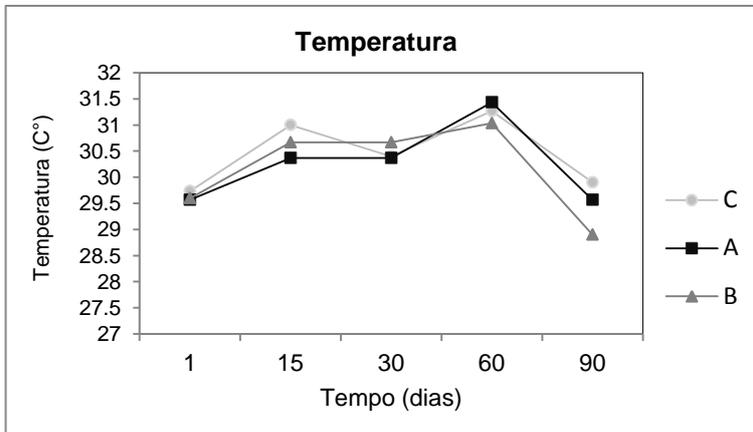


Figura 14- Valores de salinidade medido durante o monitoramento do experimento

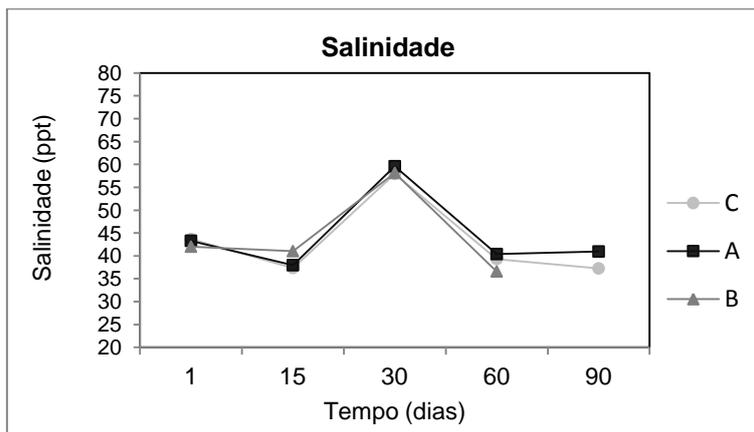
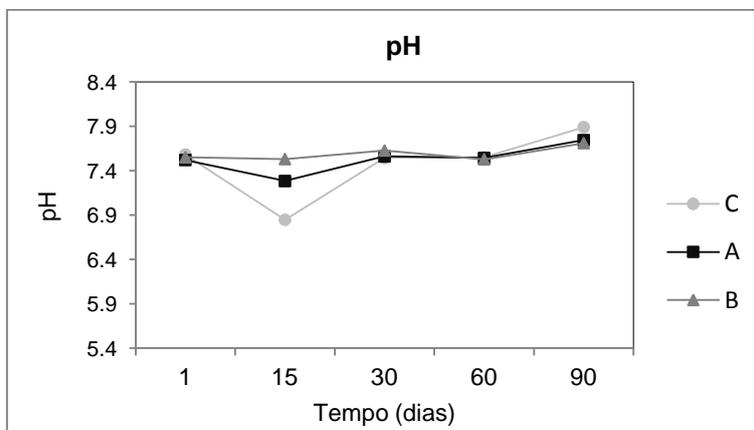


Figura 15- Valores do pH medido durante o monitoramento do experimento



A temperatura é um fator físico que influencia diretamente a taxa do metabolismo microbiano, e por consequência, a biodegradação dos HTPs (HAIDER, 1999; ADAMS et al., 2015). Alguns autores destacam que a temperatura da água do mar é um fator determinante para a composição de comunidades bacterianas em manguezais (GONZALEZ-ACOSTA et al., 2006; DIAS et al., 2010). A faixa ótima indicada por alguns estudos para que ocorra a biodegradação é entre 25 a 30 °C (ATLAS, 1991; EPA, 1995; ANDRADE et al., 2010). Dessa forma, pode-se presumir que a variação da temperatura no experimento esteve dentro da faixa indicada.

No gráfico da salinidade foi possível observar um comportamento similar em todos os tratamentos (Figura 14). A partir do T15 foi verificado um aumento progressivo (37 a 57 ppt), que pode está diretamente relacionado à temperatura, visto que altas temperaturas acarretam no aumento da evaporação da água, e consequentemente aumento da salinidade. Durante o monitoramento verificou-se a presença de cristais de sal marinho (NaCl) nas paredes de vidro das unidades de simulação e redução do nível da água devido a evaporação da mesma. Para evitar que essa grande variação fosse capaz de interferir nos resultados, adicionou-se água destilada autoclavada para preencher as unidades de simulação ao nível inicial. Posteriormente mediu-se a salinidade para conferir que a mesma tivesse sido reestabelecida.

No gráfico do pH foi possível observar que a variação em todos os tratamentos se comportou de maneira similar (Figura 15). Nos primeiros 15 dias observou-se uma queda nos valores do pH, variando entre 7,5 e 6,8, que se encontram dentro da faixa de referência da Resolução 357/05 do CONAMA para águas salobras. Além disso, sabe-se que a maioria dos microrganismos apresentam uma melhor taxa de desenvolvimento em pH entre 6 e 8, com valor ótimo em torno de 7 (VERSTRAETE et al., 1976; BOSSET et al., 1984; ROSATO, 1998; MELLO, 2010).

A variação do pH pode estar relacionada com a evaporação da água devido ao aumento da temperatura nas unidades de simulação e consequente aumento da salinidade. Após o preenchimento com água autoclavada, foi possível observar no T30 o reestabelecimento e manutenção dos valores do pH. Apesar das variações observadas ao longo desse experimento, sabe-se que os microrganismos do local são tolerantes a variações em ambiente de transição, mas a biodegradação de contaminantes é realizada com maior rapidez em valores de pH neutros ou próximos da neutralidade (COSTA, 2009).

As variações observadas ao longo dos 90 dias de experimento montado em laboratório também são encontradas nos ecossistemas costeiros marinho, como os manguezais, que compreendem zonas intertidais que promovem flutuações diárias nas condições ambientais (WU et al., 2017). Por conseguinte, sabe-se que muitos

microrganismos do local também são tolerantes a essa heterogeneidade físico-química, por isso, acredita-se que estas variações não tenham sido relevantes neste trabalho.

Apesar de não ter sido possível monitorar a taxa de oxigênio nos experimentos por falta de equipamento para sua medição, sabe-se que em sedimentos de manguezais são encontrados tanto grupos de microrganismos aeróbios na camada mais superficial, quanto anaeróbios, na maior parte dos sedimentos de manguezal. Em processos de degradação, algumas comunidades de microrganismos podem alternar entre o metabolismo aeróbico e anaeróbico para a degradação de compostos de hidrocarbonetos (CRAVO-LAUREAU; DURAN, 2014; ROBINS et al., 2015; WU et al., 2017).

A degradação da matéria orgânica na zona aeróbica ocorre principalmente pela respiração aeróbica, utilizando o O_2 , como aceptor de elétrons na oxidação do carbono orgânico; enquanto que na camada anaeróbica ocorre principalmente pela redução de sulfato (NEDWELL et al., 1994; HOWARTH et al., 1998; COLARES, 2014). No entanto, geralmente a biodegradação aeróbica ocorre mais rapidamente do que a biodegradação anaeróbica (WIDDEL; RABUS, 2001; CCME, 2010; ABBASIAN et al., 2015; MECKENSTOCK et al., 2016; VARJANI, 2017).

As variáveis físico-químicas medida nesse experimento não se mostraram significativas na explicação da variância total dos HTPs. Contudo, o monitoramento dessas variáveis é importante porque descrevem seu comportamento ao longo do tempo e orientam na tomada de decisão durante o período de amostragem. Nesse experimento houve um período de evaporação intensa que fez com que a salinidade aumentasse rapidamente, mas através da medição durante o monitoramento, foi possível fazer uma correção imediata. O comportamento observado durante o monitoramento microbiológico mostrou o período da queda no número de UFCs, que poderia sugerir uma adição de consórcios (bioaumento) para estimular a metabolização dos compostos.

Os parâmetros inorgânicos (nitrito, amônio e fósforo) e o COT medido nas amostras de sedimento coletada durante o monitoramento foram apresentados em gráficos (Figura 16,17 e 18). Resultados detalhados encontram-se no APÊNDICE 3.

Os resultados obtidos para o nitrogênio na forma mineral indicaram predomínio de nitrito (NO_2^-) para o tratamento A e B (Figura 16). O aumento das concentrações de nitrito e amônio observadas no T15 é acompanhado de uma relativa diminuição até o T90. Esse aumento inicial pode ser explicado pela possível associação entre populações hidrocarbonoclasticas e diazotróficas no ambiente, que geralmente ocorre quando há quebra na relação C: N: P após um derramamento de óleo em que grande carga de C é exposta no ambiente (MUSAT et al., 2006; HEAD et al., 2006; TAKETANI et al., 2009).

Figura 16- Valores de nitrato e amônio medido no sedimento durante o monitoramento do experimento para o tratamento A

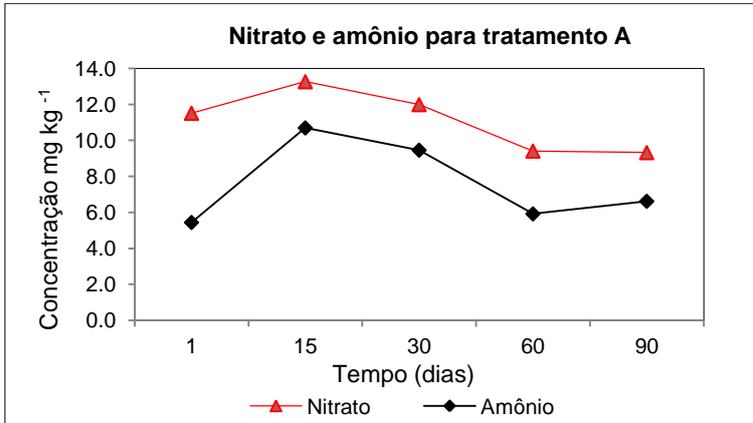


Figura 17- Valores de nitrato e amônio medido no sedimento durante o monitoramento do experimento para o tratamento B

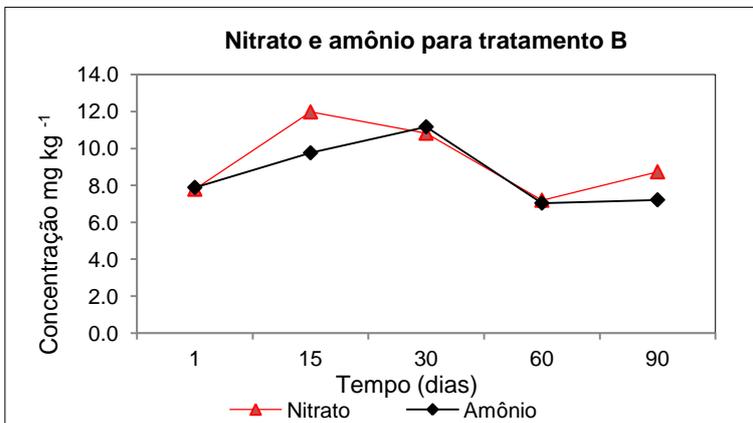


Figura 18- Valores de fósforo medido no sedimento durante o monitoramento do experimento para o tratamento B

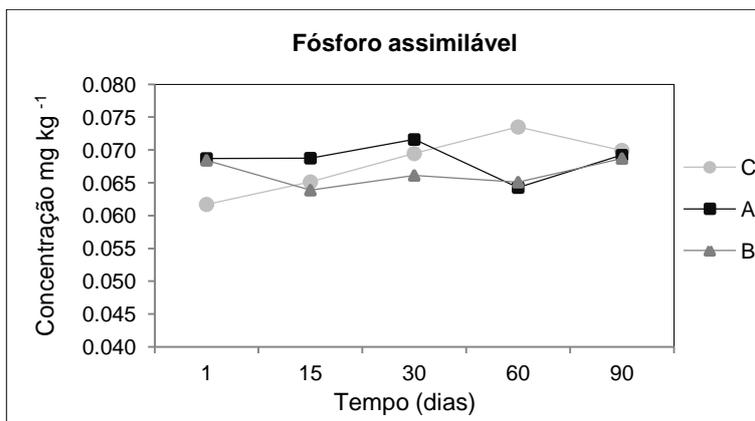
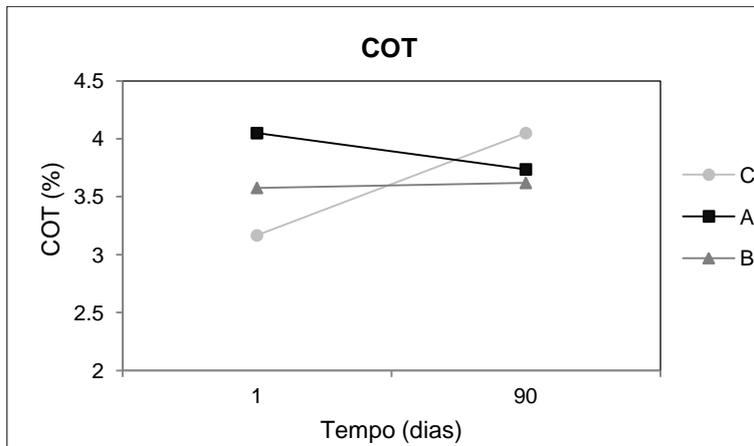


Figura 19- Valores de COT medido durante o monitoramento do experimento para o tratamento C, A e B



De acordo como Taketani et al. (2009), esse desequilíbrio cria uma grande limitação à degradação natural dos hidrocarbonetos na maioria dos ecossistemas e leva ao rápido consumo do nitrogênio e fósforo disponível para as populações hidrocarbônicas presentes, fazendo com que a degradação se torne mais lenta ou até cesse. Esse rápido consumo pode explicar a redução da concentração do nitrato e amônio observados nos tratamentos A e B após o T15.

