



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

MILTON SANTOS CARDOSO FILHO

**BIORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS -
HPAs EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL ASSISTIDA EM BIORRETORES
ATRAVÉS DO FUNGO *ASPERGILLUS* SP. E DE EXTRATO VEGETAL**

Salvador

2020

MILTON SANTOS CARDOSO FILHO

**BIORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS -
HPAs EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL ASSISTIDA EM BIORRETORES
ATRAVÉS DO FUNGO ASPERGILLUS SP. E DE EXTRATO VEGETAL**

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

Orientador: Dr. Ícaro Thiago Andrade Moreira
Co-Orientadora: Dr^a Odete Gonçalves

Salvador

2020

Milton Santos Cardoso Filho

**BIORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS -
HPAs EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL ASSISTIDA EM BIORRETORES
ATRAVÉS DO FUNGO ASPERGILLUS SP. E DE EXTRATO VEGETAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Geoquímica do Petróleo e Ambiental, Instituto de Geociências da Universidade Federal da Bahia.

Salvador, 10 de jun de 2020

Banca examinadora

Ícaro Thiago Andrade Moreira _____
Doutor em Geologia Ambiental, Hidrogeologia e Recursos Hídricos pela Universidade Federal da Bahia – UFBA.
Universidade Federal da Bahia

Odete Gonçalves _____
Doutora em Biotecnologia Industrial pela Rede Nordeste de Biotecnologia Universidade Federal da Bahia – UFBA.
Universidade Federal da Bahia

Fabio Alexandre Chinália _____
Doutor em Environmental Microbiology pela University of Aberdeen
Universidade Federal da Bahia

Iara Furtado Santiago _____
Doutor em Microbiologia pela Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG-
Universidade Federal de Minas Gerais



Emitido em 10/06/2020

PARECER N° Folha de Aprovação/2020 - POSPETRO-GEO (12.01.14.05)

(N° do Documento: 1897)

(N° do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado eletronicamente em 02/09/2020 11:59)

ICARO THIAGO ANDRADE MOREIRA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

3897782

(Assinado eletronicamente em 02/09/2020 14:03)

FABIO ALEXANDRE CHINALIA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

1919894

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufba.br/documentos/> informando seu número:

1897, ano: **2020**, tipo: **PARECER**, data de emissão: **02/09/2020** e o código de verificação: **c566908cf8**

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer aos deuses por terem me dado força e me guiarem em todos os momentos dessa jornada, dos mais felizes aos mais difíceis eles estiveram sempre presentes.

Queria agradecer aos meus pais, Celeste M^a de Sena Barbosa e Milton Santos Cardoso (*in memoriam*), por terem me proporcionado o privilégio de me dedicar exclusivamente ao mestrado, possibilitando assim a execução de um trabalho que me encontro feliz e orgulhoso de ter concluído.

Agradeço à minha IC linda e maravilhosa, Camila Rozene, que atuou toda a minha cantoria no laboratório por três meses; ela foi um dos pilares que permitiu a conclusão de toda essa pesquisa e me fez evoluir como profissional dentro do ambiente acadêmico. Agradeço mais uma vez por toda a sua colaboração na execução e finalização do meu mestrado. Agradeço também à equipe maravilhosa de biorremediação, Janaína, Diego e Erick, pelo suporte em momentos cruciais de dúvidas, de desespero, de tristeza, e alegria.

Aos velhos amigos Raiany, Naiara, Samires e Camila Paim pelos bons momentos, sem vocês não seria possível, obrigado por estarem presente durante esse momento tão estressante em nossas vidas, mas que no final é sempre recompensador. À Lua, à Joana e Guilherme pelo suporte no campo de amostragem, a cervejinha no final da coleta foi a melhor parte, sou grato a vocês.

Aos novos amigos: Bruna pelo carinho instantâneo, Jules pelos momentos de descontração nos piores momentos do laboratório, Rodolfo por ter abandonado o barco e à Fernanda por ter tido toda a paciência comigo no laboratório de microbiologia; alô Gisele, obrigado por serem pessoas maravilhosas e por me aturarem quando eu estava estressado com o experimento, haha. Não menos amigos, mas por ocuparem uma posição especial eu gostaria de agradecer a toda a equipe do LEPETRO e POSPETRO, Liliane, Carol, Larissa, Gisele, Jorginho, Juci, Alex, Regina, Naná, Jean, Ruy, Ilene e Cícero.

Queria fazer um agradecimento especial à coordenadora e técnica do Laboratório a Dr^a Sarah Rocha, por todo o carinho e apoio que me foi dado durante toda a minha estadia no laboratório, fico muito grato pelo tempo e dedicação investidos em mim.

Falando em tempo e dedicação não posso esquecer da pessoa que me cedeu toda uma linha de pesquisa e materiais para eu realizar essa pesquisa, a minha Co-Orientadora, que na verdade foi uma Orientadora presente e atuante em toda a pesquisa a Prof^a Odete Gonçalves. Gostaria de agradecer imensamente as suas palavras, as orientações e tempo que foi me dado durante esses dois anos, finalizo hoje essa pesquisa muito contente com o resultado e orgulhoso por ter conseguido dar continuidade a algo que a senhora começou.

Agradeço também aos professores do Pospetro, que contribuíram com toda a minha formação durante o mestrado em especial à Prof^a Olívia Cordeiro de Oliveira, Prof^a Eliane Soares, Prof^a Danúsia de Oliveira e à Prof^a Gisele Mara Hadlich. Agradecer também à Iara Furtado pela parceira feita entre o Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG com a Universidade Federal da Bahia – UFBA, que possibilitou a identificação do microrganismo utilizado nesse estudo.

Por fim, mas não menos importante eu queria agradecer ao meu orientador Dr Ícaro Thiago Andrade Moreira, não só pelo mestrado, mas por toda a orientação me dada desde 2014. A primeira vez que eu assisti uma aula dele foi o divisor de águas em minha vida acadêmica. Obrigado por me ceder toda a estrutura física e acadêmica para eu poder seguir adiante, sou grato pelas oportunidades, pelos momentos e pelas palavras que me foram ditas.

Agradeço ao CNPq pelo investimento à pesquisa e a FAPESB pela concessão da bolsa de Mestrado.

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

RESUMO

Os manguezais são ecossistemas complexos e com grande importância ecológica para as regiões costeiras em todo o mundo, mas vem sendo ameaçado devido a diversas atividades relacionadas a indústria do petróleo em todo o mundo. A presente pesquisa tem como objetivo estudar o desenvolvimento tecnológico do uso de fungos e extrato vegetal na remediação hidrocarbonetos e avaliar a biodegradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos – HPAs em sedimento de manguezal a partir do uso da bioaugmentação com um fungo do gênero *Aspergillus* sp., e da bioestimulação com um extrato vegetal retirado da folha da *Alocasia Macrorrhizos (L.) g. don* em biorreatores. Como resultado foi possível observar que o desenvolvimento tecnológico voltado a recuperação de áreas impactadas por petróleo só obteve maior investimento a partir de 2012, sendo uma tecnologia ainda em desenvolvimento, que existe um baixo depósitos de invenções relacionadas a aplicação de fungos e extratos vegetais na biodegradação de hidrocarbonetos, que a maioria dos processos que envolvem a bioaugmentação são relacionados ao uso de bactérias hidrocabonoclasticas e que países como China e Estados Unidos da América são os que têm um maior número de invenções por conta do seu alto investimento em pesquisa. O experimento ocorreu em biorreatores contendo sedimento de manguezal e água estuarina, com o objetivo de proporcionar aos microrganismos presentes uma condição ambiental o mais próxima possível a natural. Como resultado as taxas de remoção foram maiores na condição onde houve a união de duas técnicas, bioaugmentação associada a bioestimulação, com 39,81% de remoção dos HPAs estudados, seguida pela bioestimulação com 28,53% de remoção, bioaugmentação com 23,57% de remoção e biorremediação intrínseca com 6,61% de remoção, sendo que a biodegradação de HPAs com baixo peso molecular foi maior do que dos HPAs de alto peso molecular, com destaque para o Pireno, o HPA de alto peso molecular que teve as maiores taxas de remoção nesse estudo e o extrato vegetal mostrou ser um bom agente bioestimulador de microrganismos indígenas em sedimento de manguezal, aumentando em cerca de 5 vezes os percentuais de degradação quando comparado a atenuação natural. A análise estatística apontou uma correlação positiva do Fósforo e do Nitrogênio na biodegradação de compostos como Naftaleno, Fluoreno, Acenaftileno, Pireno, Criseno, Benzo(a)Pireno e Dibenzo(a)antraceno.

Palavras-chave: Biorremediação, Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos, extrato vegetal, manguezal, petróleo.

ABSTRACT

Mangroves are complex ecosystems with great ecological importance for coastal regions around the world, but they have been threatened due to various activities related to the oil industry worldwide. This research aims to study the technological development of the use of fungi and hydrocarbon plant extract and to evaluate the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons - PAHs in mangrove sediments, using bio-augmentation with fungi of the genus *Aspergillus* sp., and of biostimulation with a plant extract taken from the leaf of *Alocasia Macrorrhizos* (L.) g.don in bioreactors. As a result, it was possible to observe the technological development aimed at the recovery of areas impacted by oil and the greater investment since 2012, being a technology still under development, that there is a low storage of inventions related to applications of fungi and plant extracts in hydrocarbon biodegradation, that most of the processes that involve bio-augmentation are related to the use of hydrocarbonotics and that countries like China and the United States of America are the ones that have a greater number of inventions due to their high investment in research. The experiment took place in bioreactors that include mangrove sediment and estuarine water, in order to offer the microorganisms present an environmental condition or the next most natural possible. As a result, removal rates were higher in the condition in which there was a union of two techniques, biostimulation associated with biostimulation, with 39.81% removal of PAHs studied, followed by biostimulation with 28.53% removal, biostimulation with 23.57 % removal and intrinsic bioremediation with 6.61% removal, and the biodegradation of low molecular weight PAHs was higher than high molecular weight PAHs, with emphasis on Pyrene, or high molecular weight PAH which had the highest removal rates in this study and plant extract shown as a good biostimulating agent for indigenous microorganisms in mangrove sediments, at about 5 times the percentage of degradation when displayed in natural attenuation. A statistical analysis showed a positive correlation between phosphorus and nitrogen in the biodegradation of compounds such as Naphthalene, Fluorene, Acenaftilene, Pyrene, Crisene, Benzo (a) Pyrene and Dibenzo (a) anthracene.

Keywords: Bioremediation, Aromatic Polycyclic Hydrocarbons, plant extract, mangrove, oil.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS.....	12
3	CENÁRIO TECNOLÓGICO DA BIORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS ASSISTIDA PELO USO DE FUNGOS E EXTRATOS VEGETAIS: PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA	13
3.1	INTRODUÇÃO	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
3.2	METODOLOGIA	15
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.4	CONCLUSÃO	23
3.5	AGRADECIMENTOS.....	23
4	BIORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS ASSISTIDA EM BIORREATOR COM O USO DO FUNGO <i>Aspergillus</i> sp. E DE EXTRATO VEGETAL	25
4.1	INTRODUÇÃO	26
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.2.1	Área de estudo	28
4.2.2	Sedimento de manguezal	29
4.2.3	Água estuarina.....	30
4.2.4	Extrato vegetal.....	30
4.2.5	Inóculo fúngico	31
4.2.6	Sistema de biorremediação	32
4.2.7	Protocolo para a montagem dos biorreatores	34
4.2.8	Caracterização geoquímica e microbiológica	34
4.2.8.1	<i>Nitrogênio amoniacal em água.....</i>	34
4.2.8.2	<i>Nitrogênio total em água.....</i>	34
4.2.8.3	<i>Fósforo total em água.....</i>	35
4.2.8.4	Fósforo assimilável.....	35
4.2.8.4.1	Fósforo assimilável em água.....	35
4.2.8.4.2	Fósforo assimilável em sedimento	36
4.2.8.5	<i>Fósforo total em sedimento.....</i>	36
4.2.8.6	<i>HPAs no sedimento.....</i>	37
4.2.8.7	<i>Carbono Orgânico Total (COT) e Nitrogênio total em sedimento</i>	38

4.8.2.8	<i>Unidades Formadora de Colônias - UFC</i>	38
4.2.8.9	<i>Identificação molecular do fungo</i>	39
4.2.8.10	<i>Análise estatística</i>	39
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÕES	40
4.3.1	Caracterização química	40
4.3.2	Comunidades fúngicas nos quatro modelos de remediação	41
4.3.3	Remoção de HPAs nas diferentes condições experimentais	43
4.3.4	Conclusão	51
4.4	AGRADECIMENTOS	52
5	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICE A	66

1 INTRODUÇÃO

Os manguezais são um dos ecossistemas mais sensíveis e produtivos ao longo das zonas costeiras de todo o mundo e segundo Sandilyan e Kathiresan (2012), a sua preservação é fundamental por conta da sua importância ecossistêmica, pois abriga uma ampla comunidade de plantas e animais com grande valor econômico e ecológico, mas que vêm sendo ameaçado em todo o mundo pela indústria petrolífera.

O Brasil detém 7% de todas as florestas de mangue do mundo e 50% da América do Sul (FAO, 2005), a sua preservação é de grande importância para a manutenção ecológica, pois reduz os impactos do aquecimento global ao absorver gases do efeito estufa (SIKIMAKI; SANCHIRICO; JARDINE, 2012). Além de contribuir para desenvolvimento local, pois é comum que as comunidades que vivem em torno desses ecossistemas façam o uso dos seus bens para o seu desenvolvimento econômico (TERCEIRO; SANTOS; CORREIA, 2013).

Segundo Hayden e Granek (2015), os manguezais servem como uma importante interface entre a terra e o mar, pois a sua vegetação funciona como um amortecedor físico ajudando na redução da energia das ondas impedindo a erosão costeira e a sedimentação dos ecossistemas marinhos, também atuando na regulação da qualidade da água, servindo como fonte alimentar para os humanos e animais (ONUBR, 2017).

Além disso, os microrganismos presentes nos manguezais têm papel fundamental na reciclagem de nutrientes, estabilização de sedimentos e promoção do crescimento da vegetação (ADAME et al., 2012; BOUCHEZ et al., 2013), atua como berçário para diversas espécies, pois fornece abrigo e alimento necessário para a sobrevivência dos animais marinhos nos primeiros estágios da vida (GIARRIZO et al., 2006; SILVA-CAMACHO et al., 2017). Sua preservação é um fator crucial para a reprodução e desenvolvimento de algumas espécies, como visto no trabalho de Serafy et al. (2015), onde a presença de 50% das espécies de peixes estudadas estão positivamente correlacionadas com a extensão das florestas de mangue.

Os manguezais estão sujeitos a impactos ambientais pois a sua contaminação pode ocorrer através de diferentes fontes seja do oceano, dos rios e do continente, que os tornam um local ideal para acumulação de poluentes como Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos - HPAs, devido as características únicas do ecossistema que contribuem para a acumulação desses contaminantes, como material particulado em abundância (BERNARD; PASCALINE; JEREMIE, 1996), condição anóxica e altas concentrações de matéria orgânica (WU et al., 2014; TAM et al., 2001), que são parâmetros que colaboram para a fixação e preservação dos HPAs nos manguezais.

Sabe-se que a contaminação por hidrocarbonetos no meio ambiente está relacionada com os processos de exploração de petróleo em todo o mundo, pois durante a prospecção, o refino, o transporte e nas operações de armazenamento, podem vir a ocorrer derramamentos acidentais ocasionando na contaminação de solos, rios, manguezais, praias e outros (AISLABIE; SAUL; FOGHT, 2004; MARÍN et al., 2006).

Segundo o ITOPIF, (2020) o volume total de petróleo perdido para o meio ambiente registrado em 2019 foi de aproximadamente 1.000 toneladas. E a presença de hidrocarbonetos nos manguezais pode causar diversos impactos negativos, como inibição do crescimento da vegetação, danos na membrana celular, no DNA/RNA, desajuste no metabolismo, desfolhação, diminuição do tamanho das folhas (Song et al., 2012; ALVES et al, 2001). A fauna que vive no manguezal também sofre efeitos crônicos por conta da exposição a hidrocarbonetos, como por exemplo anemia hemolítica em aves (LEIGHTON; PEAKALL; BUTLER, 1983).

Nos últimos anos diversas técnicas de biorremediação vêm sendo utilizadas nos processos de biodegradação de petróleo, e o uso de microrganismos nos processos de biorremediação vêm apresentando resultados positivos (LOUISA, 2010). Nas pesquisas relacionadas a biorremediação de solos e sedimentos contaminados por petróleo a bioaumentação e bioestimulação são as técnicas mais difundidas.

A bioaumentação consiste na introdução de microrganismos com capacidade de utilizar o contaminante como fonte de energia e/ou com capacidade de converter o contaminante em formas menos nocivas, consumindo-os e conseqüentemente diminuindo a sua concentração ao longo do tempo (DZIONEKE; WOJCZYZYNSKI; GUZIK, 2016). Enquanto a bioestimulação visa aumentar a atividade microbiana, com o intuito de acelerar e aumentar os percentuais de biodegradação através da adição de uma fonte menos complexa de nutrientes (LIU et al., 2018; MADUEÑO et al., 2011; WU et al., 2016).

