



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

LUA MORENA LEONCIO DE OLIVEIRA

INFLUÊNCIA DE NUTRIENTES NA BIODEGRADAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO (HTP)
DISPERSADOS PELA FORMAÇÃO DE AGREGADOS ÓLEO-
MPS (OSAs)

Salvador

2019

LUA MORENA LEONCIO DE OLIVEIRA

**INFLUÊNCIA DE NUTRIENTES NA BIODEGRADAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO (HTP) DISPERSADOS PELA
FORMAÇÃO DE AGREGADOS ÓLEO-MPS (OSAs)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente, na Universidade Federal da Bahia, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Geoquímica do petróleo e ambiental.

Orientadora: Prof.^a Dra. Danusia Ferreira Lima

Prof. Dr. Ícaro Thiago Andrade Moreira

Salvador
2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e à minha ancestralidade por guiarem meus caminhos até aqui, a caminhada foi longa e árdua e muitas vezes me apegava a vocês pedindo força e coragem, sempre fui atendida.

Quero agradecer à equipe técnica do LEPETRO, pelo incentivo todas as manhãs, pela parceria, pelas risadas e por ficar comigo até depois do fim do expediente, só para que eu conseguisse dar conta das minhas análises, principalmente Gisele, Marcão (meu guia e amigo), Lili, Sarinha e Regina, sem vocês nada seria possível.

Às minhas queridas estagiárias Paula e Thaiane por estarem comigo quando mais precisei e por todo o cuidado que tiveram com minha pesquisa.

Aos meus colegas de mestrado, principalmente que muitas vezes me inspiraram e me mostraram que apesar de toda dedicação, esforço e trabalho duro, é necessário manter a mente sã para conseguir chegar ao fim sem se perder no caminho.

Serei eternamente grata à Pd, Guga, Tchê, Diego e Rafael por dedicarem um sábado inteiro ao meu campo, e cá entre nós, como eu iria carregar 19 garrações sem vocês?

Aos meus amigos Guilherme, Adrielle, Milton, Isana, Juliana, Samires e Naiara, obrigado por serem a minha âncora, por serem a alegria dos meus dias intermináveis no laboratório e por me ajudarem todas as vezes que precisei, vocês são verdadeiros companheiros. A Marcio por toda ajuda e disponibilidade sempre que precisei

Agradeço à Lucas Jorge por trilhar esse caminho ao meu lado, por nunca soltar minha mão e por estar sempre disponível para me ouvir e me dar soluções.

À minha mãe, Joana Leoncio que é minha base, meu orgulho e meu exemplo de mulher e profissional, nada seria possível sem seu apoio, seu incentivo e seu amor incondicional.

Aos meus orientadores, Dr^a Danúsia Lima e Dr. Ícaro Moreira que acreditaram em mim e em meu trabalho, serei eternamente grata.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Gostaria de agradecer ao CNPq pelo financiamento da pesquisa e à Fapesb pela bolsa concedida.

Ao projeto “Desenvolvimento de Multibioprocesso de Remediação Aplicável em Áreas Costeiras Impactadas por Atividades Petrolíferas- DEMBPETRO” - Processo 4026663/2013 6, no âmbito da CHAMADA MCTI/CNPq/CT-BIOTEC N° 30/2013.

RESUMO

Derrames de petróleo no meio ambiente têm sido uma das grandes preocupações atuais, diante disso surgiu à necessidade de recuperar áreas impactadas por petróleo, utilizando como ferramenta biotecnologias que auxiliem na retirada e/ou biodegradação do óleo no meio ambiente. Os agregados óleo- particulado em suspensão (OSAs) consiste em uma técnica natural de intemperismo (dispersão e biodegradação) do óleo a partir da interação de gotículas de óleo e Material Particulado em Suspensão (MPS). A bioestimulação pode aumentar a eficiência da biodegradação a partir da formação dos OSAs. Sendo assim, o objetivo central dessa pesquisa foi avaliar por meio de ensaios laboratoriais, a influência dos nutrientes na biodegradação de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) dispersados pelos agregados Óleo-MPS (OSAs). A bioestimulação e bioaugmentação autóctone foram utilizadas em conjunto com a dispersão de óleo pela formação de OSAs, como forma de potencializar a biodegradação dos HTP a partir da adição de nutrientes (N, P, K) e adição de microrganismos provenientes do MPS coletado no estuário do rio São Paulo. Antes de iniciar o experimento foi realizada a amostragem do MPS e água proveniente da área de interesse para caracterização geoquímica dos HTP e quantificação dos nutrientes. O experimento foi realizado no Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO) do Núcleo de Estudos Ambientais (NEA), localizado no Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia (IGEO/UFBA) e está inserido no projeto de pesquisa “Desenvolvimento de Multibioprocesso de remediação aplicável em áreas costeiras impactadas por atividades petrolíferas”- DEMBPETRO. O experimento contou com a montagem de oito biorreatores com volume de 20 L de água salina e uma bomba de aeração *wave maker* com capacidade para bombear 3000 L. h⁻¹ no qual foi realizado de forma pioneira, pois, foi o primeiro experimento de formação de OSAs a ser bioestimulado. Nas unidades de bioestimulação foi adicionado óleo, MPS e nutrientes à água salina produzida em laboratório, nas unidades de atenuação natural foi adicionado óleo e MPS e nas unidades de branco foi adicionado à água salina somente MPS e nutrientes. As coletas para contagem de Unidades Formadoras de Colônia foram realizadas nos tempos 0, 7, 15, 30 e 60 dias, e para quantificação de HTP as coletas foram realizadas em 0, 15, 30 e 60 dias. A cada tempo de coleta foram retiradas alíquotas para quantificação de espécies químicas (nitrato, nitrito, amônio e fosfato). Entre os resultados encontrados observou-se que nos biorreatores bioestimulados houve um ligeiro aumento na formação de OSAs de fluabilidade negativa, a adição de nutrientes no tempo 7 acarretou um maior crescimento de UFCs, porém em 30 e 60 dias os biorreatores branco e atenuação natural apresentaram maior crescimento. Contudo, para a biodegradação dos HTP a bioestimulação mostrou-se eficiente uma vez que sua média foi de 98,12% de degradação em comparação a 84,61% de degradação das unidades de atenuação natural. Os dados mostraram que a adição de nutrientes apesar de não contribuir significativamente na formação de OSAs é de grande importância para a biodegradação dos HTP.

Palavras-Chave: Bioestimulação, Dispersão natural, Petróleo.

ABSTRACT

Oil spills into the environment have been one of the biggest exemptions today, and it is necessary to recover areas impacted by oil, using the same technologies, biotechnologies that aid in the removal and / or biodegradation of oil in the environment. Suspended particulate amortization systems consist of a natural dispersion and oil biodegradation technique with oil droplet particles and suspended particulate matter (SPM). Biostimulation can increase the efficiency of biodegradation from OSAs formation. Thus, the central objective of the research was evaluated by laboratory tests, based on the concentration of Total Petroleum Hydrocarbons (TPHs) dispersed by Oil-MPS aggregates (OSAs). Biostimulation and autocorreal bioassistance were used in conjunction with the dispersion of a life cycle by the formation of OSAs, as a way to potentiate the biodegradation of HTP from the addition of nutrients (N, P, K) and addition of microorganisms from the SPM collected in the São Paulo estuary. Before starting the experiment, a sample of the SPM and the water of the area of interest for the geochemical characterization of the TPHs and quantification of the nutrients were carried out. The experiment was carried out at the Nucleus of Environmental Systems Studies (NEA), located in the Institute of Geosciences of the Federal University of Bahia (IGEO / UFBA) and is part of the research project "Development of Multibioprocesses of Remediation". in coastal areas impacted by oil activities "- DEMBPETRO. The experiment consisted of a set of eight bioreactors with a volume of 20 L of salt water and a ventilation pump with capacity to pump 3000 L. h⁻¹ was not carried out in a pioneering way, as it was the first experiment of formation of OSAs a be biostimulated. The biosorption unit is a new product, the SPM and the nutrients to salt water have been produced in the laboratory, having been of natural attenuation units to a single year and the SPM and the base units were added to the salt water only SPM and nutrients. Colony counts were counted at 0, 7, 15, 30 and 60 days, and quantification of TPHs as collected was performed at 0, 15, 30 and 60 days. Each time of sampling was withdrawn the anullitis for quantification of the species (nitrate, nitrite, ammonium and phosphate). Among the results found, biostimulated bioreactors were identified, there was a slight increase in the formation of negative buoyancy OSAs, an addition of nutrients in time 7 resulted in a higher growth of CFUs, but in 30 and 60 days the white bioreactors and natural attenuation increased growth . However, for a biodegradation of the TPHs a biostimulation was shown to have a mean of 98.12% degradation compared to 84.61% degradation of the natural attenuation units. Data were significantly significant for a critical analysis of hypersensitivity of TPHs.

Keywords: Biostimulation, Natural dispersion; Petroleum.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS	12
2.1	OBJETIVO GERAL.....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3	PROCESSO DE BIOESTIMULAÇÃO DURANTE A FORMAÇÃO DOS AGREGADOS ÓLEO- MPS (OSAs) PARA A BIODEGRADAÇÃO DOS HTP	13
3.1	INTRODUÇÃO.....	14
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.2.1	Amostragem e pré- tratamento	16
3.2.2	Caracterizações geoquímicas da água e MPS	17
3.2.3	Desenho do biorreator para o processo de biorremediação	20
3.2.4	Método de diluição seriada membrana filtrante	22
3.2.5	Protocolo de formação de OSAs.....	23
3.2.6	Tratamento estatístico	24
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
3.3.1	Caracterização da água e MPS.....	24
3.3.2	Dispersão dos hidrocarbonetos a partir da formação de OSAs	27
3.3.3	Distribuição temporal da concentração de HTP de médio e alto peso em 0, 15, 30 e 60 dias	30
3.3.4	Avaliação temporal do crescimento de UFCs	37
3.4	CONCLUSÃO.....	44
4	CONCLUSÃO GERAL	46
	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

A atividade de extração e transporte de petróleo continua ocorrendo de forma intensa nos dias de hoje ocasionando o derrame de grandes volumes de óleo nos oceanos. Somente no ano de 2018 foram derramadas aproximadamente 116.000 toneladas de óleo, a maioria dos incidentes ocorreu no mar da China Oriental, e foi considerado o maior volume de óleo anual registrado em 24 anos (ITOPF, 2018). O petróleo é transportado através de oleodutos terrestres e marinhos e navios tanque, porém, seja na exploração, refino, transporte, produção, estocagem ou vazamentos naturais inevitavelmente o petróleo poderá causar acidentes ocasionando a contaminação do meio ambiente (ATLAS; BOEHM; CALDER, 1981).

Os estuários são caracterizados como uma área de transição entre rio e oceano onde ocorre uma grande variação de salinidade, em função da proximidade da nascente ou foz do rio. Já os manguezais são considerados como importantes áreas alagadiças estuarinas entre marés. Em caso de derramamentos de petróleo nos estuários, os manguezais poderão ser afetados uma vez que os manguezais podem ser considerados como o destino final do contaminante, ocasionando a deposição do mesmo nos sedimentos e nas raízes aéreas. Sendo assim, em consequência do sedimento anóxico, ocorre uma diminuição do potencial de biodegradação dos hidrocarbonetos. Os principais impactos associados à contaminação por petróleo são desfolhação dos vegetais, morte da fauna e reduções na reprodução de plantas (NOAA, 2014; TAM et al., 2001).

Segundo Gomes et al. (2010) e Kronenberg et al. (2017) em casos de derramamento onde manguezais são atingidos os impactos ambientais associados ao derramamento vão além da contaminação da fauna e flora da região. Portanto existe um enorme desafio ambiental em caso de acidentes, pois os hidrocarbonetos bioacumulam-se na cadeia alimentar, causando grandes impactos no meio ambiente de forma geral (KE et al., 2002; KRONENBERG et al., 2017; SANTOS et al., 2011). Entretanto é importante ressaltar que exsudados de raízes e plantas de manguezais também podem ser considerados responsáveis por uma parcela da contaminação uma vez que as raízes secretaram vários compostos orgânicos (JIA et al., 2018).

Muitos acidentes já foram documentados na literatura, e um dos ecossistemas mais atingidos são os ecossistemas costeiros, dentre eles os manguezais. Em abril de 2005 no Rio de Janeiro- Brasil, um acidente causou o vazamento de 60.000 L de óleo e apesar do trabalho de contenção, o óleo atingiu o manguezal do estuário de Caceribu (GOMES et al., 2010). Outro vazamento de óleo que atingiu diretamente o manguezal foi em Hong Kong no estuário Pearl River. Mais de 60.000 galões de petróleo bruto vazaram, o manguezal afetado possui 1,21

hectares de extensão e obtêm quatro espécies de mangue, sendo elas: *Avicênia marina*, *Aegiceras corniculatum*, *Acanthus ilicifolius* e *Kandelia candel* (KE et al., 2002).

Segundo ISLAM et al., (2017) o manguezal tem sido cada vez mais ameaçado devido às atividades antropogênicas. O desenvolvimento industrial e agrícola próximo aos manguezais de Sundarban localizado na Índia tem chamado atenção em consequência dos diversos vazamentos de óleo e fertilizantes. Em 2014 o manguezal de Sundarban foi atingido por 350.000 L de combustível.

Em 2000, 1,3 milhões de toneladas de petróleo contaminaram os manguezais do Rio de Janeiro, o que causou uma forte destruição dos manguezais presentes na área. Os impactos desse vazamento foram caracterizados como impactos agudos na coluna d'água e impactos crônicos para habitats da zona intertidal (SANTOS et al., 2011). Em 2006 cerca de 25 toneladas de petróleo foram derramadas na Austrália, afetando significativamente os manguezais (MELVILLE; ANDERSEN; JOLLEY, 2009).

O manguezal é caracterizado como parte de uma zona costeira e possui grande importância ambiental para a fauna e flora da região. A alta atividade primária devido à grande quantidade de matéria orgânica encontrada possibilita a presença de peixes, crustáceos, moluscos, répteis, mamíferos e nidificação de pássaros. O manguezal é um ambiente rico em carbono orgânico, oferece proteção contra erosões costeiras, e geralmente se encontram próximos a indústrias (NOAA, 2014). Possui também uma importância social e econômica, uma vez que a pesca é considerada a principal fonte de renda da população ribeirinha (QUEIROZ; CELINO, 2008).

Um dos métodos promissores para recuperar áreas impactadas por petróleo consiste no uso de tecnologias de biorremediação, pois esta é caracterizada pela abordagem ecológica, sustentável e econômica. Sendo assim, a cada dia surgem novas tecnologias que buscam a degradação do óleo de forma a não deixar um passivo ambiental no ambiente marinho, acarretando diversos impactos negativos tanto no setor ambiental quanto social e econômico principalmente devido aos compostos tóxicos presentes no óleo, como os Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP), alvo do presente estudo (PATOWARY et al., 2018).

Os hidrocarbonetos totais de petróleo- HTP englobam frações de gasolina, óleo diesel, óleo lubrificante, óleo combustível, entre outros. Essas substâncias são diferenciadas de acordo com suas estruturas moleculares (linear, ramificada e cíclica) e o grau de saturação de suas ligações entre carbonos (simples duplas ou triplas). Os HTP são considerados como um conjunto de hidrocarbonetos avaliados de acordo com a quantidade de ligações entre carbonos que são feitas, o que influencia no peso molecular dos HTP (BERGER, 2005). Eles possuem

uma faixa de carbono variando entre C6 e C35, a faixa que corresponde à gasolina está entre C6 e C12, a faixa de diesel encontra-se entre C12 e C22 e a faixa de óleo lubrificante está entre C22 e C35 (KOLESNIKOVAS et al., 2009). Os compostos saturados são encontrados em maior quantidade na maioria dos óleos e sofrem biodegradação, evaporação e dispersão mais facilmente, além de possuírem baixa toxicidade em comparação com os outros compostos (SOUZA, 2003).

Os hidrocarbonetos de baixo peso molecular possuem maior facilidade em se dissolverem na água, enquanto que os de médio e alto peso molecular são hidrofóbicos se adsorvendo mais facilmente no MPS. Nos oceanos o destino e transporte dos hidrocarbonetos estão associados aos processos de solubilização, adsorção e biodegradação. O transporte vertical dos hidrocarbonetos faz com que os contaminantes orgânicos dissolvidos se incorporem ao sedimento do fundo, dificultando sua biodegradação podendo permanecer no ambiente por muitos anos (GONG et al., 2014).