Apesar da diferença das concentrações iniciais de nitrato e amônio entre os tratamentos A ($11,55 \text{ mg kg}^{-1}$ de NO^{3+} ; $5,48 \text{ mg kg}^{-1}$ de NH^{4+}) e B ($7,83 \text{ mg kg}^{-1}$ de NO^{3+} ; $7,93 \text{ mg kg}^{-1}$ de NH^{4+}), é possível observar que o tratamento B apresentou uma variação maior na concentração, comparada ao tratamento A (Figura 16 e 17). Esse comportamento pode indicar uma maior taxa de mineralização no tratamento B, visto que neste tratamento as UFCs ocorreram em maior número comparado ao tratamento A (Figura 20).

Nos gráficos de nitrato e amônio também é possível observar de maneira geral, um comportamento similar entre a taxa de amonificação e nitrificação equivalente ao aumento da população microbiana (número de UFCs) nos primeiros 30 dias de experimento (Figura 16 e 17). Seguido de uma estabilidade da concentração do nitrato e amônio até o final do experimento, no T90, em ambos os tratamentos, assim como para a redução de UFCs a partir do T30 até o T90 (Figura 20). Isso pode indicar, que a medida que o amônio e o nitrato foram sendo produzidos, os microrganismos foram beneficiados, refletindo no aumento da sua população.

Sabe-se que a decomposição da folha de manguezal aumenta a quantidade de proteínas e nitrogênio no sedimento, resultando em uma colonização de bactérias (WOODROFFE et al.,1998; JORCIN, 2000). Dessa forma, a presença da folha de manguezal triturada adicionada as cápsulas dos consórcios microbianos podem ter

favorecido a produção de amônio e nitrato e ao número elevado de UFCs nos primeiros 30 dias de experimento.

Apesar da decomposição da matéria orgânica produzir compostos que podem ser assimilados pelos vegetais ou outros microrganismos de maneira natural, essa atividade é muito mais intensa quando em associação a rizosfera e nos 20 cm superficiais do solo (SOUZA et al., 2002; SIQUEIRA, 2006; TAKETANI et al., 2009). Os exsudados radiculares das rizosferas da vegetação de manguezal também é uma importante fonte de nutrientes para a população microbiana associada (BASHAN; HOLGUIN, 1997; PEIXOTO et al., 2011), por este motivo, a inexistência dessa vegetação no experimento, pode ter contribuído para a baixa eficiência da biodegradação.

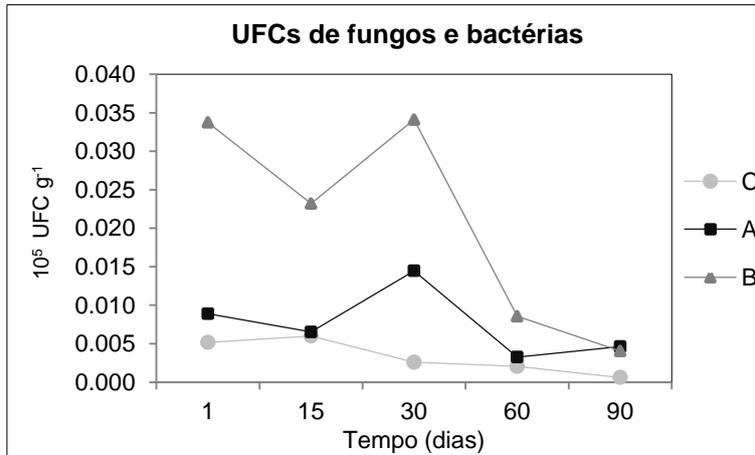
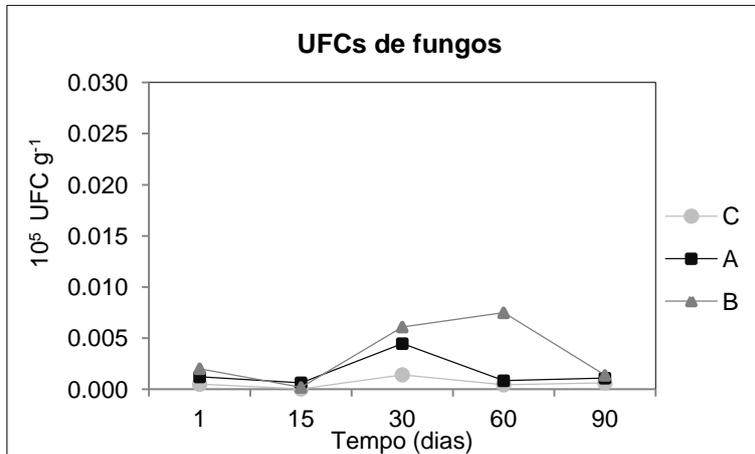
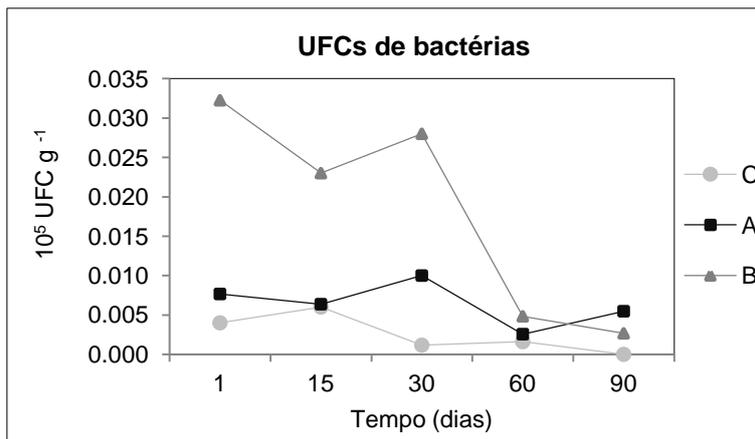
Para os resultados do fósforo assimilável (fosfatos) verificou-se um comportamento aproximadamente constante para os tratamentos C, A e B. A ausência de uma variação significativa na concentração dos fosfatos no sedimento, pode ser um indicativo de que o mesmo não foi utilizado de maneira eficiente pelos microrganismos presentes no sedimento.

Um pequeno aumento foi observado no tratamento A e queda para tratamento B até o T30, seguido de uma manutenção nos valores da concentração até o final do experimento no T90. A redução dos compostos de N e P inorgânico observado nos tempos iniciais do monitoramento, podem significar de maneira geral, que os mesmos podem ter sido utilizados pela população microbiana como fonte de nutrientes essenciais para manter em funcionamento suas atividades vitais.

A presença de fosfatos em manguezais geralmente está associada a precipitação por conta da abundância de cátions na água intersticial e a bactérias solubilizadoras de fosfatos associada as rizosferas da vegetação de manguezal (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001; COLARES, 2014). Dessa forma, pode-se concluir que a biorremediação, nesse experimento, pode ter sido prejudicada pela falta da vegetação de manguezal, ou seja, a revegetação de manguezais pode minimizar os impactos negativos causados pela degradação.

Esses resultados evidenciam que tanto as fontes de nutrientes quanto a estratégia de fertilização são fatores relevantes que devem ser levados em conta para obter um processo bem-sucedido de biorremediação. Essas adaptações metabólicas são objeto de estudo quanto aos mecanismos que as causam, dentre elas, a de adaptação e indução de enzimas biodegradadoras, mutações genéticas ou adaptação fisiológica a condições de estresse por carência nutricional (BRITO et al., 2004; MELLO, 2010).

Os parâmetros microbiológicos medido nas amostras de sedimento coletada durante o monitoramento foram apresentados em gráficos (Figura 20, 21 e 22). Resultados detalhados encontram-se no APÊNDICE 4.

Figura 20- Valores de UFCs de fungos e bactérias medido durante o monitoramento do experimento**Figura 21-** Valores de UFCs de fungos medido durante o monitoramento do experimento**Figura 22-** Valores de UFCs de bactérias medido durante o monitoramento do experimento

A abundância da população de fungos e bactérias no sedimento dos tratamentos C, A e B foram significativamente afetadas durante o experimento montado em laboratório ($p < 0,05$) (Figura 20). É possível observar que no T1 o número de UFCs para o tratamento B ($0,0337 \times 10^5 \text{ UFC g}^{-1}$) foi superior aos tratamentos C ($0,0052 \times 10^5 \text{ UFC g}^{-1}$) e o tratamento A

($0,0088 \times 10^5$ UFC g^{-1}). Este comportamento já era esperado, visto que no tratamento B foram adicionados consórcios de microrganismos encapsulados.

O tratamento C apresentou um comportamento aproximadamente constante ao longo dos 90 dias de experimento. Esta invariabilidade indica que sem a presença do óleo, não houve variância na população microbiana em termos de abundância. Os tratamentos A e B apresentaram um comportamento similar entre eles, entretanto, para o tratamento B, o número de UFCs foi superior, comparado ao tratamento A (Figura 20).

Foi possível observar uma alternância entre a abundância de fungos e bactérias ao longo dos 90 dias de experimento (Figura 21 e 22). Enquanto as populações bacterianas atingiram valores máximos do T1 até o T30 (Figura 22); para os fungos, o aumento populacional foi observado a partir do T15 até o T60 (Figura 23). Esse comportamento pode estar relacionado a sucessão de comunidades bacterianas e fúngicas numa pequena escala de tempo.

Mudanças na dominância de microrganismos degradadores podem ser observadas em solos contaminados por hidrocarbonetos a longo prazo e também em solos sujeitos a aplicação de estratégia de biorremediação, como na bioaugmentação (VÁZQUEZ et al., 2009; PACWA-PŁOCINICZAK et al., 2016). Alguns estudos caracterizam essas mudanças na composição da comunidade microbiana em resposta à contaminação por óleo em manguezais (SANTOS et al., 2011; PEIXOTO et al., 2011; COLARES, 2014).

Esse comportamento de sucessão também é um indicativo de que diferentes comunidades microbianas podem ser responsáveis pela degradação de diferentes frações do petróleo. Liu et al. (2011), descobriu em seu experimento que a comunidade bacteriana foi responsável pela degradação dos hidrocarbonetos saturados e parcialmente dos aromáticos no estágio inicial de remediação, mas a comunidade fúngica foi dominante na decomposição das frações de hidrocarbonetos polares no final da biorremediação (WU et al., 2017).

A adaptação desses microrganismos pode ser o resultado de mudanças genéticas, fisiológicas ou ecológicas da comunidade microbiana devido a pré-exposição desses microrganismos, que se refletem pela indução de enzimas específicas ou pelo aumento da população degradadora (BRITO et al., 2004; MELLO, 2010).

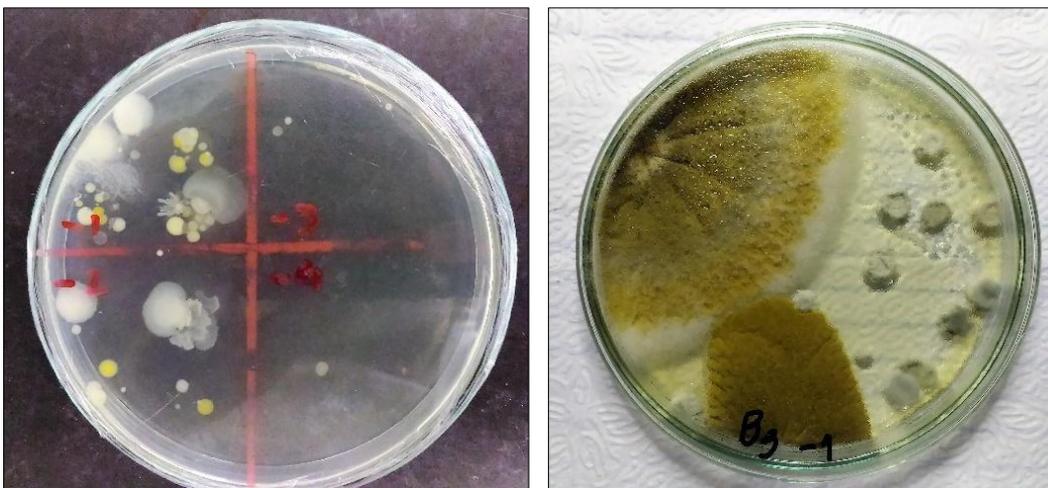
Durante todo o período do experimento o tratamento B apresentou as maiores populações de microrganismos (Figura 20). Este comportamento pode estar associado ao bioestímulo, decorrente da adição de nutrientes, que pode ter favorecido o metabolismo dos microrganismos, e conseqüentemente, o aumento de UFCs.

Além disso, a inserção dos consórcios de microrganismos hidrocarbonoclasticos configurou-se como uma triagem prévia de populações capazes de utilizar os hidrocarbonetos de petróleo como fonte de C. Esse procedimento já ocorre naturalmente em

ambientes que já sofreram algum tipo de contaminação pregressa, ou seja, é uma seleção prévia de populações capazes de utilizar eficientemente esses compostos (MARGESIN et al., 2003; LABBE et al., 2007; TAKETANI et al., 2009).

Durante o monitoramento microbiológico, através da contagem das UFCs para os três tipos de tratamento, foi visualizado uma variedade no aspecto morfológico tanto para fungos quanto para bactérias, com o predomínio de UFCs nas placas petri do tratamento B (Figura 23).

Figura 23- Bactérias e fungos do tratamento B, cultivados em placas petri durante o monitoramento e coleta das amostras de sedimento



Fonte: Autora, 2017.