A microrremediação, o uso de fungos nos processos de biodegradação, tem se mostrado como uma alternativa eficiente na recuperação de matrizes ambientais contaminadas com hidrocarbonetos (FRANCESCA; MOLLEA, 2019). Atualmente os trabalhos que visam identificar espécies de microrganismos com capacidade de sobrevivência a ambientes contaminados com petróleo, frequentemente encontram os fungos do gênero *Aspergillus* sp. em solos e sedimentos contaminados com hidrocarbonetos (EZEKOYE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2018; GHIZELINI et al., 2019). E esses fungos vêm sendo frequentemente utilizados em pesquisas devido a sua tolerância a altas concentrações hidrocarbonetos e da capacidade de utilizar o petróleo como fonte de carbono para o seu desenvolvimento (ALI KHAN et al., 2016).

Nesse contexto a presente pesquisa buscou avaliar a biodegradação de HPAs por meio do uso de biorreatores com o propósito de verificar o potencial do uso do extrato vegetal como bioestimulador de microrganismos autóctones e de um fungo do gênero *Aspergillus sp.* em sedimento de manguezal contaminado com petróleo da bacia do Recôncavo.

Para o desenvolvimento desse trabalho, foram utilizadas o uso de diferentes técnicas como bioestimulação, bioaugmentação e biorremediação intrínseca. Além de avaliar o atual cenário tecnológico no desenvolvimento de invenções relacionadas ao uso de extrato vegetais e fungos nos processos de biorremediação de hidrocarbonetos.

2 OBJETIVOS

Avaliar temporalmente o uso de um extrato vegetal extraído das folhas da *Alocasia macrorrhizos (L.) g. don*, conhecida popularmente como Orelha de Elefante Gigante, como bioestimulante e da bioaugmentação através de um fungo do gênero *Aspergillus* sp., na biodegradação de HPAs em sedimento de manguezal contaminado com petróleo da bacia do Recôncavo.

Os objetivos específicos são:

- a) Investigar o atual cenário tecnológico no desenvolvimento de tecnologias voltadas a biorremediação de hidrocarbonetos através do uso de fungos e extrato vegetais.
- b) Avaliar a eficiência de um sistema de biorreatores em batelada de operação contínua no desenvolvimento da técnica de bioestímulo e bioaumento.
- c) Monitorar temporalmente as concentrações de fósforo e nitrogênio na biodegradação de hidrocarbonetos.
- d) Avaliar a eficiência do extrato vegetal como bioestimulante de microrganismos autóctones e do fungo utilizado.
- e) Analisar a eficiência do fungo utilizado nesse estudo como a gente biorremediador em sedimento de manguezal contaminado com petróleo.

3 CENÁRIO TECNOLÓGICO DA BIORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS ASSISTIDA PELO USO DE FUNGOS E EXTRATOS VEGETAIS: PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA

RESUMO

A presente pesquisa visa a prospecção do atual cenário tecnológico no uso de fungos e extratos vegetais nos processos de biorremediação de hidrocarbonetos. Para o desenvolvimento dessa prospecção as informações foram retiradas do banco de dados do Espacenet, uma plataforma em nível mundial onde contém as principais informações sobre as patentes depositadas. A pesquisa foi feita através da utilização de palavras chaves e dos códigos de indexação B09C1/10 – Microbiologicamente, biologicamente ou usando enzimas e C02F2101/32 – Hidrocarbonetos ou petróleo, como resultado foi obtido a quantidade de patentes depositadas durante os anos, quais os principais inventores, quais empresas tem desenvolvidos novas tecnologias e a aplicabilidade dessas invenções. Foi constatado que o desenvolvimento biotecnológico voltado a biorremediação de áreas impactadas por hidrocarbonetos só obteve maior investimento a partir de 2012, tendo maior destaque para o ano de 2013 com 20 invenções depositadas. Palavras-chave: Prospecção, biotecnologias, extrato vegetal, fungos.

ABSTRACT

This research aims to explore the current technological scenario in the use of fungi and plant extracts in hydrocarbon bioremediation processes. For the development of this prospecting, the information was taken from the Espacenet database, a worldwide platform where it contains the main information about the patents filed. The research was done using keywords and indexing codes B09C1 / 10 - Microbiologically, biologically or using enzymes and C02F2101 / 32 - Hydrocarbons or petroleum, as a result the number of patents filed during the years was obtained, which are the main ones inventors, which companies have developed new technologies and the applicability of these inventions. It was found that the biotechnological development aimed at the recovery of areas impacted by hydrocarbons only obtained greater investment from 2012, with greater emphasis for the year 2013 with 20 inventions deposited. Keywords: Bioremediation, fungus, oil. Keywords: Prospecting, biotechnologies, plant extract, fungi.

3.1 INTRODUÇÃO

Segundo o ITOPF^a, (2020) o volume total de petróleo perdido para o meio ambiente registrado em 2019 foi de aproximadamente 1.000 toneladas, com a maior parte desse volume associada a grandes derramamentos. A presença de petróleo em ecossistemas marinhos e costeiros acarreta diversos impactos negativos a saúde ambiental das regiões diretamente atingidas, principalmente por conta dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos – HPAs, uma das frações constituintes do petróleo bruto (MAZEAS; BUDZINSKI, 2001).

Os HPAs são considerados poluentes orgânicos tóxicos com potencial carcinogênico e mutagênico, podendo afetar diretamente a saúde da fauna, da flora e dos seres humanos (PONGPIACHAN et al., 2018; KONG et al., 2018; MANARIOTIS et al., 2011; WOLSKA et al., 2012). E devido a serem lipossolúveis possuem predisposição a bioacumulação em tecido animal, causando uma série de efeitos negativos a saúde (ALEGBELEYE; OPEOLU; JACKSON., 2017).

A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) listou 16 HPAs como poluentes de controle prioritário, Acenafteno acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(ghi)perileno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-cd)pireno, naftaleno e pireno (EPA, 2014).

Devido aos HPAs de origem petrogênica estarem cada vez mais presente na natureza, diversos pesquisadores vêm estudando os impactos em diversas matrizes ambientais e métodos para recuperar essas áreas de forma sustentável, através do desenvolvimento de processos e invenções com potencial de serem utilizadas na biodegradação de petróleo em diferentes ambientes (ZENG et al., 2018, LOFTHUS et al., 2018, LI, J; LI, F; LIU., 2017).

Nos últimos anos diversas técnicas de biorremediação vêm sendo utilizadas nos processos de biodegradação de petróleo, e o uso de microrganismos nesses processos vêm apresentando resultados positivos (LOUISA, 2010). Nas pesquisas relacionadas a biorremediação de solos e sedimentos contaminados por petróleo a bioaumentação e bioestimulação são as técnicas mais difundidas.

A bioaumentação consiste na introdução de microrganismos com capacidade de utilizar o contaminante como fonte de energia e/ou com capacidade de converter o contaminante em formas menos nocivas, consumindo-os e conseqüentemente diminuindo a sua concentração ao longo do tempo (DZIONEKE; WOJCZYZYNK; GUZIK, 2016). Enquanto a bioestimulação visa aumentar a atividade microbiana, com o intuito de acelerar e aumentar os percentuais de biodegradação através da adição de uma fonte menos complexa de nutrientes (LIU et al., 2018; MADUEÑO et al., 2011; WU et al., 2016).

A prospecção tecnológica tem sido considerada fundamental para promover e direcionar o desenvolvimento científico, pois é possível através da prospecção de patentes, levantar as tecnologias existentes, as lacunas a serem preenchidas, as principais concorrentes e as suas variações, os principais inventores, os países que mais depositam invenções, principais empresas depositantes, entre outros dados, sendo possível avaliar se a tecnologia em questão já

foi desenvolvida, se já foi apropriada ou se já está sendo utilizada pela sociedade (QUINTELLA, C. M. et al, 2011).

Essa pesquisa tem como objetivo avaliar tendências tecnológicas voltadas aos processos de biorremediação de área impactadas por hidrocarbonetos com o uso de fungos e extrato vegetal como bioestimulante na biodegradação de HPAs.

3.2 METODOLOGIA

A metodologia consistiu na busca de patentes no banco de dados Web of Science – Espacenet, que se trata de uma plataforma online e gratuita para pesquisa e pedidos de patentes, desenvolvida pelo Escritório Europeu de Patentes (EPO), o qual possui documentos de diversos países contendo todas as informações relacionadas as invenções tecnológicas. A investigação reportou com o uso de palavras chaves e a combinação de códigos indexados, os dados obtidos foram utilizados na confecção dos quadros e figuras desse artigo.

Foi utilizado o Portal de Periódicos CAPES/MEC na revisão bibliográfica deste artigo, o Portal CAPES/MEC atualmente disponibiliza a instituições de ensino e pesquisa no Brasil o melhor da produção científica internacional de forma online e gratuita. Com um acervo de mais de 45 mil títulos com texto completo, 130 bases referenciais, 12 bases dedicadas exclusivamente a patentes, além de livros, enciclopédias e obras de referência, normas técnicas, estatísticas e conteúdo audiovisual (CAPES/MEC, 2019).

Feita a prospecção foi identificado quais são os principais países responsáveis pelo depósito dessas invenções, quais são as suas aplicabilidades, os principais autores e as indústrias interessadas na tecnologia em questão.

Os códigos de indexação de interesse e suas combinações estão apresentadas na Tabela 01 juntamente com o número de invenções encontradas no universo dos registros de patentes para os quais utilizou-se operadores booleanos AND e OR com o intuito de capturar conteúdos mais específicos dessa prospecção.

O levantamento patentário por prospecção científica tecnológica foi realizado em setembro de 2019. O grupo de patentes selecionados para a prospecção corresponde a utilização os códigos de indexação B09C1/10 que caracteriza B como realizando operações + 09C como reclamação de solo contaminado, totalizando B09C1/10 como microbiologicamente, biologicamente ou usando enzimas, o que corresponde a tornar o solo contaminado inofensivo por meio de tratamento biológico.

Quadro 01 – Descrição dos códigos de indexação na busca das patentes na Web of Science – Espacenet - EPO

CÓDIGO	DESCRIÇÃO
A62D3/02	Por métodos biológicos, ou seja, processos usando enzimas ou microrganismos
C12R 1/00	Processos usando microrganismos
Y10S435/821	Microrganismos utilizados na destruição de resíduos perigosos ou tóxicos
C12R1/645	Usando fungo
B09C 1/105	Remoção de contaminantes de solo contaminado por fungos ou plantas
C02F2101	Natureza do contaminantes
C02F2101/32	Hidrocarbonetos ou petróleo
C02F2101/327	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos [HPAs]
B09	Eliminação de resíduos sólidos; Reclamação de solo contaminado
B09C1/00	Recuperação de solo contaminado
C12R1	Processos usando microrganismos
Y10S435/911	Usando fungo

Fonte: Autor, 2019.

Tal código se justifica porque é um subtópico dos códigos B09C1 (Recuperação de solos contaminados) e C02F2101/32 que caracteriza C como Química + 02 como tratamento de resíduos + F2 como a natureza do contaminante os compostos orgânicos totalizando C02F2101/32 como Hidrocarbonetos, por exemplo, óleo. Além destes foram investigados outros e todos os códigos de indexação utilizados na prospecção encontram-se no Quadro 01 juntamente com a sua descrição.

Como resultado da prospecção foram geradas figuras com os dados obtidos com a partir do Espacenet, o tratamento desses dados fora feitos utilizando o software Microsoft Excel 2016.

Tabela 01 – Palavras Chaves e Códigos de indexação e números de patentes encontrados com a sua combinação no banco de dados Web of Science – Espacenet - EPO

Bioremediation	Biodegradation	PAH	Plant Extract	Fungus	B09	B09C1/10	B09C1/105	C02F2101/32	C12R1/00	C12R1/645	Y10S435/821	A62D3/02	C02F2101/327	Total
	X													5975
		X				X								1670
							X	X						928
						X								320
					X								X	78
						X		X	X					60
										X		X		29
X				X										23
						X		X				X		15
						X					X			14
X		X												9
X			X											3
		X		X										3

Fonte: Autor, 2019.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise do conteúdo foi possível identificar o avanço do desenvolvimento tecnológico na área ambiental nos últimos anos, foi encontrado um total de 320 patentes, com 148 famílias, com uma cobertura da base de dados de 99%, com esse tipo de tecnologia sendo solicitado em média em 2,16 países.

A Figura 01 demonstra as empresas e universidades que mais depositaram patentes pertinentes a prospecção, dentre as empresas destaca-se a IET - Innovative Environmental Technologies, voltada ao desenvolvimento e implementação de alternativas corretivas in-situ e ex-situ, utilizando-se de equipamentos projetados, patenteados e licenciados tendo 15 patentes depositadas pela mesma nos últimos 23 anos de atuação.

A IET conta com 7 depósitos de patentes, US2017239699, BR112015028317, US2018001358, US2018093308, EP2969977, EP2994428 e US2015183670, relacionadas a estabilização de metais tóxicos, remoção de compostos orgânicos semi-voláteis em solos, lamas, águas subterrâneas, águas de produção e águas residuais através de processos de oxidação, atenuação biológica e uso de enzimas na biodegradação (IET, 2018).

Outras empresas também se destacaram como a Thermocyclomics, LLC com uma patente, WO2013116830A1, voltada a biorremediação de contaminantes orgânicos em solo,

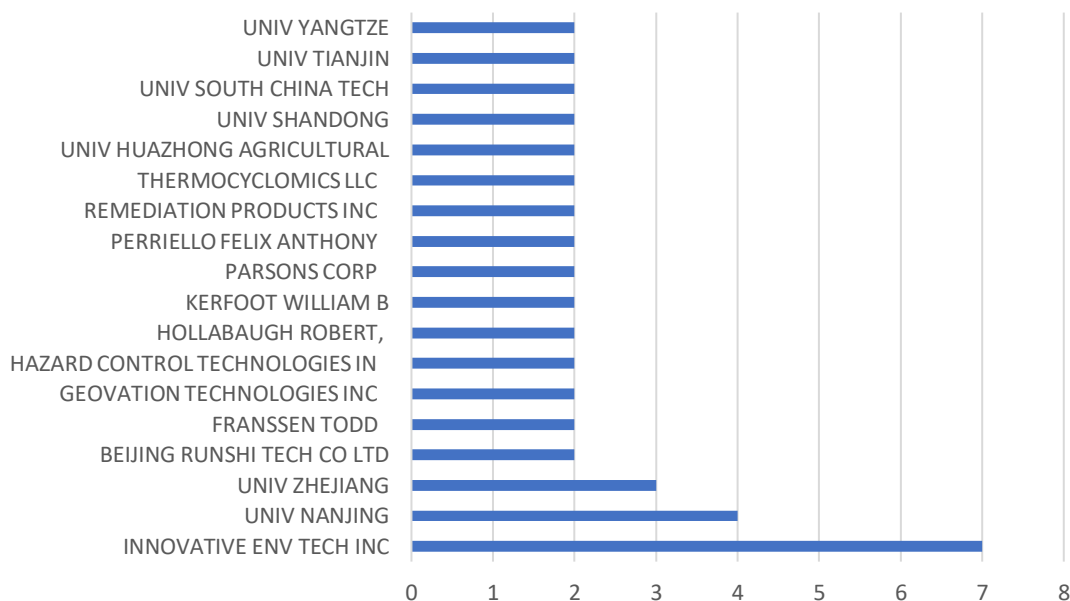
sedimentos ou águas residuais contaminadas. A Remediation Products apresenta uma patente, US20180297871A1, de uma composição para remediação *in situ* de solo e água subterrânea contaminada com hidrocarbonetos na qual descreve um método de biorremediação para áreas contendo hidrocarbonetos e compostos halogenados através da introdução de microrganismos com capacidade de biodegradar hidrocarbonetos.

E a segunda patente, US20190217354A1, sobre uma composição para remediação *in situ* do solo e águas subterrâneas contaminadas com hidrocarbonetos através do uso de um material adsorvente, um composto contendo sulfato e um sistema com nutrientes para promover microrganismos anaeróbios facultativos.

Dentre as universidades destacaram duas a Zhejiang University e Nanjing University, ambas chinesas. A China atualmente é uma potência mundial possuindo 6 instituições de ensino superior ocupando o "top 100" das melhores universidades do mundo (ABMES, 2019), a Zhejiang University ocupa 5ª posição das melhores universidades chinesas, com mais de 2000 patentes de invenções depositadas até 2017 (ZJU, 2019) e a Nanjing University que ocupa a 7ª posição.

A Zhejiang University possui, nessa prospecção, 3 patentes relacionadas a imobilização de enzimas para serem utilizadas na biodegradação de petróleo e na aplicação de bactérias e biossurfactantes na degradação de n-hexadecano e a Nanjing University com 4 patentes de uso de cepas bacterianas como agente de biodegradação de petróleo.