Os agregados óleo-MPS (OSAs) é um dispersante natural que permite a estabilização das moléculas de óleo uma vez que haja integração entre gotículas do mesmo e material particulado em suspensão (MPS), permitindo que o óleo esteja biodisponível na coluna d'água para que os microrganismos hidrocarbonoclasticos realizem a mineralização. A formação de OSAs, segundo Martins et al. (2019) possibilitou a dispersão de 92,86 % para a coluna d'água, ocasionando uma maior biodegradação dos HTP devido a maior exposição à fatores intempéricos. Para que ocorra a formação dos OSAs é necessário que um conjunto de fatores estejam presentes no oceano. Fatores como hidrodinâmica, salinidade, viscosidade do óleo e concentração de MPS são fundamentais e somente atuando em conjunto será possível promover a formação dos OSAs (HUA et al., 2018; GUSTITUS; JOHN; CLEMENT, 2017).

A hidrodinâmica possui um papel fundamental, pois através dela ocorre à quebra da mancha de óleo em pequenas gotículas, é responsável também por promover a suspensão do sedimento e colisão entre gotículas de óleo e o material particulado (GONG et al., 2014; GUSTITUS; JOHN; CLEMENT). Com o aumento da energia de mistura obtém-se uma maior formação de OSAs. A salinidade é outro fator crucial para a formação de OSAs, pois, a mesma possui um efeito de controle sobre o número de OSAs formados, ou seja, quanto maior a salinidade, mais OSAs serão formado (KHELIFA et al., 2005). Segundo Gong et al. (2014) com o aumento da salinidade ocorre um aumento das camadas elétricas duplas sobre a superfície das partículas, o que resulta em uma diminuição da repulsão da superfície das partículas, aumentando consequentemente a atração entre óleo e particulado. Miranda et al. (2016) utilizou diferentes salinidades (35, 20, 10 e 0) para identificar qual beneficiaria mais a

formação de OSAs, de acordo com os resultados encontrados, o aumento da salinidade juntamente com a maior concentração de MPS resultou em maior formação de OSAs.

Óleos de alta viscosidade são de difícil quebra e dispersão, sendo assim, menos propensos a formar OSAs (GONG et al., 2014). Estudos apontam que quanto menor for o diâmetro do particulado, maior será sua área superficial facilitando a integração com a gotícula de óleo. Com o aumento da concentração de particulado disponível na coluna d'água ocorrerá maior interação com o óleo, conseqüentemente formando mais OSAs. De acordo com Miranda (2016) conforme havia um aumento da concentração de MPS, havia um favorecimento da formação de OSAs de flutuabilidade neutra, possivelmente em função do diâmetro do MPS e da energia de mistura adequada. Rios et al. (2017) testou diferentes concentrações de MPS (50, 200 e 300) e concluiu de acordo com seus resultados que 300 mg L⁻¹ foi a melhor concentração de MPS para formação de OSAs. Os agregados óleo-MPS possuem três tipos de flutuabilidade, os OSAs de flutuabilidade positiva, tendem a permanecer na superfície, quando ocorrem OSAs de flutuabilidade negativa são devido à densidade dos agregados que é maior do que a densidade da água, levando a sedimentação. As formações de OSAs de flutuabilidade negativa são prejudiciais para os organismos bentônicos presentes no ambiente devido principalmente a contaminação por hidrocarbonetos no substrato. Por fim a flutuabilidade neutra onde os agregados permanecem na coluna d'água é a mais esperada por facilitar a ação de microrganismos hidrocarbonoclasticos que irão biodegradar o óleo (GONG et al., 2014; SUN et al., 2015; ZHAO et al., 2016).

A formação de OSAs de flutuabilidade neutra pode ocorrer em associação com outros tipos de biorremediação, como a bioestimulação. Em consequência da adição de nutrientes poderá haver um aumento da biomassa, facilitando a biodegradação do óleo dispersado pela formação de OSAs. A bioestimulação utiliza nutrientes orgânicos ou inorgânicos na estimulação de comunidades hidrocarbonoclasticas em função do aumento da biodegradação dos hidrocarbonetos. Através da ação de bactérias hidrocarbonoclasticas, o hidrocarboneto é mineralizado e transformado em compostos que são assimiláveis ao seu metabolismo, resultando em biomassa, água e dióxido de carbono (ATLAS, 1995).

Estudos comprovam que a adição das concentrações de nitrogênio e fósforo nos oceanos contribui para o aumento da concentração de bactérias que mineralizam os hidrocarbonetos (ATLAS, 1995; LONGO; LIU; BAO, 2016). O nitrogênio é considerado indispensável para os microrganismos, pois são utilizados para a biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos. O fósforo por sua vez é um componente necessário dos ácidos nucleicos e fosfolipídios que

constitui as membranas celulares e possui uma vital importância para a transferência de energia nas células integrando-se à molécula adenosina trifosfato (ATP) (MARA; HORAN, 2003).

Sendo assim, a adição de fertilizantes inorgânicos como NPK e osmocote, ricos em nitrogênio e fósforo geralmente estimulam o crescimento das comunidades bacterianas presentes na coluna d'água. A adição de uma microbiota somente não é suficiente para promover a biodegradação dos hidrocarbonetos a longo prazo, sendo necessário que esses microrganismos sejam bioestimulados continuamente para que ocorra o crescimento da comunidade e assim a biodegradação dos hidrocarbonetos. Segundo Hassanshahian et al. (2014) em ambientes marinhos a concentração de nutrientes geralmente é insuficiente para suportar um aumento significativo do crescimento microbiano, assim o processo de degradação de petróleo é lento e ineficiente sem a utilização da bioestimulação.

Alguns estudos têm evidenciado que a formação de OSAs aumenta o crescimento de bactérias hidrocarbonoclásticas em função da bioissorção que ocorre entre a parede celular das bactérias e os hidrocarbonetos a partir da formação de exopolissacarídeos (ATLAS, 1981; LE FLOCH et al., 2002; MENG, et al., 2019; MOREIRA, 2014). Sendo assim, as bactérias hidrocarbonoclásticas utilizam o MPS contido nos OSAs como fonte de nutrientes para o seu crescimento, porém a longo prazo ocorre o esgotamento desses nutrientes, havendo a necessidade de bioestimulação. Por tanto, a hipótese desse trabalho é: a bioestimulação realizada através da adição de nutrientes (N, P, K) potencializa a biodegradação dos HTP dispersados pela formação dos OSAs.

A partir dessa premissa, o objetivo do presente trabalho é bioestimular o crescimento de bactérias hidrocarbonoclásticas que atuam na biodegradação dos hidrocarbonetos totais de petróleo dispersados pela formação dos OSAs. Sendo assim, o presente trabalho tem caráter inovador, uma vez que se utiliza de nutrientes para potencializar o processo de biodegradação facilitado pela formação dos OSAs.

Essa dissertação apresenta a metodologia e os resultados diretamente discutidos em forma de artigo científico intitulado “Processo de bioestimulação durante a formação dos agregados óleo- MPS (OSAs) para a biodegradação dos HTP”.

2 OBJETIVOS

Os objetivos foram divididos em geral e específicos, conforme descrito a seguir.

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem como objetivo principal avaliar por meio de ensaios laboratoriais, a influência dos nutrientes nitrogênio, fósforo e potássio na biodegradação de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) dispersados pela formação de agregados Óleo-MPS (OSAs).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer um gradiente de concentração de nutrientes para analisar sua influência na biodegradação de HTP dispersados pela formação de OSAs;
- identificar a concentração ótima de nutrientes que favoreça a maior biodegradação de HTP dispersados pela formação de OSAs em águas salinas;
- promover ensaios microbiológicos para certificar que os microrganismos hidrocarbonoclásticos foram bioestimulados e realizaram a biodegradação do HTP presentes na amostra;
- desenvolver a partir dos resultados um protocolo para testes laboratoriais da formação de OSAs em função da concentração ótima de nutrientes e seu uso como dispersante natural em áreas afetadas por derramamento de petróleo.

3 PROCESSO DE BIOESTIMULAÇÃO DURANTE A FORMAÇÃO DOS AGREGADOS ÓLEO- MPS (OSAs) PARA A BIODEGRADAÇÃO DOS HTP

RESUMO

Os estudos de formação de agregados óleo- MPS (OSAs) tem avançado de forma significativa na comunidade científica, entretanto há uma necessidade de acelerar a biodegradação do petróleo que foi disperso pela formação de OSAs. Dessa forma, a presente pesquisa apresenta caráter pioneiro no que se refere à adição de nutrientes com o objetivo de bioestimular bactérias hidrocarbonoclásticas autóctones na biodegradação dos Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP), dispersados pela formação de OSAs. Por meio da montagem de oito biorreatores, onde quatro foram bioestimulados e dois biorreatores correspondiam a atenuação natural, foram retiradas alíquotas de água ao longo de 60 dias para a realização de análises de espécies iônicas, extração líquido/líquido, metodologia de diluição seriada e membrana filtrante. A quantificação dos HTP foi realizada no cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC). A bioestimulação contribuiu para formação de OSAs, de forma geral houve maior formação de OSAs de fluatibilidade negativa. A biodegradação dos HTP foi potencializada nas unidades que haviam nutrientes, entretanto o crescimento das bactérias bioestimuladas foi significativo apenas em 0 e 7 dias, em 30 e 60 dias houve maior crescimento de bactérias dos biorreatores de atenuação natural. Contudo, os biorreatores bioestimulados apresentaram maior potencial de biodegradações dos hidrocarbonetos resultando em uma média de 98,12% de biodegradação dos HTP.

Palavras-chave: Petróleo; Nutrientes; Dispersão.

ABSTRACT

The formation studies of oil-MPS aggregates (OSAs) have advanced significantly in the scientific community; however there is a need to accelerate the biodegradation of the oil that has been dispersed by the formation of OSAs. Thus, the present research presents a pioneering character regarding the addition of nutrients with the objective of bioestimular autochthonous hydrocarboclastic bacteria in the biodegradation of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH), dispersed by the formation of OSAs. By means of the assembly of eight bioreactors, where four were biostimulated and two bioreactors corresponded to natural attenuation, water aliquots were taken over 60 days to perform ionic species analysis, liquid / liquid extraction, serial dilution methodology and membrane filter. The quantification of TPHs was performed on the gas chromatograph with flame ionization detector (CG-FID). The biodegradation of the TPHs was potentiated in the units that had nutrients, however the growth of the biostimulated bacteria was significant only in 0 and 7 days, in 30 and 60 days there was greater growth of bacteria of the natural attenuation bioreactors. However, biostimulated bioreactors had a higher potential for biodegradation of hydrocarbons resulting in an average of 98.12% biodegradation of TPH.

Keywords: Petroleum; Nutrients; Dispersal.

3.1 INTRODUÇÃO

A interação das gotículas de óleo com o Material Particulado em Suspensão- MPS presente na coluna d'água pode resultar na dispersão do óleo para a coluna ou fundo do ambiente (ZHAO et al., 2016). Esses agregados óleo- MPS são intitulados OSAs, que se caracterizam como um dispersante natural no meio ambiente sendo capaz de dispersar de 4,20% a 37,28% de HTP e até 75% de HPAs (PINHEIRO, 2019).

Os OSAs são responsáveis por alterar o destino do petróleo no ambiente, através da remoção do óleo na fase aquosa, possibilitando a estabilização das gotículas de óleo impedindo-as de se agregarem novamente (GONG et al., 2014). Segundo Hua et al. (2018), a formação de OSAs é mais eficiente na dispersão do óleo para a coluna d'água do que a utilização de dispersantes químicos, em função da integração do particulado com o óleo que é capaz de fazer com que os OSAs submerjam e seja detectado na coluna d'água.

Os componentes dos Hidrocarbonetos Totais de petróleo são considerados recalcitrantes e carcinogênicos, causam grande contaminação no meio ambiente, além de serem bastante prejudiciais às plantas, animais e comunidades microbianas (BHATTACHARYA et al., 2019). Os HTP mais leves (menor peso molecular) sofrem evaporação logo após o derramamento, enquanto que os hidrocarbonetos com cadeias maiores e mais complexas resistem no ambiente, adsorvendo-se principalmente ao sedimento e ao MPS (compostos $> nC_{25}$), em função do intemperismo sofrido pelo óleo (RAMADASS et al., 2018).

A biorremediação de áreas impactadas por petróleo e seus derivados pode ocorrer a partir do uso de microrganismos na mineralização de hidrocarbonetos, utilizando-os como fonte de carbono e energia. Ao final da biodegradação encontra-se água e gás carbônico, consequentemente diminuindo a toxicidade para a fauna e flora. Existem diversas técnicas de biotratamentos que visam à aceleração do processo natural de biodegradação de determinadas substâncias, como por exemplo, bioventilação, fitorremediação, bioaumento e bioestimulação (FRANCO, 2018; MOREIRA et al., 2013; PRIYA et al., 2015; SAFDARI et al., 2018).

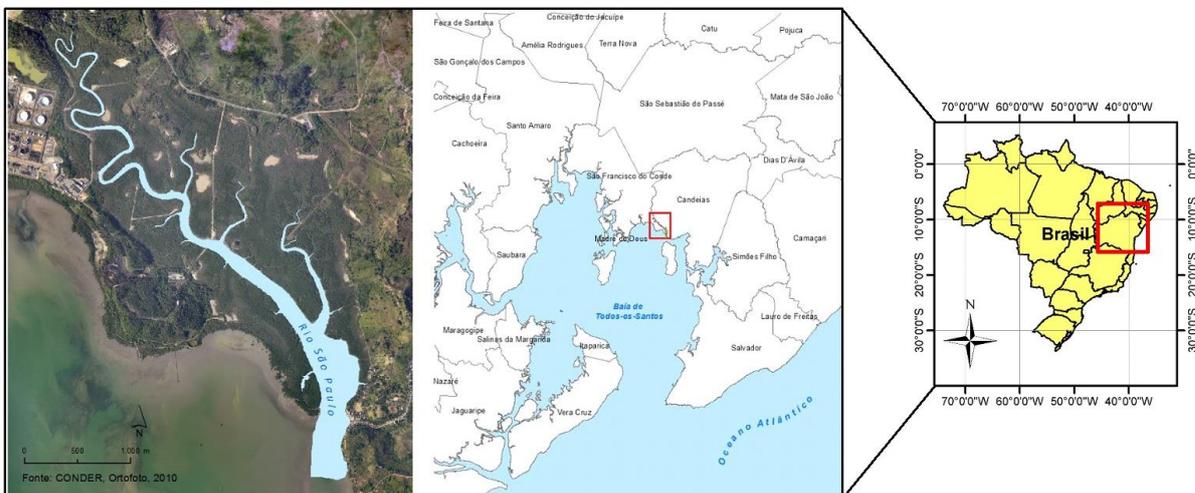
Na bioestimulação são adicionados nutrientes no microcosmo contaminado, consequentemente ocorrendo o crescimento dos microrganismos ali presentes contribuindo para um aumento na biodegradação dos hidrocarbonetos. A adição de nitrogênio e fósforo que são nutrientes encontrados em baixas concentrações nos oceanos estimula significativamente o crescimento de bactérias e fungos hidrocarbonoclásticos (PRIYA et al., 2015). Os microrganismos hidrocarbonoclásticos possuem a capacidade de formar exopolissacarídeos que

permitem a biossorção entre a parede celular e os hidrocarbonetos de petróleo. A formação de OSAs contribui para o aumento do crescimento de bactérias, uma vez que o MPS que se encontra rico em matéria orgânica, sirva de suporte vital para as bactérias hidrocarbonoclásticas, porém, para que haja a continuidade da biodegradação, faz-se necessário a adição de nutrientes (ATLAS, 1981; LE FLOCH et al., 2002; MENG, etl al., 2019; MOREIRA, 2014). A partir dessa premissa, o objetivo desse estudo foi avaliar por meio de ensaios laboratoriais, a influência dos nutrientes na biodegradação de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP) dispersados pela formação de agregados Óleo-MPS (OSAs).

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

A coleta da água e Material Particulado em Suspensão (MPS) para a realização do experimento ocorreu no rio São Paulo (Figura 1), localizado na Baía de Todos os Santos (BTS) (38 W 33' 28", 12S 42' 31"), próximo ao município de Candeias- Ba, sua nascente está localizada no município de São Francisco do Conde. O rio São Paulo possui uma área de drenagem de 37 km², vazão média de 0,3 m³ s⁻¹, uma extensão total de 17 km (Bahia, 2000). Ao longo do rio observa-se a presença de indústrias químicas, petroquímicas e siderúrgica, por fim o rio desagua na Baía de Todos os Santos. A escolha do rio São Paulo como local de coleta (Figura 2) para realização desta pesquisa ocorreu em função da proximidade do local à refinaria Landulpho Alves, sendo esta a principal contribuinte para a contaminação por HTP na área (BAHIA, 2000).

Figura 1- Local de coleta de amostras de água do rio São Paulo- BA, 2018



Elaboração: Adaptado de CONDER, 2010.