Analisando as UFCs separadamente foram visualizadas algumas particularidades (Figura 21 e 22).

No gráfico de UFCs para fungos, os tratamentos C, A e B apresentaram comportamento similar entre o T1 e T15, exibindo uma diminuição gradual até o T90 (Figura 21). Provavelmente, este comportamento pode estar relacionado com a reprodução e crescimento mais lento dos fungos, comparado ao das bactérias, que são mais acelerados. Além disso, também pode estar associado ao impacto dos compostos tóxicos do óleo, onde estes podem ter passado por processos de ajustes as mudanças em seu habitat (aclimatização). Esse período inicial de adaptação ao poluente em que nenhuma transformação ocorre ou não é detectada, geralmente é seguido por um período de início e aceleração da degradação após uma exposição duradoura (LINKFIELD et al., 1989; SIMOM, 1999; MELLO, 2010), que pode ser visualizada pelo aumento de UFCs após o T15 (Figura 21).

Em seu experimento, Mello (2010) observou que na presença exclusiva do petróleo como fonte de carbono, não houve crescimento dos fungos, o que só foi possível com a

adição de glicerina (1%), para estimular o cometabolismo, sugerindo que o petróleo foi metabolizado como substrato secundário. Outros autores, como Pointing (2001), Tucker et al. (1995), e Bennet et al. (2002), observaram que uma fonte externa nutricional é geralmente necessária aos fungos, devido a inaptidão dos mesmos em utilizar organopoluentes como fonte primária de C e precisam de uma fonte suplementar para sustentar seu crescimento, ou seja, a degradação ocorre por cometabolismo (MELLO, 2010).

Estudos realizados por Atlas (1984) e Mello (2010), indicam que a poluição do sedimento pode conduzir a um decréscimo na diversidade microbiana em termos de abundância de espécies, devido a extinção de espécies não adaptadas ao estresse imposto; mas, pode também ocasionar o enriquecimento de espécies mais adaptadas a esse estresse. O que pode ser explicado, pelo aumento de UFCs após esse tempo de adaptação, no T30 (Figura 21).

Após 30 dias de experimento as UFCs do tratamento B aumentou até o T60 de maneira progressiva e diminuiu ao final do experimento; diferente do tratamento A e C, que exibiu um comportamento contrário, com diminuição até o T60 e aproximadamente constante até o final do experimento (Figura 21). O tratamento A, assim como o C, apresentou valores oscilantes, porém com pequenas variações comparado ao tratamento B, ao longo de 90 dias de experimento.

No gráfico de UFCs para as bactérias é possível observar um valor elevado no T1 para o tratamento B, comparado aos tratamentos A e C (Figura 22). Esse resultado indica que as bactérias do consórcio microbiano foram capazes de crescer e se multiplicar. Em um trabalho realizado no manguezal na BTS, Peixoto et al. (2011) observou que cerca de 70% dos 364 morfotipos de microrganismos isolados foram capazes de crescer usando óleo como única fonte de carbono, no qual 95% dos isolados eram bactérias degradadoras de óleo.

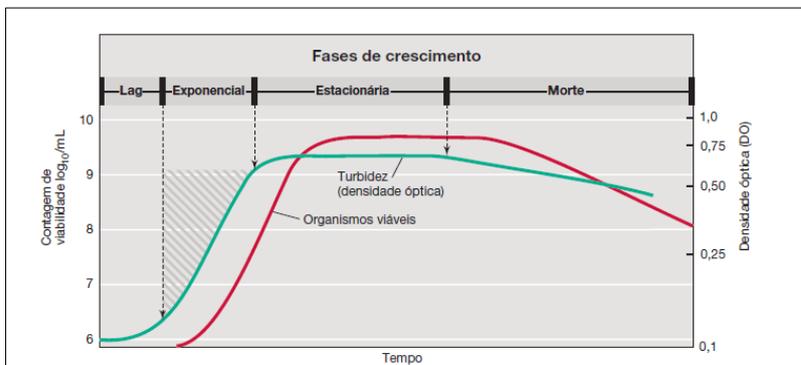
A degradação mais eficiente de poluentes em ambientes com contato prévio com o poluente está frequentemente relacionada a um maior número de bactérias hidrocarbonoclásticas, principalmente quando há uma seleção prévia de populações capazes de utilizar eficientemente esses compostos (OLIVERA et al. 1997; MARGESIN et al., 2003; JOHNSEN; KARLSON, 2005; POLYMENAKOU et al., 2006; TAKETANI et al., 2009). Isso explica o valor alto de UFCs bacterianas no tratamento B, em que foi aplicado o bioaumento e o bioestímulo.

Uma queda brusca observada a partir do T30 pode estar relacionada com os baixos níveis de nutrientes inorgânicos no sedimento (Figura 16, 17 e 18), que poderiam afetar ou reduzir o número de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, retardando o processo de biodegradação (CHEN et al., 2008; LANG et al., 2016). Além disso, os fatores bióticos, como

as interações antagônicas; competição por recursos e espaço; a predação de microrganismos por protozoários e bacteriófagos; e o crescimento da própria população até que a biomassa crítica seja alcançada, também podem interferir negativamente (BOOPATHY, 2000; MADHAVI; MOHINI, 2012; BROCK, 2016; ABATENH et al., 2016).

Levando-se em conta que o crescimento microbiano depende do tempo de geração ou tempo de duplicação de cada microrganismo, e que este é característico de cada espécie de microrganismo, pode-se apenas inferir de maneira geral, que nesse experimento, as bactérias podem ter sido favorecidas pelo aumento do crescimento no início do experimento, devido ao seu crescimento exponencial (Figura 24).

Figura 24- Curva de crescimento típica de uma população bacteriana a partir da contagem de células viáveis medida a partir das células presentes na cultura capazes de se reproduzir



Fonte: Brock, 2016.

A curva de crescimento de uma população bacteriana elaborada em condições laboratoriais a partir dos números de células viáveis (curva traçada em vermelho) desenvolvida por Brock (2016) (Figura 24), exibe certa similaridade com a curva de UFCs para as bactérias, gerada no monitoramento microbiológico desse experimento (Figura 22).

Neste gráfico é possível observar que na fase inicial de crescimento (lag) há uma adaptação das células ao novo meio de cultura, sintetizando macromoléculas, tais como os componentes dos ribossomos, necessários à síntese de proteínas e enzimas necessárias durante a divisão celular, aumentando de volume e iniciando a divisão celular. Sua duração varia com a condição em que se encontram os microrganismos e com a natureza do meio (Figura 24). Essa adaptação foi observada no início do experimento, quando o óleo foi adicionado e uma queda no número de UFCs foi notada no segundo monitoramento (T15), após a primeira coleta (Figura 22).

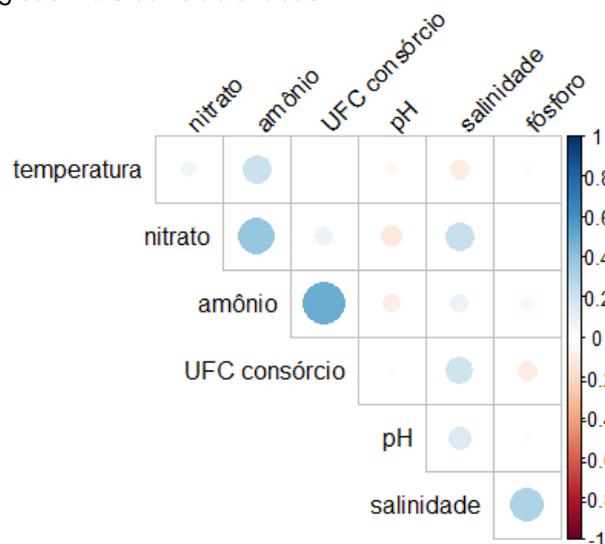
Na fase exponencial, as bactérias se dividem a uma taxa máxima, sendo o tempo de geração constante. A velocidade de divisão depende das condições ótimas para cada organismo, tais como fatores nutricionais, pH, temperatura e composição do meio (Figura 24). Na figura 22, o T30 apontou um valor máximo no número de UFCs para as bactérias, possivelmente associado as boas condições de adaptação ao meio.

Na fase estacionária, o crescimento populacional exponencial cessa e o número de células resultantes da multiplicação iguala ao número de células que morrem, normalmente devido à falta de um composto ou elemento necessário ao seu metabolismo (Figura 24). Seguido da fase de morte ou de declínio, com o número total de células viáveis decrescentes e aumento do número de células que morrem por lise celular (Figura 24). Após o T30, esse comportamento foi observado no gráfico da Figura 22, com uma queda exponencial de UFCs bacterianas até o final do experimento após 90 dias.

Todas as fases descritas por Brock (2016) ocorrem simultaneamente durante todo o processo do ciclo das populações microbianas, por isso não podem ser analisadas separadamente.

Os dados das variáveis físico-químicas, inorgânicas e microbiológicas foram agrupados para verificar a correlação entre elas (Figura 25).

Figura 25- Matriz de correlação destacando as variáveis físico-químicas, inorgânicas e microbiológicas mais correlacionadas



Na matriz de correlação para as variáveis físico-químicas, inorgânicas e microbiológicas foi possível observar a relação entre elas e quais foram mais ou menos correlacionadas entre si (Figura 25). As correlações positivas foram exibidas nas cores azul e negativa na cor vermelha, e a intensidade da cor e o tamanho do círculo são proporcionais aos coeficientes de correlação.

As variáveis que apresentaram maior correlação foi a concentração de nitrato e amônio, e a concentração de amônio e as UFCs da comunidade microbiana. Essas variáveis apresentaram comportamento similar em determinados tempos durante o monitoramento do T1 ao T90.

O nitrato e amônio variaram proporcionalmente durante todo o experimento, e o aumento e a diminuição do nitrato foram acompanhados do amônio. Esse comportamento

já era esperado visto que o processo de amonificação é seguido do processo de nitrificação para a formação do amônio e do nitrato respectivamente. A concentração de amônio também apresentou um aumento no T30, similar a UFCs dos microrganismos no mesmo período.

Essas variáveis podem estar relacionadas, pois a presença de fonte de nitrogênio no sedimento pode ter favorecido o aumento da comunidade microbiana, visto que são fontes de nutrientes essenciais para seu metabolismo. Alguns parâmetros apesar de apontarem algum tipo de relação na matriz de correlação, não tem associação direta, pois na natureza, também podem se comportar de maneira independente (Figura 25).

4.3.3 Análise temporal da biodegradação dos HTPs no sedimento

Ao nível de 95% de confiança, o Teste de *Shapiro-Wilk* indicou que os dados não apresentaram normalidade (não paramétricos, com $p < 0,05$). Partindo deste pressuposto, o teste apontou que houve diferença entre as unidades. Desse modo, o teste de *Nemenyi* foi aplicado para verificar quais unidades apresentaram diferença (Figura 26).

A comparação entre os pares utilizando o teste de *Nemenyi* para amostras independentes mostrou através dos dados das razões HTP/UCM que houve diferença entre os ensaios em triplicatas para os três tipos de tratamento utilizando o p-valor $< 0,05$ (Figura 26).

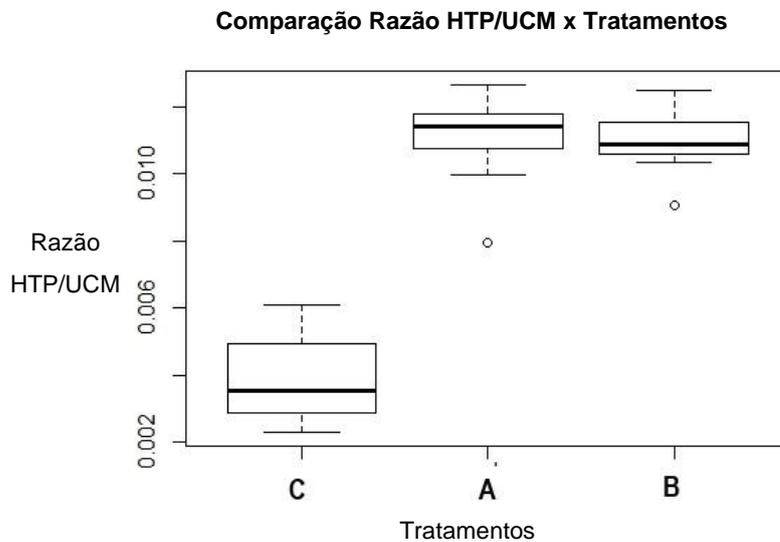
Figura 26- Teste de comparação entre as unidades para os dados da razão HTP/UCM e as unidades dos tratamentos C, A e B

	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2
A2	1.000	-	-	-	-	-	-	-
A3	1.000	1.000	-	-	-	-	-	-
B1	1.000	1.000	1.000	-	-	-	-	-
B2	1.000	1.000	0.999	1.000	-	-	-	-
B3	1.000	1.000	0.998	1.000	1.000	-	-	-
C1	0.149	0.140	0.049	0.117	0.279	0.293	-	-
C2	0.085	0.080	0.025	0.065	0.176	0.186	1.000	-
C3	0.207	0.197	0.075	0.167	0.365	0.380	1.000	1.000

A análise indicou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as unidades. Para os valores de p-valor menores que 0,05 ($p\text{-valores} < 0,05$), os pares de unidades são diferentes, e $p\text{-valor} > 0,05$, indica que não há diferença significativa. Os pares que indicaram diferença ($p\text{-valores} < 0,05$) foram: C1xA3 (0,049); C2xA3 (0,025).

Verificou-se a distribuição dos dados da variável razão HTP/UCM com os tratamentos C, A e B durante 90 dias de experimento através do gráfico de *boxplot* (Figura 27). Resultados detalhados encontram-se no APÊNDICE 5.