Figura 01 – Depósito de patentes por empresa e universidades



Fonte: Autoria própria, 2019.

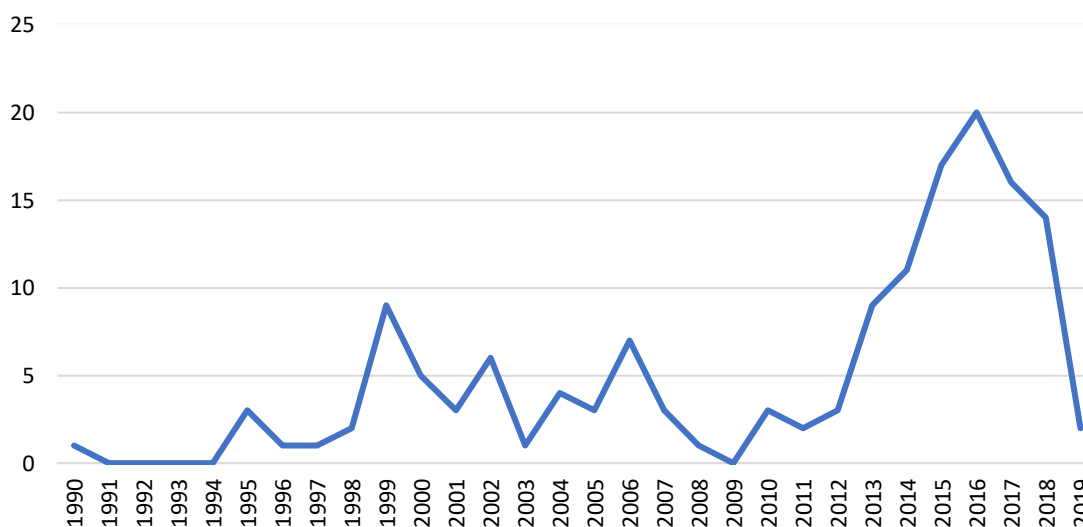
Relacionada ao uso de extratos vegetais na biorremediação de compostos orgânicos, foi encontrada apenas uma única patente “Natural-origin enzymatic bioremediation with wide applicability, the substrate being an environment consisting of extracts from oleaginous vegetable sources added to an isomer mixture”, com inventores brasileiros e depositada como uma PCT - Patent Cooperation Treaty.

Essa invenção traz uma inovação técnica para a manipulação de elementos enzimáticos de origem natural desenvolvidos utilizando as enzimas para biopolimerização de um ambiente específico com características biodegradáveis, usando como substrato um elemento constituído por extratos de fontes vegetais oleaginosas adicionadas a uma mistura de isômero.

Quanto ao cenário brasileiro, nessa prospecção foi encontrada uma única patente depositada pela Universidade Salvador em dezembro de 2017 sobre um Sistema para tratamento de águas, solos e sedimentos poluídos por petróleo, metais pesados, efluentes industriais e lodo de esgoto através da aplicação de espécies vegetais e microrganismos bentônicos.

Na evolução do depósito de patentes, Figura 02, houve um pequeno aumento no final da década de 90 com uma média de 1 patente por ano, com destaque para o ano de 2003 com 8 patentes registradas relacionadas a uso de processos naturais na biodegradação de hidrocarbonetos, logo após esse período houve um declínio e tendo um novo aumento considerável no ano de 2013, sendo o ano de 2016 onde houve o maior número de patentes depositadas, 20 patentes encontradas, com a sua grande maioria voltadas a utilização de microrganismos como agentes de remoção e biodegradação de compostos orgânicos tóxicos.

Figura 02 – Depósito de patentes por ano



Fonte: Autor, 2019.

Essa baixa na década de 90 pode ser justificada devido ao alto investimento de países como Estados Unidos, Japão, França e Reino Unido na decodificação do código genético humano ao longo de 10 anos no Programa Genoma humano. Dessa forma direcionou as pesquisas, que como consequência limitou o desenvolvimento de biotecnologias, pois o desenvolvimento tecnológico ficou direcionado a produtos relacionados a medicina e farmácia (MAYOR, 1992). Rio 92, epa e reino unido

Enquanto que o aumento no final da década de 90 e início dos anos 2000, pode ter ocorrido por conta do grande volume de petróleo perdido entre 1991 e 1996 de cerca de 732,000 toneladas de petróleo (ITOPF^b, 2020), que como consequência foi criada uma demanda de tecnologias para a remoção do petróleo e recuperação desses ambientes contaminados por conta dessa série de derramamentos.

E do fato que em 1992 a agenda ambiental começava a ganhar destaque entre as nações, o que acarretou na conferência das Nações Unidas, popularmente conhecida como Eco-92, com a presença de 178 países, onde foi discutido a criação de parâmetros para a proteção da biodiversidade, assim os países seriam responsáveis de desenvolver e fornecer tecnologias para alcançar um novo modelo de desenvolvimento que fosse sustentável, principalmente para a redução dos padrões de consumo de combustíveis fósseis (OLIVEIRA, 2012).

O aumento após 2014 pode ser devido a quantidade de substâncias geradas nos processos industriais nos últimos anos, que causa impactos negativos ao meio ambiente. Em vista disso, quantidades consideráveis de resíduos industriais começaram a ser produzidos e consequentemente afetando na capacidade ambiental de auto-depuração desses poluentes, assim criando a necessidade em investir em novas tecnologias que fossem baratas e ecologicamente corretas para a remediação de diversas áreas impactadas por atividades antropogênicas (GODECK; NAIME; FIGUEIREDO, 2012)

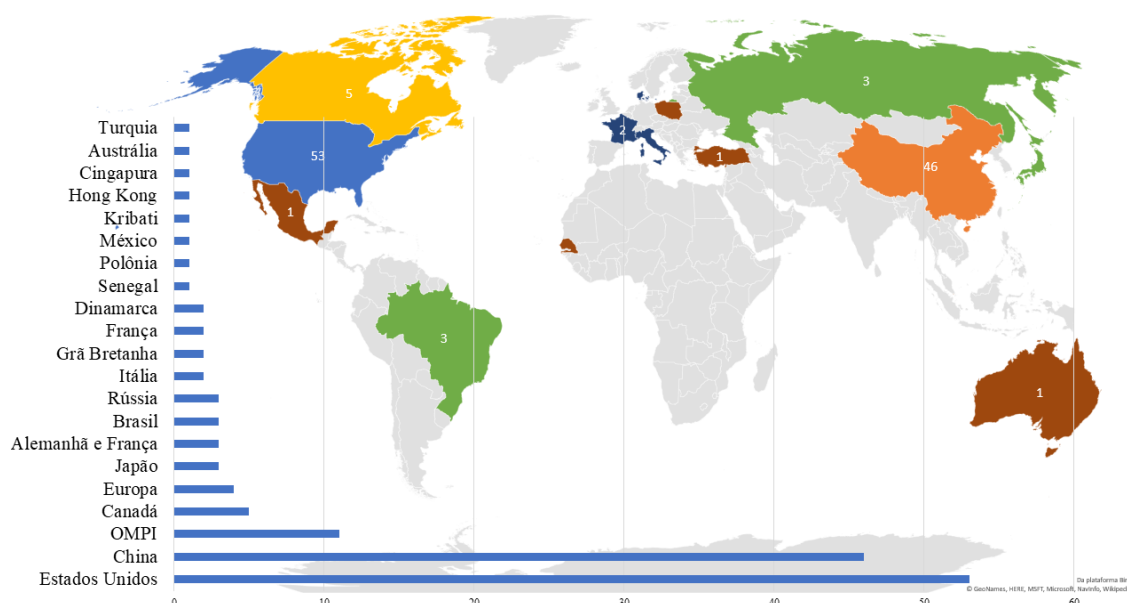
A primeira patente nessa prospecção foi depositada pelo Japão no qual é descrito um processo de purificação e processamento de materiais contaminados. E a última invenção depositada em 2019 pelo Canadá, sobre a aplicação de uma bactéria do gênero *Pseudomonas*, isolada de um solo contaminado com petróleo, como agente de biodegradação de hidrocarbonetos.

Em seguida uma patente depositada pelos Estados Unidos que na qual descreve um método de bioremediação de solos e águas subterrâneas contendo hidrocarbonetos e compostos halogenados através de composições. Esta descreve uma metodologia tecnológica que conta com um consórcio microbiano com capacidade de biodegradar hidrocarbonetos, um segundo

consórcio com capacidade de degradar compostos halogenados, um composto orgânico e um terceiro consórcio com capacidade de biodegradar o composto orgânico.

Na Figura 03 é ilustrado os países que possuem o maior número de patentes depositadas. Os Estados Unidos lidera o ranking com 55 patentes relacionadas com a biorremediação de compostos orgânicos com a utilização de microrganismos, com fibras de plantas e na utilização de resíduos agrícolas como fonte nutricional na biorremediação de hidrocarbonetos.

Figura 03 – Principais países depositantes de patentes



Fonte: Autor, 2019.

Os Estados Unidos atualmente é uma das maiores economias mundiais que mais investem em tecnologia tendo a maioria de suas patentes depositadas por empresas. Enquanto a China conta com 46 patentes, relacionadas a utilização de culturas microbianas na biorremediação, na recuperação de petróleo através de processos microbianos, métodos para tratamentos de solos contaminados com petróleo, imobilização de enzimas degradadoras de petróleo e etc, com todas as suas patentes depositadas pelas universidades do país.

Os Estados Unidos e a China possuem um maior número de depósito de patentes, Luna et al., (2015), encontrou um resultado semelhante, onde a China e os Estados Unidos eram os maiores depositantes de patentes relacionados a recuperação de áreas impactadas por petróleo, também foi observado que a maioria dessas patentes estavam relacionadas ao uso de microrganismos no tratamento desse contaminante.

E na pesquisa feita por Quintella, Mata e Lima., (2019), onde foi feito uma avaliação do desenvolvimento tecnológico na biorremediação de petróleo com o uso de fungos, também

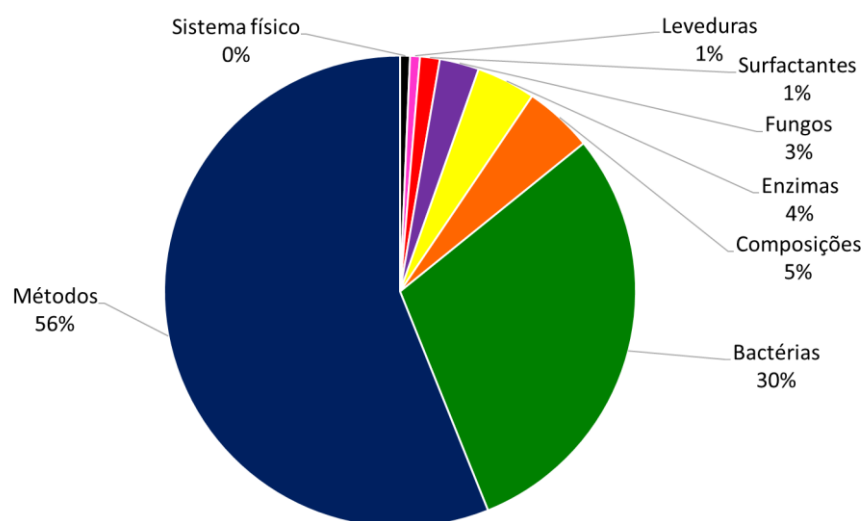
identificou que a maioria das patentes são originária da China e dos Estados Unidos e que sua grande maioria tem as bactérias, fungos e enzimas como agentes promotores da biorremediação.

Esse alto número de invenções pode ser justificado devido a serem países com altos investimentos em pesquisas de P&D, com isso os EUA superaram os 31 bilhões de reais de investimento nas áreas da ciência da vida, engenharias, física, ciências ambientais, ciências da computação e matemática, psicologia, ciências sociais e outros (NSF, 2019), e a China 685 bilhões de reais em investimento em educação superior (CHINA, 2019), o que justifica o alto depósitos de patentes.

Outro fator que pode ter influenciado esse grande investimento da China e dos Estados Unidos em biotecnologias para a recuperação dessas áreas contaminadas é a sua grande produção e consumo de petróleo e derivados. Segundo O instituto brasileiro de petróleo e gás, (2020), os Estados Unidos e a China lideraram o consumo de petróleo em 2019, somando juntos 34% do consumo mundial.

Entre os principais processos e produtos, Figura 04, destacam-se as invenções referentes a métodos de biorremediação, que refere-se a metodologias que descrevem a forma de aplicação de agentes oxidativos, estimulantes e adsorptivos em um processo de remediação, estas são as que representam a maior parte de todas as patentes dessa prospecção, obtendo o total de 56% de todas as invenções, seguido do uso de bactérias com 30%.

Figura 04 – Principais processos e produtos das patentes selecionadas



Fonte: Autor, 2019.

É possível observar que o uso de fungos em tecnologias de biorremediação é ainda algo pouco expressivo em comparação ao uso de bactérias, nessa prospecção, apesar de que atualmente o seu uso já é algo difundido e que apresenta bons resultados de fungos de diversos gêneros na biodegradação de hidrocarbonetos (FRANCESCA, B; MOLLEA, C, 2019).

3.4 CONCLUSÃO

Nessa prospecção foi possível concluir que a tendência tecnológica nos processos de biorremediação de hidrocarbonetos estão relacionadas a métodos específicos e ao uso de bactérias hidrocarbonoclásticas, o uso de fungos e extratos vegetais foram considerados tecnologias inexpressivas em relação as demais devido ao baixo número de patentes, o que necessariamente não quer dizer que o uso de fungos ou extratos sejam tecnologias ineficientes, pois diversas pesquisas vêm apontando o seu potencial nos processos de biorremediação.

O baixo depósito de invenções relacionadas ao uso de fungos e extrato vegetais é um indicativo de ser uma área pouco desenvolvida ou em desenvolvimento, dando perspectiva para a exploração desse nicho tecnológico.

Os Estados Unidos e a China são os que possuem o maior número de patentes depositadas, um resultado já esperado, por conta do alto investimento em educação e desenvolvimento tecnológico desses países.

Enquanto que no Brasil foi encontrado uma única patente nacional, provavelmente por conta do baixo investimento em pesquisas aplicadas a biorremediação quando comparado ao Estados Unidos e China, revelando a necessidade de mais investimentos em tecnologias utilizando microrganismos ou bioprodutos na biodegradação de hidrocarbonetos no Brasil.

3.5 AGRADECIMENTOS

Essa pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq através do projeto “Desenvolvimento de Multibioprocessos 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, tendo com alicerce laboratorial o Centro de Excelência em Geoquímica: LEPETRO, no Instituto de Geociências – IGEO da Universidade Federal da Bahia – UFBA, através do programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente – POSPETRO. O autor desse estudo científico recebeu uma bolsa como auxílio da Fundação de Amparo à

Pesquisa da Bahia – FAPESB (BOL0468/2018). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

4 BIORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS ASSISTIDA EM BIORREATOR COM O USO DO FUNGO *Aspergillus* sp. E DE EXTRATO VEGETAL

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs são uns dos principais problemas associados à contaminação por petróleo em diversos ecossistemas marinhos e costeiros devido a sua natureza tóxica, carcinogênica e mutagênica. Diversas técnicas têm sido estudadas com o intuito de remediar de forma natural esses compostos, como a bioaumentação, bioestimulação e o uso de biorreatores. Nesta pesquisa foi avaliado a biodegradação de HPAs em sedimento de manguezal contaminado com petróleo da bacia do Recôncavo, através da bioaumentação utilizando um fungo do gênero *Aspergillus* sp. e da bioestimulação utilizando um extrato vegetal extraído da *Alocasia Macrorrhizos* (L.) G. Don. O processo foi realizado em biorreatores contendo sedimento de manguezal e água estuarina afim de proporcionar um ambiente mais próximo ao natural, simulando o regime de maré, como resultado a união de técnicas, bioaumentação associada a bioestimulação, obteve maiores taxas de remoção, 39% de HPAs. Em comparação a aplicação de uma única técnica, a remoção de HPAs de baixo peso molecular foi mais expressiva quando comparada aos HPAs de alto peso molecular, o extrato vegetal mostrou ser um bom agente bioestimulador de microrganismos indígenas em sedimento de manguezal, aumentando em cerca de 5 vezes os percentuais de degradação quando comparado a atenuação natural e contribuindo para o aumento da densidade microbiana nas condições experimentais que não receberam o extrato. Quanto a análise estatística foi observada uma forte correlação nas concentrações de Fósforo e Nitrogênio na degradação de compostos como Naftaleno, Fluoreno, Acenaftileno, Pireno, Criseno, Benzo(a)Pireno e Dibenzo(a)antraceno.