Na Tabela 1 consta a caracterização da água no momento da coleta a partir do uso da sonda multiparâmetros da marca HORIBA que foi calibrada tanto automaticamente a partir da solução pH 4 como também manualmente com a utilização da solução pH 7, onde foi ajustado parâmetros como condutividade, salinidade e turbidez.

Quadro 1- Parâmetros não conservativos do ponto de coleta do estuário do rio São Paulo- BA, medidos com sonda multiparâmetros em 28. 04. 2018

Parâmetros não conservativos	Dados
Temperatura (°C)	24,8
pH	4,4
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	148,1
Salinidade	36,0

Elaboração: Autora, 2018.

Figura 2- Local de coleta das amostras, rio São Paulo, BA



Fotos: Autora, 2018.

3.2.1 Amostragem e pré- tratamento

As amostras de água foram coletadas em oito recipientes âmbar com capacidade de 1 L. Esses recipientes foram previamente descontaminados com sabão extran e solvente orgânico (diclorometano- DCM), bem como os recipientes de polietileno de capacidade de 20 L que foram utilizados para a coleta do MPS. O MPS obtido mediante decantação de 20 L de água do estuário, compõe uma parte fundamental para a formação de OSAs, além de constituir-se como fonte de bactérias hidrocarbonoclasticas, uma vez que segundo Gao et al. (2018), a exposição continuada de uma comunidade microbiana à presença de hidrocarbonetos, como no caso do

rio São Paulo, leva à adaptação dos microrganismos, causando conseqüentemente um aumento progressivo do potencial de biodegradação.

Para a determinação dos parâmetros físico-químicos, a saber: Temperatura (°C), Potencial Hidrogeniônico (pH), Potencial de Redução (mV), Condutividade (mS/cm), Turbidez (NTU), Oxigênio Dissolvido (mg L^{-1}), Sólidos Totais Dissolvidos (TDS) (g L^{-1}) e Salinidade foi utilizado *in-situ* uma sonda multiparâmetros HORIBA (modelo U50). Os nove recipientes com amostras de água do rio São Paulo foram armazenados em um freezer com temperatura média de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, para conservação dos parâmetros desejados (Carbono Orgânico no Particulado- COP, HTP e cátions e ânions) até serem filtradas em membranas de fibra de vidro $45\mu\text{m}$ para as análises. O MPS foi liofilizado e desagregado para análises de geoquímicas de caracterização.

3.2.2 Caracterizações geoquímicas da água e MPS

As análises de caracterização da matriz água e MPS ocorreram no Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO), Núcleo de Estudos Ambientais (NEA), Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia (IGEO/UFBA). Na matriz água houve a realização das análises de cátions e ânions e na matriz MPS foram realizadas análises de COP, HTP, nitrato, amônia, fósforo e potássio.

3.2.2.1 Cátions e ânions

Para a determinação de cátions e ânions (Na, K, Ca, Mg, nitrogênio amoniacal e nitrogênio nitrato, nitrogênio nitrito, sulfatos, fosfatos, brometo, fluoretos e cloretos) inicialmente é feita a diluição dos interferentes da amônia mediante destilação por via úmida utilizando destilador de arraste de vapores através do método de *Kjeldahl* (EMBRAPA, 2009). Para determinação dos demais compostos utilizou-se o método adaptado de cromatografia iônica seguindo a metodologia de nitrogênio orgânico para águas salinas que, resumidamente, consiste na conversão do nitrogênio orgânico em sulfato de amônio a partir da digestão da amostra com ácido sulfúrico. Para a digestão do material foi utilizado sulfato de sódio e a amônia resultante é destilada e recolhida em ácido bórico (APHA, 1999) e por fim, a leitura foi verificada no cromatógrafo (*Compact IC plus Metrohm*).

3.2.2.2 Carbono Orgânico no Particulado (COP)

A quantificação do carbono orgânico (Figura 3) foi realizada a partir da oxidação da matéria orgânica por via úmida com dicromato de potássio em meio sulfúrico. A leitura da amostra foi desempenhada no Espectrofotômetro de Absorção Molecular (Embrapa, 1997; Walkey e Black, 1934).

Figura 3- Análise de Carbono Orgânico no Particulado



Fotografia: Autora, 2018.

3.2.2.3 HTP no MPS

Para análise de HTP no MPS filtrou-se em membrana de fibra de vidro 400 mL da água coletada no rio São Paulo, posteriormente as membranas foram liofilizadas e maceradas para realização da extração via ultrassom (método U.S. EPA 3550C adaptado do LEPETRO), executado em série (3 ciclos de 15 min cada) mediante a mistura hexano (*MERK, Darmstadt, Alemanha*) e DCM (*MERK, Darmstadt, Alemanha*) (1:1, V/V). As amostras foram fortificadas a partir da adição de 10 μL da solução padrão de alcanos de *n*-C8 à *n*-C40 mais isoprenóides como pristano e fitano, com concentração final de 50mg L⁻¹ em duas amostras para verificar a exatidão do método em extrair os compostos orgânicos. Em seguida as amostras foram inseridas no equipamento de ultrassom com frequência 35 Hz por 15 minutos, e filtradas em sulfato de sódio anidro (pré-calcinado a 400 °C por 4 h). Esse procedimento foi repetido 3 vezes utilizando no total 75 mL da mistura de solventes. O extrato obtido foi concentrado em rotavapor (modelo R-215) e avolumado com dicloreto de metano à 500 μL e injetado em um cromatógrafo a gás *Agilent* modelo CP 3800 e detector de ionização de chama GC-DIC (U.S. EPA 3510C, 2007), o mesmo foi realizado com os brancos. As taxas de recuperação dos compostos nas amostras variaram entre 60 % a 99 % (79% \pm 8,1). Foi realizada análise de branco de bancada para assegurar que

não haveria contaminação provinda do laboratório durante o processo de extração. As amostras de branco foram submetidas aos mesmos procedimentos analíticos do restante das amostras.

3.2.2.4 Nitrato e Amônio no MPS

Para a quantificação de nitrato e amônio no MPS utilizou-se 10 g de amostra, a determinação de amônio ocorreu mediante a destilação por vapor de arraste no *Kjeldahl* e em seguida a determinação de nitrato, incidiu por meio de titulação (pH 4,7). Utilizou-se uma solução indicadora (vermelho de metila/verde de bromocresol) até atingir a mudança de cor (EMBRAPA, 2009).

3.2.2.5 Fósforo no MPS

A análise de fósforo efetuou-se a partir da conversão do fósforo em ortofostato dissolvido utilizando-se molibdato de amônio e antimônio tartarato de potássio, que a partir de reações em meio ácido gera o complexo azul de molibdênio intensamente colorido possibilitando a determinação colorimétrica do ortofostato. Para tal, foi utilizado 0,4 g de amostra e a leitura da mesma realizou-se no Espectrofotômetro de absorção molecular no comprimento de onda de 880nm (APHA, 1998).

3.2.2.6 Potássio no MPS

Inicialmente a amostra de 1 g de MPS foi digerida em meio ácido (Figura 4) no micro-ondas (marca CEM/ *Mars- 6*), em seguida avolumada com água deionizada para 50 mL. Para a determinação da concentração fez-se uso do Espectrômetro de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ASTM D5258, 1996).

Figura 4- Análise de quantificação de potássio na água coletada das biorreatores



Fotografia: Autora, 2018.

3.2.2.7 Granulometria do MPS

Para análise de granulometria foi utilizado 1,5 gramas de MPS peneirado em uma peneira de 500 μm . Posteriormente transferiu-se a amostra para o tubo de ensaio onde foi adicionado H_2O_2 , com o intuito de digerir toda matéria orgânica presente na amostra, em seguida adicionou-se 20 mL de hexametáfosfato de sódio (0,1 mol) e a determinação foi realizada no analisador de partículas, utilizando o método de difração a laser modelo Cilas 1064.

3.2.3 Desenho do biorreator para o processo de biorremediação

Foram montadas quatro biorreatores, na qual correspondem a Atenuação Natural (A.N), Bioestimulação 1 (Bio 1), Bioestimulação 2 (Bio 2) e Branco (1 e 2). As biorreatores continham 8 biorreatores com capacidade de 30 L devidamente lavados com sabão extran neutro e descontaminados com solvente orgânico DCM. Cada unidade continha 3 g de MPS e 3 mL de óleo de $^{\circ}\text{API}$ 21,7 para garantir o volume exato de óleo, a massa foi pesada em uma balança analítica em média 10 vezes e a massa de óleo obtida foi de 2,72 g. A água salina foi produzida em laboratório a partir da diluição do sal marinho fostato *Blue Treasure Reef Salt* em água ultrapura, até atingir a salinidade 30. É importante ressaltar que o sal marinho além de possuir rápida dissolução em água também não conta com a presença de fosfato e nitrato. A escolha da salinidade foi baseada em experimentos anteriores como Rios et al. (2017), Miranda et al. (2016) e Khelifa et al. (2005). O experimento foi realizado em duplicata para garantir maior controle de qualidade dos dados, além de contar com 10% de triplicatas de experimento. O Quadro 2 apresenta resumidamente os dados referentes às condições experimentais.

Quadro 2- Condições experimentais dos biorreatores

Parâmetro	Valor
Volume de água salina artificial	15 L
Óleo	Bacia de Campos
$^{\circ}\text{API}$	21,7
Concentração de óleo (quantidade adicionada)	200 mg L^{-1} (2,72 g)
Tempo de agitação	0, 15, 30 e 60 dias
Tempo de overnight	12 h
Concentração de MPS	200 mg L^{-1}

Elaboração: Autora, 2019.

Nas unidades de A.N não havia nutrientes, somente óleo, MPS e água salina. Nas unidades Bio 1 e Bio 2, continham MPS, óleo, água salina e as concentrações indicadas na Tabela 1. O experimento durou um total de 60 dias, as coletas foram realizadas em 0, 15, 30 e

60 dias. A escolha dos nutrientes se deu em função da eficiência desses compostos para bioestimulação em água salina comprovada por Pasumarthi; Mutnuri (2016) e Hassanshahian et al. (2014) e sua completa solubilização em água. O quadro 3 apresenta resumidamente, os dados referentes às condições experimentais.

Quadro 3- Concentração de nutrientes presentes nas biorreatores

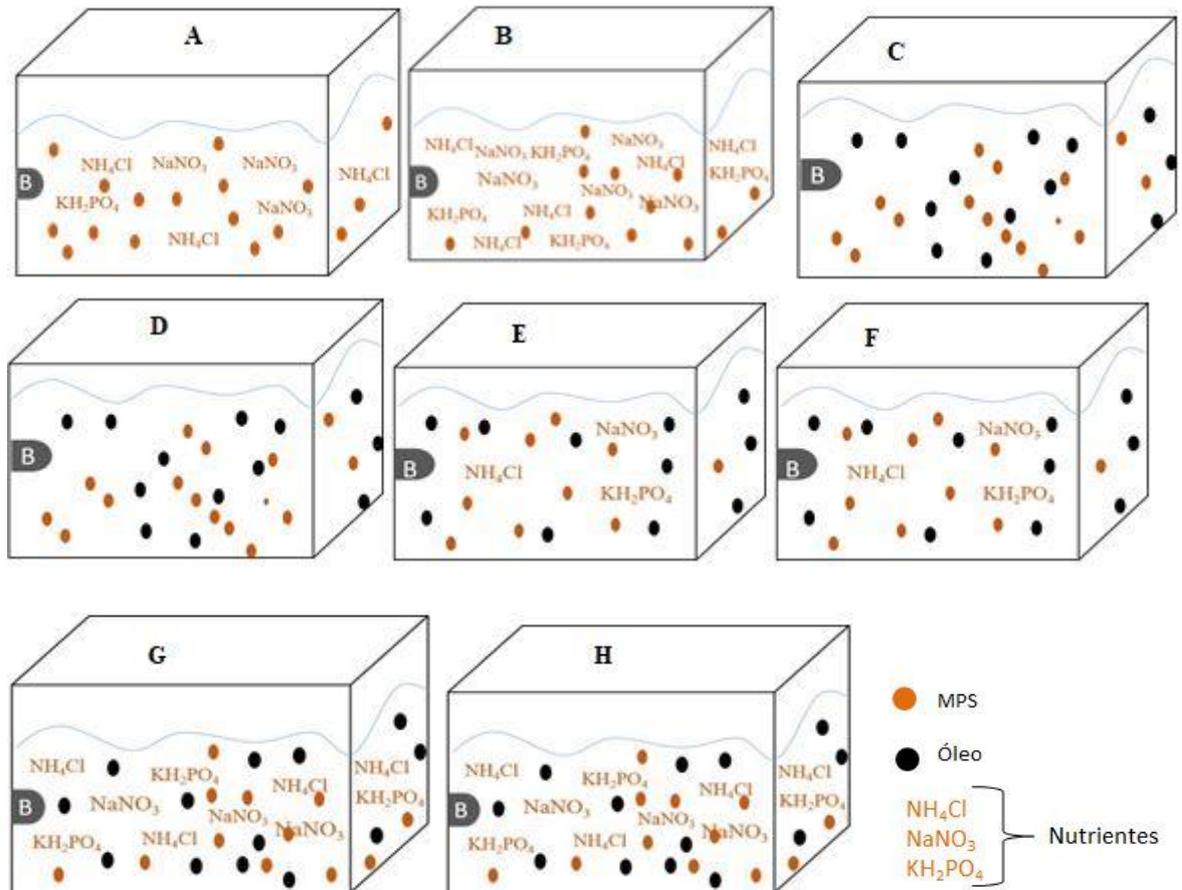
	Cloreto de amônio- NH₄Cl (g L⁻¹)	Nitrato de sódio- NaNO₃ (g L⁻¹)	Fosfato monopotássico- KH₂PO₄ (g L⁻¹)	de
Bioestimulação 1	0,2	0,1	0,1	
Bioestimulação 2	0,4	0,2	0,1	
Branco 1	0,2	0,1	0,1	
Branco 2	0,4	0,2	0,1	
A.N	-	-	-	

Elaboração: Autora, 2019.

Instalou-se aproximadamente na metade da altura do biorreator uma bomba (*Wave Maker* da marca SUNSUN JUP modelo JVP- 101 cuja potência é de 6W e vazão 3000 L h⁻¹) com o objetivo de simular a energia de mistura do estuário auxiliando na quebra do óleo em gotículas menores, na suspensão do MPS e interação do mesmo com as gotículas de óleo. A Figura 5 apresenta o esquema ilustrativo da montagem das biorreatores.

A coleta das alíquotas de água do experimento foi realizada por meio de amostragem composta. Com a utilização de um pipetador automático e pipetas de vidro, 50 mL de água e óleo eram coletados, a amostragem seguia um padrão para coleta na qual traçava-se um X imaginário na coluna e fundo das biorreatores, a fim de alcançar maior representatividade. O experimento contou também com a análise temporal de nitrato, amônia, fosfato e potássio em água. Para a leitura das amostras utilizou-se o cromatógrafo de marca *Compact IC plus Metrohm* seguindo a metodologia da CETESB (1978).

Figura 5- Representação dos biorreatores



Elaboração: Autora, 2019.

3.2.4 Método de diluição seriada membrana filtrante

As contagens de Unidades Formadoras de Colônias- UFC foram seguidas através da metodologia de CETESB L5. 214 (2007) e ROMEIRO (2001). Ao fim dos tempos de coleta foram retiradas alíquotas de 100 mL das biorreatores. Em seguida foi recolhido 10 mL da amostra coletada para ser transferido para erlenmeyes que continham solução salina e Tween 80. Ao fim da quinta diluição, era retirados 1 mL de cada erlenmeyer e diluído mais cinco vezes (Figura 6). Ao fim das diluições as amostras foram filtradas por meio de membranas de nitrato de celulose (47 mm de diâmetro, porosidade de $0,45 \mu\text{m}$ da marca Millipore) que por fim, eram adicionadas às placas de petri que continham meio de cultura ágar nutriente, próprio para bactérias.

Figura 6- Análise de diluição seriada e membrana filtrante e placas de petri após contagem de UFC



Fotografia: Autora, 2018.

3.2.5 Protocolo de formação de OSAs

Inicialmente o MPS e água salina (30 PSU) foram adicionados nas oito biorreatores e em seguida colocados em funcionamento, ainda sem a presença do óleo por 15 dias para a aclimação dos microrganismos provenientes do MPS. Nesta pesquisa foi utilizado o protocolo de formação de OSAs adaptado por Moreira (2014) que foi dividido em duas fases que serão descritas a seguir.

Na primeira fase, um recipiente contendo óleo da bacia de Campos foi agitado durante 30 min na mesa agitadora a $180 \text{ ciclos minutos}^{-1}$, posteriormente uma alíquota de 3 mL foi retirada e adicionada às biorreatores com o auxílio de uma seringa de vidro. Ao fim de cada tempo do experimento foram retiradas alíquotas de 50 mL da coluna d'água e fundo dos biorreatores com o objetivo de quantificar a dispersão do óleo pela formação dos OSAs, juntamente com a biodegradação dos hidrocarbonetos.