Figura 27- Gráfico de *boxplot* comparando os diferentes tratamentos em relação ao índice de biodegradação– Razão HTP/UCM x Tratamento

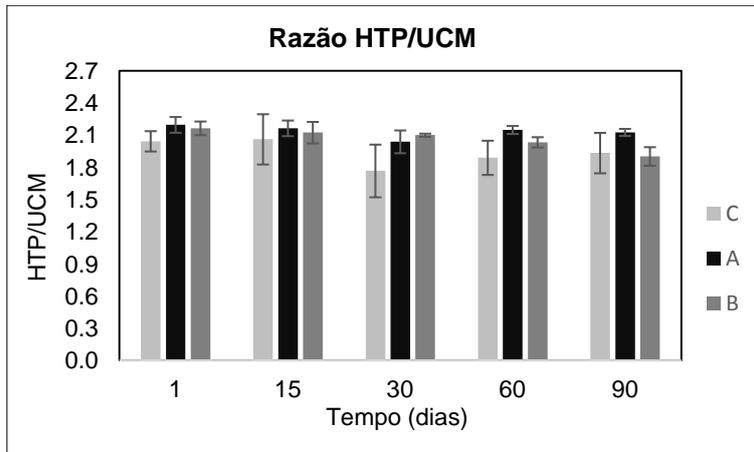


A diferença mais significativa foi observada entre o tratamento C, sem a presença do óleo, e os tratamentos A e B, com adição do óleo. Este comportamento já era esperado, visto que no tratamento C não foi adicionado óleo. Além disso, o sedimento utilizado nos três tipos de tratamentos continha uma quantidade inicial pequena de HTPs ($359,04 \text{ mg kg}^{-1}$), tendo sua fonte majoritária de carbono oriunda de matéria orgânica contida no sedimento de manguezal.

Apesar da análise estatística (intervalo de confiança de 95%) não ter demonstrado diferença significativa entre os dois tratamentos como adição de óleo (A e B), é possível observar uma variação entre o comportamento dos dois tratamentos ao analisar diferentes parâmetros e índices.

A degradação do óleo durante o monitoramento do experimento em mesocosmos foi avaliada inicialmente pela razão HTP/UCM dos tratamentos C, A e B (Figura 28). O aumento da UCM (mistura complexa não resolvida) é considerado um indício de aumento da biorremediação a medida que a linha de base cresce, já que os metabólitos da degradação por parte dos microrganismos geralmente não são identificados pelo cromatógrafo (MARCHAL et al., 2003; COIMBRA, 2006).

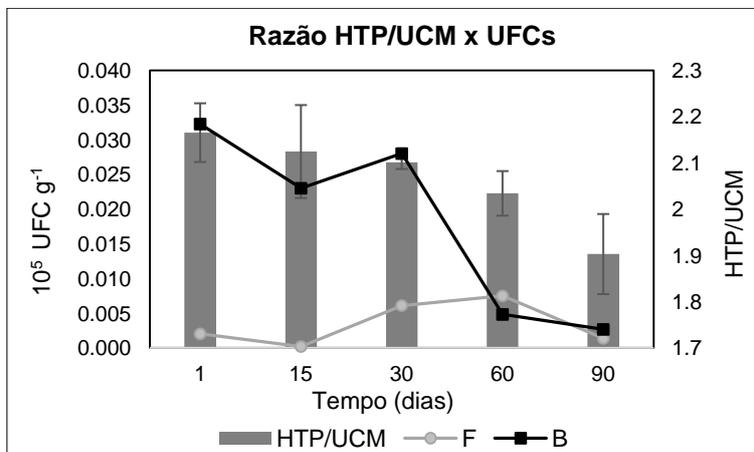
É possível observar uma pequena variação para os três tipos de tratamento, entretanto o B (12%) apresentou maior variação ao longo de 90 dias, em relação aos tratamentos C (5%) e A (3%).

Figura 28- Variação no tempo da razão HTP/UCM dos tratamentos C, A e B durante o experimento

A variação no tratamento C pode ser explicada pelo fato de já existir a presença de resíduo de óleo no sedimento coletado no manguezal ($359,04 \text{ mg kg}^{-1}$) e na água do rio São Paulo ($1431,50 \text{ mg L}^{-1}$) utilizada no experimento. Esse aumento pode estar relacionado com a transferência de contaminante da água para o sedimento e vice-versa.

Além disso, essa variação também pode indicar que a presença de microrganismos autóctones hidrocarbonoclasticos no sedimento do manguezal são capazes de degradar esses compostos. Isto confirma vários estudos anteriores que mostram que os manguezais possuem microrganismos nativos com capacidade de metabolizar hidrocarbonetos (TAM et al., 2002; YU et al., 2005; BRITO et al., 2006; TAM; WONG, 2008; LU et al., 2011; MOREIRA et al., 2011; LANG et al., 2016).

O tratamento B que apresentou maior variação ao longo dos 90 dias foi correlacionado como a atividade microbiológica monitorada ao longo do tempo (Figura 29).

Figura 29- Variação no tempo da razão HTP/UCM e das UFCs bacterianas (B) e fúngicas (F) do tratamento B do experimento em mesocosmos

No gráfico da Figura 29 é possível visualizar uma grande atividade bacteriana no tratamento B entre o T1 e o T30; e fúngica entre o T30 e o T60, acompanhado de um decréscimo da razão HTP/UCM até o T90.

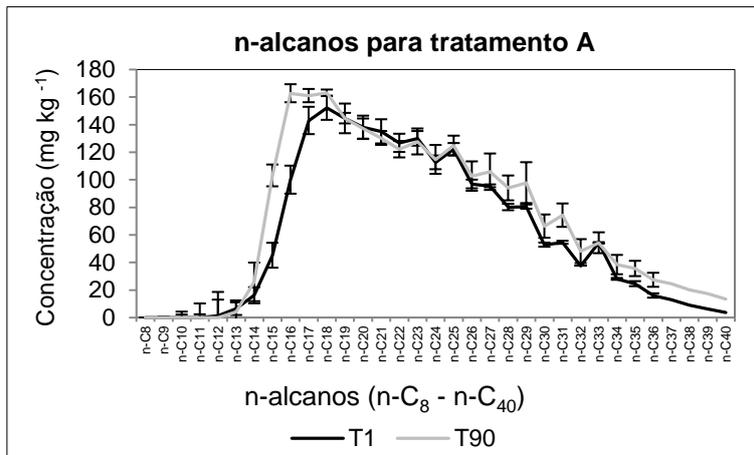
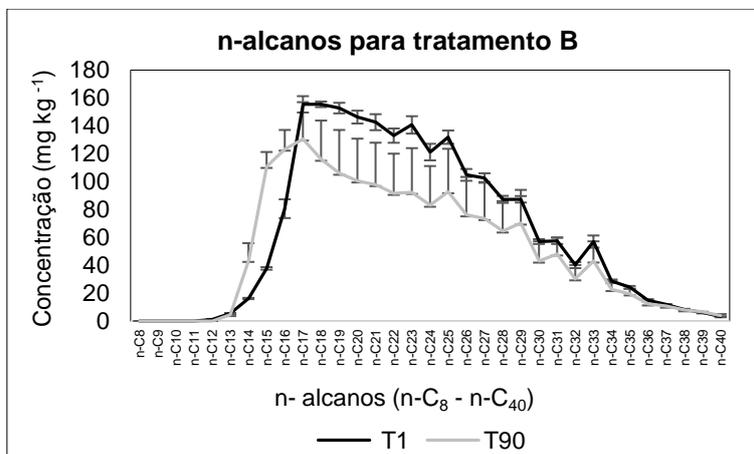
Esse comportamento pode ser um indicativo de que o consórcio obteve um potencial em biodegradar os hidrocarbonetos. Geralmente, quanto maior a atividade microbianas, maior a degradação dos HTPs (KRUTZ et al., 2005; LACAYO-ROMERO et al., 2006; WU et al., 2017). Além disso, esse resultado aponta para uma resposta positiva da população de bactérias à presença de uma alta quantidade de carbonos complexos no início do experimento, indicando que parte desses microrganismos estão ligados aos consórcios de microrganismos hidrocarbonoclasticos adicionados no tratamento B (Figura 29).

Peixoto et al. (2011), identificou através de análises dos perfis DGGE, variações na estrutura da comunidade bacteriana detectada dentro dos manguezais estudados na BTS, que estavam claramente associados a gradientes de nutrientes e poluentes (HTP); resultado este, que sugere uma comunidade bacteriana dominante e bem adaptada, distribuída no manguezal, que varia com as características químicas do sedimento.

A presença de UFCs fúngicas a partir do T30 seguido de uma diminuição na razão até o T90, também pode indicar a contribuição dos fungos na degradação dos HTPs. De acordo com Shahi et al. (2016), os fungos possuem alta capacidade em degradar compostos recalcitrantes, demonstrando maior tolerância a altos níveis de contaminantes do que as bactérias. Além disso, incorporam-se facilmente ao solo, crescem em condições mínimas de pH, umidade e nutrientes, sendo por isso, bastante utilizados no processo de biorremediação (SHAHI et al., 2016).

A correlação entre a razão HTP/UCM e as UFCs bacterianas e fúngicas do tratamento B também apontou uma queda drástica na população de microrganismos no T90 (Figura 29). Esse comportamento pode estar relacionado com a fase de morte ou declínio, com o número total de células viáveis decrescentes e aumento do número de células que morrem por lise celular. Um acréscimo de consórcios microbianos nesse momento provavelmente poderia contribuir para o aumento da degradação dos HTPs no sedimento.

Os tratamentos A e B também foram analisados quanto a distribuição dos n-alcenos presente no início e no fim do experimento de 90 dias (Figura 30 e 31). Resultados detalhados encontram-se no APÊNDICE 6 e 7.

Figura 30- Concentração de n-alcenos do início (T1) ao final do experimento (T90) do tratamento A**Figura 31-** Concentração de n-alcenos do início (T1) ao final do experimento (T90) do tratamento B

É possível observar nos gráficos de n-alcenos para os tratamentos A e B um comportamento distinto. Enquanto a concentração de n-alcenos para o tratamento A se mostrou invariável do T1 ao T90 (Figura 30), no tratamento B observou-se uma redução expressiva da concentração dos n-alcenos a partir do C₁₇ ao C₃₅, em detrimento a um aumento de C mais leves (<C₁₇) (Figura 31). A concentração de HTP para o tratamento A apresentou valores $4583,83 \pm 216,96 \text{ mg kg}^{-1}$ no T1 e $5695,66 \pm 286,07 \text{ mg kg}^{-1}$ para o T90; enquanto que o tratamento B variou de $4675,66 \pm 65,17 \text{ mg kg}^{-1}$ no T1 para $4003,65 \pm 817,83 \text{ mg kg}^{-1}$ no T90. O alto valor do desvio padrão, indicou que os ensaios em triplicata se comportaram de maneira particular, ainda sim, apresentaram diminuição na concentração dos HTPs após 90 dias. Esse comportamento é frequentemente observado em experimentos com organismos vivos, visto a dificuldade em reproduzir os mesmos resultados de maneira fidedigna.

Esses carbonos que apresentaram redução foram considerados de degradação preferencial, frente a outros hidrocarbonetos, como o pristano e fitano, que são considerados mais resilientes a degradação neste ambiente (TAKETANI et al., 2009). A

susceptibilidade dos hidrocarbonetos ao ataque microbiano é definida como: alcanos lineares> alcanos ramificados> pequenos aromáticos> alcanos cíclicos (PERRY, 1984; ULRICI, 2000; LANG, 2016). Dessa forma, os n-alcanos mais leves (n-C₆ a n-C₁₀), com ligações simples entre os átomos de C são mais susceptíveis a degradação comparado aos hidrocarbonetos de médio (C₁₁ à C₂₂) e maior peso molecular (\geq C₂₃) com ligações duplas ou triplas entre seus átomos de carbono (TISSOT; WELTE, 1984; PEREIRA JR et al., 2009; MELLO, 2010).

Apesar da susceptibilidade de quebra de compostos de cadeias mais simples, a existência de microrganismos nos consórcios capazes de degradar compostos mais pesados, como a fração aromática, provavelmente pode ter sido responsável pela diminuição dos n-alcanos C₁₇ ao C₃₅. A quebra das cadeias alifáticas maiores, o fracionamento molecular ou a oxidação de componentes mais complexos, também podem enriquecer os alcanos de baixo peso molecular, fato já corroborado nas pesquisas de Peters et al.(2005) e Yang et al. (2013) (REYES, 2015). Essas reações podem explicar o aumento de n-alcanos de baixo peso molecular (<C₁₇) no tratamento B (Figura 31). Esse resultado também pode ser observado através dos cromatogramas que apontam as alterações nos carbonos no período de 90 dias experimento (Figura 34).

Esses resultados sugerem que o bioaumento foi capaz de contribuir para a biorremediação, apesar de limitada. Alguns fatores como a concentração muito alta de hidrocarbonetos, sua biodisponibilidade e afinidade, e a grande concorrência e predação de microrganismos autóctones no sedimento, podem causar prejuízos ao processo de biorremediação (ALMEIDA et al., 2013; JASMINE; MUKHERJI, 2015; ROY et al., 2018).

Abatenh et al. (2017) cita a taxa de degradação como dependente da concentração do contaminante e da quantidade de “catalisador” presente, de forma que a presença de pequenas quantidades de hidrocarbonetos pode atuar como estimulante da biorremediação. Dessa forma, pode-se inferir que a concentração de óleo adicionada ao experimento pode ter sido excessiva em relação a quantidade de consórcios microbiano adicionado, e por isso tenha levado a exposição crônica, inibido a expressão de enzimas específicas, tornando-as insuficiente para metabolizar os HTPs presente no óleo.