Palavras-chave: fungos, manguezal, biodegradação, extrato vegetal.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons - PAHs are one of the main problems associated with oil contamination in several marine and coastal ecosystems due to their toxic, carcinogenic and mutagenic nature. Several techniques have been studied in order to naturally remedy these compounds, such as bio-augmentation, biostimulation and the use of bioreactors. In this research it was evaluated the biodegradation of PAHs in mangrove sediment contaminated with oil from the Recôncavo Basin, through bio-augmentation using a fungus of the genus *Aspergillus* sp. and biostimulation using a plant extract extracted from *Alocasia Macrorrhizos* (L.) G. Don. The process was carried out in bioreactors containing mangrove sediment and estuarine water in order to provide an environment closer to the natural, simulating the tidal regime, as a result the combination of techniques, bioincrease associated with biostimulation, obtained higher removal rates, 39% of PAHs. In comparison to the application of a single technique, the removal of low molecular weight PAHs was more expressive when compared to high molecular weight PAHs, the plant extract proved to be a good biostimulating agent of indigenous microorganisms in mangrove sediment, increasing by about 5 times the percentage of degradation when compared to natural attenuation and contributing to the increase of microbial density in experimental conditions that did not receive the extract. Regarding the statistical analysis, a strong correlation was observed in the concentrations of phosphorus and nitrogen in the degradation of compounds such as Naphthalene, Fluorene, Acenaftilene, Pyrene, Crisene, Benzo (a) Pyrene and Dibenzo (a) anthracene.

Keywords: fungus, mangrove, biodegradation, vegetable extract.

4.1 INTRODUÇÃO

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos – HPAs são uma das principais frações do petróleo, podendo corresponder de 25 a 40% de toda a sua massa (MAZEAS; BUDZINSKI, 2001; TISSOT; WELTE, 1984). Estudos mostram que os HPAs tendem a sofrer processos cumulativos em áreas com sedimentos e solos ricos em matéria orgânica (MEIRE; AZEREDO; TORRES, 2007). E por serem lipossolúveis possuem predisposição a bioacumulação em sistemas biológicos, podendo vir a causar um impacto maior à medida que o tempo de exposição aos organismos presentes no ambiente contaminado aumenta.

Os HPAs são tóxicos, com potencial carcinogênico e mutagênico e por conta da sua natureza tóxica e persistente na natureza. A Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA) listou 16 HPAs como poluentes de controle prioritário, Acenafteno acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(ghi)perileno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-cd)pireno, naftaleno e pireno (EPA, 2014).

A contaminação por petróleo tornou-se uma ameaça à sociedade humana e aos ambientes naturais, principalmente a ecossistemas importantes e sensíveis como os manguezais, especialmente pelos HPAs serem altamente hidrofóbicos, recalcitrantes e persistentes, o que os tornam difíceis de serem remediados, tornando um contaminante com alta biotoxicidade. Atualmente existem diversos métodos para a remoção de hidrocarbonetos em solos e sedimentos, como os processos físico-químicos e biológicos. Os métodos físico-químicos são efetivos, mas quando comparado aos processos biológicos eles são mais caros, mais trabalhosos e requerem uma alta demanda energética, além de precisar de uma grande quantidade de reagentes químicos (HARITASH; KAUSHIK, 2009).

A biorremediação é uma alternativa viável e ecologicamente correta para recuperar diversas matrizes ambientais contaminadas com hidrocarbonetos, por ser uma técnica baseada em mecanismos biológicos para degradar, desintoxicar, mineralizar ou transformar contaminantes no meio ambiente (LIU et al., 2017; IMAM et al., 2019).

Dentre as técnicas de biorremediação que visam aumentar os percentuais de remoção do contaminante destacam-se a bioaugmentação e a bioestimulação, por conta da alta eficiência de remoção e possibilidade de atuar sobre uma grande variedade de contaminantes (HALEYUR et al., 2019).

A bioaugmentação consiste na inserção de microrganismos capazes de biodegradar moléculas recalcitrantes no ambiente poluído. Normalmente a bioaugmentação é utilizada

quando o poluente apresenta características como alta toxicidade, baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade, alta estabilidade e baixa biodegradabilidade (NZILA; RAZZAK; ZHU., 2016).

E segundo Koshlaf et al., (2016) a bioestimulação tem como objetivo fornecer uma fonte menos complexa de alimento aos microrganismos presentes no solo, através da adição de nutrientes, normalmente nitrogênio e fósforo, para melhorar a atividade microbiana, tornando a remoção dos HPAs mais eficiente e mais rápida.

Na bioaugmentação os fungos do gênero *Aspergillus* sp. são comumente utilizados por conta da sua tolerância a altas concentrações de hidrocarbonetos e por apresentarem resultados satisfatórios quanto a remoção de hidrocarbonetos, como visto na pesquisa de Zafra et al., (2014), onde foram isolados cerca de 50 fungos de um solo contaminado com petróleo no qual as cepas do gênero *Aspergillus* spp. apresentaram tolerância a concentrações de até 6000 mg L⁻¹ de diferentes HPAs. Na remoção total de 15 HPAs, em uma concentração de 500 ppm, em águas residuais de uma biorrefinaria com alta concentração salina (GONZALEZ-ABRADELO et al., 2019). Indicando potencial na utilização da espécie para remover compostos complexos como hidrocarbonetos.

Além do uso da bioestimulação e da bioaugmentação, a biorremediação também pode ocorrer através do uso de reatores biológicos, biorreatores, tanto em condições aeróbias como anaeróbicas. O uso de biorreatores apresenta diversas vantagens pois permitem o aumento da biodisponibilidade do contaminante, é possível controlar e otimizar o processo de biorremediação com precisão através do ajuste de parâmetros físico-químicos (PINO-HERRERA et al., 2017). Portanto, os biorreatores proporcionam um ambiente ideal para a biodegradação de poluentes químicos orgânicos, sendo considerado uma boa opção para tratamento de solos e sedimentos superficiais poluídos com produtos químicos recalcitrantes.

A degradação microbiana com o uso de biorreatores é uma técnica, ainda pouco difundida, para a recuperação de sedimentos contaminados por hidrocarbonetos (GAN; LAU; NG, 2009). Dentre os microrganismos utilizados, destaca-se os fungos, pois possuem a capacidade bioquímica de degradar produtos químicos orgânicos, devido a sua capacidade de produzir enzimas degradantes de poluentes, como a Lacase (Lac), peroxidase de manganês (MnP) e lignina peroxidase (LiP), que são responsáveis por catalisar uma variedade de compostos, inclusive HPAs (YE et al., 2011; EIBES et al., 2005; SILVA et al., 2011; ZHANG et al., 2016).

Tendo como referência a pesquisa realizada por Quintella, Almeida e Gonçalves, (2017) onde foi desenvolvido o método para a extração do princípio ativo da folha de uma planta da

família Aracea, com o objetivo de melhorar a fluidez do petróleo com o extrato vegetal e também mostrou ser eficiente na biodegradação de HPAs, o que resultou na patente de número do registro BR1020170030520. E na pesquisa realizada por Luna (2018) que resultou na redução de 89,88% de HPAs e 87,60% de HTPs em solo contaminado com petróleo através da utilização do extrato vegetal.

A presente pesquisa tem como objetivo avaliar diferentes técnicas de bioremediação de HPAs em sistemas de reatores, com a finalidade avaliar o potencial da cepa fúngica e do extrato vegetal na biodegradação de HPAs em sedimento de manguezal, simulando condições próximas de um ambiente natural através do uso de biorreatores.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Área de estudo

As amostras de sedimento para a realização dos ensaios laboratoriais foram coletadas no manguezal do rio São Paulo, Figura 02, localizado na cidade de São Francisco do Conde, BA – Brasil, com coordenadas UTM 12°43'04.9"S 38°32'44.9"O, esse mesmo rio desagua na Baía de Todos os Santos (BTS) localizada nas bordas da terceira maior cidade brasileira, Salvador, capital da Bahia, apresenta uma área de 1233 km², sendo a segunda maior baía do Brasil, dentre as baía da costa leste brasileira é a única que apresenta dez terminais portuários de grande porte. A BTS apresenta uma grande riqueza em relação a extensão de recifes de corais, estuários e manguezais (HATJE; ANDRADE, 2009).

A BTS ganhou destaque devido às diversas atividades ligadas a indústria petrolífera, após a fundação da Petrobrás na década de 50. A região norte da BTS sofreu na segunda metade do século XX inúmeros derramamentos de petróleo (CELINO; QUEIROZ., 2006), sendo o último registrado em Junho de 2018, onde cerca de 3 m³ de água oleosa vazou e atingiu diretamente os manguezais do rio São Paulo (G1, 2018) e derramamento ocorrido em setembro de 2019 no litoral do nordeste brasileiro, onde cerca de 130 praias foram atingidas (G1, 2019), não há informação oficial sobre a quantidade total de óleo derramado.

Figura 02 – Estação de amostragem localizada no manguezal do rio São Paulo



Fonte: Autor, 2019.

Além da indústria petrolífera a BTS é vizinha da base Naval de Aratu e do maior polo petroquímico do hemisfério sul, onde as principais atividades desenvolvidas são químicas, petroquímicas, metalúrgicas, de produtos alimentícios e fertilizantes (ROCHA et al., 2012), o que torna a região bastante vulnerável a impactos ambientais, principalmente os manguezais por serem considerados ecossistemas sensíveis e com bastante valor ambiental e econômico agregado.

4.2.2 Sedimento de manguezal

O sedimento utilizado nesse estudo foi recolhido com o auxílio de uma pá de aço inoxidável e posteriormente acondicionado em recipientes de alumínio, previamente calcinados a 400°C durante 4h, a fim de eliminar qualquer tipo de contaminação, as características desse sedimento foram: Carbono Orgânico Total 1,6 mg kg⁻¹, Fósforo Total 302, 5 mg kg⁻¹, Fósforo Inorgânico 1577 mg kg⁻¹, Nitrogênio Total < LQM (≤ 0,10%). Com concentração total dos 16 HPAs estabelecidos pela EPA dos EUA como poluentes de controle prioritário foi de 359,72 µg kg⁻¹.

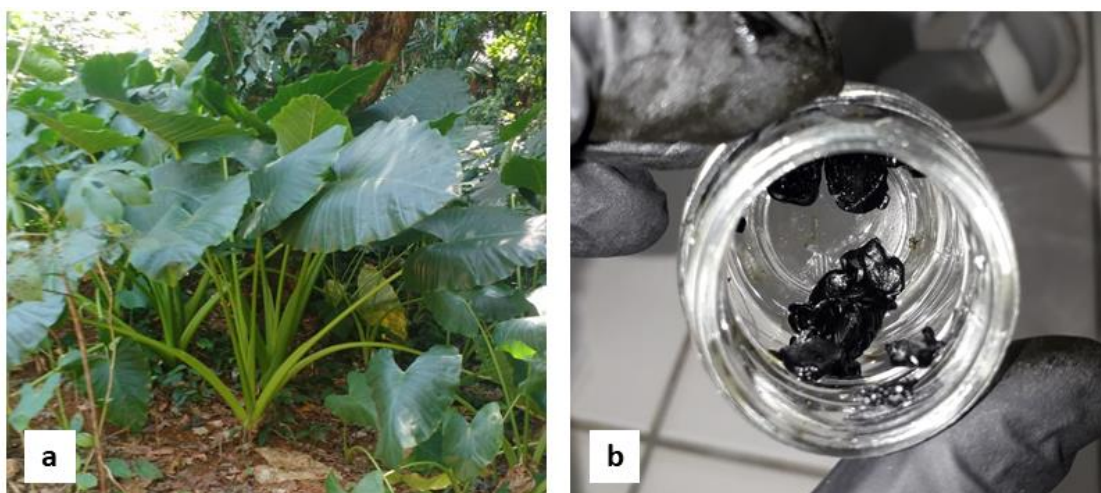
4.2.3 Água estuarina

A água utilizada nos biorreatores foi coletada as margens do rio São Paulo, em uma estação de amostragem próxima a área onde foi coletado o sedimento. As características básicas da água foram pH 7,5, temperatura 28° C, Oxigênio dissolvido 90% e Salinidade 29, Nitrogênio Amoniacoal 0,9 mg L⁻¹, Nitrato 19,6 mg L⁻¹ Fósforo total 0,11 mg L⁻¹ e Fósforo assimilável ≤ LQM (0,005 mg L⁻¹).

4.2.4 Extrato vegetal

O extrato foi extraído da Orelha de Elefante Gigante (OG) é o nome popular dado *Alocasia Macrorrhizos (l.) g. Don*, como visto na Figura 03, pois toda sua estrutura (folha, caule e raiz) contém grandes concentrações de Oxalato de Cálcio (CaC₂O₄) (FIOCRUZ, 2018). Foi identificada no Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, no Departamento de Botânica como sendo da família Aracea, cujo nome científico é *Alocasia Macrorrhizos (l.) g. Don*. A extração foi feita seguindo o protocolo da patente de número do registro BR1020170030520.

Figura 03 – a) Orelha de Elefante Gigante (*Alocasia Macrorrhizos (l.) g. Don*) a planta utilizado para a produção do extrato, b) Extrato vegetal concentrado

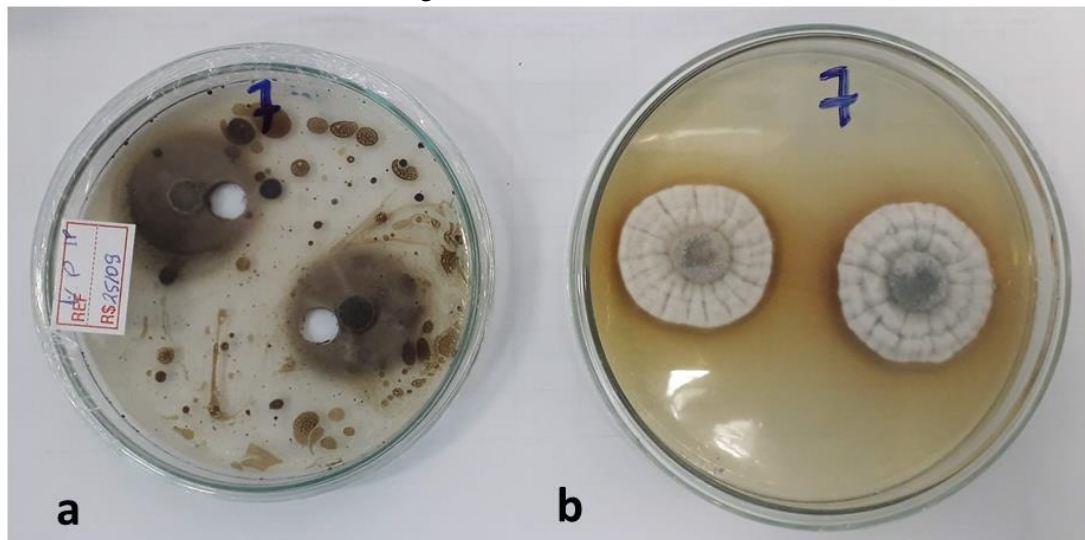


Fonte: Autor, 2020.

4.2.5 Inóculo fúngico

A cepa, *Aspergillus* sp., utilizado no experimento foi extraído de uma amostra de solo contaminado com petróleo e posteriormente cultivado em meio Bushnell-haas broth + agar + 1% de petróleo, Figura 04, afim de verificar o seu desenvolvimento tendo como o petróleo a sua principal fonte de carbono, posteriormente cultivado em meio de cultivo àgar Sabouraud 4% com 0,1 g L⁻¹ de Clorofenicol dissolvido em 10 ml de etanol a 95%, e em seguida cultivado no resíduo da folha do extrato vegetal para a inoculação no biorreator.

Figura 04 – a) Fungo isolado cultivado em meio BHI + Agar e 1% de petróleo, b) Repique da placa “a” em meio Sabouraud Dextrose Agar



Fonte: Autor, 2019.

Figura 05 – Fungo isolado no resíduo da folha



Fonte: Autor, 2019.

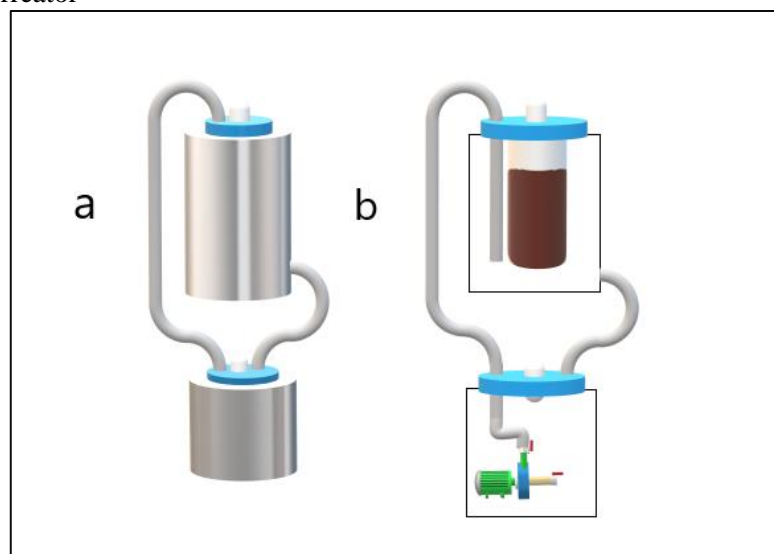
Uma cultura do fungo *Aspergillus* sp. com 20 dias de incubação foi utilizada nesse estudo, o processo de cultivo foi por meio do repique do fungo no meio Sabouraud dextrose Agar para placa de Petri contendo 2,0 g da folha da OG desidratada e 2 mL de água salina a 1%, como visto na Figura 04. Estes foram incubados a 30°C durante 20 dias, o resultado após 20 dias pode ser conferido na figura 05, um controle abiótico sem fungo foi realizado em paralelo.