Na segunda fase, realizou-se a extração líquido/ líquido (Figura 7) a partir do uso de DCM com o objetivo de extrair e concentrar o óleo presente na amostra. O processo de extração repetiu-se 3x utilizando-se 50 mL de DCM (*MERK, Darmstadt, Alemanha*) a cada vez, totalizando 150 mL por extração. Posteriormente, as amostras foram concentradas em rotoevaporador e transferidas para vials onde foi mantida uma razão óleo/ solvente fixa (1:20), visando ter uma abundancia do analito constante em todas as amostras, dessa forma mantem-se uma concentração constante, permitindo uma melhor comparação entre os cromatogramas.

A quantificação dos HTP foi realizada no cromatógrafo a gás *Agilent* modelo CP 3800 equipado com coluna capilar DB-5 (30 m de comprimento, 0,25 mm diâmetro interno, 0,25 μm

de espessura de filme) e detector de ionização de chama (CG-DIC, U.S. EPA 3510C, 2007). As condições cromatográficas foram: temperatura do injetor de 300 °C, temperatura inicial do forno a 40 °C (por 2 minutos) numa rampa de 10 °C min⁻¹ até 300 °C por 12 minutos. O Hélio foi usado como gás carreador a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹ e uma razão de separação de 10:1.

Figura 7- Extração líquido/líquido, protocolo de formação de OSAs



Fotografia: Autora, 2018.

3.2.6 Tratamento estatístico

Com os resultados obtidos realizaram-se as seguintes análises estatísticas no programa de tratamento estatístico R: Shapiro- Wilk para verificação da normalidade dos dados, Kruskal-Wallis, para ANOVA não paramétrica. Para testar a significância entre os parâmetros foi utilizado gráfico de correlação, gráfico de dispersão (2D e 3D). Para analisar o comportamento da variável resposta (HTP) foi utilizado um nível de significância ($p < 0,05$) e por fim gráficos e tabelas realizadas no programa Excel 2016.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão abordados os seguintes resultados: caracterização da matriz água e MPS, dispersão dos OSAs, análise temporal da distribuição de HTP e sua biodegradação, avaliação do crescimento de microrganismos e parâmetros físicos químicos referentes à bioestimulação.

3.3.1 Caracterização da água e MPS

A Tabela 1 apresenta consta os valores dos parâmetros físicos e químicos da água e do MPS coletados no rio São Paulo.

Tabela 1. Caracterização das matrizes água e MPS coletadas no rio São Paulo- BA

Análises	Concentração	LQM
Carbono Orgânico em Particulado (C.O.P) (mg L ⁻¹)	1,33	1,0
Nitrato em água (mg L ⁻¹)	4,86	0,05
Nitrito em água (mg L ⁻¹)	<LQM	0,25
Amônio em água (mg L ⁻¹)	<LQM	0,25
Fosfato em água (mg L ⁻¹)	<LQM	0,25
Potássio no MPS (mg kg ⁻¹)	211	0,25
Nitrogênio Total no MPS (mg kg ⁻¹)	4.300	0,10 (%)
Nitrato e amônia no MPS (mg kg ⁻¹)	31,17 e 31,17	0,25
Fósforo Assimilável (mg kg ⁻¹)	120,39	0,005
Granulometria do MPS- areia grossa (%)	0	-
Granulometria do MPS- areia média (%)	0	-
Granulometria do MPS- areia fina (%)	0,13	-
Granulometria do MPS- areia muito fina (%)	7,89	-
Granulometria do MPS- silte (%)	69,87	-
Granulometria do MPS- argila (%)	22,1	-

Elaboração: Autora, 2019.

Todas as análises na Tabela 1 foram realizadas em triplicata com o objetivo de garantir maior precisão dos resultados. A concentração de nitrato na matriz água apresentou valores acima do nível máximo permitido na resolução nº 357 de 2005 do CONAMA para águas com salinidade 30 (0,40 mg L⁻¹) (CONAMA 357/2005) O valor encontrado por esta pesquisa está pouco abaixo do encontrado também no rio São Paulo por Martins et al. (2019), sendo este 5 mg L⁻¹, indicando possíveis condições sanitárias inadequadas. Porém, os resultados de nitrito, amônio e fosfato em água deram abaixo do limite de quantificação do método (0,25 mg L⁻¹). Os tipos de uso e ocupação do solo do local da coleta podem justificar os resultados em função da presença de diversas indústrias nesta área, podendo gerar um excesso de nitrogênio, fósforo e potássio a partir da contribuição de dejetos industriais, domésticos e lixiviação do solo (LIMA, 2010; MIRANDA, 2016).

De acordo com Oliveira et al. (2010), o nitrogênio atua como constituinte da molécula de clorofila, ácidos nucleicos, aminoácidos e proteínas. A concentração de nitrogênio total encontrada foi de 4.300 mg kg⁻¹, estando pouco abaixo do limite (4.800 mg kg⁻¹), permitido pela CONAMA (CONAMA nº45/2012), indicando condições sanitárias razoáveis uma vez que o excesso de nitrogênio e fósforo na água e sedimento

indicam contribuição de efluentes domésticos e desejos industriais. A concentração de nitrato e amônia foi de 31,17 mg kg⁻¹, este valor encontra-se um pouco acima do valor encontrado por Barreto, (2018), 11,67 e 5,84 mg kg⁻¹ e consideravelmente menor do que é utilizado em meios de cultura próprios para bactérias em água salina (435 mg kg⁻¹), indicando que a necessidade de bioestimulação para o crescimento ideal dos microrganismos. O meio utilizado como valor referência foi Marine Agar 2216, produzido pela Difco.

A forma química do fósforo mais apta para os microrganismos é trifosfato e polifosfato, além de ser fundamental para a síntese de ácidos nucleicos e trifosfato de adenosina. A concentração de fósforo encontrada foi de 120,39 mg kg⁻¹, este valor encontra-se abaixo da menor concentração encontrada por Miranda (2016), (438,10 mg kg⁻¹) também no rio São Paulo, possivelmente em função da distância do local de coleta em relação as comunidades ribeirinhas (LIMA, 2010; MARA; HORAN, 2003; MIRANDA, 2016).

Em ambientes estuarinos a alta presença de Carbono Orgânico é muito comum, uma vez que a decomposição de plantas e animais contribui para o aumento da matéria orgânica, além de ser largamente favorecido pela produção primária, entretanto o consumo de carbono em ecossistemas como o manguezal é considerado alto (Liu et al., 2019). O valor encontrado para Carbono Orgânico no Particulado (COP) foi 1,33 mg L⁻¹, o que está próximo do encontrado por Liu et al. (2019) no estuário do rio Changjiang (1,29 mg L⁻¹). Porém, abaixo dos valores encontrados por Miranda (2016) (3,75, 4,08 e 3,16 mg L⁻¹) também no estuário do rio São Paulo.

O potássio segundo Sattar et al. (2018), participa ativamente da síntese de células e atividades de enzimas, aumentando a resistência da mesma. Contudo, de acordo com o autor, até 10% do potássio solúvel estão associados a minerais de argila, sendo assim, segundo a Tabela 1 e Figura 3 a fração argila ocupa 22% do MPS coletado no estuário do rio São Paulo- BA, explicando os altos valores encontrados.

A caracterização do MPS foi realizada a partir da análise de granulometria, que continha predominantemente fração silte (69,87 %) e argila (22,1%) (Tabela 4). O que está de acordo com o Tran e Strom (2017), que afirmam que muitos ambientes ribeirinhos, costeiros e marinhos contém uma porção significativa do sedimento em suspensão composto por minerais de argila e silte. De acordo com Gong et al. (2014) os OSAs se formam mais prontamente quando o tamanho das partículas de sedimento é inferior a 2

μm , sendo assim, principalmente a argila possui um papel fundamental para o aumento do potencial de formação de OSAs.

Foram realizados testes de controle de qualidade da extração do MPS, e suas taxas de recuperação dos compostos (*n*C8- *n*C40) variaram entre 60 a 99 %, com média de $79 \pm 8,1$. A concentração de HTP quantificada na amostra de MPS foi de $492,31 \text{ mg kg}^{-1}$. Este resultado é superior ao encontrado por Miranda (2016) no estuário do rio São Paulo que realizou sua coleta em dois pontos, um próximo a nascente e outro próximo à foz ($16,21 \text{ mg kg}^{-1}$ e $28,51 \text{ mg kg}^{-1}$ respectivamente).

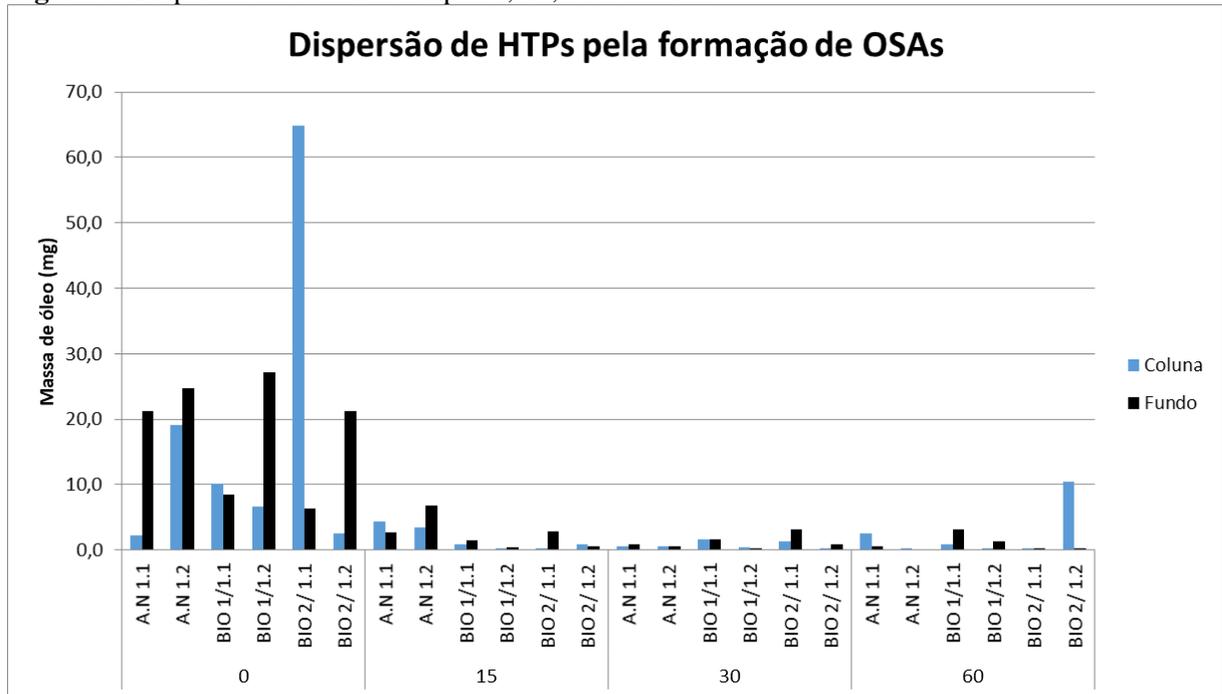
Possivelmente esse resultado seja devido à proximidade do local de coleta a uma região onde ocorrem atividades de refino de petróleo e de pesca com uso de embarcações motorizadas, além da contribuição biogênica. As concentrações de *n*-C17 e *n*-C18 estiveram abaixo do limite de quantificação (3,9 e 4,1 ppm, respectivamente), portanto, não foi possível através do uso das razões, pristano/*n*-C17 e fitano/*n*-C18, demonstrar se havia presença de óleo, verificar o grau de degradação e nem tão pouco sua origem (pirolítica, petrogênica ou biogênico).

3.3.2 Dispersão dos hidrocarbonetos a partir da formação de OSAs

A metodologia dos experimentos de formação dos OSAs é usualmente realizada em uma escala temporal de 3h, lembrando que o tempo mínimo de agitação no presente trabalho foi 15 dias. HTP de menor peso molecular possuem a capacidade de se solubilizarem na água, entretanto com o passar do tempo, processos intempéricos, como evaporação, dissolução, foto-oxidação e biodegradação preferencialmente degradam HTP mais leves, logo, os compostos com maiores cadeias, considerados os HTP mais pesados, se adsorvem ao MPS, gerando uma forte ligação entre os hidrocarbonetos e as partículas de sedimento, possivelmente a extração líquido/líquido não foi suficiente para extração de todo o óleo adsorvido ao MPS (DUAN et al., 2018; WANG et al., 2018).

Na Figura 8 são apresentados os dados relativos à dispersão dos HTP, a partir da quantificação do extrato de óleo na coluna e no fundo das biorreatores calculados em função do MPS dispersado. De forma geral houve maior formação de OSAs de fluutuabilidade negativa (fundo) do que de fluutuabilidade neutra (coluna). Possivelmente a adição de nutrientes aumentou a densidade dos OSAs.

Ao decorrer do experimento, foi observada uma diminuição significativa da concentração de óleo dispersada, exceto pela unidade de simulação Bio 2/ 1.2 em 60 dias que apresenta um aumento da mesma.

Figura 8- Dispersão de óleo nos tempos 0, 15, 30 e 60 dias

Elaboração: Autora, 2019.

A formação de OSAs ocorre por meio das interações de cargas elétricas da superfície das partículas em suspensão e dos compostos orgânicos presentes no óleo a partir da atuação de cátions como pontes elétricas (GONG et al., 2014). Conseqüentemente, a adição de nutrientes e MPS contribui para a biodegradação dos HTP, uma vez que os nutrientes melhoraram a atividade metabólica das bactérias que irão mineralizar os HTP (MOREIRA, 2014; MUSCHENHEIM; LEE, 2002; SILVA, 2014; SAKAYA; SALAM; CAMPO, 2019).

Possivelmente em função da transferência vertical (dispersão) a formação de OSAs de flutuabilidade negativa é majoritariamente maior do que os OSAs de flutuabilidade neutra, esse mesmo padrão foi observado também nos cromatogramas de fundo. É provável que em casos de derramamento com o passar do tempo ocorra a formação de OSAs de flutuabilidade negativa, em função das características do óleo como grau API, densidade e viscosidade, uma vez que os compostos mais leves são perdidos por volatilização ou solubilização mais rapidamente, impactando negativamente os organismos bentônicos, conseqüentemente seria mais complexo e dispendioso limpar o fundo do corpo hídrico (GUSTITUS; JOHN; CLEMENT, 2017; HUA et al., 2018).

De acordo com a Figura 9, podemos observar uma diminuição significativa da quantidade de óleo disponível na superfície do aquário.

Figura 9. Biorreatores A.N: Atenuação natural e Bio 1: Bioestimulação 1



Elaboração: Autora, 2019.

Segundo Zhao et al. (2016) o MPS se adere à superfície das gotículas de óleo atuando como uma barreira impedindo que o mesmo volte a se aglutinar. Dessa forma, os OSAs ao dispersar o óleo na coluna d'água ou fundo permite que o mesmo se torne biodisponível para a ação de microrganismos (HILL et al., 2002).

A viscosidade do óleo é considerada uma propriedade importante na formação dos OSAs, pois óleos de alta viscosidade são de difícil dispersão (GONG et al., 2014). No caso do óleo cru da bacia de Campos cuja viscosidade é 36,4 mPa·s, sendo este pouco viscoso em temperatura ambiente, é facilmente desagregado pela hidrodinâmica do local, óleos com tais característica costumam perder rapidamente os compostos mais leves (n -C₈ à n -C₁₂), gerando uma tendência do óleo em afundar logo nos primeiros dias, a partir do aumento da fração média e pesada (n -C₁₂ a n -C₂₂ e n -C₂₂ a n -C₄₀) principalmente em casos de formação de OSAs (GONG et al., 2014).

Contudo, levando em consideração o intemperismo sofrido pelo óleo, evidenciados pelos cromatogramas da Figura 12 e 13 nos biorreatores que continham nutrientes houve maior consumo de HTP, indicando que o intemperismo auxiliou não somente na transferência vertical do óleo (coluna para o fundo), como também na degradação do mesmo. Esses conjuntos de fatores intempéricos aliados à formação de OSAs e bioestimulação em conjunto com a bioaumentação autóctone possivelmente auxiliaram no desaparecimento do óleo da superfície dos biorreatores, como podemos observar na Figura 8.