A falta de afinidade e biodisponibilidade do óleo em relação a população microbiana também pode ter contribuído para os resultados encontrados, visto que estes são fatores importantes, que limitam a biodegradação do óleo no ambiente (COONEY et al., 1985; LANG et al., 2016). Quando em contato com o sedimento, os compostos do óleo ligam-se aos componentes do sedimento e podem ser removidos ou degradados, entretanto, a alta viscosidade (resistência ao fluxo) do óleo do Recôncavo utilizado nesse experimento pode ter afetado a taxa de espalhamento e dispersão no sedimento (BARATHI; VASUDEVAN, 2001; LANG et al., 2016). Além disso, a pequena área de superfície entre o óleo e o

sedimento, com as cápsulas dos consórcios, também pode ter reduzido a interação e o contato entre ambos.

Também foram utilizadas algumas razões de abundância relativa de n-alcenos que têm sido citadas como um fator indicativo de biodegradação de óleo: P/n-C₁₇ e F/n-C₁₈ (MOLDOW, 2005; MARSAIOLI, 2012; YANG et al., 2017) (Figura 32 e 33).

Figura 32- Variação no tempo da razão P/n-C₁₇ do tratamento C, A e B

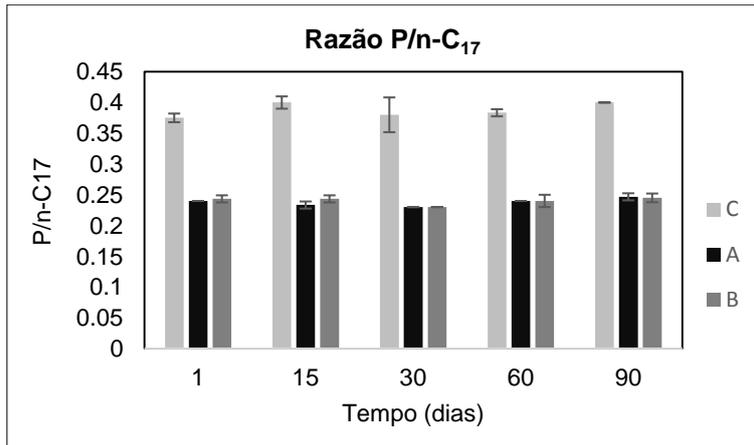
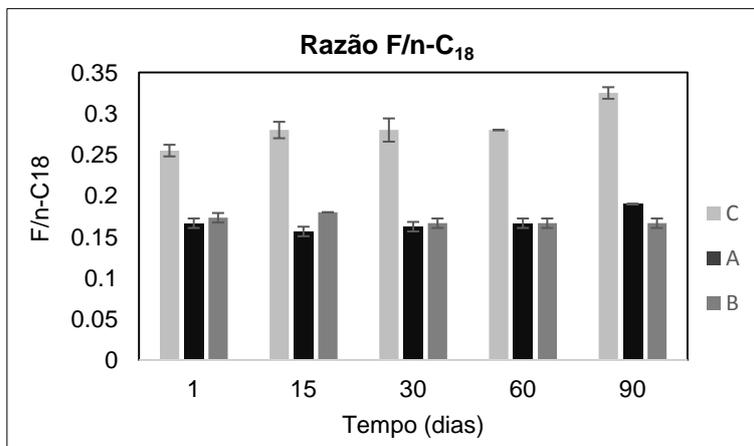


Figura 33- Variação no tempo da razão F/n-C₁₈ do tratamento C, A e B



Calculou-se a variação no tempo da razão P/n-C₁₇ e F/n-C₁₈ dos três tipos de tratamento (Figura 32 e 33). Os isoprenóides pristano e fitano são considerados produtos de alteração geológica do fitol e não constituintes da biota terrestre, por este motivo são recalcitrantes a biodegradação frente os n-alcenos, que possuem degradabilidade superior (PETERS; MOLDOWAN 1993; BARAKAT et al., 2001; CELINO et al., 2008). Valores altos destas razões indicam presença de óleo degradado, enquanto que valores baixos indicam que o óleo foi recentemente introduzido no ambiente, ou seja, que ainda não ocorreu biodegradação (MARIANO et al., 2008; COIMBRA, 2006; KRONBAUER, 2014).

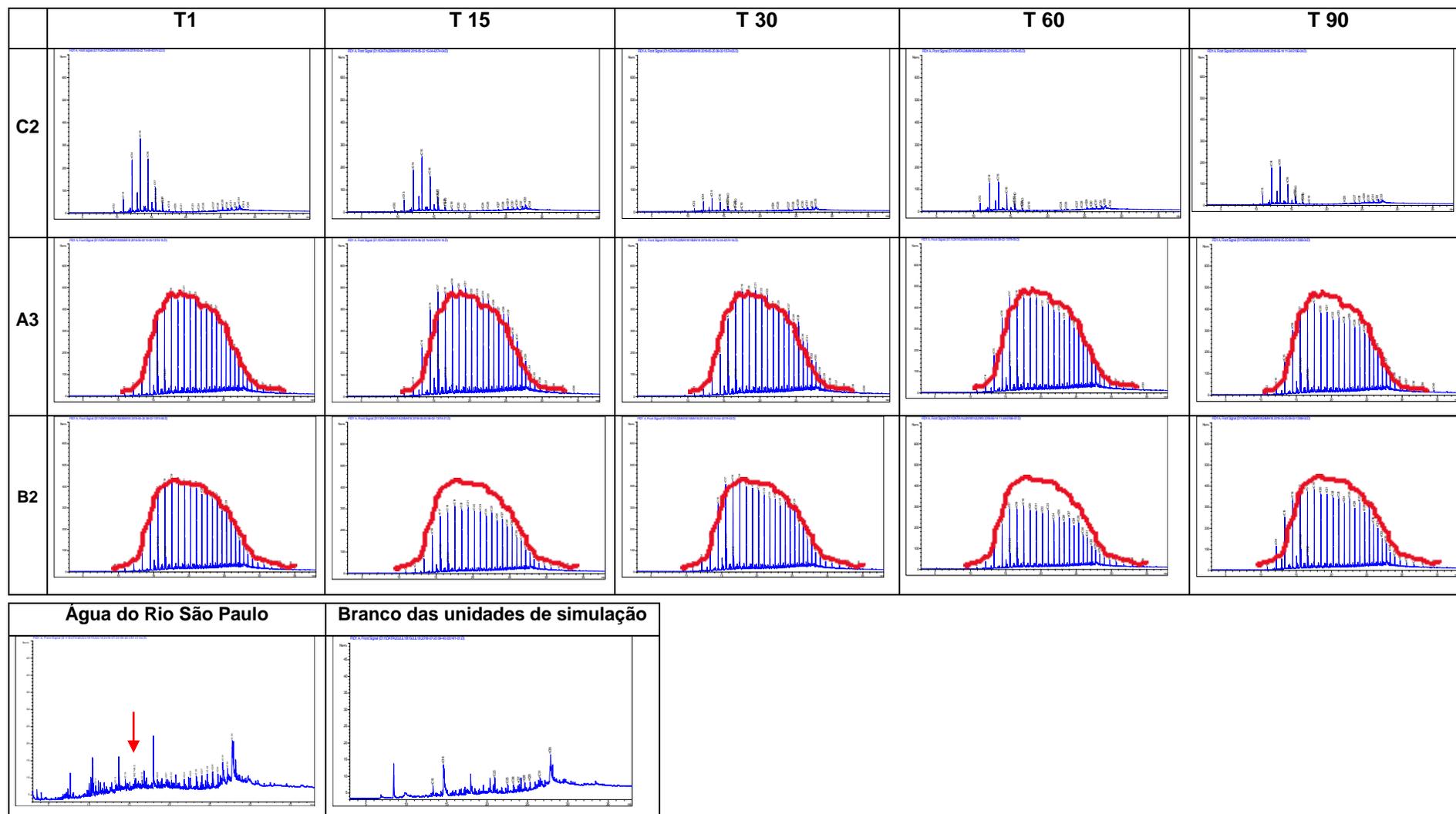
Os valores das razões $P/n-C_{17}$ e $F/n-C_{18}$ apresentaram, em sua totalidade, um comportamento muito semelhante ao longo dos 90 dias de experimento (Figura 32 e 33). O tratamento C foi o único que apresentou valores mais altos, justificado pelo fato dessas unidades apresentarem quantidades baixas de HTPs, o que refletiu nas razões. Os padrões de degradação similares do tratamento A e B revelaram que a adição do consórcio microbiano não pode estimular a degradação do óleo de maneira eficiente, pois a variação das razões ao longo do tempo foi muito pequena.

Esse comportamento sugere que a degradação observada em todos os tratamentos pode ter sido resultado, principalmente, de condições naturais (atenuação natural), associada ao intemperismo físico-químico, como a fotodegradação e/ou evaporação (RAMSAY et al., 2000; TAM et al., 2002; BRITO et al., 2009). Alguns autores apontam que hidrocarbonetos de petróleo da faixa C_6 a C_{10} , são as frações mais voláteis, seguido da fração semi-volátil de C_{10} a C_{16} , e a fração não volátil, C_{16} a C_{34} , além de $>C_{35}$, como a fração com menor volatilidade e solubilidade (CCME, 2008; VARJANI, 2017). Portanto, as temperaturas elevadas fazem com que a perda por evaporação dos componentes voláteis do petróleo seja mais rápida, tendo como resultado, a diminuição dos efeitos tóxicos sobre a microflora local (WANG; FINGAS, 2003).

Na atenuação natural os hidrocarbonetos também são degradados espontaneamente pelos processos naturais, como na volatilização, através da quebra da molécula em compostos voláteis; a diluição, mediante a diminuição da concentração inicial do poluente; e a sorção, por meio da adsorção dos poluentes a parede celular microbiana ou a seus metabólitos (MULLIGAN; YONG, 2004). Esse comportamento lento da biorremediação passiva pode explicar a baixa eficiência dos consórcios microbiano ao longo dos 90 dias de experimento.

Esse desempenho mostrou que a bioestimulação e o bioaumento combinado, nesse modelo de experimento, apresentou baixa eficiência. Modificações no delineamento experimental e análises moleculares podem contribuir para um melhor desempenho dos consórcios e melhor entendimento sobre a ecologia microbiana no sedimento. Além disso, os resultados demonstraram dificuldade em determinar com precisão as concentrações em amostras ambientais, especificamente ligada a biodegradação pela comunidade microbiana. Visto que outros fatores intempéricos podem ter atuado no sistema semiaberto, em que era permitida a entrada de água, ar atmosférico e radiação solar do ambiente entorno.

Figura 34- Cromatogramas dos HTPs (n-C₈ a n-C₄₀) das amostras de sedimento dos tratamentos C, A e B nos tempos 0, 15, 30, 60 e 90 dias (todos com mesma escala), das amostras de água do Rio São Paulo e da amostra do branco das unidades de simulação; onde o eixo y, representa a abundância e o eixo x, o tempo de retenção em minutos



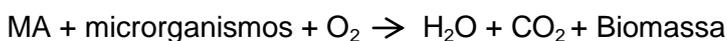
O cromatograma da amostra de água coletada do rio São Paulo indicou a presença de 1431,50 mg L⁻¹ de HTPs, cerca de 5,78 mg L⁻¹ do isoprenóide pristano (indicado pela seta vermelha), e para fitano, abaixo do limite de quantificação do aparelho (Figura 34). Esse resultado já era esperado, visto o histórico de acidentes de derramamentos de óleo corriqueiro existente no local.

Para o branco das unidades de simulação, foi feita a análise de água destilada coletada dos utensílios plásticos utilizado para a montagem dos experimentos (bomba, mangueiras, galões plásticos), com o intuito de verificar se os mesmos seriam uma fonte de contaminação por derivados de petróleo. O resultado indicou uma concentração pequena de HTPs (460,49 mg L⁻¹); e para o pristano e fitano, abaixo do limite de quantificação (Figura 34).

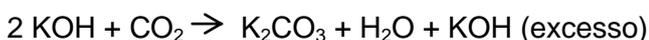
4.3.4 Análise da produção de CO₂ através do Respirômetro

De acordo com Teixeira (2010), durante o período de incubação e análise dos tratamentos, ocorreram diferentes reações:

1º) Oxidação (biodegradação) da matéria orgânica (MA):



2º) Absorção do CO₂ gerado:



3º) Na titulação o cloreto de bário reage com o carbonato de potássio:



4º) Na titulação ocorre a neutralização do excesso de KOH com HCl:



5º) Da titulação resultam as substâncias:



Os valores do volume de ácido titulado nas amostras coletadas durante o monitoramento foram aplicados na seguinte fórmula:

$$\text{CO}_2 \text{ acumulado (mg)} = (\text{A}-\text{B}) \times 50 \times f(\text{HCl}) \times 0,044$$

Em que:

A= volume de HCl gasto em mL na titulação do branco;

B= volume de HCl gasto na titulação da amostra;

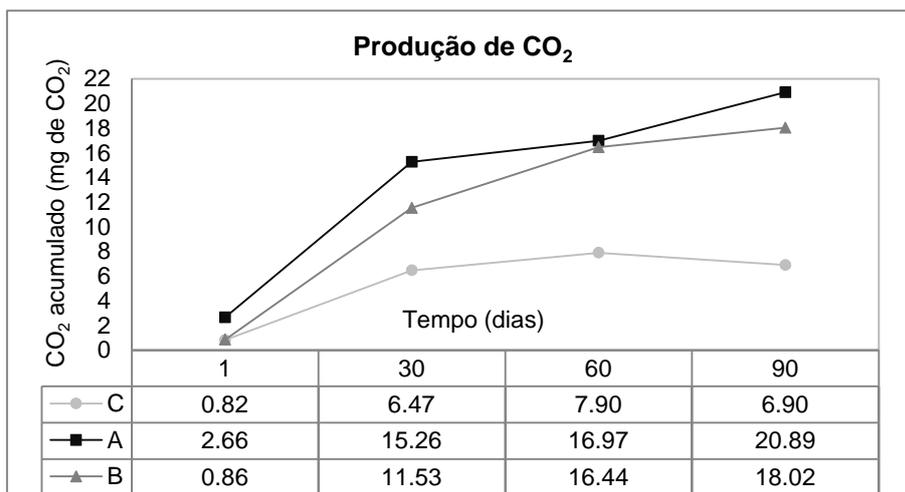
50= fator para transformar equivalente em μmol de CO₂;

f_{HCl} = fator da solução HCl 0,1N = 1,0113;

0,044= fator para transformar μmol em mg de CO_2 .