4.2.6 Sistema de biorremediação

O experimento de biorremediação foi simulado em condições de maré semelhantes ao de um manguezal, com subida e descida de “maré” a cada 6h. Cada reator teve cerca de 0,850g de sedimento e 1,650 L de água estuarina.

O experimento ocorreu em um sistema com 16 potes de vidro grandes de 3,5 L e com 23 cm de altura e 11,5 cm de largura interligados por meio de mangueiras com potes menores de 1,3 L de volume total com 16,5 cm de altura e 11,5cm de largura, exemplificado na Figura 05. Nos potes maiores foi acondicionado o sedimento em uma “camisa” feita com tecido 100% algodão, Figura 06, para impedir a suspensão do sedimento a medida que a água fosse bombeada na subida da maré, os dois potes foram interligados com duas mangueiras de Policloreto de Vinila – PVC, ½ x 1,5mm e 1 x 2mm.

Figura 06 – Modelo biorreator, **a**: parte externa do biorreator e **b**: parte interna do biorreator

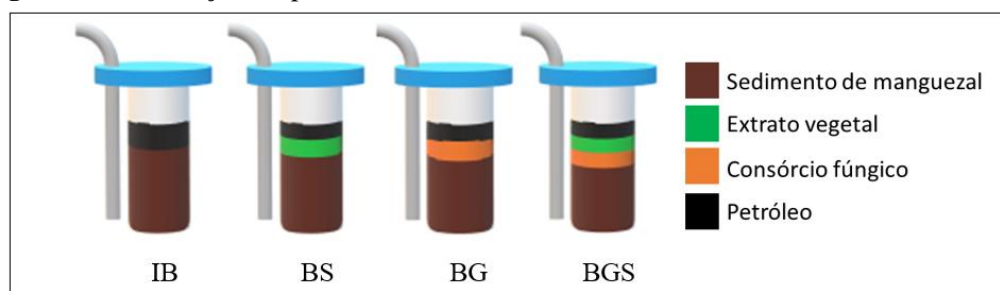


Fonte: Autor, 2019

A circulação da água foi feita com o auxílio de uma bomba Sarlo Better Mini A - 60 A com vazão de 170 L h^{-1} , o seu funcionamento foi controlado com um timer que ligava e desligava as bombas a cada 06h e a água retornava ao recipiente menor pela força da gravidade. Totalizando 16 reatores, 4 para cada condição experimental, considerando que a coleta do tempo 0 foi feita durante a montagem do experimento.

O experimento ocorreu em 4 condições diferentes, Figura 07, a primeira Biorremediação Intrínseca (IB) com 1% de petróleo da bacia do Recôncavo mais o sedimento não esterilizado, Bioestimulação com extrato vegetal (BS) com 1% de petróleo da bacia do Recôncavo mais o sedimento não esterilizado e 8 g de extrato vegetal, Bioaugmentação (BG) com 1% de petróleo da bacia do Recôncavo mais o sedimento esterilizado e o 4g do resíduo da folha com o inóculo fúngico, Bioestimulação associada a bioaugmentação (BGS) 1% de petróleo da bacia do Recôncavo mais o sedimento esterilizado, 8 g de extrato vegetal e 4g do resíduo da folha com o inóculo fúngico. 1% de petróleo expresso no valor total da massa do sedimento. C18-E15

Figura 07 – Condições experimentais nos reatores



Fonte: Autor, 2019.

O monitoramento temporal do experimento de biorremediação foi feito nos tempos 0, 7, 15, 29 e 45 dias, o sistema de biorreatores assegurou aclimação e segurança para o crescimento dos microrganismos, hidratação igual em todos os experimentos, distribuição uniforme dos microrganismos e 1% de petróleo da Baía de Todos os Santos (BTS).

Em cada tempo de amostragem uma unidade experimental de cada condição foi desativada e amostras de sedimento foram coletadas para posteriormente serem utilizadas nas análises de UFC, fósforo total, fósforo inorgânico, nitrogênio total, Carbono Orgânico Total - COT e HPAs.

Todos os potes foram descontaminados com sabão Extran a 10% e com diclorometano, enquanto as mangueiras foram limpas com sabão Extran a 10% e Ácido clorídrico a 5%.

4.2.7 Protocolo para a montagem dos biorreatores

Inicialmente foi pesado 3,6 kg de sedimento em uma bacia de alumínio e adicionada 36 g de óleo da bacia do Recôncavo, 1% da massa do sedimento, em seguida foi homogeneizado com o auxílio de espátulas de alumínio, após ser homogeneizado o sedimento foi separado em 4 frações de 0,850 g e acondicionados nas camisas de algodão e logo em seguida posto dentro dos biorreatores, nesse mesmo momento foram separadas frações de sedimento para análises geoquímicas referentes ao tempo 0 do experimento, esse procedimento se repetiu para todas as condições experimentais. Além do petróleo foi adicionado na condição BG e BGS 4g do inóculo com o fungo no sedimento e na condição BS e BGS 8g do extrato vegetal no sedimento.

A água estuarina foi adicionada dentro dos biorreatores com o auxílio de uma proveta graduada, onde no reator inferior foi posto 1,150 L e no reator superior 0,450 L.

4.2.8 Caracterização geoquímica e microbiológica

4.2.8.1 Nitrogênio amoniacal em água

Nitrogênio amoniacal em água foi determinado pelo método *Standard Methods* 4110, após passar por destilação em um balão de Kjeldahl seguindo a metodologia APHA (1998). Essa técnica consiste na filtração de 100 ml da água utilizando uma membrana de acetato de celulose com porosidade de 0,45 μ m, para retirar todo o material particulado presente na amostra, no qual o nitrogênio é determinado pela remoção da amônia por destilação e convertido em sulfato de amônio por digestão com ácido sulfúrico, sulfato de potássio e catalisado sulfato de mercúrio. O material digerido é tratado com tiosulfato de sódio em meio alcalino e a amônia restante é destilada, recolhida em ácido bórico, e a sua concentração é sendo determinada em um cromatógrafo de íons modelo 887 Professional UV/VIS detector.

4.2.8.2 Nitrogênio total em água

A análise de nitrogênio total em água foi realizada como descrita no *Standard Methods for the examination of Water and Wastewater* 4500-N_{ORG}, que determina o nitrogênio no estado trinegativo. Eles não respondem pelo nitrogênio na forma de azida, azina, azo, hidrazona, nitrato, nitrito, nitrila, nitro, nitroso, oxima e semi-carbazona. "Nitrogênio Kjeldahl" é a soma do nitrogênio orgânico e do nitrogênio amoniacal. Na presença de H₂SO₄, catalisador de sulfato

de potássio (K_2SO_4) e sulfato cúprico ($CuSO_4$), o nitrogênio amino de muitos materiais orgânicos é convertido em amônio. A amônia livre também é convertida em amônia. Após a adição da base, a amônia é destilada a partir de um meio alcalino e absorvida em ácido bórico ou sulfúrico.

4.2.8.3 Fósforo total em água

A análise de fósforo total em água foram filtradas com o auxílio de uma bomba a vácuo e uma membrana de acetato de celulose com porosidade $0,45\mu m$, com o objetivo de retirar todo o particulado presente na amostra, e analisados através Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivo - ICP OES, com câmara de nebulização: Ciclônica (Single Pass), Nebulizador: SeaSpray, Potência de radiofrequência: 1.10 kW, vazão do gás do plasma: 15 L min⁻¹, vazão do gás auxiliar: 1,5 L min⁻¹ e vazão do gás de nebulização: 0,75 L min⁻¹ utilizando o método ASTM, 1992 para determinação dos metais na água. O método utilizado para a extração do analito foi o descrito pelo método 3051^a – EPA.

4.2.8.4 Fósforo assimilável

O método utilizado para a análise de fósforo assimilável foi está descrito *no Standard Methods for the examination of Water and Wastewater* 4500-P, esse método consiste na determinação do fósforo em duas etapas, a primeira consiste na conversão das formas de interesse em ortofosfato dissolvido e a segunda a determinação colorimétrica do ortofosfato na amostra. O molibdato de amônio e o antimônio tartarato de potássio reagem em meio ácido com o ortofosfato para formar um ácido heteropoli-fosfomolibdico que é reduzido pelo ácido ascórbico formando o complexo azul de molibdênio intensamente colorido. A absorbância do complexo é medida espectrofotometricamente em um espectrofotômetro de absorção molecular modelo CARY 601E no comprimento de onda 880 nm, proporcional à concentração de fosfato presente na amostra.

A solução padrão utilizada na análise foi 30,0 mg P-PO $4^{-3} L^{-1}$, sendo preparada uma série de soluções padrões de 0,05 a 1,0 mg P-PO $4^{-3} L^{-1}$, tendo no fim o coeficiente de correlação (r) igual ou maior que 0,9989 como critério de aceitação.

4.2.8.4.1 Fósforo assimilável em água

10 ml de amostra é filtrada com o auxílio de uma bomba a vácuo e filtro de acetato celular 45 um de porosidade e posteriormente acondicionadas em tubos de falcom de 10 mL, onde é adicionado 0,2 ml da solução de ácido ascórbico e 0,8 ml da solução de molibdato tartarato, as amostras são homogeneizadas e entre 10 e 30 minutos após a homogeneização é lida a absorbância da amostra a 880nm em uma cubeta de 1cm, o branco é feito com água ultra pura.

Foi analisado diferentes frações dos fósforo por conta de uma fração representar a fração assimilável, que é a parte do fósforo que encontra-se diluída na solução do solo ou da água, que pode ser facilmente absorvida pelas plantas ou microrganismos e a fração orgânica que pode torna-se disponível a partir da mineralização da matéria orgânica

4.2.8.4.2 Fósforo assimilável em sedimento

0,4 g do sedimento foi pesado em um tubo de falcom de 50 mL com o auxílio de uma balança analítica, em seguida foi adicionado 10 mL de ácido clorídrico a $4,5 \text{ mol L}^{-1}$ e em seguida as amostras foram colocadas em uma Mesa Agitadora Orbital MA 140 CFT por 16 horas a 305 rpm, após a agitação a amostra foi centrifugada por 15 min a 3000 rpm, uma alíquota de 1 mL do sobrenadante e transferido para um tubo falcom de 10 mL, onde é adicionado 10mL de água ultra pura, 0,8 m L de Mobilidato tartarato e 0,2 mL de ácido ascórbico e homogeneizada, aguardar 10 min, transferir para uma cubeta de 1 cm e fazer a leitura no Espectrofotômetro de absorção molecular no comprimento de onda de 880 nm, o branco é feito com água ultra pura.

4.2.8.5 Fósforo total em sedimento

O método utilizado para fazer a extração do fósforo do sedimento foi 3051A – EPA, este método consiste na extração do analito usando aquecimento por micro-ondas, foi utilizado 0,5 g de sedimento pulverizado em almofariz, o sedimento é digerido utilizando ácido nítrico e ácido perclórico em seguindo a solução é filtrada utilizando uma membrana de acetato de celulose com porosidade de $0,45 \mu\text{m}$, o filtrado é diluído em balões de 50 mL e lido em um Espectrofotômetro de absorção atômica por chama ICP-OES.

4.2.8.6 HPAs no sedimento

Na análise HPAs foram determinada através de Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrometria de massa (GC-MS) Agilent Technologies 7890B. Inicialmente 2g da amostra foram acondicionadas em tubos de extração de 40 ml, previamente descontaminados com diclorometano, e adicionado 25 ml de uma solução de diclorometano e hexano numa proporção volumétrica de 1:1, em seguida foi realizado a fortificação da amostra com 20 µL do padrão Pterphenyl D14, 1000 µL L⁻¹.

A extração foi feita em um banho de ultrassom no equipamento ELAM ULTRASSONIC TI H 10 a 40° C em numa frequência de 35khz, a amostra passou por 3 extrações sucessivas de 15 minutos, totalizando 75 mL da mistura do solvente DCM:HEX para cada amostra, em cada extração o sobrenadante foi transferido com o auxílio de uma pipeta de pasteur de vidro para um balão de fundo redondo de 250 mL com um funil com algodão limpo descontaminado com diclorometano e sulfato de sódio calcinado a 400°C durante 4h, com o intuito de retirar quaisquer resquícios de umidade na amostra, foi adicionado cobre ativado dentro do balão volumétrico com o intuito de remover o enxofre elementar da amostra. Posteriormente as amostras foram concentradas em um roevaporador rotativo, modelo Buchi Rotavapor R-210 e transferido para vials de 1,5 ml e avolumados com DCM.

Todas as amostras foram fortificadas utilizando o padrão surrogate (Pterphenyl D14), adicionando 20 ul com concentração de 1000 ug, para verificar a recuperação em todo o processo metodológico e os resultados mostraram recuperação de 62% a 95% do padrão. A quantificação dos 16 HPAs investigados nesse estudo foi realizado em um cromatógrafo a gás modelo GC system Agilent 7890B acoplado a um espectrômetro de massas modelo Agilent 5977A (GC/MS) no modo Singular Ion Monitoring (SIM). A temperatura inicial foi de 100°C variando em intervalos até 300°C, a temperatura da fonte de íons de 230°C e do quadrupolo 150°C.

O gás de arraste utilizado foi Hélio de alto grau de pureza com fluxo de 1 mL min⁻¹. A calibração interna do equipamento foi feita através de cinco pontos com uma mistura dos 16 HPAs prioritários com concentrações entre 100 e 200 200 µg L⁻¹. O coeficiente de correlação aceito foi de 0,99 e as características da da coluna capilar de sílica: HP-5MS, 60m x 250 µm x 0,25 µm de espessura.

4.2.8.7 Carbono Orgânico Total (COT) e Nitrogênio total em sedimento

Nos solos, de maneira geral, podem ser encontrados diversos componentes cujas estruturas apresentam elementos como o carbono (C) e nitrogênio (N). A matéria orgânica do solo, em seus diversos estágios de transformação e origem, representa um importante conjunto de estruturas, moléculas e/ou substâncias que contêm esses elementos. Outros materiais, como carbonatos e bicarbonatos, também são fontes desses elementos. O nitrogênio total foi determinado de acordo com a metodologia descrita no Manual de métodos de análise de solos da EMBRAPA (2017) com o analisador elementar, modelo LECO CN628, as amostras sofrerão um tratamento anterior a leitura onde serão desagregadas e peneiradas a 2 mm, maceradas e peneiradas novamente em uma peneira de 80 mesh.

A amostra é submetida ao processo de combustão (temperatura em torno de 1.000 °C), onde o carbono é convertido em CO₂ e o nitrogênio em N₂ gasoso. Outros elementos, como, por exemplo, o cloro, também são convertidos em produto de combustão apropriado, tal como cloreto de hidrogênio. Após a combustão, os produtos são arrastados para fora da câmara de combustão por meio de um gás de transporte inerte, como o hélio, e passa através de uma coluna aquecida (em torno de 625 °C) de cobre de elevada pureza. O cobre tem a função de remover o oxigênio residual não consumido na combustão. Para a determinação do C e N, os gases gerados na câmara de combustão (CO₂, N₂) são separados em uma coluna de cromatografia gasosa, seguido da detecção por condutividade térmica.

4.8.2.8 Unidades Formadora de Colônias - UFC

O cultivo dos fungos foi realizado em meio de cultivo àgar Sabouraud 4% com 0,1 g L₋₁ de Clorofenicol dissolvido em 10 ml de etanol a 95%.

Para a extração dos microrganismos do sedimento para a contagem de UFC, 10 g do sedimento foi transferido para um Erlenmeyer contendo 90 mL de uma solução salina estéril, em seguida essa solução foi homogeneizada com o auxílio de um bastão de vidro e 1,0 mL da solução foi transferida para um tubo de falcon contendo 9 mL de solução salina estéril, diluição -1, onde foi submetido ao vortex e depois transferido 1,0 mL para o tubo de diluição -2, esse procedimento se repete até a diluição -5. Em seguida 1,0 mL de cada tudo de diluição é transferido para uma placa de petri das respectivas diluições. Posteriormente o meio de cultura será vertido sobre cada placa, pour plate, onde será incubado em uma câmara de germinação durante 7 dias a 30 ° C.

4.2.8.9 Identificação molecular do fungo

A identificação molecular do fungo foi realizada no Laboratório de Microbiologia Polar e Conexões Tropicais a partir da cooperação técnica entre a Universidade Federal da Bahia – UFBA e a Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

A identificação do fungo utilizado foi por meio da análise 16s rDNA, o DNA da cepa P2-3 foi extraído pelo método descrito por Rosa et al. (2009). A amplificação por PCR e a purificação do 16s rDNA foram realizados conforme descrito por White et al. (1990), o rDNA 16S foi sequenciado utilizando os iniciadores ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para a amplificação da região transcrita interna (ITS1-5.8S-ITS2) e para a amplificação parcial do gene β -tubulina foram utilizados os iniciadores BT2a (GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) e BT2b (ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC), conforme descrito por Glass e Donaldson (1995).