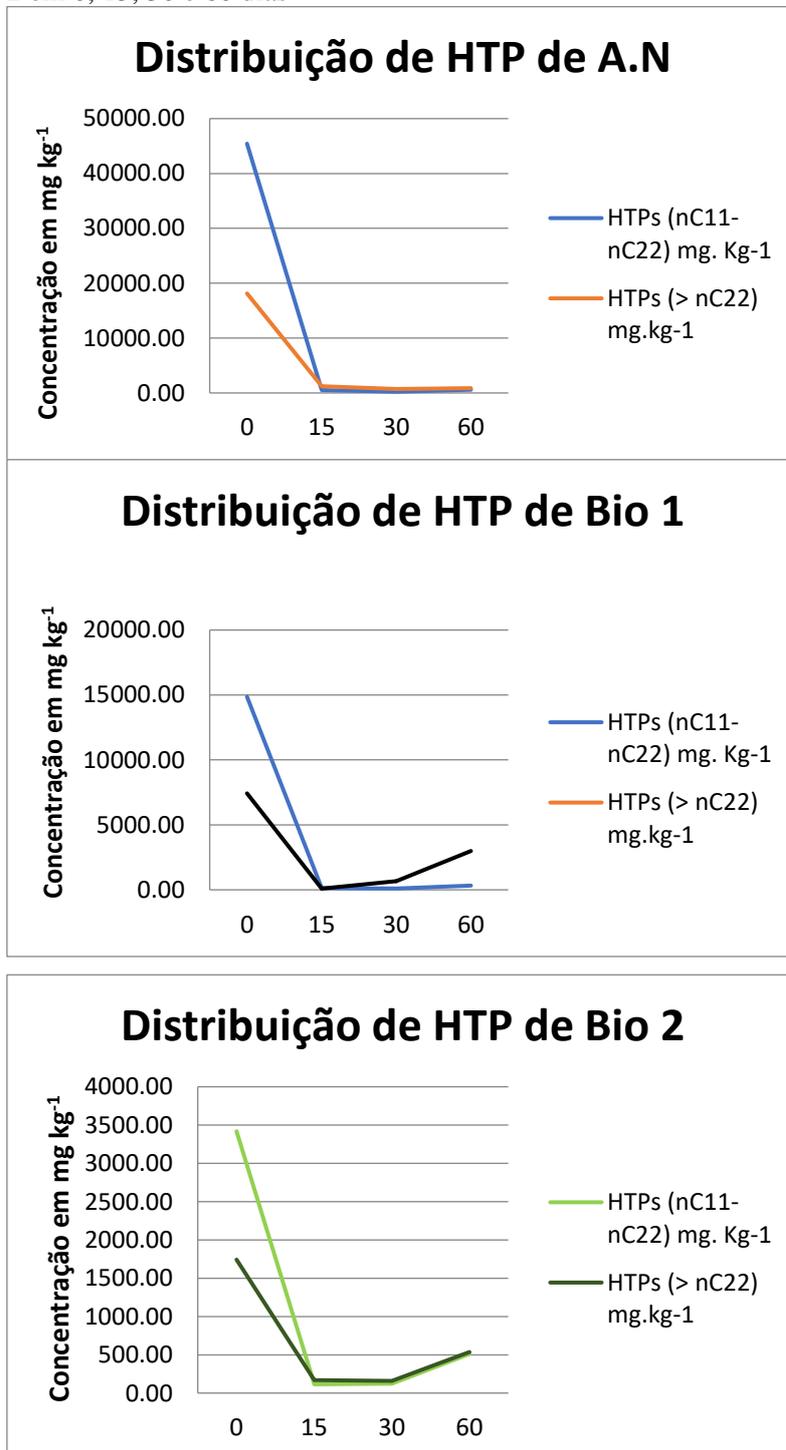
3.3.3 Distribuição temporal da concentração de HTP de médio e alto peso em 0, 15, 30 e 60 dias

No gráfico da Figura 10, foi observada a distribuição temporal da concentração de HTP de médio e alto peso.

Nota-se inicialmente, que de forma geral há um aumento da concentração de HTP mais pesados em detrimento dos mais leves (<nC22) possivelmente devido ao fracionamento molecular, que aumenta a concentração de HTP de maior peso molecular, em função da oxidação de outros compostos (REYES, 2015). A.N apresentou maior abundância de hidrocarbonetos do que em Bio 1 e Bio 2, o que também foi observado no cromatograma da Figura 11C, possivelmente indicando a degradação do óleo, tanto em função da biodegradação como também da volatilização e foto-oxidação. Resultados similares foram encontrados por Roy et al. (2018). Os autores reportaram que a atenuação natural possuía maior concentração de HTP em comparação as unidades que foram bioestimuladas e bioaumentadas em 120 dias. O tratamento bioestímulo e bioaumentação alcançou 75% de degradação de HTP, já atenuação natural obteve 35% de degradação dos HTP.

Na Figura 11, após 60 dias pode ser observado que a sobreposição dos cromatogramas nos apresenta também a diminuição da intensidade dos picos, resultando na perda de compostos, o que está de acordo com Sakaya; Salam e Campos (2019) que teve os HTP completamente degradados sob o efeito da bioestimulação.

Figura 10- Distribuição temporal de HTP de médio e alto peso nas biorreatores A.N, Bio 1 e Bio 2 em 0, 15, 30 e 60 dias



Elaboração: Autora, 2019.

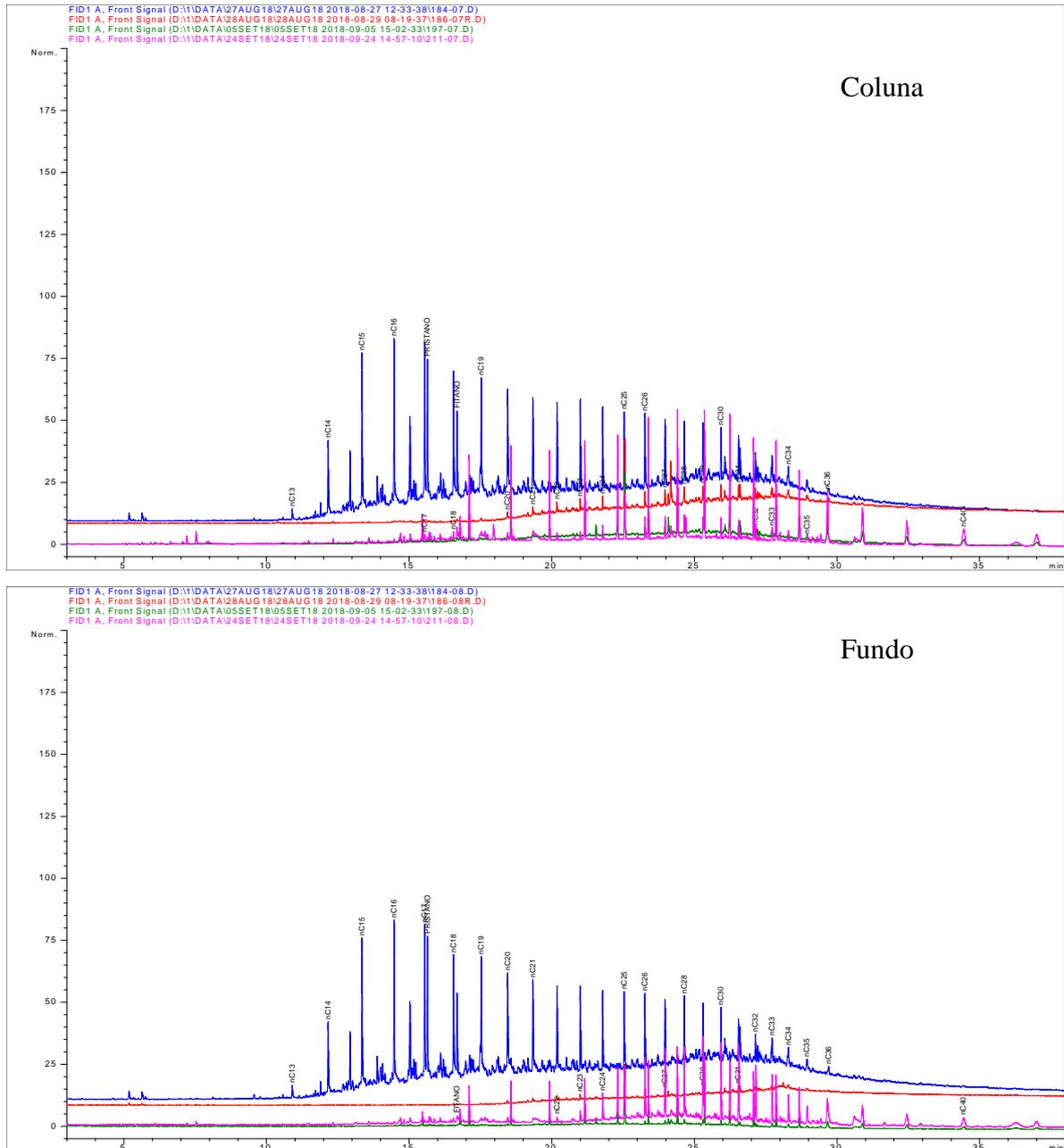
Tabela 2- Concentrações de HTP de médio a alto peso molecular referentes a Figura 10

	TEMPO (dias)	HTP (nC11- nC22) mg kg ⁻¹	HTP (> nC22) mg kg ⁻¹
A.N	0	45430,08	18137,02
	15	522,21	1231,37
	30	225,99	722,27
	60	589,99	893,64
Bio 1	0	14861,31	7426,92
	15	128,05	94,82
	30	103,84	668,30
	60	325,00	2988,87
Bio 2	0	3418,68	1742,57
	15	114,79	169,33
	30	121,35	159,01
	60	512,64	535,98

Elaboração: Autora, 2019.

Os cromatogramas abaixo são referentes às alíquotas da coluna d'água que foram extraídos por meio da extração líquido/líquido. No tempo 0 dias nota-se a presença de pristano e fitano, que são biomarcadores isoprenóides. Observa-se também que a transferência vertical possivelmente em função da formação de OSAs ocorreu de forma mais distribuída, ou seja, a formação de OSAs de flutuabilidade neutra e flutuabilidade negativa foram similares. O que não ocorreu no cromatograma dos biorreatores Bio 1 e Bio 2, havendo uma maior dispersão de óleo para o fundo em função também da formação de OSAs de flutuabilidade negativa. Os picos do cromatograma rosa (60 dias) da Figura 11 são consideravelmente maiores do que os cromatogramas das outras unidades de tratamento, outra diferença é que em A.N em 60 dias é possível observar a presença de pristano e fitano, compostos que não apareceram nos cromatogramas (15, 30 e 60 dias) de Bio 1 e Bio 2.

Figura 11- sobreposição dos cromatogramas referentes às alíquotas da coluna d'água que foram extraídos por meio da extração líquido/líquido do biorreator atenuação natural. Cromatograma azul: 0 dias; cromatograma vermelho: 15 dias; cromatograma verde: 30 dias e cromatograma rosa: 60 dias.



Elaboração: Autora, 2019.

Quadro 4- Classificação do grau API

Órgão	º API			
	Óleo leve	Óleo médio	Óleo pesado	Óleo ultrapesado
OPEP	≥ 34,1	25,0 - 34,0	10,0 - 25,0	≤ 10,0
Petrobrás offshore	≥ 35,1	25,0 - 35,1	10,0 - 25,0	≤ 10,0
Petrobrás onshore	≥ 32,0	26,0 - 32,0	10,5 - 26,0	≤ 10,5
ANP/ Brasil	≥ 32,0	19,0 - 32,0	14,0 - 19,0	≤ 14,0
Alberta Government/ Canadá	≥ 32,0	18,0 - 32,0	13,0 - 18,0	≤ 13,0
U.S Department of energy	≥ 31,1	22,3- 31,1	12,0 - 22,3	≤ 12,0

Elaboração: Adaptado Reyes (2015); Gonçalves; Silva (2017).

Em todos os biorreatores observa-se a presença de compostos mais leves somente no tempo 0 dias (*n*C8-*n*C22). Nos cromatogramas de 15, 30 e 60 dias para todos os biorreatores, os componentes mais leves estiveram abaixo do limite de quantificação do método (LQM), o que era de se esperar em função do ºAPI do óleo da bacia de campos (21,7) considerado um óleo médio pela Agência Nacional de Petróleo- ANP, *Alberta Government* e *U.S Departamento of energy* (Quadro 4). Dessa forma, os compostos mais leves foram possivelmente perdidos por evaporação e dissolução rapidamente (REYES, 2015).

Em Bio 1 foi observado um aumento dos compostos de maior peso molecular em 30 dias. De acordo com Reyes (2015) esse comportamento ocorre devido ao fracionamento molecular, o que causa um aumento exacerbado dos compostos pesados em função da oxidação dos compostos menos complexos.

Pode-se notar uma que tanto em Bio 1 como em Bio 2 há uma maior dispersão de óleo para o fundo, em função da formação de OSAs de flutuabilidade negativa. Essa transferência vertical pode ocorrer em consequência do aumento da concentração de compostos pesados, devido à quebra de moléculas mais complexas. Sendo assim, frações polares do petróleo são formadas provenientes da quebra de moléculas mais complexas, aumentando a atração do óleo para o MPS. A dispersão vertical (formação de OSAs de flutuabilidade negativa) impacta negativamente os organismos bentônicos além de enfraquecer a biodegradação por microrganismos hidrocarbonoclasticos, (GONG et al., 2014; GUSTITUS; JOHN; CLEMENTE, 2017; HUA et al., 2018;; MARTINS, et al., 2019; MIRANDA, 2016; MOREIRA, 2014).

Figura 12- Sobreposição dos cromatogramas referentes às alíquotas da coluna d'água que foram extraídos por meio da extração líquido/líquido do biorreator bioestimulação 1. Cromatograma azul: 0 dias; cromatograma vermelho: 15 dias; cromatograma verde: 30 dias e cromatograma rosa: 60 dias.