Foram realizadas médias aritméticas dos valores do CO_2 acumulado das triplicatas dos três tipos de ensaios (Controle (C), Atenuação (A) e Biorremediação (B)) ao longo dos 90 dias de incubação (Figura 35).

Figura 35- Gráfico de linhas da quantidade de CO_2 produzido por biodegradação em função do tempo para os tratamentos C, A e B



O gráfico mostrou um crescimento da curva de acúmulo de CO_2 para os tratamentos C, A e B durante a incubação, indicando que houve liberação de CO_2 por todos os três tipos de tratamentos. Este comportamento foi similar ao resultado encontrado no experimento 1 (Figura 27). Ambos os experimentos exibiram semelhança no comportamento para o tratamento A e B. Além disso, também foi observado uma semelhança na atividade microbiana observada no T30 para os dois experimentos (Figura 20 e 35), apesar dos dois experimentos terem sido montado com arranjos diferentes.

Do total de CO_2 gerado durante os 90 dias de experimento, mais da metade foi produzido nos primeiros 30 dias de incubação. Supõe-se que este comportamento pode estar ligado ao consumo total do O_2 pelos microrganismos até seu completo esgotamento, visto que não houve suprimento de O_2 durante o período de experimento montado, e, além disso, o sistema era fechado, impossibilitando a troca gasosa com o meio externo. A partir do T30 até o T90, foi possível observar uma produção de CO_2 lenta, com uma tendência a manutenção das taxas de acúmulo de CO_2 para os tratamentos C, A e B (Figura 35).

A quantidade de oxigênio é um fator importante na biorremediação de sedimentos poluídos por resíduos de petróleo, uma vez que o O_2 atua comoceptor final de elétrons na oxidação de compostos orgânicos em reações aeróbias. Contudo, quando o O_2 é totalmente consumido, os microrganismos passam a utilizar outros receptores de elétrons disponíveis no solo, alguns podem usar compostos orgânicos ou íons inorgânicos como aceptores finais de elétrons alternativos. Dessa forma, a biodegradação anaeróbica pode ocorrer pela

desnitrificação, redução do ferro, redução do sulfato ou condições metanogênicas (AELION; BRADLEY, 1991; ANDRADE et al., 2010).

Ururahy et al. (1998) estudaram o efeito da aeração na biodegradação de resíduos oleosos de petróleo através da evolução de CO₂ e constataram que a interrupção do fornecimento de O₂ era acompanhada pela queda drástica na produção do CO₂, provavelmente devido ao decréscimo da atividade microbiana. A degradação inicial dos hidrocarbonetos de petróleo frequentemente requer a ação de enzimas oxigenases, fato que torna o processo biodegradativo dependente do oxigênio molecular (ATLAS, 1991; CHAERUN et al., 2004).

A maior atividade foi verificada no final do experimento, no 90° dia, nos tratamentos A (20,89 mg/50 g de sedimento) e B (18,02 mg/50 g de sedimento), ultrapassando a quantidade de CO₂ produzida pelo tratamento C (6,90 mg/50 g de sedimento) (Figura 35). Esse resultado demonstrou que mesmo sem o suprimento de O₂, os microrganismos foram capazes de metabolizar também os carbonos do óleo adicionado, entretanto, independentemente da adição do consórcio, ambos os tratamentos exibiram comportamento similares. Apesar da via aeróbica para degradação de hidrocarbonetos ser considerada mais rápida que a anaeróbica, a taxa desse processo depende principalmente da classe de hidrocarbonetos e da fisiologia dos microrganismos (KLEINDIENST et al., 2015; WU et al., 2017).

Segundo Holguin et al. (2001), a maioria das camadas superiores dos sedimentos de manguezal são anaeróbicas, com apenas uma fina camada aeróbica superficial. Essa correlação pode ser um indicativo de que o potencial metabólico dos microrganismos de manguezal varia em função das condições ambientais químicas gerais no sedimento (PEIXOTO et al., 2011). Portanto, nessas circunstâncias, os microrganismos anaeróbicos podem ter sido responsáveis pela produção de CO₂ após o T30.

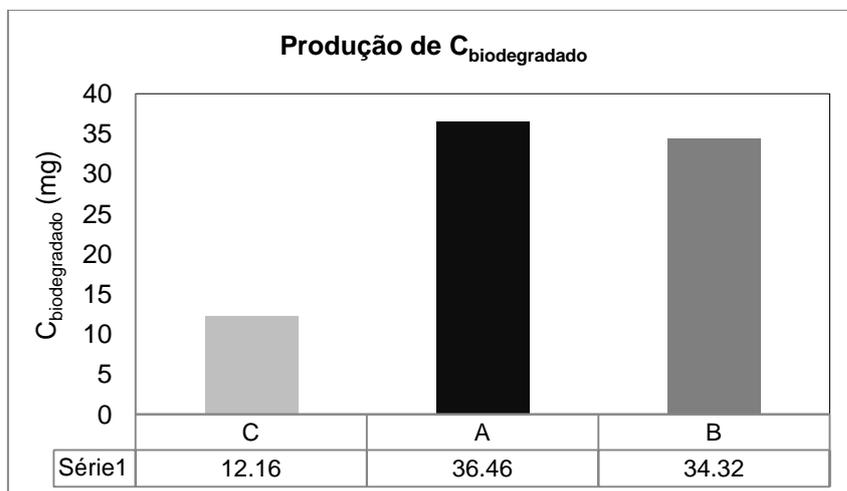
A Figura 35 também mostrou que o consórcio aplicado no tratamento B não apresentou melhor degradabilidade comparada ao tratamento A, ou seja, não houve diferença expressiva quando o consórcio foi adicionado ao sedimento. Este resultado foi análogo ao resultado do experimento 1, evidenciando que apesar de terem sido submetidos a condições distintas, tiveram correspondência.

De acordo com a Norma Técnica L6350 (CETESB, 1999), admitindo que 50% do carbono biodegradado se transforma em CO₂, e que os 50% remanescentes se incorporam ao sedimento sob a forma de biomassa, calculou-se o valor do carbono biodegradado pela fórmula:

$$C_{\text{biodegradado}} \text{ (mg)} = 2 * CO_2 \text{ biodegradado}$$

Assumindo que os microrganismos assimilem carbono existente no óleo, além de liberá-lo na forma de gás carbônico, considera-se que o carbono biodegradado seja o dobro do produzido. Então, avaliou-se os valores para os três tipos de tratamentos (Figura 36).

Figura 36- Gráfico de coluna para a quantidade de $C_{\text{biodegradado}}$ durante 90 dias de experimento



Dessa forma, pode-se concluir que, descontando a produção no respirômetro do tratamento C, a quantidade de carbono biodegradado em 50 g de sedimento após 90 dias de experimento, foi de 24,30 mg para o tratamento A e 22,16 mg para o tratamento B (Figura 36).

Pode-se considerar que dos produtos finais de uma biodegradação efetiva (mineralização), uma parcela da matéria orgânica é, em parte convertida em biomassa e em parte mineralizada para CO_2 e H_2O (MARIANO, 2006). Na mineralização, o substrato absorvido é quebrado em moléculas menores que, posteriormente serão metabolizadas por reações que geram energia. Consequentemente, a biomassa da população aumenta às custas do substrato e a concentração deste diminui consideravelmente com a expansão da população microbiana. Neste processo, a molécula é degradada completamente a moléculas inorgânicas de ocorrência universal, como CO_2 , CO , H_2O , NH_3 , H_2S e HCL . É, portanto, o único meio de eliminar um composto xenobiótico do ambiente (MELO; AZEVEDO, 2008).

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O processo de biorremediação é um sistema muito complexo, devido principalmente, a dependência de diversas variáveis ambientais. Por este motivo, pode ter sido difícil avaliar precisamente os níveis de contaminação no sedimento e medir sua recuperação após a simulação de derramamento de óleo no ecossistema de manguezal em um experimento de laboratório. Como sugestão, é interessante traçar novas estratégias e ajustes para a inserção de consórcios no processo de biorremediação de óleo no ambiente.

Sugere-se realizar a identificação dos microrganismos presentes no consórcio, através da análise molecular, para corroborar que as cepas são as responsáveis pela degradação dos HTPs. A microbiologia molecular é atualmente uma área de pesquisa em crescimento e os microrganismos são materiais genéticos valiosos e promissores para a solução de ameaças ambientais. Além disso, a falta de vegetação típica de manguezais no experimento evidenciou um grande prejuízo a eficiência do método de biorremediação, visto a influência das raízes de mangue na abundância e composição de comunidades bacterianas associada a rizosfera.

Para prever respostas aos impactos e orientar ações de restauração de ecossistemas impactados por petróleo através da estratégia de biorremediação, é essencial compreender as propriedades do petróleo bruto, dos mecanismos de degradação, dos fatores que controlam suas taxas, dos processos metabólicos dos microrganismos envolvidos e da ecologia microbiana do ambiente de estudo. O desenvolvimento e a otimização das técnicas de biorremediação é um grande desafio para a comunidade científica, visto a importância da conservação e recuperação desses ecossistemas.

5 CONCLUSÕES

Como o intuito desse experimento foi simular o mais próximo possível de um derramamento de óleo em sedimento de manguezal, fez-se necessário levar em conta todos os fatores ambientais que atuam no ecossistema, mantendo o mínimo de controle sob essas variáveis. Dessa forma, seria possível prever o comportamento da aplicação dos consórcios mistos de bactérias e fungos no manguezal “in situ” e medir sua eficiência em degradar os compostos de petróleo.

Nesse estudo foi possível montar dois experimentos de biorremediação adaptados, como o objetivo de avaliar a eficiência da biorremediação de HTPs através do bioestímulo e bioaumento. Para tal, foram coletados e caracterizados, o óleo da Bacia do Recôncavo, a água do rio São Paulo e o sedimento no manguezal próximo a uma zona de atividades petrolíferas. Foi possível observar, que apesar das limitações existentes em experimentos de mesocosmos montados em laboratório, ambos os testes apresentaram resultados razoáveis. A caracterização corroborou para a avaliação das condições inicial das matrizes utilizadas nos experimentos e para se ter um panorama geral das condições em qual se encontra o manguezal em um ponto naquela região.

Para o experimento 1 em mesocosmos, a correlação dos fatores ambientais e da ocorrência dos microrganismos monitorado durante 90 dias de experimento mostrou que os parâmetros físico-químicos variaram entre a faixa considerada normal para um ambiente de manguezal da região tropical; os microbiológicos indicaram mudanças ao longo do tempo, como resultado de uma possível resposta de adaptação as novas condições químicas e ambientais; os inorgânicos apresentaram pequena variação. Dessa forma, pode-se aferir que o estabelecimento da população microbiana do experimento foi afetado positivamente pelas condições estabelecida no experimento.

Os resultados da cromatografia gasosa apontaram que a degradação do óleo ocorreu nos três tratamentos, indicando que vários fatores intempéricos atuaram ao mesmo tempo que a biorremediação, como a evaporação e a foto-oxidação. Apesar do tratamento estatístico não apontar diferença significativa em relação a remoção dos HTPs entre o tratamento com e sem a presença do consórcio microbiano, a análise dos n-alcenos para o tratamento A se mostrou estável, enquanto que no tratamento B, observou-se uma redução expressiva da concentração dos n-alcenos a partir do C_{17} ao C_{35} , em detrimento de um aumento de C mais leves ($<C_{17}$). A razão HTP/UCM indicou maior biodegradação para o tratamento B (12%) em relação aos tratamentos o C (5%) e A (3%). Esse comportamento é um indicativo de que o consórcio obteve um potencial em degradar hidrocarbonetos através do bioestímulo e bioaumento, mesmo que pequeno.

O experimento 2 mostrou resultados similares ao experimento 1. Nos dados do Teste Respirométrico, constatou-se que houve atividade dos microrganismos por meio da degradação do óleo através da produção de CO_2 pelo sistema. Dessa forma, concluiu-se que os Respirômetros foram úteis para acompanhar o processo de consumo da matéria orgânica biodegradável no sedimento de manguezal, apesar das perdas de alguns tratamentos em triplicatas.

REFERÊNCIAS

ABATENH, E.; GIZAW, B.; TSEGAYE, Z.; WASSIE, M. Application of microorganisms in bioremediation-review. **Journal of Environmental Microbiology**, v. 1, n. 1, 2017.

ABBASIAN, F.; LOCKINGTON, R.; MALLAVARAPU, M.; NAIDU, R. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 176, n. 3, p. 670-699, 2015.

ADAMS, G. O.; FUFYIN, P. T.; OKORO, S. E.; EHINOMEN, I. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 3, n. 1, p. 28-39, 2015.

ANDRADE, J.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 14283: **Resíduos em solo – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico**. 8 p. Rio de Janeiro, 1999.

ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J.; WALLIS, F. M. Fungal Bioremediation of creosote contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 172, n. 1-4, p. 201-219, 2006.