Os amplicons gerados pelas reações de PCR foram purificados utilizando-se a metodologia EDTA- Etanol. O sequenciamento foi realizado utilizando-se o kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA), seguindo as recomendações do fabricante, em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730. Na reação de sequenciamento foi utilizado 5-20 ng do DNA purificado em um kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) combinado com um sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730.

A análise computacional das sequências de DNA foi feita comparando as sequências de espécies tipo ou referências de fungos depositadas no GenBank, utilizando o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), podendo ser encontrado no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). O fungo apresentou identidade > 99% em comparação às sequências de fungos depositadas no GenBank, foi considerada pertencente à mesma espécie. Na identificação molecular as sequências que possuíam mais de 350 nucleotídeos foram utilizadas para a análise filogenética utilizando-se o programa MEGA.

4.2.8.10 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados obtidos com as análises físico-químicas do experimento, foi tratada a partir do software STATISTIC 9.0 na confecção dos gráficos e da Análise de Componentes Principais (PCA).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1 Caracterização química

Entre as variáveis ambientais, a temperatura é um dos parâmetros mais importantes e que afetam a biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo. A temperatura inicial do experimento foi de 29°C tendo variações de $\pm 2^\circ\text{C}$ em cada tempo de coleta, na pesquisa de Moghadam et al., (2014) a melhor eficiência de remoção de HPAs foi registrada na temperatura mais alta registrada do estudo, 35°C, e segundo Viamajala et al., (2007) a solubilidade dos HPAs aumenta à medida que há um aumento da temperatura, o que conseqüentemente facilitando os processos de degradação.

Moghadam et al., (2014) também verificou que em uma faixa de pH entre 6 e 8, o processo de biodegradação é ativo, tendo melhores resultados no seu estudo no pH 8, enquanto Ye et al., (2011) et al., aponta que um fungo do gênero *Aspergillus* sp. exibiu melhor eficácia na biodegradação do Antraceno na faixa de pH de 5,0-7,5 do que nas condições relativamente mais ácidas ou alcalinas em uma faixa de temperatura de 20 a 30°C.

Além da temperatura, pH e presença de microrganismos degradadores, também são necessário nutrientes. O baixo suprimento de nutrientes limita a eficiência de um processo de biorremediação, pois durante a biodegradação dos hidrocarbonetos os microrganismos consomem os nutrientes disponíveis no ambiente, causando deficiência e aumentando os fenômenos de competição existentes (LANG et al., 2016).

O Nitrogênio e o Fósforo aceleram o processo de biodegradação de hidrocarbonetos em ambientes marinhos, e apesar de haver a disponibilidade do carbono dos hidrocarbonetos para o crescimento microbiano, é necessário o nitrogênio e o fósforo para que seja possível metabolizar os compostos de carbono (BEOLCHINI et al., 2010; JÚLIO et al., 2018) sendo assim um parâmetro fundamental para que ocorra a biodegradação de hidrocarbonetos.

A concentração média de fósforo total inicial no solo contaminado foi de 302,5 mg Kg⁻¹, a concentração de nitrogênio no sedimento ficou abaixo do limite de quantificação mínimo do equipamento, que como consequência pode ter afetado diretamente no processo de remediação, pois a proporção ideal de carbono: nitrogênio: fósforo (C: N: P) nas atividades de biorremediação do solo é de 100: 10: 1 (WU et al., 2016), Ghaly et al., (2013) relataram que a proporção ideal da relação N:P na biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos varia entre 2,4:10 a 1:10.

Ao contrário do sedimento as concentrações de nitrogênio total na água, com concentração média de 5,33 mg L⁻¹, foram mais altas do que as concentrações de fósforo que

que não ultrapassou $0,17 \text{ mg L}^{-1}$, estando também fora da proporção estabelecida como ideal para um processo de biodegradação.

Quanto as concentrações de matéria orgânica, foram semelhantes as concentrações normalmente encontrada nos manguezais da BTS, como visto no estudo de Moreira et al., (2013), que fez o uso da técnica de fitorremediação de petróleo utilizando o sedimento do mesmo manguezal dessa pesquisa, onde a concentração de carbono orgânico no sedimento foi de 3,32% e no entanto na pesquisa de Almeida et al., (2018) que avaliou a distribuição de HPAs em sedimentos superficiais de diversas regiões da baía de Todos os Santos as concentrações de COT variou de 0,0% a 1,9%.

Enquanto nesse estudo a concentração de COT no sedimento foi de 1,6% e segundo Pereira et al., (2015) esses valores são considerados baixos, principalmente para ambientes como manguezais, que são normalmente classificados como enriquecidos em concentrações de matéria orgânica. O que justifica as baixas concentrações de nutrientes, pois segundo Cunha, Mendes e Giongo, (2015), a matéria orgânica quando mineralizada atua no fornecimento de nutrientes essenciais como nitrogênio (N), fósforo (P) e micronutrientes para o solo. Todos os parâmetros discutidos estão disponíveis em tabela no anexo A.

4.3.2 Comunidades fúngicas nos quatro modelos de remediação

Durante 45 dias de experimento, Tabela 01, o número total de fungos nos quatro modelos de remediação foi quantificado em 5 amostras estabelecidas anteriormente, as contagens iniciais em BG variou entre 10 e $0 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$, em BGS 10 e $0,35 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$, em BS 0,340 e $0,06 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$ e em IB 0,32 e $0,06 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$, após 7 dias de experimento houve uma diminuição em relação aos valores iniciais do experimento BG registrando valores entre 10 e $0,35 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$, no vigésimo nono dia houve um aumento significativo na comunidade fúngica dos experimentos BG ($10 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$), BGS ($10 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$) e BS ($10 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$) em relação ao IB ($8 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$). Após 15 dias a quantidade de UFC na condição experimental BG mantiveram-se constante até a última amostragem, enquanto que nos experimento BGS, BS e IB houve uma diminuição no número de fungos no último tempo de coleta, 10 e $0,003 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$, 0,27 e $0,20 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$ e 0,3 e $0 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$, correspondentemente. A Figura 7 representa a contagem total de fungos durante os 45 dias, com os dados expressos em notação científica.

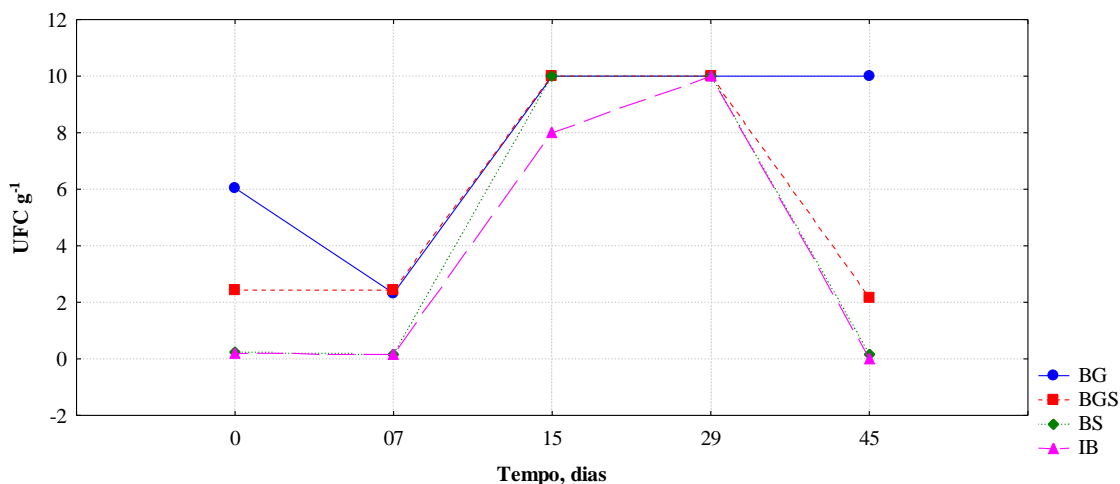
Tabela 01 – Contagem fúngica total em 45 dias, valores em notação científica (UFC g⁻¹) das Unidades Formadoras de Colônias – UFC, BG - Bioaugmentação, BGS - Bioaugmentação associada e Bioestimulação, BS - Bioestimulação e IB – Biorremediação Intrínseca

	T0	T7	T15	T29	T45
BA-1	1,00E+07	1,00E+07	1,00E+07	1,00E+07	1,00E+07
BA-2	1,00E+07	1,00E+06	1,00E+07	1,00E+07	1,00E+07
BA-3	2,20E+05	3,00E+05	1,00E+07	1,00E+07	1,00E+07
BA-4	1,00E+07	2,70E+05	1,00E+07	1,00E+07	1,00E+07
BA-5	0,00E+00	5,00E+04	1,00E+07	1,00E+07	1,00E+07
BAE-1	1,00E+07	1,00E+07	1,00E+07	1,00E+07	1,00E+07
BAE-2	1,19E+06	1,34E+06	1,00E+07	1,00E+07	4,40E+05
BAE-3	3,30E+05	5,00E+05	1,00E+07	1,00E+07	3,60E+05
BAE-4	3,10E+05	3,00E+05	1,00E+07	1,00E+07	2,00E+04
BAE-5	3,50E+05	0,00E+00	1,00E+07	1,00E+07	3,00E+04
BE-1	3,40E+05	4,00E+05	1,00E+07	1,00E+07	2,70E+05
BE-2	1,90E+05	2,20E+05	1,00E+07	1,00E+07	1,10E+05
BE-3	1,60E+05	1,40E+05	1,00E+07	1,00E+07	1,90E+05
BE-4	4,80E+05	1,00E+05	1,00E+07	1,00E+07	2,00E+04
BE-5	6,00E+04	0,00E+00	1,00E+07	1,00E+07	2,20E+05
BI-1	3,20E+05	3,60E+05	1,00E+07	1,00E+07	3,00E+05
BI-2	2,70E+05	2,50E+05	1,00E+05	1,00E+07	8,00E+04
BI-3	1,60E+05	1,10E+05	1,00E+07	1,00E+07	5,00E+04
BI-4	1,10E+05	0,00E+00	1,00E+07	1,00E+07	3,00E+04
BI-5	6,00E+04	0,00E+00	1,00E+07	1,00E+07	0,00E+00

Fonte: Autor, 2020.

Também pode ser observado comparando a condição BS, BG e BGS, que o uso do extrato e do resíduo das folhas como substrato para o crescimento dos fungos, diminuiu o tempo de aclimatação dos microrganismos, alcançando o pico de UFC após 15 dias de experimento, como visto na Figura 8, sendo um indicativo que o extrato pode ter fornecido nutrientes mais rapidamente aos microrganismos, enquanto a condição IB esse pico só foi acontecer após 29 dias, apresentando também uma resposta mais rápida na diminuição das concentração dos HPAs estudados, após 7 dias. Os resultados sugerem também que a concentração de extrato utilizada não inibiu os microrganismos de metabolizar os hidrocarbonetos, devido a ser uma fonte de carbono menos complexa presente no ambiente.

Figura 8 - Contagem fúngica total em 45 dias, BG - Bioaugmentação, BGS – Bioaugmentação associada e Bioestimulação, BS - Bioestimulação e IB – Biorremediação Intrínseca



Fonte: Autor, 2020.

4.3.3 Remoção de HPAs nas diferentes condições experimentais

As concentrações de HPAs no sedimento em cada condição experimental após 45 dias diminuíram consideravelmente de seus valores iniciais de 3398,15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para 2596,89 $\mu\text{g kg}^{-1}$ na condição experimental BG, de 3090,45 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para 1861,15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ na condição BGS, 2531,71 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para 1809,29 $\mu\text{g kg}^{-1}$ na condição BS e 2148,44 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para 2006,40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ na condição IB. Respectivamente equivale a eficiência de remoção de 23,57%, 39,81%, 28, 53% e 6,61%, a diminuição das concentrações em porcentagem de HPAs em todas condições experimentais temporalmente pode ser verificado na Figura 9, do seu valor inicial correspondente.

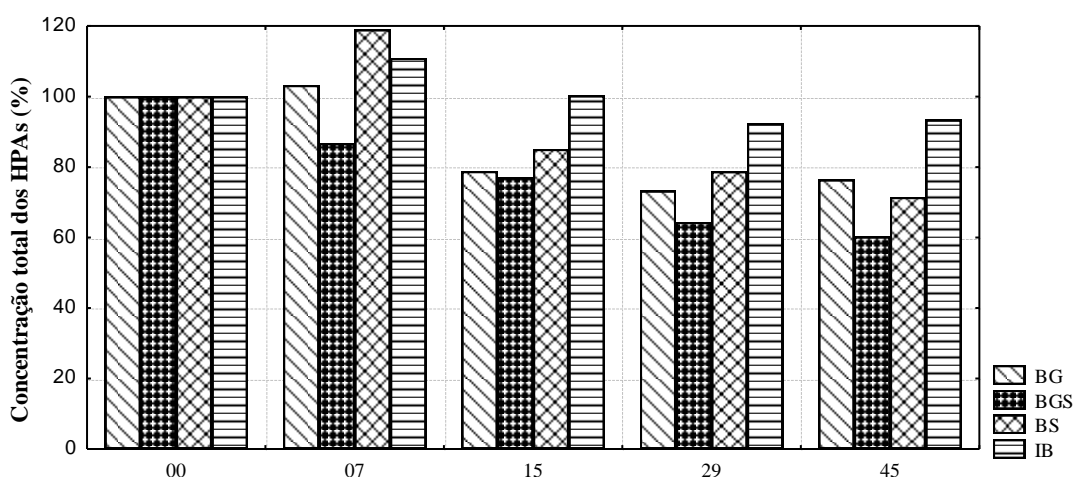
O tratamento BGS teve a melhor remoção de HPAs em comparação aos demais, seguido pelo BG, BS, e pela condição experimental IB, Figura 8, a que apresentou a pior taxa de remoção, 6,61%, o que já era esperado por conta de ser o único tratamento que não sofreu nenhum tipo de intervenção com a finalidade de aumentar as taxas de biodegradação. No final do experimento a condição IB registrou apenas 142,04 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de remoção de HPAs do sedimento, a porcentagem aumentou significativamente na condição BS, onde houve a bioestimulação com o extrato vegetal, tendo 722,42 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de remoção de HPAs do sedimento, uma taxa de remoção cerca de 5x maior que na condição IB, demonstrando o potencial da microbiota indígena na remoção dos HPAs com o uso da bioestimulação e do potencial do extrato vegetal na promoção da atividade microbiana.

Em relação as condições experimentais que receberam o inóculo fúngico, BG e BGS, a condição BG teve uma taxa menor que a condição BS, 23,57% e 28,53%, em comparação as suas concentrações iniciais, mas quando verificado a união das duas técnicas, BGS, os resultados aumentaram significativamente, 39,81%, com remoção total de 1229,32 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de HPAs, com uma remoção média de 27,31 $\mu\text{g kg}^{-1}$ por dia, indicando que uma aplicação combinada de diferentes técnicas aumenta as taxas de remoção.

Quanto ao aumento das concentrações de HPAs após 15 dias nas condições experimentais BS e IB e nas concentrações de HPAs de APM em todos os experimentos, segundo Reyes (2015), que fez uma pesquisa sobre biodegradação de petróleo em água marinha, esse aumento é justificado devido ao fracionamento molecular de componentes do petróleo, que ocorre por conta dos processos de biodegradação que são responsáveis pela perda de componentes leves de um óleo, facilitando o enriquecimento das frações pesadas, o fracionamento molecular consiste no aparente aumento das concentrações de certos componentes do petróleo, como consequência da diminuição de compostos de menor complexidade, e maior degradabilidade, como por exemplo, alcanos de baixo e médio peso molecular ($C \leq 15$) e os compostos aromáticos de baixa massa molecular.

As concentrações de HPAs nas diferentes condições experimentais e em cada tempo amostral podem ser encontrados no apêndice A, tabelas A3 e A4.

Figura 9 – Concentração temporal (%) dos 16 HPAs nos diferentes modelos de remediação temporalmente. BG - Bioaugmentação, BGS – Bioaugmentação associada e Bioestimulação, BS - Bioestimulação e IB – Biorremediação Intrínseca Remoção dos HPAs



Fonte: Autor, 2020.

Embora tenha havido remoção dos compostos com maior peso molecular, eles não tiveram uma remoção tão significativa quanto aos compostos de menor peso molecular nesse

estudo, mesmo no tratamento onde houve os melhores percentuais de biodegradação, BGS, a taxa a remoção do HPAs de Baixo Peso Molecular - BPM, 47,03%, foi superior a remoção dos compostos Alto Peso Molecular – APM, 14,97%, já na condição BG a remoção de BPM foi de 28,13% enquanto a remoção de APM foi de 8,17%, na condição BS a remoção de BPM 34,48% e APM 8,75% e na condição IB a remoção de BPM 7,15% e APM 5,02%.