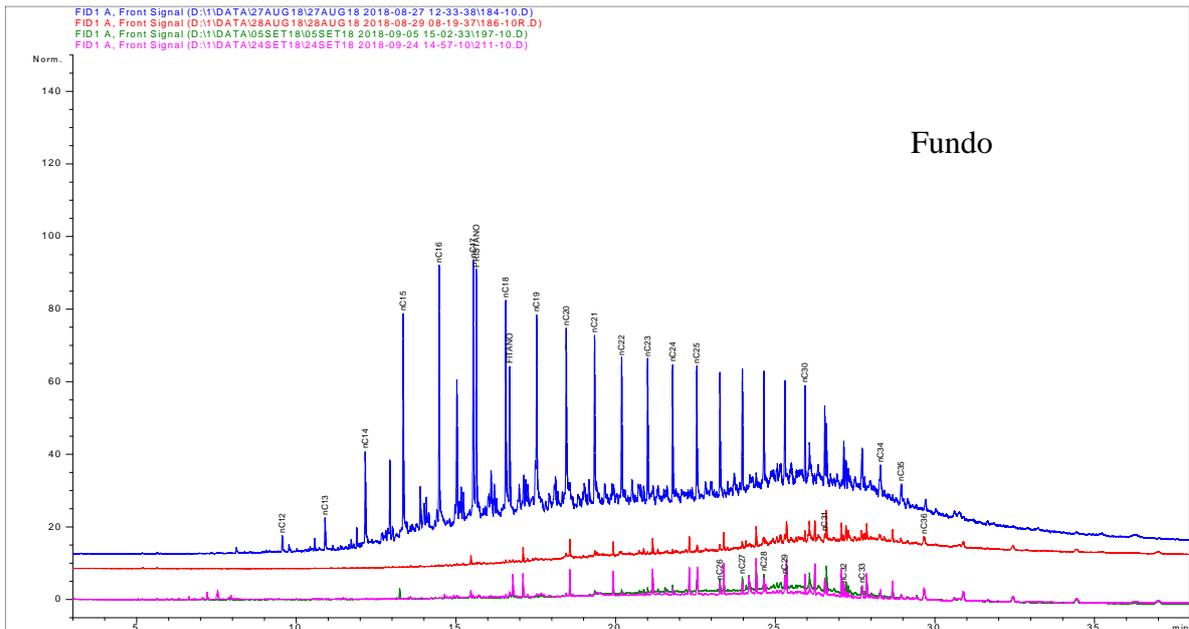
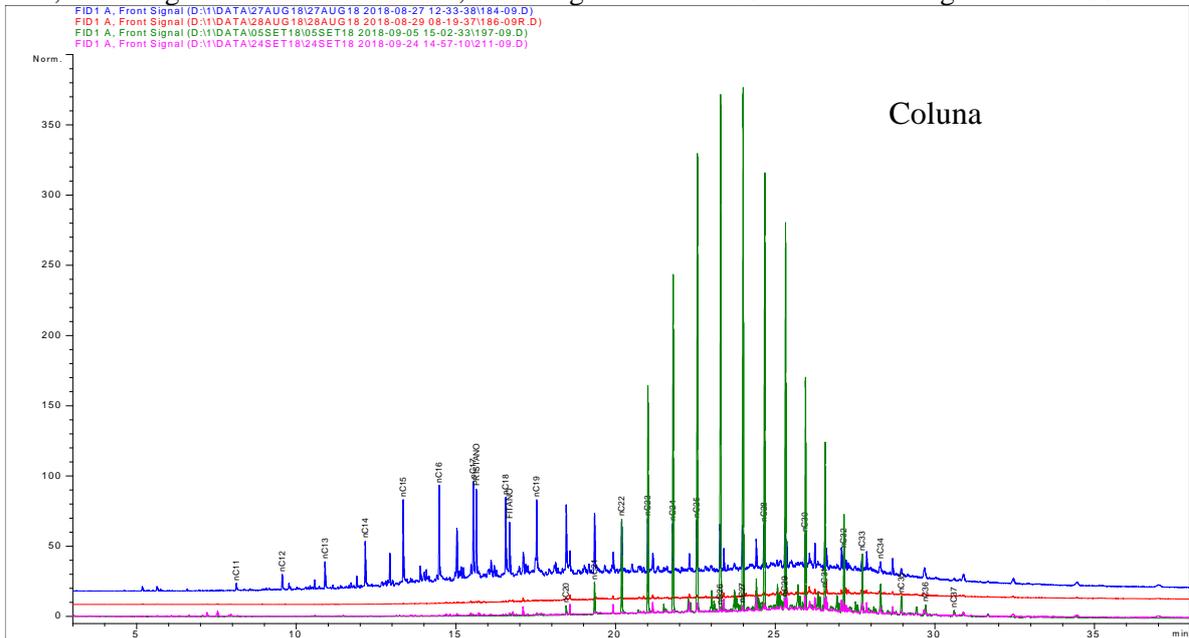
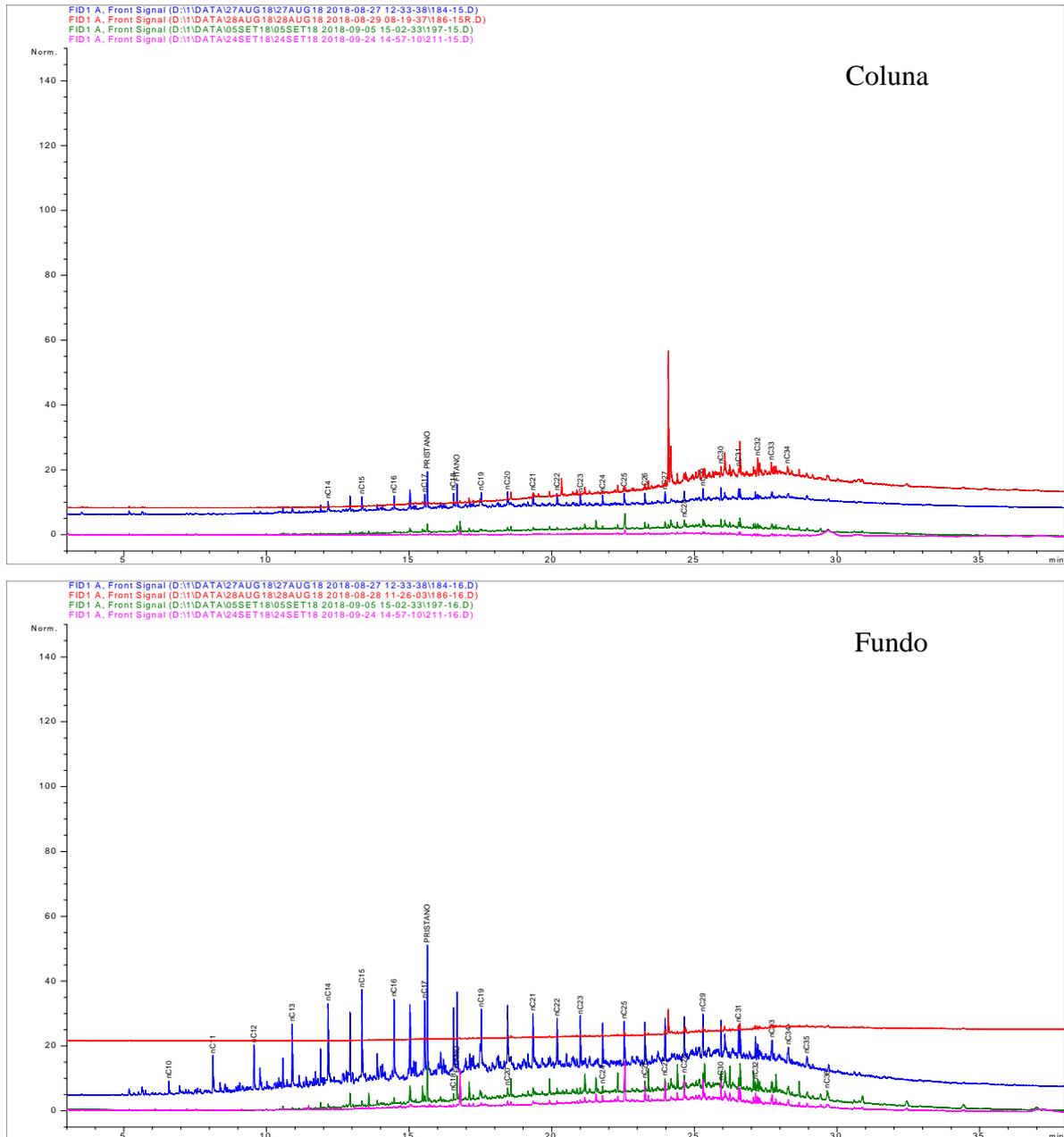


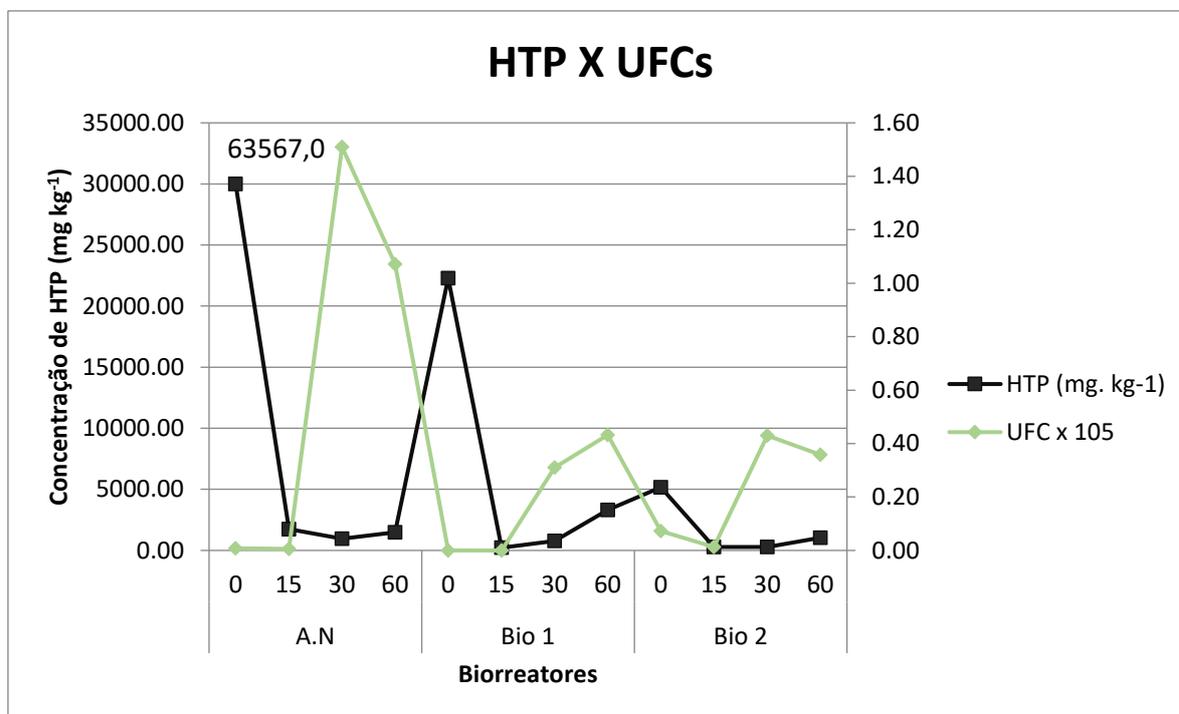
Figura 13- sobreposição dos cromatogramas referentes às alíquotas da coluna d'água que foram extraídos por meio da extração líquido/líquido do biorreator bioestimulação 2. Cromatograma azul: 0 dias; cromatograma vermelho: 15 dias; cromatograma verde: 30 dias e cromatograma rosa: 60 dias.



De acordo com a Figura 11, 12 e 13, as concentrações de hidrocarbonetos nos três tratamentos diminuiu significativamente de A.N (unidade 0), Bio 1 (unidade 1) e Bio 2 (unidade 2) resultando em uma média de 98,12% de diminuição da concentração de 60 dias em comparação à 0 dias. Possivelmente essa diminuição significativa da concentração de HTP se deu em função do aumento das atividades metabólicas dos microrganismos autóctones, nas unidades em que havia nutrientes. O mesmo foi observado em Roy et al. (2018); Sakaya; Salam e Campo, (2019). Na Figura 14 o valor máximo encontrado para A.N foi 63567,0 (mg kg⁻¹), porém em função da melhor visualização no gráfico o valor foi retirado. Em 30 e 60 dias em A.N observa-se uma

redução significativa da concentração de HTP quando havia aumento no crescimento de bactérias com exceção de 0 dias, o mesmo ocorre em Bio 1 e Bio 2.

Figura 14- Gráfico HTP *versus* UFCs



Elaboração: Autora, 2019.

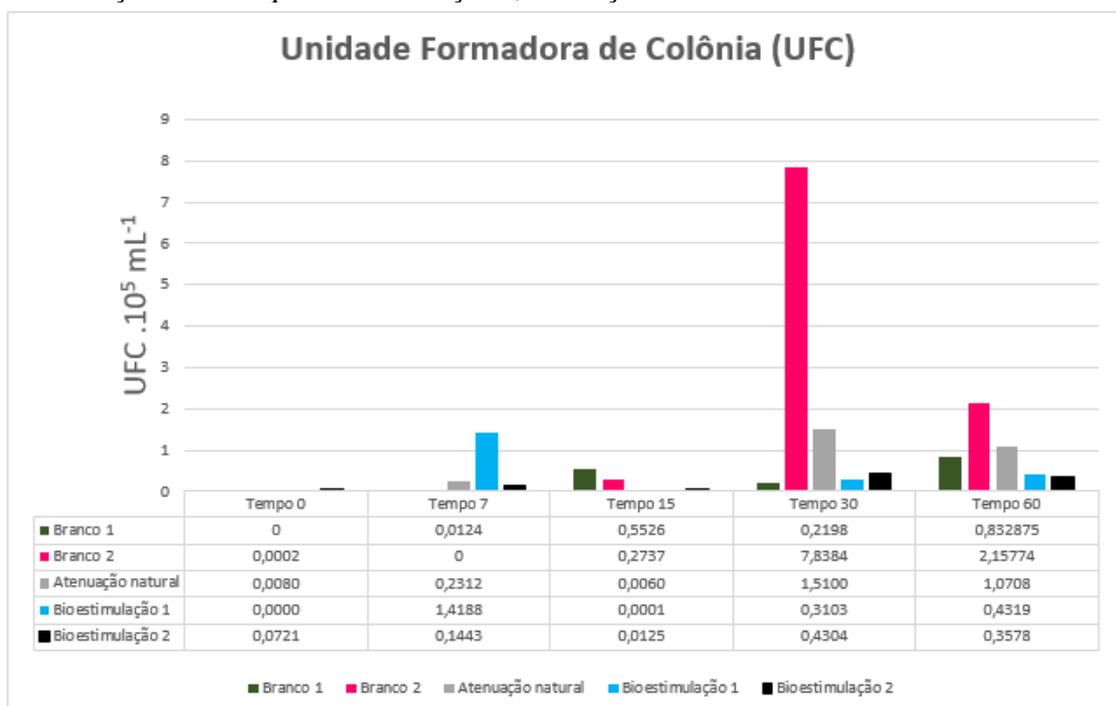
3.3.4 Avaliação temporal do crescimento de UFCs

Na Figura 15, em 0 dias, a unidade de simulação que havia maior concentração de nutrientes (Bio 2) foi a que apresentou o maior crescimento de bactérias, já em 7 dias a unidade de simulação que apresentou maior eficiência foi Bio 1, seguido por A.N e Bio 2. A adição de nutrientes (N, P e K) em 0 dias e 7 dias comprova que a partir do uso do bioestímulo os microrganismos crescem mais rapidamente, possibilitando maior degradação de hidrocarbonetos, como apresentado nos cromatogramas das unidades que haviam bioestimulação, em comparação à atenuação natural. Esse fato também foi observado por Hassanshahian et al. (2014) e Pasumarthi e Mutnuri (2016).

Nos biorreatores de A.N, não houve bioestímulo, muito embora no MPS continha nitrogênio e fósforo, garantindo o crescimento dos microrganismos. É possível que o carbono proveniente dos hidrocarbonetos tenha sido utilizado como estímulo ao crescimento pelas bactérias, o que está de acordo com a literatura. Apesar de haver crescimento com o *input* de matéria orgânica provinda dos hidrocarbonetos e MPS, sem a adição de nitrogênio e fósforo (macronutrientes fundamentais para o crescimento de

microrganismos), o crescimento irá cessar o que dificultará o processo de biodegradação dos HTP (GHOLAMI- SHIRI et al., 2017; NWINYI E OLAWORE, 2017; HASSANSHAHIAN et l., 2014).

Figura 15- Avaliação do crescimento das UFCs em 0, 15, 30 e 60 dias, nas biorreatores: branco 1, branco 2, atenuação natural, bioestimulação 1 e 2 (Os brancos não continham óleo e branco 1 continha a mesma concentração de NPK que bioestimulação 1 e branco 2 continha a mesma concentração de NPK que bioestimulação 2, atenuação natural não continha NPK



Elaboração: Autora, 2019.

Foi observado na Figura 15 que em 15 dias praticamente não houve crescimento de bactérias. Após o fim da fase Lag onde o crescimento não é significativo, ocorre um aumento da biomassa para posteriormente iniciarem a fase estacionária. A menor concentração de bactérias ocorreu, possivelmente em função do aumento da taxa de mortalidade dos microrganismos em consequência da produção dos metabólitos tóxicos (SOUZA, 2003). Por esse motivo em 30 dias foram readicionados os nutrientes (NH_4Cl , NaNO_3 e KH_2PO_4), com o intuito de potencializar a biodegradação que já estava em andamento. Pasumarthi e Mutnuri (2016) utilizaram os mesmos nutrientes utilizados por esta pesquisa, e também observaram que em atenuação natural houve um aumento da fase Lag, causando uma menor eficiência dos resultados quando comparado à bioestimulação,

Foi observado que em 15 dias houve uma alteração da abundância de nitrato em Bio 1 e Bio 2 (Figura 18), menor crescimento de bactérias, como também menor concentração de HTP ($2260,58\text{mg kg}^{-1}$). Com a menor concentração de carbono

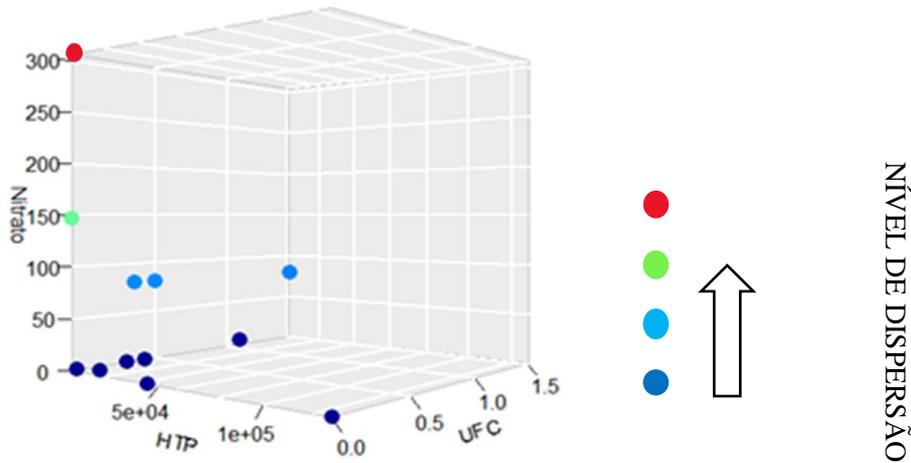
disponível em 15 dias apesar das altas concentrações de nutrientes disponíveis, é possível, de acordo com Hitchcock e Mitrovic (2013), que a menor concentração de HTP pode ter influenciado no crescimento das bactérias. Uma vez que o carbono é fundamental para os microrganismos já que compõe o protoplasma, sendo este, muitas vezes utilizado como fonte de energia.