BRITO, E. M. S.; DURAN, R.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; DE OTEYZA, T. G.; CRAPEZ, M. A.; WASSERMAN, J. C. (2009) A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, n. 3, p. 418-423, 2009.

CELINO, J. J.; VEIGA, I. G.; TRIGÜIS, J. A.; QUEIROZ, A. F. S. Fonte e distribuição de hidrocarbonetos do petróleo nos sedimentos da Baía de Todos os Santos, Bahia. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 31-38, 2008.

CHAERUN, S. K.; TAZAKI, K., ASADA, R.; KOGURE, K. Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. **Environment International**, v. 30, n. 7, p. 911-922, 2004.

COLARES, G. B. **Ecologia microbiana em sedimentos de manguezais**. Fortaleza, Ceará, 2014. 162 p. Tese (Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, 2014.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Norma L5 201: **Bactérias Heterotróficas - Contagem em placas: método de ensaio**. 26 p. São Paulo, 1999.

COSTA, M. R. **Uso da respirometria para avaliação da biodegradação aeróbia de lixiviado de resíduos sólidos urbanos em Latossolo Vermelho-Escuro**. Distrito Federal, Brasília, 2009. 109 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) - Universidade Estadual de Brasília, 2009.

DANTAS, C. P. **Utilização de Protótipo de Biorreator de Imersão Temporária na Biodegradação de Petróleo em Sedimento de Manguezal**. Salvador, Bahia, 2016. 108 f. Dissertação (Mestrado em Geoquímica do Petróleo) - Universidade Federal da Bahia, 2016.

DE ANDRADE, J. B.; HATJE, V. (Eds.). **Baía de Todos os Santos: aspectos oceanográficos**. Salvador: EDUFBA, 2009. 306 p.

DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D.; RIGONATO, J.; FIORE, M. F.; MELO, I. S.; ARAÚJO, W. L. The bacterial diversity in a Brazilian non-disturbed mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 4, p. 541-551, 2010.

DONAGEMA, G. K.; DE CAMPOS, D. B.; CALDERANO, S. B.; TEIXEIRA, W. G.; VIANA, J. M. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. rev. Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 2011. 230 p.

DUKE, N. C. Oil spill impacts on mangroves: recommendations for operational planning and action based on a global review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 109, n. 2, p. 700-715, 2016.

GOMEZ, F.; SARTAJ, M. Field scale ex-situ bioremediation of petroleum contaminated soil under cold climate conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 375-382, 2013.

JORCIN, A. Physical and chemical characteristics of the sediment in the estuarine region of Cananéia (SP), Brazil. **Hydrobiologia**, v. 431, n. 1, p. 59-67, 2000.

LANG, F. S.; DESTAIN, J.; DELVIGNE, F.; DRUART, P.; ONGENA, M.; THONART, P. Characterization and evaluation of the potential of a diesel-degrading bacterial consortium isolated from fresh mangrove sediment. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 2, p. 58, 2016.

LIM, M. W.; VON LAU, E.; POH, P. E. A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil- present works and future directions. **Marine pollution bulletin**, v. 109, n. 1, p. 14-45, 2016.

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**. Salvador, Bahia, 2014. 224f. Tese (Doutorado em Geologia) - Universidade Federal da Bahia, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Cidade: Artmed Editora, 2016.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Rio Claro, São Paulo, 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) – Universidade Estadual Paulista, 2006.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. 2. ed. rev. e ampl. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. 647 p.

MELO, L. DE A. L. **Potencial de degradação do petróleo por fungos isolados de sedimentos de manguezal impactado**. Recife, Pernambuco, 2010. 58 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

MIKESKOVÁ, H.; NOVOTNÝ, Č.; SVOBODOVÁ, K. Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 95, n. 4, p. 861-870, 2012.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N. Natural attenuation of contaminated soil. **Environmental International**, Oxford, v.30, n. 4, p. 587-601, 2004.

NOAA - NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION. Environmental Sensitivity Index for Coastal Areas. 2014. Disponível em: < <https://www.noaa.gov/>> Acesso em: setembro de 2018.

ORGE, M. D. R.; PORSCHE, I. J.; COSTA, M. C.; LIMA, J. S.; SOARES, S. E. D.; JUSTINO, R. Assessment of oil refinery waste on *Rhizophora mangle* L. seedling growth in mangroves of Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 3, p. 471 – 477, 2000.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G. A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Monitoring the changes in a bacterial community in petroleum-polluted soil bioaugmented with hydrocarbon-degrading strains. **Applied Soil Ecology**, v. 105, p. 76-85, 2016.

PEIXOTO, R.; CHAER, G. M.; CARMO, F. L.; ARAÚJO, F. V.; PAES, J. E.; VOLPON, A.; ROSADO, A. S. Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediment. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 2, p. 341-354, 2011.

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

POI, G.; ABURTO-MEDINA, A.; MOK, P. C.; BALL, A. S.; SHAHSAVARI, E. Large scale bioaugmentation of soil contaminated with petroleum hydrocarbons using a mixed microbial consortium. **Ecological engineering**, v. 102, p. 64-71, 2017.

REYES, C. Y. **Simulação do intemperismo em mesocosmos para petróleos brasileiros**. Salvador, Bahia, 2015. 288 f. Tese (Doutorado em Geologia) - Universidade Federal da Bahia, 2015.

RIZZO, A. C.; SISINNO, C. L. S.; CUNHA, C. D. 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**. 1º ed. Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, v. 1, 2014. 55 p.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Universidade Federal de Viçosa, 279 p., 2011.

ROY, A.; DUTTA, A.; PAL, S.; GUPTA, A.; SARKAR, J.; CHATTERJEE, A.; KAZY, S. K. Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. **Bioresource technology**, v. 253, p. 22-32, 2018.

SHEPPARD, P. J.; SIMONS, K. L.; ADETUTU, E. M.; KADALI, K. K.; JUHASZ, A. L.; MANEFIELD, M.; BALL, A. S. The application of a carrier-based bioremediation strategy for marine oil spills. **Marine pollution bulletin**, v. 84, n. 1-2, p. 339-346, 2014.

SILVA JÚNIOR, W. F. **Avaliação da gestão ambiental de uma refinaria de petróleo para as perdas de catalisador de craqueamento**. Salvador, Bahia, 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde, Ambiente e Trabalho) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, 2010.

SHAHI, A.; AYDIN, S.; INCE, B.; INCE, O. The effects of white-rot fungi *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta* on microbial community structure and functional genes during the bioaugmentation process following biostimulation practice of petroleum contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 114, p. 67-74, 2016.

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.

TAKETANI, R. G.; DOS SANTOS, H. F.; VAN ELSAS, J. D.; ROSADO, A. S. Characterisation of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, n. 3, p. 343-354, 2009.

TEIXEIRA, M. V. **Ensaio ecotoxicológico da biodegradação de óleos**. Rio Claro, São Paulo, 2010. 22 f. Monografia (Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, 2010.

VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource technology**, v. 223, p. 277-286, 2017.

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

VERANE, J. L. DA S. **Eficiência do mangue vermelho (rhizophora mangle) na fitorremediação de sedimentos de manguezal contaminados por petróleo**. Salvador, Bahia, 2016. 99 p. Monografia (Oceanografia) - Universidade Federal da Bahia, 2016.

WAGENER, A. D. L. R. **Possíveis contribuições de fontes de combustão na composição do sedimento superficial de rios e lagos no trecho Coari-Manaus**. Manaus, Amazonas, 2007. Tese (Doutorado)- PUC-Rio, 2007.

WANG, Z.; FINGAS, M. F. Developments of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. **Marine Pollution Bulletin**, v. 47, p. 423 - 452, 2003.

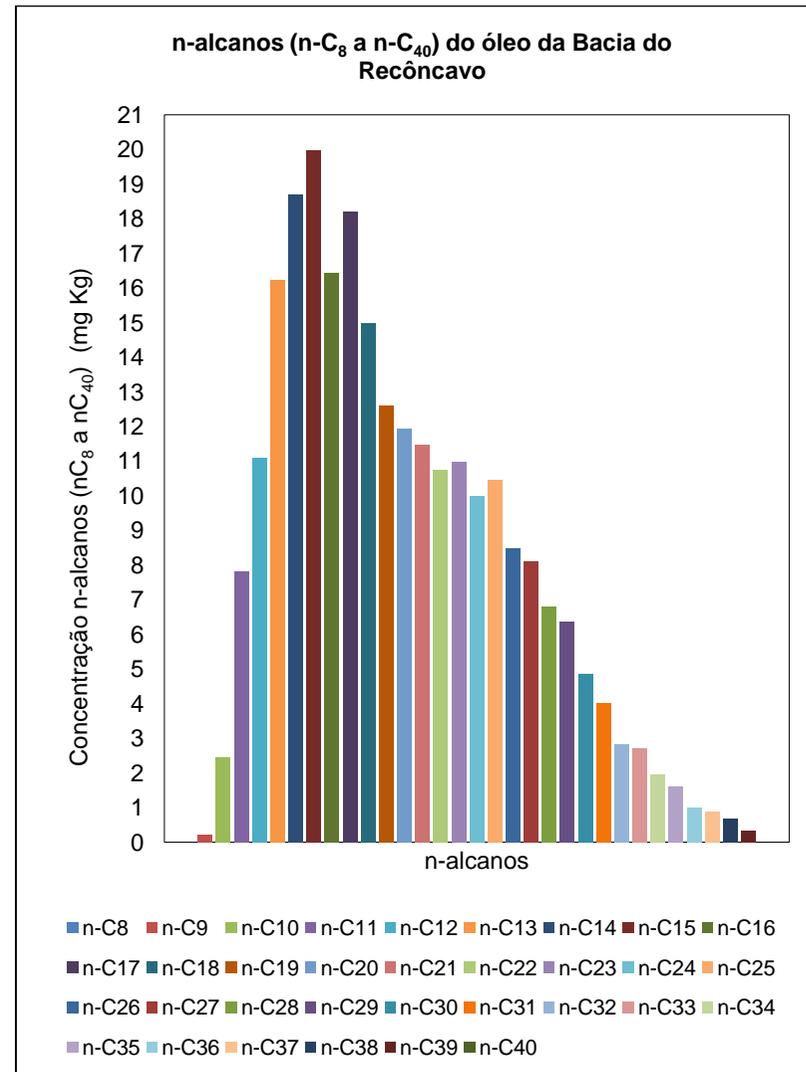
WU, M.; YE, X.; CHEN, K.; LI, W.; YUAN, J.; JIANG, X. Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil. **Environmental pollution**, v. 223, p. 657-664, 2017.

WU, M.; LI, W.; DICK, W. A.; YE, X.; CHEN, K.; KOST, D.; CHEN, L. Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination. **Chemosphere**, v. 169, p. 124-130, 2016.

YANG C. **Oil Spill Science and Technology: Chemical Fingerprints of Crude Oils and Petroleum Products**. Burlington: Elsevier, cap. 4, p. 209 - 304, 2017.

APÊNDICE 1- CONCENTRAÇÃO DE N-ALCANOS DO ÓLEO DA BACIA DO RECÔNCAVO NO TEMPO ZERO DE EXPERIMENTO

n-alcenos	Concentração mg Kg= ppm	LMQ (ppm)
n-C ₈	<LQM	0,07
n-C ₉	0,22	0,09
n-C ₁₀	2,45	0,09
n-C ₁₁	7,83	0,11
n-C ₁₂	11,10	0,10
n-C ₁₃	16,24	0,09
n-C ₁₄	18,70	0,08
n-C ₁₅	19,99	0,06
n-C ₁₆	16,45	0,08
n-C ₁₇	18,20	0,08
n-C ₁₈	14,99	0,08
n-C ₁₉	12,61	0,09
n-C ₂₀	11,94	0,08
n-C ₂₁	11,48	0,10
n-C ₂₂	10,75	0,12
n-C ₂₃	10,99	0,09
n-C ₂₄	9,98	0,11
n-C ₂₅	10,47	0,08
n-C ₂₆	8,49	0,08
n-C ₂₇	8,10	0,08
n-C ₂₈	6,82	0,13
n-C ₂₉	6,38	0,10
n-C ₃₀	4,87	0,07
n-C ₃₁	4,03	0,07
n-C ₃₂	2,83	0,04
n-C ₃₃	2,70	0,07
n-C ₃₄	1,97	0,08
n-C ₃₅	1,60	0,08
n-C ₃₆	1,00	0,10
n-C ₃₇	0,88	0,08
n-C ₃₈	0,67	0,09
n-C ₃₉	0,34	0,04
n-C ₄₀	<LQM	0,11



APÊNDICE 2 - PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO EXPERIMENTO 1

Ensaio	T 1			T 15			T 30			T 60			T 90		
	pH	T (°C)	S (ppt)												
C 1	7,71	30	-	7,54	32	37,32	7,53	30	57,03	7,49	30,8	-	7,84	30	35,2
C 2	7,62	29,6	45,08	5,77	29,8	38,61	7,65	30,9	61,02	7,71	31,5	40,98	7,91	30	41,62
C 3	7,41	29,6	42,24	7,23	31,2	36,13	7,45	30,3	55,68	7,45	31,5	37,65	7,92	29,7	34,9
A 1	7,34	29,7	42,49	7,26	31	39,3	7,5	30,4	59,45	7,46	31,5	37,82	7,69	30	38,82
A 2	7,78	29,6	43,25	7,05	30,9	36,55	7,76	30,3	63	7,56	31,1	43,27	7,99	29,1	43,55
A 3	7,44	29,4	44,1	7,54	31,4	38	7,42	30,4	56,26	7,61	31,7	40,05	7,55	29,6	40,44
B 1	7,71	29,6	41,8	7,6	30,6	42,12	7,54	30,8	50,13	7,12	31	34,77	-	-	-
B 2	7,8	29,6	43,12	7,59	31,8	42,23	7,69	31,1	65,62	7,58	31,4	43,2	7,5	28,8	7,5
B 3	7,14	29,6	41,08	7,4	30,6	38,7	7,65	30,1	58,65	7,88	30,7	31,78	7,92	29	7,92