Segundo WANG, et al., (2010) esse baixo percentual pode ser justificado porque existe um período mínimo para que os microrganismos façam a remoção desses compostos mais pesados, pois inicialmente eles preferem os compostos mais simples e deixam os substratos mais complexos para uso posterior, o que significa que os compostos mais pesados, com mais de três anéis, seriam biodegradados posteriormente.

Sendo assim necessário um maior tempo experimental para verificar se a abordagem adotada nesse estudo tem uma eficiência tão boa em biodegradar os HPAs com mais de três anéis aromáticos como ocorreu nos HPAs de baixo peso molecular.

É notável a biodegradação significativa da maioria dos HPAs de baixo peso molecular, no tratamento BGS, como visto na Figura 10, a biodegradação de NAP alcançou 82%, ACE 83%, Fen 46% e FLU 45% após 45 dias de experimento.

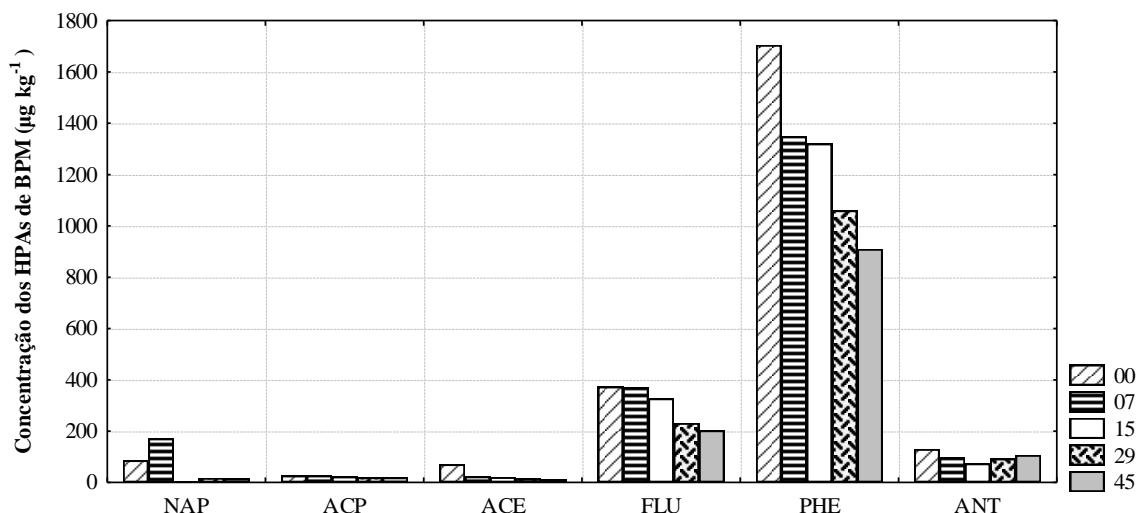
Entre os HPAs de baixo peso molecular o NAP foi o que apresentou a maior diminuição nas condições BGS, BG e BS, alcançando 98,9% após 15 dias no experimento BGS, sabe-se que HPAs com 2, 3 e 4 anéis de benzenos são preferíveis ao ataque inicial dos microrganismos, e compostos como NAP, com dois anéis de benzeno, irá ter preferência para ser biodegradado inicialmente pelos microrganismos, pois a biodegradabilidade dos HPAs está inerente a sua estrutura química e fortemente influenciada pela toxicidade de cada composto, (SHEN et al., 2015).

Os resultados encontrados foram consistentes como de outras pesquisas que demonstraram comportamentos semelhantes na biodegradação de HPAs, onde as eficiências de remoção com a utilização do fungo *Aspergillus spp.* RFC - 1 de Petróleo bruto, NAP, PHE e PYR alcançaram 60,3%, 97,4%, 84,9% e 90,7%, respectivamente, em Meio de Sal Mineral – MSM, após 7 dias (AL-HAWASH, ZHANG, MA., 2018), a remoção total de ACE, PHE e PYR após 8 semanas em sedimento de manguezal, através da comunidade microbiana indígena do sedimento (MUANGCHINDA et al., 2013).

A inoculação de um consórcio degradador de HPAs aumentou significativamente as taxas de biodegradação de FLU, PHE, FLT e PYR e na diminuição da meia vida em 53% para HPAs com 3 anéis e 45% para HPAs com 4 anéis em sedimento de manguezal (LI et al., 2015), o uso da bioestimulação em sedimento de manguezal contaminado com hidrocarbonetos, as

concentrações de PHE e PYR reduziu $81,1 \pm 7,5\%$ e $59,5 \pm 2,4\%$ respectivamente, após 5 semanas (LANG et al., 2016).

Figura 10 – Concentrações de HPAs de Baixo Peso Molecular - BPM temporalmente na unidade experimental BGS. NAP (Naftaleno), ACP (Acenaftileno), ACE (Acenafteno), FLU (Fluoreno), PHE (Fenantreno) e ANT (Antraceno)



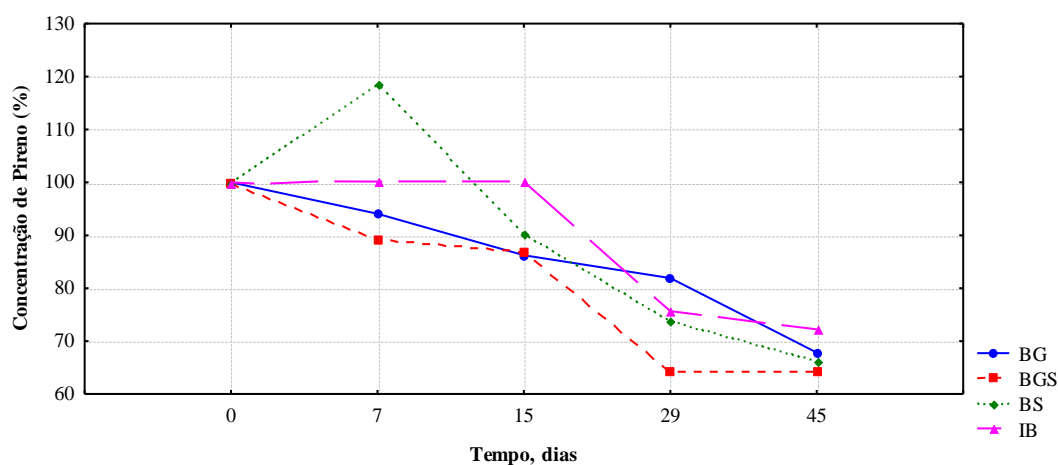
Fonte: Autor, 2020.

Dos compostos de alto peso molecular o Pireno (PYR) teve a melhor taxa de remoção nos experimento BG, BGS e BS, como visto na Figura 11, chegando a ter 35,88% de remoção na condição experimental BGS, com uma taxa de remoção maior do que de compostos mais simples como o ACP e ANT, demonstrando que mesmo havendo uma degradação inicial mais eficiente dos compostos de baixo peso molecular a cepa *Aspergillus* sp. possui capacidade de biodegradar os HPAs de alto peso molecular.

Passarini et al., (2011) apresentou resultados que demonstra a eficiência de um fungo do mesmo gênero, em uma cultura isolada, de metabolizar o Pireno em 16 dias através da oxidação monoxigenase em pirenilsulfato, um metabólito mais solúvel em água e menos tóxicos em relação ao seu composto parental, demonstrando que o uso de fungos do gênero é um método eficaz na desintoxicação de HPAs (LANGE et al., 1994).

E nos experimentos onde houve a inserção da cepa *Aspergillus* sp., BG e BGS, houve uma diminuição imediata nas concentrações de PYR, enquanto que nas condições onde não houve bioaugmentação a diminuição nas concentrações de PYR só começou a ocorrer após 15 dias de experimento, indicando que essa cepa pode biodegradar PYR mais rapidamente.

Figura 11 – Concentrações de Pireno temporalmente em cada condição experimental BG - Bioaugmentação, BGS – Bioaugmentação associada e Bioestimulação, BS - Bioestimulação e IB – Biorremediação Intrínseca



Fonte: Autor, 2020.

O tratamento BS aponta que, apesar do sedimento utilizado nesse estudo não ter sido exposto a grandes contaminações de hidrocarbonetos, a bioestimulação indica que os microrganismos indígenas presentes no sedimento do manguezal do rio São Paulo possui grande potencial na biodegradação dos HPAs a longo prazo, quando submetidos ao processo de bioestimulação, comprovando que um possível uso futuro do extrato vegetal in-situ pode ser viável, pois na condição experimental BS, onde o sedimento foi submetido a bioestimulação, teve as mesmas condições experimentais que a condição IB tendo apenas como diferença a inserção do extrato vegetal e foi registrado um aumento significativo nos percentuais de biodegradação em relação ao IB.

As taxas superiores de remoção de HPAs da condição experimental BGS também pode ser confirmada devido a presença de biofilme após 15 dias de experimento, enquanto na condição BG só ocorreu após 29 dias e na BS após 45 dias, a condição IB não registrou o crescimento de biofilme, Figura 12. Na biorremediação o biofilme auxilia no aumento da adaptação e sobrevivência dos microrganismos, especialmente durante o período de estresse, devido às interações físicas e fisiológicas mutuamente benéficas entre os microrganismos no biofilme, fazendo com que o uso do xenobiótico seja acelerado assim ajudando na imobilização e degradação do poluente (SINGH; PAUL; JAIN, 2006).

Figura 12 – Biofilme registrado na condição experimental BGS, Bioaumentação associada à bioestimulação, após 15 dias de experimento



Fonte: Autor, 2019.

Os microrganismos que secretam polímeros e formam biofilmes na superfície dos hidrocarbonetos são especialmente adequados para o tratamento de compostos recalcitrantes ou de degradação lenta, como os HPAs, devido à sua alta biomassa microbiana e à capacidade de aumentar a solubilidade dos HPAs, facilitando assim a sua biotransformação, imobilização por biossorção, bioacumulação e biomineralização do poluente (EDWARDS; KJELLERUP, 2013).

O uso de biofilmes tem sido relatado em diversas pesquisas apontando a eficiência do seu uso como uma alternativa para a remediação de hidrocarbonetos, Al-Mailem et al., (2015) cultivou biofilme em placas de vidro estéreis submersas verticalmente por 1 mês em uma suspensão hipersalina de solo e água natural de um lago contendo 0,3% de óleo bruto e teve como resultado a remoção de cerca de 20% a 25% de petróleo bruto, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em 2 semanas através do biofilme.

Mangwani e Kumari, (2017) utilizaram microrganismos isolados de água marinha na produção de biofilmes em um microcosmo de solo na presença da microflora nativa e do consórcio isolado, como resultado teve um aumento da solubilização dos HPAs e uma degradação de 70,29% do PHE e 55,54% do PYR no solo bioaumentado e Isaac et al., (2017) utilizou um biofilme formado por meio de um consórcio bacteriano como uma estratégia para de imobilização e remediação de HPAs, removendo 100% de PHE e $69 \pm 3,91\%$ de PYR, após 3 dias de incubação.

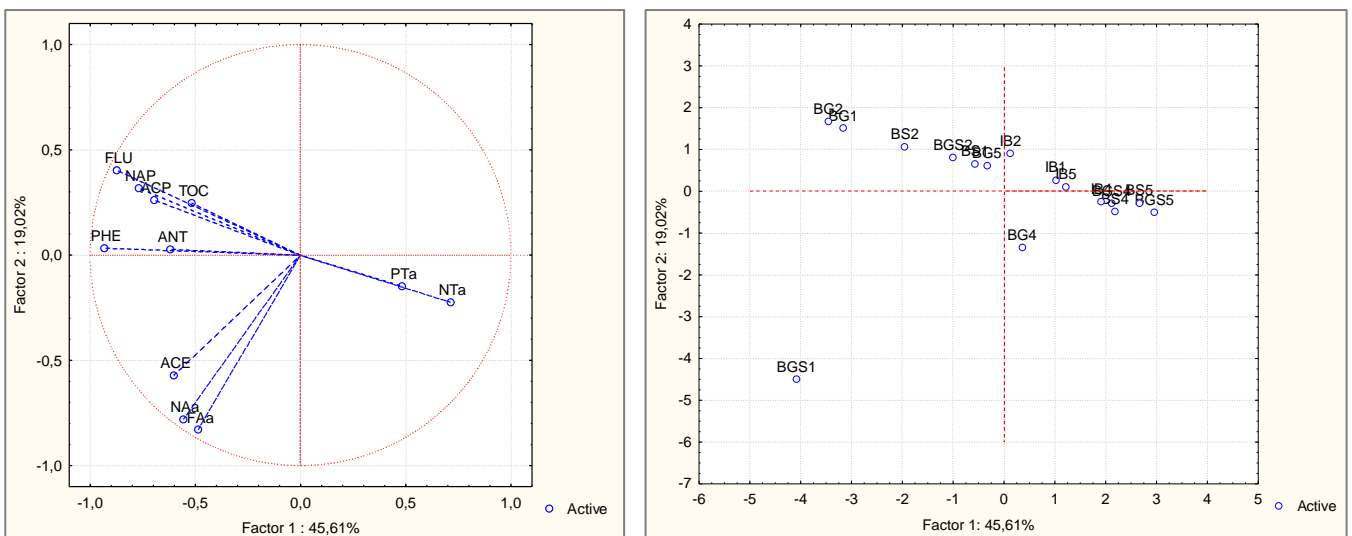
Aparentemente a condição BGS apresentou condições favoráveis a sobrevivência dos microrganismos desde o início do experimento, além de contar com um agente promotor de

processos de remediação, fazendo com que a biodegradação pudesse ocorrer mais rapidamente e um menor período em relação as demais condições experimentais.

Quanto a Análise de Componente Principais – PCA dos 6 HPAs de baixo peso molecular, Naftaleno, Acenftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fenantreno e Antraceno, figura 13, essa PCA tem 64,63% de variância dos dados analíticos e os parâmetros FLU, PHE, NAa e FAa foram os que são os parâmetros com maior importância estatística nessa PCA e ANT e TOC foram tiveram a menor importância estatística.

Os compostos FLU, NAP, ACP e TOC tiveram correlação positiva entre si e correlação inversa com PTa e NTa, demonstrando que possivelmente a degradação do FLU, NAP e ACP, que estão inversamente proporcionais aos parâmetros de PTa e NTa, teve correlação direta com esses parâmetros. Indicando que a bioestimulação influenciou diretamente na degradação desses compostos, principalmente quando observado gráfico onde demonstra o agrupamento das condições experimentais, é possível notar que o PTa e NTa tiveram correlação com as condições experimentais BGS e BS, as condições experimentais que tiveram o bioestímulo, indicando que a bioestimulação teve impacto direto na degradação desses compostos nesse estudo.

Figura 13 – Análise de Componentes Principais - PCA dos HPAs de baixo pelo molecular estudados durante os 45 dias de experimento. BG1-5 = Bioaumentação do tempo 1 a 5, BGS1 – 2 = Bioaumentação associado a bioestimulação do tempo 1 a 5, BS1 – 5 = Bioestimulação do tempo 1 a 5 e IB1 – 5 = Biorremediação Intrínseca do tempo 1 a 5. NAP = Naftaleno, ACP = Acenaftileno, ACE = Acenafteno, FLU = Fluoreno, PHE = Fenantreno e ANT = Antraceno, NTa = Nitrogênio total em água, PTa = fósforo total em água, TOC = Carbono Orgânico Total e PT = Fósforo total, NAa = Nitrogênio amoniacal na água, FAa = Fósforo assimilável na água. O processo de mineralização está liberando n e p



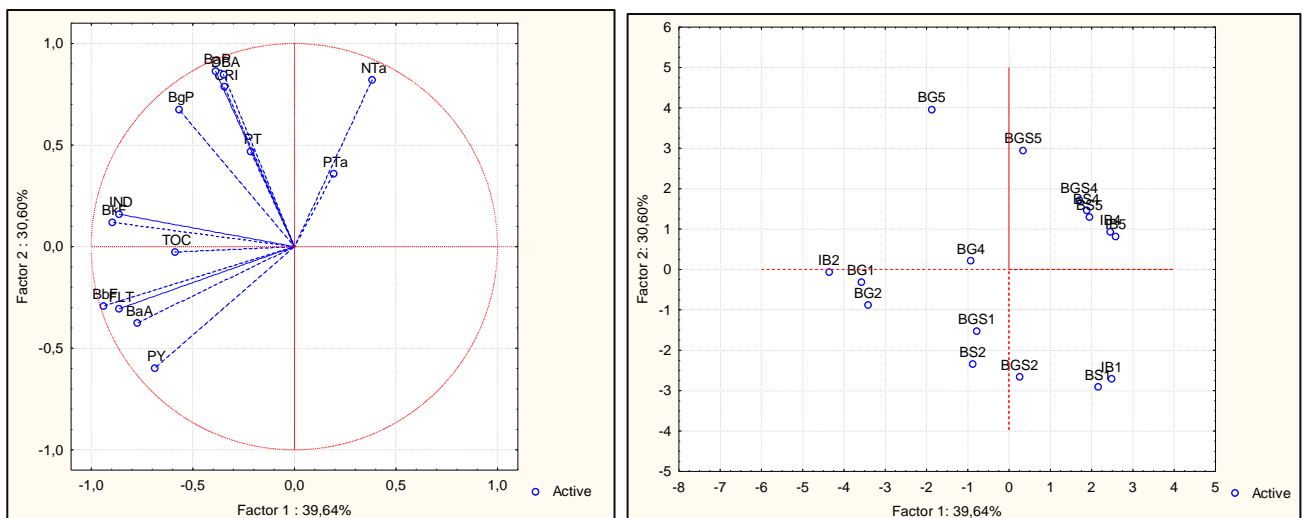
Fonte: Autor, 2020.