Considerando que as bactérias que foram bioestimuladas são litotróficas, ou seja, utilizam substâncias inorgânicas reduzidas como fonte de elétrons. As bactérias bioestimuladas, chamadas heterotróficas, possivelmente entraram em competição por nutrientes, com bactérias autotróficas que utilizam compostos inorgânicos solubilizados na água, causando menor crescimento de UFCs porém maior biodegradação dos hidrocarbonetos (MARA; HARAN, 2003).

É necessário levar em consideração que cada espécie tem suas condições ideais de crescimento, por exemplo, em 15 dias houve maior concentração de nutrientes auxiliando no crescimento de algumas espécies, porém outro grupo de bactérias podem ter maior preferência por carbono. Ou seja, alguns grupos podem reagir à um estímulo enquanto outros grupos não produzem a mesma resposta. De acordo com Hassanshahian et al. (2014), experimentos “*in vitro*” oferecem dados distantes da realidade da dinâmica do meio ambiente, além de existir uma dificuldade em reproduzir o experimento em escalas maiores como os biorreatores, quando comparado à erlenmeyers onde o controle das variáveis é mais rigoroso.

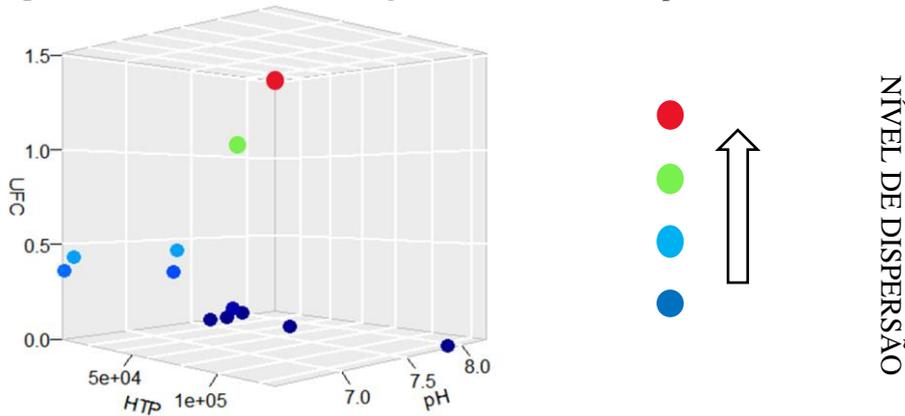
No intervalo de 0 a 100 mg L⁻¹ de nitrato, segundo a Figura 16, é o intervalo que apresenta maior eficiência como receptor de elétrons favorável ao metabolismo microbiano e com isso possibilitar o crescimento de bactérias hidrocarbonoclásticas, resultando nas menores concentrações de HTP (ROY et al., 2018). Como apresentado no gráfico anterior, o crescimento de bactérias bioestimuladas não foi tão grande quanto o crescimento de bactérias em A.N, entretanto acredita-se que as bactérias hidrocarbonoclásticas foram beneficiadas.

Figura 16- Gráfico da dispersão de HTP, UFC e nitrato



Elaboração: Autora, 2019.

Figura 17- Gráfico em 3D de dispersão de HTP, UFC e pH.



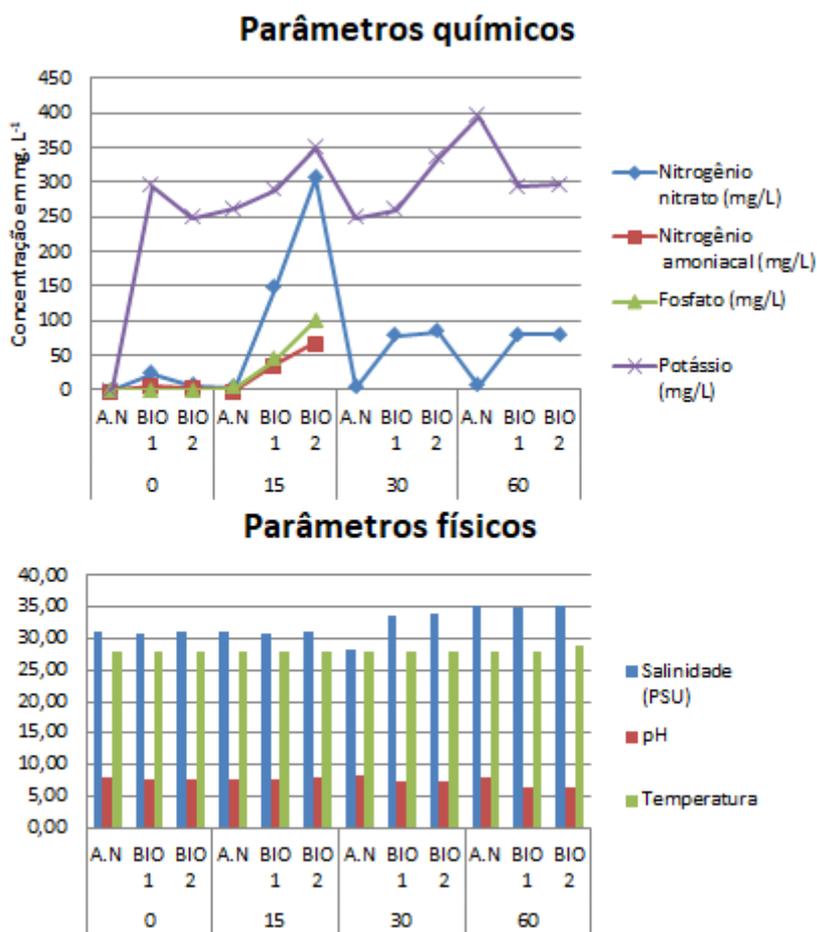
Elaboração: Autora, 2019.

Na Figura 17 No intervalo de crescimento entre 0 e 0,5 ml. 10^{-5} foi onde apresentou maior dispersão dos dados e isso ocorreu com o pH entre 7 e 8, ou seja, um pH alcalino. Ou seja, apesar do crescimento de bactérias não ser considerado significativo, com o pH alcalino obtiveram-se as menores concentrações de HTP.

Sánchez et al. (2018), descreveu que com o aumento do pH de 6 para 8 combinados com alta salinidade resultou em uma extensão da fase Lag, as UFCs tiveram maior facilidade de adaptação às condições impostas pelo experimento. Ainda segundo o autor a combinação entre pH 8 e alta salinidade causa uma ATPase mais ativa, que consiste em uma molécula fundamental para o fornecimento de energia que impulsiona a reprodução dos microrganismos. Bhattacharya et al. (2019) afirma que o pH em sua

pesquisa foi o parâmetro mais significativo na biodegradação dos HTP, seguido pela aeração e temperatura. Segundo o autor, o pH alcalino (8,0) apresentou crescimento de bactérias ideal para biodegradação do petróleo bruto.

Figura 18- Gráfico da distribuição temporal de parâmetros físico e químicos



Elaboração: Autora, 2019.

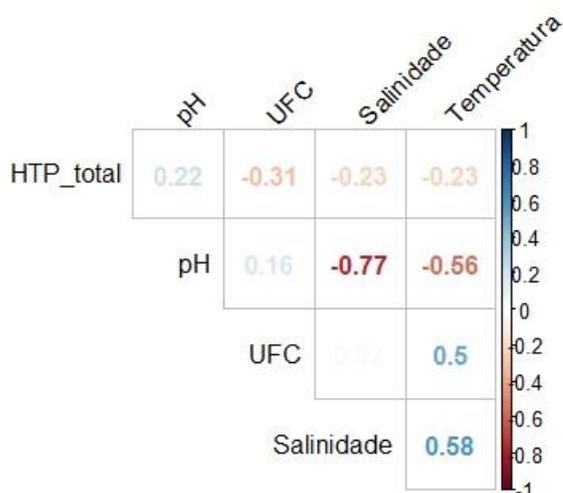
O potássio como observado na Figura 18, se destacou apresentando altas concentrações e mantendo-se relativamente estável durante todo o experimento uma vez que o MPS já continha potássio abundância. O que está de acordo com Sattar et al. (2018), que afirma que a faixa de pH entre 6,5 e 8,0 permite maior solubilização de potássio (~ 490 a 758 mg L^{-1}).

Na Figura 18 nota-se que a temperatura permanece relativamente constante durante todo o experimento (28°C), com exceção de 60 dias que apresentou um pequeno aumento da temperatura. Porém, em temperaturas mais altas segundo Gong et al. (2014), os hidrocarbonetos tendem a solubilizarem mais facilmente no MPS, assim como na

presença de matéria orgânica. A salinidade é considerada um parâmetro fundamental para a formação de OSAs, pois a mesma facilita a floculação de partículas sólidas e diminui a força de repulsão entre a superfície do óleo e o MPS, aumentando a adsorção dos hidrocarbonetos no particulado (GONG et al., 2014). Observou-se em 30 e 60 dias um diminuto aumento da salinidade em Bio 1 e Bio 2 (de 31 para 34), porém não contribuiu positivamente na formação de OSAs, uma vez que a variação de salinidade não foi significativa o suficiente para aumentar a dispersão de HTP. Contudo, devido à evaporação da água em função do aumento da temperatura, observou-se uma concentração dos sais que resultou no aumento da salinidade, em função disso, foi adicionado água ultra pura sempre que havia uma diminuição no volume de água salina.

Na Figura 19, quanto mais forte a cor azul e mais próximo de 1 o parâmetro estiver, significa que a correlação é forte e positiva. Já quanto mais forte a cor vermelha e o numeral estiver próximo do -1 mais forte será a correlação negativa. Como esperado, a temperatura, salinidade e UFC foram considerados parâmetros correlacionados, uma vez que ambos contribuem para o crescimento dos microrganismos (VARJANI, 2007).

Figura 19- Teste de correlação de parâmetros realizado no programa de estatística R.



Elaboração: Autora, 2019.

HTP/ pH, encontram-se fracamente positivos, a adição de nutrientes possivelmente promoveu uma redução do pH em função da utilização do amônio como fonte de nitrogênio. Este, ao ser metabolizado por microrganismos gerou íons hidrogênio, resultando em um decréscimo do pH (ZHENG et al., 2019). O pH e a salinidade, assim como o pH e a temperatura apresentaram uma relação fortemente negativa na Figura 19 (-0,77) indicando que o aumento temperatura e evaporação da água, houve um aumenta

da salinidade possibilitando a dissociação e liberação dos íons de hidrogênio, influenciando a redução do pH.

A relação entre HTP/ temperatura foi fracamente negativa, indicando que com o aumento da temperatura houve uma ligeira diminuição da concentração de HTP, ou seja, o aumento da temperatura propiciou o crescimento de bactérias, levando a diminuição do HTP, assim como a salinidade/ HTP que está ligada ao aumento da temperatura, como já foi explicado. A relação HTP/ UFC foi inversa, com o aumento do crescimento de bactérias hidrocarbonoclásticas houve uma diminuição dos HTP.

3.4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados observados conclui-se que a adição de nutrientes (nitrogênio, fósforo e potássio) contribuiu de forma positiva na biodegradação dos HTP. Com base nos resultados dos biorreatores bioestimulados, acredita-se que a menor concentração de nutrientes foi suficiente para aumentar o potencial de degradação dos HTP, permitindo uma redução nos custos em casos de derramamentos de petróleo. A partir de ensaios microbiológicos foi observado que nos tempos 0 e 7 dias houve maior crescimento de bactérias nos biorreatores que foram bioestimulados, contudo em 30 e 60 dias o maior crescimento foi referente a atenuação natural. Esse resultado foi atribuído à extensão da fase Lag nos biorreatores de atenuação natural, o que explica o crescimento somente em 30 e 60 dias. O menor crescimento de UFCs nas unidades bioestimuladas ocorreu possivelmente em função da competição interespecífica que favoreceu as bactérias hidrocarbonoclásticas, explicando os melhores resultados de biodegradação dos hidrocarbonetos. Como contribuição para pesquisas futuras, indicamos a realização de testes com diferentes nutrientes visando o crescimento apenas de bactérias hidrocarbonoclásticas, recomenda-se o teste com diferentes concentrações de nutrientes para avaliar a concentração mínima a ser adicionada visando a redução de custos com bioestímulo.

AGRADECIMENTOS

Esse estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio do Projeto “Desenvolvimento de Multibioprocesso de Remediação Aplicável em áreas Costeiras Impactadas por Atividades Petrolíferas-DEMBPETRO” - Processo 4026663/2013-6, no âmbito da CHAMADA MCTI/CNPq/CT-BIOTEC Nº 30/2013. A autora Lua Leoncio recebeu uma bolsa de dissertação da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). Esse trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente (POSPETRO).

4 CONCLUSÃO GERAL

A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que a hipótese deste trabalho foi confirmada: a adição de nutrientes potencializou a biodegradação dos HTP dispersados pela formação de OSAs. O bioestimulo 1 apresentou resultados similares ao bioestimulo 2, em função disso acredita-se que a menor concentração de nutrientes já foi eficiente para aumentar o potencial de degradação do HTP, com isso haveria uma redução nos custos com nutrientes e nos impactos causados devido a adição de nutrientes. A bioestimulação mostrou maior capacidade para acelerar a degradação do que a atenuação natural (98% e 84% respectivamente).

A partir das análises microbiológicas foi perceptível que as bactérias que foram bioestimuladas cresceram mais rapidamente do que as bactérias do conjunto atenuação natural em função do aumento da fase Lag. Contudo, apesar dos resultados terem mostrado um maior potencial de biodegradação no biorreatores bioestimulados, eles apresentaram menores crescimentos de UFCs, o que pode ser explicado devido à competição interespecífica que promoveu um maior crescimento das bactérias hidrocarbonoclásticas em função das bactérias autotóxicas. Foi verificada algumas limitações no experimento em função da tentativa de manter o experimento em biorreatores de 30 L o mais próximo do protocolo gerado para erlenmeyers de 250 mL. Para trabalhos futuros, sugerem-se testes com outros nutrientes que de fato aumentem o crescimento das bactérias hidrocarbonoclásticas. É indicado a extração em Soxhlet das membranas filtradas durante a extração líquido/líquido, uma vez que 90 segundos é um tempo curto para retirada do óleo adsorvido no MPS. Recomenda-se ajustes no biorreator referente a retroalimentação do volume de água evaporado e controle da turbulência mínima para formação de OSAs.

REFERÊNCIAS

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater 4500-P A/B/E**. 20th Ed. Washington: APHA, 1998.

ASTM - AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Sediment Metals: Partial Opening D5258**, v. 1, p. 740- 742, 1996.

ATLAS, R.M.; BOEHM, P.D.; CALDER, J. A. Chemical and biological weathering of oil, from the Amoco Cadiz spillage, within the littoral zone. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 12, p. 589-608, 1981.

ATLAS, R.M. Petroleum Biodegradation and Oil Spill Bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v.31, p. 178-182, 1995.

BAHIA. Secretaria de Infraestrutura – Secretaria do Planejamento Ciência e Tecnologia – Consórcio HIDROS CH2M Hill / CRA - Centro de Recursos Ambientais – **Modelamento e avaliação ambiental: Relatório de Diagnóstico da Qualidade das Águas da Baía de Todos os Santos**, vol. 3. Salvador, 2000. 122 p.

BAHIA. Centro de Recursos Ambientais. **Avaliação da qualidade das águas da Bacia Hidrográfica do Recôncavo Norte: relatório técnico, avaliação ambiental**. Salvador: CRA, 2000.

BHATTACHARYA, M.; GUCHHAIT, S.; BISWAS, D.; SINGH, R. Evaluation of a microbial consortium for crude oil spill bioremediation and its potential uses in enhanced oil recovery. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.18, p.101034, 2019.

BERGER, T. M. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos totais de petróleo: enfoque na aplicação do processo Terraferm**, nf. 99, 2005. Tese (Doutorado em Ecologia)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Porto Alegre, 2005.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Determinação de nitrogênio orgânico e de nitrogênio total kjeldahl em água: método de determinação de nitrogênio na forma de amônia - método de ensaio**. São Paulo: CETESB, 1978

CETESB. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO- **Determinação pela técnica da membrana filtrante: método de ensaio (NTL5.214)**. São Paulo, 2007.

CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Classificação de águas, doces, salobras e salinas do Território Nacional**, resolução de N° 357, 2005. Disponível em: < <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em 10 jan. 2019.

CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional**, resolução de N° 454, 2012. Disponível em: < <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=693>>. Acesso em 15 mar. 2019.

DOM, J.; KHELIFA, A.; XILAI, Z.; WANG, Z. A laboratory study on the kinetics of the formation of oil-suspended particulate matter aggregates using the NIST-1941b sediment. **Marine Pollution Bulletin**, v.60. P. 1701–1707, 2010.