* Para a construção dos gráficos, foram realizadas médias dos valores das triplicatas mais próximos

APÊNDICE 3- PARÂMETROS INORGÂNICOS DO EXPERIMENTO 1

Ensaio	T 1				T 15				T 30				T 60				T 90			
	P (mg kg ⁻¹)	NO ³⁻ (mg kg ⁻¹)	NH ⁴⁺ (mg kg ⁻¹)	COT (%)	P (mg kg ⁻¹)	NO ³⁻ (mg kg ⁻¹)	NH ⁴⁺ (mg kg ⁻¹)	P (mg kg ⁻¹)	NO ³⁻ (mg kg ⁻¹)	NH ⁴⁺ (mg kg ⁻¹)	P (mg kg ⁻¹)	NO ³⁻ (mg kg ⁻¹)	NH ⁴⁺ (mg kg ⁻¹)	P (mg kg ⁻¹)	NO ³⁻ (mg kg ⁻¹)	NH ⁴⁺ (mg kg ⁻¹)	COT (%)			
C 1	0,06247	9,80578	10,0393	3,09	0,06493	11,1998	7,93317	0,06135	9,80862	10,7428	0,073	9,58475	7,247	0,06875	12,5256	8,49192	2,93			
C 2	0,06095	11,2	3,73332	2,92	0,06533	12,6011	8,16739	0,07291	13,3019	9,56801	0,07474	10,5067	10,5067	0,07111	7,42994	8,49136	2,89			
C 3	0,06715	9,5679	5,5229	3,49	0,0679	13,5328	12,1328	0,066	9,09943	11,6659	0,07278	6,4218	7,5889	0,05582	6,15597	8,91554	3,02			
A 1	0,0694	11,4349	5,13404	4,04	0,0677	10,5089	10,7425	0,07059	44,6393	8,88112	0,06417	9,33643	5,36845	0,06887	14,8553	4,24438	3,44			
A 2	0,06446	11,675	5,8376	4,2	0,06352	16,1038	10,7358	0,07262	12,8336	11,6669	0,06635	11,4793	6,55958	0,06954	10,034	7,46719	4,06			
A 3	0,06802	9,56796	7,00094	3,91	0,0698	20,5559	16,8185	0,19726	11,2359	7,9588	0,0623	9,56697	4,66682	0,06239	8,70001	8,27562	3,71			
B 1	0,06808	10,9683	10,7349	3,51	0,06364	13,5387	9,10358	0,06188	11,4419	14,4775	0,07366	11,6716	9,33731	0,06756	10,0569	7,25033	3,41			
B 2	0,06659	7,4953	4,8809	3,82	0,07667	10,5013	10,5013	0,07034	10,7536	12,8576	0,06245	7,4669	7,00022	0,06984	13,8151	7,25879	3,44			
B 3	0,06877	8,16716	8,16716	3,4	0,06411	24,9814	29,1839	0,09144	10,9745	6,30448	0,06774	7,00209	4,90146	0,07505	7,49145	9,59842	4,01			

* Para a construção dos gráficos, foram realizadas médias dos valores das triplicatas mais próximos

APÊNDICE 4- PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS DO EXPERIMENTO 1

Ensaio	T 1		T 15		T 30		T 60		T 90	
	Fungo (UFC/mL ⁵)	Bactéria (UFC/mL ⁵)	Fungo (UFC/mL ⁵)	Bactéria (UFC/mL ⁵)	Fungo (UFC/mL ⁵)	Bactéria (UFC/mL ⁵)	Fungo (UFC/mL ⁵)	Bactéria (UFC/mL ⁵)	Fungo (UFC/mL ⁵)	Bactéria (UFC/mL ⁵)
C 1	0,0005	0	0	0,0065	0,018	0	0,0003	0,0032	0,0004	0
C 2	0,0005	0,006	0,0001	0	0,0002	0	0,00535	0	0	0
C 3	0,00185	0,002	0	0,0055	0,00105	0,00233	0,0006	0	0,00085	0
A 1	0	0	0,001	0,008	0,0055	0	0,00095	0,00275	0,0011	0,00095
A 2	0,0006	0,002	0,0003	0,00194	0,00395	0,02	0,00075	0,00285	0,0011	0
A 3	0,00185	0,0133	0	0,0108	0,00165	0	0,0004	0,0021	0,00075	0,01
B 1	0,00185	0	0,0004	0	0,0076	0,012	0,0084	0	0,00195	0,00433
B 2	0,0008	0,0295	0	0	0,0046	0,044	0,009	0,006	0,0003	0
B 3	0,0022	0,035	0	0,046	0,0001	0,00073	0,00507	0,00365	0,0008	0,001

* Para a construção dos gráficos, foram realizadas médias dos valores das triplicatas mais próximos

APÊNDICE 5- PARÂMETROS GEOQUÍMICOS DO EXPERIMENTO 1

Ensaio	T 1			T 15			T 30			T 60			T 90		
	HTP/UCM	P/n-C ₁₇	F/n-C ₁₈												
C 1	2,04	0,3	0,25	2,32	0,41	0,29	1,81	0,4	0,29	2,04	0,38	0,28	1,92	0,4	0,3
C 2	2,14	0,37	0	2,01	0,4	0,28	1,50	0,31	0,27	1,73	0,39	0,28	1,75	0,43	0,33
C 3	1,95	0,38	0,26	1,86	0,39	0,27	1,99	0,36	0,25	1,90	0,38	0,28	2,13	0,4	0,32
A 1	2,17	0,24	0,17	2,08	0,23	0,16	1,93	0,23	0,16	2,18	0,22	0,16	2,15	0,25	0,19
A 2	2,14	0,24	0,17	2,21	0,23	0,15	2,14	0,23	0,16	2,81	0,24	0,17	2,09	0,25	0,19
A 3	2,28	0,24	0,16	2,21	0,24	0,16	2,05	0,23	0,17	2,12	0,24	0,17	2,14	0,24	0,17
B 1	2,21	0,24	0,17	2,22	0,24	0,18	2,10	0,23	0,16	2,05	0,24	0,17	2,22	0,24	0,17
B 2	2,20	0,24	0,17	2,02	0,25	0,18	2,11	0,23	0,17	1,98	0,25	0,16	1,15	0,25	0,16
B 3	2,09	0,25	0,18	2,13	0,24	0,16	2,09	0,23	0,17	2,08	0,23	0,17	2,34	0,23	0,17

* Para a construção dos gráficos, foram realizadas médias dos valores das triplicatas mais próximos

APÊNDICE 6- CONCENTRAÇÃO DE N-ALCANOS DO TRATAMENTO A DO T1 E T90

n-alcenos	Concentração mg Kg= ppm						LMQ (ppm)
	T1			T90			
	A1	A2	A3	A1	A2	A3	
n-C ₈	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	0,07
n-C ₉	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	0,09
n-C ₁₀	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	0,09
n-C ₁₁	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	0,11
n-C ₁₂	1,39	1,48	1,44	<LQM	<LQM	<LQM	0,10
n-C ₁₃	6,67	6,24	6,46	4,92	3,77	3,99	0,09
n-C ₁₄	18,34	14,01	16,18	29,03	27,61	20,96	0,08
n-C ₁₅	55,44	34,94	45,20	104,77	101,40	64,14	0,06
n-C ₁₆	108,18	75,39	91,80	175,83	149,57	119,02	0,08
n-C ₁₇	147,55	138,34	142,94	197,21	166,80	155,17	0,08
n-C ₁₈	146,35	157,99	152,15	179,09	156,40	153,56	0,08
n-C ₁₉	135,41	153,50	144,43	153,61	138,75	141,50	0,09
n-C ₂₀	127,81	148,15	137,95	144,54	132,40	134,25	0,08
n-C ₂₁	125,15	144,97	135,04	135,56	129,15	126,13	0,10
n-C ₂₂	117,94	135,48	126,69	124,83	120,97	120,52	0,12
n-C ₂₃	119,21	140,73	129,95	129,28	130,52	123,38	0,09
n-C ₂₄	104,10	121,02	112,54	113,01	122,70	108,40	0,11
n-C ₂₅	113,30	130,83	122,04	127,10	128,33	119,05	0,08
n-C ₂₆	90,27	103,48	96,86	105,28	106,75	95,80	0,08
n-C ₂₇	90,23	100,86	95,53	111,63	110,77	94,91	0,08
n-C ₂₈	75,22	85,17	80,18	102,25	97,60	82,18	0,13
n-C ₂₉	75,95	84,97	80,45	103,75	99,86	89,98	0,10
n-C ₃₀	49,72	56,03	52,86	74,16	70,63	54,17	0,07
n-C ₃₁	53,55	55,60	54,57	75,16	87,02	60,61	0,07
n-C ₃₂	35,33	40,00	37,66	55,41	51,06	38,09	0,04
n-C ₃₃	55,70	52,64	54,17	91,32	43,78	64,74	0,07
n-C ₃₄	26,54	29,54	28,03	45,16	41,15	28,95	0,08
n-C ₃₅	23,49	25,69	24,58	42,44	38,25	26,10	0,08
n-C ₃₆	16,01	15,98	16,00	33,59	31,11	17,46	0,10
n-C ₃₇	13,53	12,48	13,00	30,80	26,82	16,15	0,08
n-C ₃₈	9,64	8,29	8,97	26,66	21,20	12,74	0,09
n-C ₃₉	8,02	4,37	6,20	21,26	19,88	11,02	0,04
n-C ₄₀	5,42	2,26	3,84	17,59	15,21	7,83	0,11

* Para a construção dos gráficos, foram realizadas médias dos valores das triplicatas mais próximos

APÊNDICE 7- CONCENTRAÇÃO DE N-ALCANOS DO TRATAMENTO B DO T1 E T90

n-alcenos	Concentração mg Kg= ppm						LMQ (ppm)
	T1			T90			
	B1	B2	B3	B1	B2	B3	
n-C ₈	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	0,07
n-C ₉	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	0,09
n-C ₁₀	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	0,09
n-C ₁₁	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM	0,11
n-C ₁₂	1,25	1,24	1,25	<LQM	<LQM	<LQM	0,10
n-C ₁₃	5,51	5,63	5,59	5,55	4,61	3,94	0,09
n-C ₁₄	15,93	16,55	13,74	52,29	34,76	22,31	0,08
n-C ₁₅	34,68	38,42	37,13	118,20	103,57	69,95	0,06
n-C ₁₆	78,80	91,81	82,37	133,00	113,50	160,71	0,08
n-C ₁₇	139,34	147,63	132,29	149,19	111,80	261,37	0,08
n-C ₁₈	154,01	156,80	140,35	135,64	96,40	281,39	0,08
n-C ₁₉	155,40	150,03	132,59	127,94	84,04	265,28	0,09
n-C ₂₀	149,52	142,99	127,17	121,91	79,05	254,67	0,08
n-C ₂₁	146,66	138,55	121,81	119,09	76,62	239,34	0,10
n-C ₂₂	136,59	129,33	115,26	111,70	71,43	220,33	0,12
n-C ₂₃	145,07	136,25	119,20	114,70	69,78	225,06	0,09
n-C ₂₄	125,37	116,98	103,01	102,94	63,15	201,84	0,11
n-C ₂₅	135,22	128,47	109,92	114,51	70,88	221,86	0,08
n-C ₂₆	107,83	101,84	87,96	95,38	56,95	182,78	0,08
n-C ₂₇	104,99	100,18	86,73	92,06	54,92	185,96	0,08
n-C ₂₈	89,06	85,50	72,92	79,73	49,46	168,66	0,13
n-C ₂₉	88,97	85,67	73,25	87,11	53,45	167,67	0,10
n-C ₃₀	58,24	55,81	47,81	53,05	33,00	118,49	0,07
n-C ₃₁	55,93	59,12	51,08	56,50	39,77	115,41	0,07
n-C ₃₂	41,75	38,64	34,75	37,32	23,29	84,10	0,04
n-C ₃₃	60,10	53,91	48,07	53,06	33,05	123,44	0,07
n-C ₃₄	29,47	27,74	25,05	26,86	18,38	68,72	0,08
n-C ₃₅	24,92	23,47	20,14	22,14	16,87	64,73	0,08
n-C ₃₆	15,73	15,06	14,08	13,98	10,64	46,79	0,10
n-C ₃₇	11,83	11,74	12,00	11,74	9,74	44,84	0,08
n-C ₃₈	8,02	8,24	8,84	8,54	7,70	35,56	0,09
n-C ₃₉	6,08	4,94	6,17	6,54	6,68	35,71	0,04
n-C ₄₀	2,94	3,05	3,60	3,21	4,74	24,37	0,11

* Para a construção dos gráficos, foram realizadas médias dos valores das triplicatas mais próximos

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Souza Barreto, Isana
CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO DO PETRÓLEO DA BACIA DO
RECÔNCAVO EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL POR CONSÓRCIOS
MICROBIANOS ENCAPSULADOS / Isana Souza Barreto. --
Salvador, 2018.
81 f. : il

Orientador: Danusia Ferreira Lima.
Coorientador: Olivia Maria Cordeiro de Oliveira.
Dissertação (Mestrado - Pós-Graduação em Geoquímica:
Petróleo e Meio Ambiente) -- Universidade Federal da
Bahia, Instituto de Geociências, 2018.

1. Biorremediação. 2. Microrganismos. 3. Petróleo .
4. Sedimento de manguezal . I. Ferreira Lima,
Danusia. II. Maria Cordeiro de Oliveira, Olivia .
III. Título.