DUAN, J.; LIU, W.; ZHAO, X.; HAN, Yuling; O'REILLY, S.E.; ZHAO, Dongye. Study of residual oil in Bay Jimmy sediment 5 years after the Deepwater Horizon oil spill: persistence of sediment retained oil hydrocarbons and effect of dispersants on desorption. **Science of The Total Environment**, v. 618, p. 1244-1253, 2018.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, DF: Embrapa Informação e Tecnológica, 2009, 627 p.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de Análises Químicas para avaliação da fertilidade do solo**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos. 1997, 30-32p.

EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY: **Method 3546 - Microwave extraction**. 2007.

EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY: **Method 8270 D – Semivolatile organic compound by gas chromatography/mass spectrometry (gc/ms)**. 2007.

GAO, E. D. S. S. **Modelagem cinética microbiana aplicada na degradação do petróleo de campos presente no sedimento de manguezal**. Nf. 88, 2018. Dissertação (Mestrado em Geoquímica do Petróleo e Meio Ambiente)- Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

GAO, P.; LI, G.; DAI, X.; DAI, L.; WANG, H.; ZHAO, L.; CHEN, Y.; MA, T. Nutrients and oxygen alter reservoir biochemical characters and enhance oil recovery during biostimulation. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.29, p. 2045-2054, 2013.

GHOLAMI- SHIRI, J.; MOWLA, D.; DEHGHANI, S.; SETOODEH, P. Exploitation of novel synthetic bacterial consortia for biodegradation of oily-sludge TPH of Iran gas and oil refineries. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, p. 2964-2975, 2017.

GOMES, A. S.; NEVES, R. L.; AUCÉLIO, R.; VAN DER VEN, P. H.; PITOMBO, F. B.; MENDES, C. L.T.; ZIOLLI, R. L. Changes and variations of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in fish, barnacles and crabs following an oil spill in a mangrove of Guanabara Bay, Southeast Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v.60, p.1359- 1363, 2010.

GONÇALVES, O. **Biorremediação de substrato de manguezal contaminado com petróleo, através da adição de nutrientes (glicerina bruta e torta de mamona) e Fungos *aspergillus spp* ou *penicillium spp***. Dissertação (Mestrado em Geoquímica do Petróleo e Meio Ambiente)- Universidade Federal da Bahia, Instituto de Geociências, 2012.

GONG, Y.; ZHAO, X.; CAI, Z.; O'REILLY, S.E; HAO, X.; ZHAO, D. A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: influence on the fate, transport and remediation of oil spills, **Marine Pollution Bulletin**, v.79. P. 13-23. 2014.

GUSTITUS, S.; JOHN, G.; CLEMENT, P. Effects of weathering on the dispersion of crude oil through oil-mineral aggregation. **Science of The Total Environment**, v. 587-588, p. 36-46, 2017.

HASSANSHAHIAN, M.; EMTIAZI, G.; CARUSO, G.; CAPELLO, S. Bioremediation (bioaugmentation/biostimulation) trials of oil polluted seawater: **A mesocosm simulation study**, v. 95, p. 28-38, 2014.

HILL, P.S.; KHELIFA, A.; LEE, K. Time scale for oil droplet stabilization by mineral particles in turbulent suspensions. **Spill Science and Technology Bulletin**, v. 8, p. 73-81, 2002.

HITCHCOK, J.; MITROVIC, S. Different resource limitation by carbon, nitrogen and phosphorus between base flow and high flow conditions for estuarine bacteria and phytoplankton. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 135, p.106-115, 2013.

HITCHCOK, J.; MITROVIC, S. Highs and lows: The effect of differently sized freshwater inflows on estuarine carbon, nitrogen, phosphorus, bacteria and chlorophyll a dynamics. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 156, p.71-82, 2015.

HUA, Y.; MIRNAGHI, F.S.; YANG, Z.; HOLLEBONE, B.P.; BROWN, C.E. Effect of evaporative weathering and oil-sediment interactions on the fate and behavior of diluted bitumen in marine environments. Part 1. Spill-related properties, oil buoyancy, and oil-particulate aggregates characterization. **Chemosphere**, v.191, p.1038-1047, 2018.

ISLAM, M.A.; AL-MAMUN, A.; HOSSAIN, F.; QURAIISHI, S.B.; NAHER, K.; KHAN, R.; DAS, S.; TAMIN, U. Contamination and ecological risk assessment of trace elements in sediments of the rivers of Sundarban mangrove forest, Bangladesh. **Marine Pollution Bulletin**, v. 124, p.356-366, 2017.

I TOPF - THE INTERNATIONAL TANKER OWNERS POLLUTION FEDERATION LIMITED. **Oil tanker spill statistics 2016**. Knowledge e resources, documents e guides. I TOPF. 2017. Disponível em: <http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>. Acesso em: 12 jan. 2019.

JI, H.; GONG, Y.; DUAN, J.; ZHAO, D.; LIU, W. Degradation of petroleum hydrocarbons in seawater by simulated surface-level atmospheric ozone: Reaction kinetics and effect of oil dispersant. **Marine Pollution Bulletin**, v. 135, p.427-440, 2018.

JIA, H.; HOU, D.; DAI, M.; LU, H.; YAN, C. Effects of root exudates on the mobility of pyrene in mangrove sediment-water system. **CATENA**, v. 162, p. 396-401, 2018.

KE, L.; WONG, T.W.Y.; WONG, W.Y.; TAM, N.F.Y. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in a mangrove swamp in Hong Kong following an oil spill. **Marine Pollution Bulletin**, v.45, p. 339-347, 2002.

KHELIFA, A.; STOFFYN-EGLI, P.; HILL, P.S.; LEE, K. Effects of salinity and clay type on oil-mineral aggregation. **Marine Environmental Research**, v.59, p. 235-254, 2005.

KHELIFA, A.; STOFFYN-EGLI, P.; MONTE, P.; LEE, K. Characteristics of oil droplets stabilized by mineral particles: effect of oil types and temperature. **Spill Science and Technology Bulletin**, v.8. P.19–30. 2002.

KOLESNIKOVAS, C.; OLIVEIRA, E.; DUARTE, U. Avaliação de risco toxicológico para hidrocarbonetos totais de petróleo em forma fracionada aplicada à gestão e monitoramento de água subterrânea em um complexo industrial. **Águas Subterrâneas**, v. 23, p. 31-44, 2009.

KRONENBERG, M.; TRABLY, E.; BERNET, N.; PUTUREAU, D. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Using microbial bioelectrochemical systems to overcome an impasse. **Environmental Pollution**, v. 231, p. 509-523, 2017.

KUMARI, S.; REGAR, R.K.; MANICKAM, N. Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria. **Bioresource Technology**, v.254, p.174-179, 2018.

LEE, M.; JUNG, J.Y. Pollution risk assessment of oil spill accidents in Garorim Bay of Korea. **Marine Pollution Bulletin**, v. 100, p.297-303, 2015.

LIMA, D.F. **Biorremediação em sedimentos impactados por petróleo na Baía de Todos os Santos, Bahia**: avaliação da degradação de hidrocarbonetos saturados, nf. 234. Dissertação (Mestrado em Geologia) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Geociências, 2010.

LIU, D.; BAI, Y.; ELE, X.; TAO, B.; PAN, D.; CHEN, C.T.; ZHANG, L.; XU, Y.; GONG, C. Satellite estimation of particulate organic carbon flux from Changjiang River to the estuary. **Remote Sensing of Environment**, v. 223, p. 307-319, 2019.

MARTINS, C. **Marcadores Orgânicos Geoquímicos em Testemunhos de Sedimento do Sistema Estuarino de Santos e São Vicente, SP**: um registro histórico da introdução de hidrocarbonetos no ambiente marinho. Tese (Doutorado em Oceanografia Química e Geológica) - Instituto Oceanógrafo, Universidade de São Paulo, 2005.

MARTIN, A.B; PINHEIRO, S.M.M.; LEONCIO, L.M.; FILHO, M.S.C.; MESQUITA, G.S; BRAGA, P.I.S.; QUEIROZ, A.F.; OLIVEIRA, O.M.C.; OLIVEIRA, A.G.; MOREIRA, I.T.A. Research of OSA seasonal training in the São Paulo River, BTS: a tool to prevent potential ecotoxicological impacts. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 191, 2009.

MELVILLE, F.; ANDERSEN, L.E.; JOLLEY, D.F. The Gladstone (Australia) oil spill – Impacts on intertidal areas: Baseline and six months post-spill. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 263-271, 2009.

MENG, L.; LIU, H.; BAO, M.; SUN, P. Microbial community structure shifts are associated with temperature, dispersants and nutrients in crude oil-contaminated seawaters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 111, p. 203–212, 2016.

MIRANDA, L.; ANJOS, J.; MOREIRA, Í. Avaliação de tecnologias de remediação em zonas costeiras impactadas pela indústria de petróleo. **Revista Eletrônica de Energia**, v.4, p.19-37.

MOREIRA, Í.T.A. **Investigação de possíveis impactos ecológicos do petróleo sobre comunidades biológicas estuarinas na Baía de Todos os Santos e no Sul da Bahia**:

OSA como uma ferramenta norteadora. 265f. 2014. Tese (Doutorado em Geologia) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, 2014.

MOREIRA, Í.; OLIVEIRA, O.; TRIGUIS, J.; QUEIROZ, A.; FERREIRA, S.; MARTINS, C. Phytoremediation in mangrove sediments impacted by persistent total petroleum hydrocarbons (tphs) using *avicennia schaueriana*. **Marine Pollution Bulletin**, v.67, p.130–136, 2013.

MUSCHENHEIM, D.K.; LEE, K. Removal of oil from the sea surface through particulate interactions: review and prospectus. **Spill Science and Technology Bulletin**, v. 8, p. 9–18, 2002.

NOAA. National Oceanic and Atmospheric Administration. **Oil Spills in Mangroves: planning & response considerations: 2014**. Washington, D.C, U.S: Department of commerce, NOAA, 2014, 96 p.

NIKOLOPOULOU, M.; PASADAKIS, N.; KALOGERAKIS, N. Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, v. 72, p.165-173, 2013.

NWINYI, O.; OLAWORE, Y. Biostimulation of spent engine oil contaminated soil using *Ananas comosus* and *Solanum tuberosum* peels. **Environmental Technology & Innovation**, v. 8, p. 373-388, 2017.

OLIVEIRA, F.; OLIVEIRA, F.R.; CAMPOS, M.; OLIVEIRA, M.; MEDEIROS, J.; SILVA, O. Interação entre salinidade e fontes de nitrogênio no desenvolvimento inicial da cultura do girasol. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, p. 479-484, 2010.

PASUMARTHI, R.; MUTNURI, S. Horizontal gene transfer versus biostimulation: A strategy for bioremediation in Goa. **Marine Pollution Bulletin**, v.113, p. 271-276, 2016.

PATWORY, R.; PATWORY, K.; KALITA, M.C.; DEKA, S. Application of biosurfactant for enhancement of bioremediation process of crude oil contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2018.

PINHEIRO, S.M.M. **Formação do agregado oleo material particulado em suspensão (OSA) e dispersão de HPAs no estuário do rio São Paulo, Bahia: uma ferramenta noteadora na prevenção de impactos ecotoxicológicos**. nf. 100. Dissertação (Mestrado em Geoquímica Petróleo e meio ambiente) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Geociências, Salvador, 2019.

PRIYA, A.; MANDAL, A.K.; BALL, A.S.; MANEFIELD, M.; LAL, B.; SARMA, P.M.; Mass culture strategy for bacterial yeast co-culture for degradation of petroleum hydrocarbons in marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v.100, p. 191-199, 2015.

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

RAMADASS, K.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU; K.; NAIDU, R. Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of

bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp. on bioremediation. **Science of The Total Environment**, v.636, p. 968-974, 2018.

REYES, C.Y. **Simulação do intemperismo em mesocosmos para petróleos brasileiros**. 284f. 2015. Tese (Doutorado em Geologia) - Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2015.

RIOS, M.; MOREIRA, I.; OLIVEIRA, O.; PEREIRA, T.; ALMEIDA, M.; TRINDADE, M.C.; MENEZES, L.; CALDAS, A. Capability of Paraguaçu estuary (Todos os Santos Bay, Brazil) to form oil–SPM aggregates (OSA) and their ecotoxicological effects on pelagic and benthic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v. 114, p. 364-371, 2017.

ROMEIRO, R.S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Roteiro das aulas práticas. 2007.

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

SAFDARI, M.S.; KARIMINIA, H.; RAHMATI, M.; FAZLOLLAHI, F.; POLASKO, A.; MAHENDRA, S.; WILDING, V.W. Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 342, p. 270-278, 2018.

SAKAYA, K.; SALAM, D.; CAMPO, P. Assessment of crude oil bioremediation potential of seawater and sediments from the shore of Lebanon in laboratory microcosms. **Science of The Total Environment**, v. 660, p. 227- 235, 2019.

SÁNCHEZ, N.; CALAHORRA, M.; RAMIREZ, J.; PEÑA, A. Salinity and high pH affect energy pathways and growth in *Debaryomyces hansenii*. **Fungal Biology**, v. 122, p. 977-990, 2018.

SANTOS, H.F.; CARMO, F.L.; PAES, J.E.S.; ROSADO, A.S.; PEIXOTO, R.S. Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum. **Water Air Soil Pollut**, v.216, p. 329-350, 2011.

SARKAR, P.; ROY, A.; PAL, S.; MOHAPATRA, B.; KAZY, S.K.; MAITI, M.K.; SAR, P. Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 242, p.15-27, 2017.

SATTAR, A.; NAVEED, M. ALI, Z.; NADEEM, S.; YASEEN, M.; MEENA, V.; FAROOQ, M.; SINGH, R.; RAHMAN, M.; MEENA, N. Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review. **Applied Soil Ecology**, v. 133, p.146-159, 2019.

SILVA, S.; PRESOTTO, R.; MAROTA, H.; ZONTA, E. Uso de torta de mamona como fertilizante orgânico. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42 P. 19-27, 2012.

SOUZA, E.S. **Desenvolvimento de métodos de biorremediação aplicados a derrames de petróleo em água do mar: testes laboratoriais**. 315f. Tese (Doutorado em

Engenharia de Reservatório e de Exploração de Petróleo)- Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2003.

SUN, J.; KHELIFA, A.; ZHAO, C.; DONGFENG, Z.; WANG, Z. Laboratory investigation of oil-suspended particulate matter aggregation under different mixing conditions. **Science of The Total Environment**, v. 473-474, p. 742-749, 2014.

SUN, J.; KHELIFA, A.; ZHENG, X.; WANG, Z.; SO, L.L; WONG, S.; YANG, C.; FIELDHOUSE, B. A laboratory study on the kinetics of the formation of oil-suspended particulate matter aggregates using the NIST-1941b sediment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p.1701-1707, 2010.

TAM, N.; KE, L.; WANG, X.; WONG, Y. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangrove swamps. **Environmental Pollution**, v. 114, p. 255-263, 2001.

TRAN, D.; STROM, K. Suspended clays and silts: Are they independent or dependent fractions when it comes to settling in a turbulent suspension?. **Continental Shelf Research**, v. 138, p. 81-94, 2017.

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

WALKLEY, A.; BLACK, I.A. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, v. 37, p. 29-38, 1934.

WANG, S.; LIU, G.; YUAN, Z.; DA, C. n-Alkanes in sediments from the Yellow River Estuary, China: Occurrence, sources and historical sedimentary record. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.150, p.199-206, 2018.

ZHAO, L.; BOUFADEL, M.; GENG, X.; LEE, K.; KING, T.; ROBINSON, B.; FITZPATRICK, F. A-DROP: A predictive model for the formation of oil particle aggregates (OPAs). **Marine Pollution Bulletin**, v.106, p. 245-259, 2016.

ZHENG, H.; WU, X.; ZOU, G.; ZHOU, T.; LIU, Y.; RUA, R. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in manure-free piggery wastewater with high-strength ammonium for nutrients removal and biomass production: Effect of ammonium concentration, carbon/nitrogen ratio and pH. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 203-211, 2019.

Leoncio de Oliveira, Lua Morena
Influência de nutrientes na biodegradação de
hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) dispersados
pela formação de agregados óleo-MPS (OSAs) / Lua Morena
Leoncio de Oliveira, Lua Morena De Oliveira. --
Salvador, 2019.

55 f. : il

Orientador: Danúsia Ferreira Lima.

Coorientador: Icaro Thiago Andrade Moreira.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Geoquímica:
petróleo e meio ambiente) -- Universidade Federal da
Bahia, Instituto de Geociências, 2019.

1. Biodegradação de HTP a partir da dispersão pela
formação de OSAs associado ao uso da bioestimulação..
II. De Oliveira, Lua Morena. I. Ferreira Lima,
Danúsia. II. Andrade Moreira, Icaro Thiago. III.
Título.