A PCA dos compostos de alto peso molecular Fluoranteno, Pireno, Benzo(a)Antraceno, Criseno, Benzo(b)Fluoranteno, Benzo(k)Fluoranteno, Benzo(a)Pireno, Indeno(1,2,3cd)Pireno, Dibenzo(ah)Antraceno e Benzo(ghi)Perileno, figura 14, teve 70,24% de variância, sendo DBA, CRI, BaP, BbF, FLT, NTa BgP, IND e BkF os parâmetros com maior importância estatística nessa PCA e PTa, PT e TOC foram que tiveram a menor importância estatística.

Os compostos BaP, CRI e DBA e tiveram correlação forte entre si e baixa correlação com o PT, enquanto PYR teve forte correlação inversa com PTa e uma correlação inversa com NTa, indicando que o fósforo foi um dos principais parâmetros que influenciaram na degradação do PYR, que coincidentemente foi o HPA de alto peso molecular que teve a maior taxa de remoção nesse estudo. E o parâmetro TOC teve correlação inversão com as concentrações de Fósforo de Nitrogênio na água.

O parâmetro NTa e PTa teve maior correlação com BGS, BS e IB na fase final do experimento, indicando que a bioestimulação influenciou diretamente na biodegradação do PYR, que foi o hidrocarboneto de alto peso molecular que teve as melhores taxas de remoção nesse estudo.

Figura 14 – Análise de Componentes Principais - PCA dos 10 HPAs de alto peso molecular estudados durante os 45 dias de experimento. BA1-5 = Bioaumentação do tempo 1 a 5, BAE1 – 2 = Bioaumentação associado a bioestimulação do tempo 1 a 5, BE1 – 5 = Bioestimulação do tempo 1 a 5 e BII – 5 = Biorremediação Intrínseca do tempo 1 a 5. FLT = Fluoranteno, PY = Pireno, BaA = Benzo(a)Antraceno, CRI = Criseno, BbF = Benzo(b)Fluoranteno, BkG = Benzo(k)Fluoranteno, BaP = Benzo(a)Pireno, IND = Indeno(1,2,3cd)Pireno, DBA = Dibenzo(ah)Antraceno e BgP = Benzo(ghi)Perileno, NTa = Nitrogênio total em água, PTa = fósforo total em água, TOC = Carbono Orgânico Total e PT = Fósforo total no sedimento



Fonte: Autor, 2020.

Sendo possível afirmar que a bioestimulação foi um fator importante para a degradação de compostos de alto e baixo peso molecular nesse estudo e que o fósforo e o nitrogênio foram os principais parâmetros que influenciaram na degradação desses compostos, em especial as frações disponíveis na água do biorreator, pois foram as que apresentam forte correlação com a concentração desses compostos no experimento.

4.3.4 Conclusão

As taxas de biodegradação nesse estudo foram bastante satisfatórias quando considerado o tempo experimental, 45 dias, mostrando que a abordagem metodológica adotada nessa pesquisa foi eficiente na remoção de HPAs em sedimento de manguezal. Tais resultados irão servir como referência futura nas pesquisas voltadas a remediação de áreas impactadas por petróleo e quanto ao uso de extrato vegetal na bioestimulação e inoculação de fungos em biorreatores.

Aparentemente os resultados de pesquisas semelhantes apresentaram taxas de remoção superiores as encontradas nesse estudo, contudo esses altos valores são frutos de pesquisas que simulam a biodegradação em ambientes controlados, em meio de culturas específicos e com HPAs isolados, o que facilita a remoção desses compostos pelos microrganismos.

Enquanto nesse estudo foi utilizado o petróleo diretamente homogeneizado ao sedimento, que como consequência proporciona um ambiente mais tóxico para os microrganismos, devido ao petróleo conter frações mais tóxicas que os HPAs em sua composição, o que impacta diretamente na sobrevivência dos microrganismos e na velocidade que ocorre processo de biorremediação.

Apesar das proporções de Nitrogênio e Fósforo não estarem dentro do que é considerado ideal para um processo de biodegradação, as concentrações de nitrogênio presente na água tiveram boa correlação com a degradação do Pireno, Fluoreno, Naftaleno e Acenaftileno, sendo um indicativo que a fração disponível na água ficou biodisponível para os microrganismos presentes no sedimento, que apresentou uma baixa concentração de nitrogênio.

A bioestimulação e a bioaugmentação mostraram-se eficientes na remoção de diversos HPAs nesse estudo. O extrato vegetal demonstrou ser um bom agente promotor do aumento da densidade microbiana no sedimento, tendo os picos de UFCs após 15 dias de experimento, enquanto nas condições experimentais sem o extrato vegetal esse pico só foi ocorrer após 29 dias. Além de apresentar taxas de remoção maiores em comparação aos demais condições experimentais que não receberam o extrato. A cepa fúngica apresentou afinidade na remoção

do Pireno, onde a remoção desse composto foi mais acentuada nos experimentos onde houve a bioaugmentação.

A união de duas técnicas, bioaugmentação associada a bioestimulação, demonstrou ser o melhor técnica a ser utilizado em um processo de remediação de HPAs, como visto na condição experimental BGS que apresentou as maiores taxas de remoção nesse estudo, indicando o potencial do uso do extrato vegetal e da cepa utilizada na remoção de HPAs em sedimento contaminado com petróleo, dando perspectivas para um possível uso futuro in-situ.

Os resultados dessa pesquisa foram obtidas através do uso de biorreatores que simularam um sistema de maré semelhante ao que acontece nos manguezais, com a subida e a descida da maré, para poder proporcionar os microrganismos um ambiente mais próximo ao natural, contudo o experimento foi realizado em laboratório, sabendo que em um ambiente natural existe uma infinidade de processos ocorrendo ao mesmo tempo que poderiam influenciar na remoção desses hidrocarbonetos.

4.4 AGRADECIMENTOS

Essa pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq através 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, tendo com alicerce laboratorial o Centro de Excelência em Geoquímica: LEPETRO, no Instituto de Geociências – IGEO da Universidade Federal da Bahia – UFBA, através do programa de Pós-Graduação em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente – POSPETRO. O autor desse estudo científico recebeu uma bolsa como auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia – FAPESB (BOL0468/2018). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

5 CONCLUSÃO

Apesar da estação de coleta estudada não apresentar grande contaminação por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos – HPAs, essa região é de bastante importância ecológica e social para a baía de Todos os Santos, principalmente para as pessoas que vivem ao seu entorno e fazem o uso da riqueza ecológica do manguezal para a sua subsistência.

O estuário do rio São Paulo vem sendo impactado negativamente diretamente por diversas atividades da refinaria Landulpho Alves – RLAM, sendo a última registrada em março de 2018 onde cerca de 1000 m³ de água oleoso vazou e atingiu diretamente o manguezal.

O sedimento coletado não apresentou potencial natural para a sua recuperação de forma espontânea, como visto na biorremediação intrínseca, a condição que teve a pior taxa de remoção em comparação as demais condições experimentais, o que torna ainda mais preocupante uma possível contaminação dessa região. Em um cenário onde houvesse o derramamento de petróleo na região estudada os impactos ecotoxicológicos atingiriam toda a cadeia ecológica da região, considerando o tempo que levaria para a remoção completa desses compostos no sedimento.

Já existem relatos científicos da utilização do fungo *Aspergillus* sp. na remediação de diversas frações do petróleo bruto, fungos do gênero são comumente encontrados em solos e sedimentos contaminados com hidrocarbonetos e a sua aplicação em processos de biorremediação vem sendo estudada por diversos pesquisadores em todo o mundo devido ao seu potencial de remoção e biotransformação desses compostos.

Quanto ao uso de extrato vegetal na biorremediação é um método relativamente novo, existem poucos relatos quanto ao uso de extratos vegetais, principalmente a um extrato retira de espécies da família Aracea, que como resultado mostrou ser um bom agente promotor do aumento da densidade microbiana nesse estudo, proporcionando assim um ambiente propício a biodegradação.

Os processos de biorremediação são complexos e experimentos laboratoriais podem apresentar limitações, principalmente quanto as condições naturais, mas os resultados encontrados nesse estudo são bastante relevantes para futuros estudos geoquímicos e biotecnológicos.

Em uma pesquisa futura é sugerido avaliar os mesmos processos em diferentes tipos de óleo, com um maior tempo experimental e com o monitoramento e controle de parâmetros como pH, oxigênio dissolvido, temperatura, salinidade e UFC de bactérias.

O uso de técnicas de biorremediação se mostrou eficiente em diversas pesquisas, porém ainda é necessário mais estudos para o seu aperfeiçoamento, e como visto na prospecção o uso de extrato vegetais e microrganismos nos processos de remediação é uma área com potencial para o desenvolvimento de novas tecnologias, quando considerado o fato de existirem diversas áreas com grande importância ambiental, mas contaminadas por uma variedade de xenobióticos de difícil remediação.

REFERÊNCIAS

- ABMES - Associação Brasileira de Mantenedoras de Ensino Superior. **Educação na China**. Disponível em: <https://www.abmes.org.br/abmes-internacional/experience/4/china/links/detalhe/40>. Acesso em: 08 de out. 2019.
- ADAME, M. F.; REEF, R.; HERRERA-SILVEIRA, J. A.; LOVELOCK, C. E. Sensitivity of dissolved organic carbon exchange and sediment bacteria to water quality in mangrove fore. **Hydrobiologia**, v. 691, n. 1, p. 239-253, 2012.
- AISLABIE, J.; SAUL, D. J.; FOGHT, J. M. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soil. **Extremophiles**, v. 10, n. 3, p. 171-179, 2006.
- AL-HAWAHSH. A. B.; ZHANG, X.; MA, F. Removal and biodegradation of different petroleum hydrocarbons using the filamentous fungus *Aspergillus* sp. RFC-1. **MicrobiologyOpen**, v. 8, n. 1, 2018.
- ALI KHAN, A. H.; TANVEER, S.; ANEES, M.; MUHAMMAD, Y. S.; IQBAL, M.; YOUSAF, S. Role of nutrients and illuminance in predicting the fate of fungal mediated petroleum hydrocarbon degradation and biomass production. **Journal of environmental Management**, v. 176, p. 54-60, 2016.
- AL-MAILEM, D. M.; ELIYAS, M.; KHANAFER, M. RADWAN, S. S. Biofilms constructed for the removal of hydrocarbon pollutants from hypersaline liquids. **Extremophiles**, v. 19, p. 189-196, 2015.
- ALMEIDA, M.; NASCIMENTO, D. V.; JR, P. O. M.; PATIRE, V. F.; ALBERGARIA-BARBOSA, A. C. R. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of a Tropical Bay influenced by anthropogenic activities (Todos os Santos Bay, BA, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 137, p. 399-407, 2018.
- ALVES, J. Mangueizais: Educar para proteger. Secretária de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável - SEMAS. Estado do Rio de Janeiro, **PLANÁGUA**, 2001.
- ANTONIS, K.; MICHAEL, S. **Processo de oxidação química e atenuação biológica para o tratamento de meios contaminados**. Innovative Environmental Tech Inc. BR nº 112015028317. Depósito 02 de maior de 2014. Publicação 25 de julho de 2017.
- APHA. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater **4500-P**. 23th Ed. Washington: APHA, 2017.
- APHA. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater **4110 C**. 23th Ed. Washington: APHA, 2017.
- ASTM – American Society for Testing and Materials. **Standard method for evaluation of antimicrobial agents in aqueous metal working fluids** – ASTM E686-91. 1992.

BEOLCHINI, F.; ROCCHETTI, L.; REGOLI, F.; DELL'ANNO, A. Bioremediation of marine sediments contaminated by hydrocarbons: Experimental analysis and kinetic modeling. **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, n. 1-3, p. 403-407, 2010.

BERNARD, D.; PASCALINE, H.; JEREMIE, J. J. Distribution and origin of hydrocarbons in sediments from lagoons with fringing mangrove communities. **Marine Pollution**, v. 32, p. 734-739, 1996.

BOUCHEZ, A.; PASCAULT, N.; CHARDON, C.; BOUVY, M.; CECCHI, P.; LAMBS, L.; HERTEMAN, M.; FROMARD, F.; GOT, P.; LÉBOULANGER, C. Mangrove microbial diversity and the impact of trophic contamination. **Marine Pollution Bulletin**, v. 66, n. 1-2, p. 39-46, 2013.

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

CHINA. China investe mais em educação em 2018. Disponível em: www.chinahoje.net/china-investe-mais-em-educacao-em-2018/. Acesso em: 09 de out. de 2019.

CUNHA, T. J. F.; MENDES, A. M. S.; GIONGO, V. Matéria orgânica do solo. In: NUNES, R. R.; REZENDE, M. O. O. (Org.). **Recurso solo: propriedades e usos**. São Carlos: Cubo, 2015. Cap. 9, p. 273 - 293.

DZIONEKE, A.; WOJCZYZYNS, D.; GUZIK, U. Natural carriers in bioremediation: A review. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 19, n. 05, 2016.

EDWARDS, S. J.; KJELLERUP, B. V. Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 9909-9921, 2013.

EIBES, G.; LÚ-CHAU, T.; FEIJOO, G.; MORREIRA, M. T.; LEMA, J. M. Complete degradation of anthracene by Manganese Peroxidase in organic solvent mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 4, p. 354-372, 2005.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 3. ed. Revista Ampliada. Brasília, DF: Embrapa solos livro técnico, 2017. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1085209>. Acesso em 02 jun de 2019.

EPA - United States Environmental Protection Agency. **Priority Pollutant List**. 2014. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>. Acesso em: 12 Jan de 2019.

EPA - United States Environmental Protection Agency. **Method 3051A (SW-846): Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils,**” Revision 1. Washington, DC.

EPA - United States Environmental Protection Agency. **Method 3500C: Organic Extraction and Sample Preparation**. 2007

EPA - United States Environmental Protection Agency. **Method 3550C**: Ultrasonic Extraction. 2007.

EZEKOYE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Fungal diversity associated with crude oil-impacted soil undergoing in-situ bioremediation. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v.10, p. 148-152, 2018.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. **Belas e Perigosas**. 2018. Disponível em: <www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/plantas_toxicas.pdf> Acesso em: 18 jul. 2018.

FRANCESCA, Bosco.; MOLLEA, Chiara. Mycoremediation in Soil. *In*: Hugo Saldarriaga-Noreña, Mario Alfonso Murillo-Tovar, Robina Farooq, Rajendra Dongre e Sara Riaz, **Environmental Chemistry and Recent Pollution Control Approaches**. IntechOpen, 2019, p. 1 – 16. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/environmental-chemistry-and-recent-pollution-control-approaches/mycoremediation-in-soil>. Acesso em: 19 nov de 2019.

G1 - Globo Bahia. Duto da Petrobras apresenta vazamento e óleo atinge rio em Candeias, na Bahia; moradores protestam. 2018. Disponível em: <https://g1.globo.com/ba/bahia/noticia/duto-da-petrobras-apresenta-vazamento-e-oleo-atinge-rio-em-candeias-na-bahia.ghtml>. Acesso em: 10 mar. 2019.

GAN, S.; LAU, E. V.; NG, H. K. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2-3, p. 532-549, 2009.

GARCIA, K.S.; ANUNCIACÃO, D.S.; JESUS, G.M. de; GOMES, J.M.P.; SOARES, S.A.R.; GARCIA, R.J.L. Técnicas de campo e laboratório aplicadas às matrizes dos ambientes costeiros nos municípios de Una, Canavieiras e Belmonte. *In*: CELINO, J. J.; HADLICH, G. M.; QUEIROZ, A. F. S.; OLIVEIRA, O. M. C. (Org.). **Avaliação de ambientes costeiros da região Sul da Bahia**: geoquímica, petróleo e sociedade. Salvador: Edufba, 2014.

GHALY, A. E.; YUSRAN, A.; DAVE, D. Effects of Biostimulation and Bioaugmentation on The Degradation of Pyrene in Soil. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, 2013.

GHIZELINI, A. M.; MARTINS, K. G.; GIEßELMANN, Y. C.; SANTORO, E.; PASQUALETTE, L.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSADO, A. S.; MACRAE, A. Fungal communities in oil contaminated mangrove sediments – Who is in the mud?. **Marine Pollution Bulletin**, v. 139, p. 181-188, 2019.

GIARRIZO, T.; JESUS, A. J. J.; LAMEIRA, E. C.; ALMEIDA, J. B. A.; ISAAC, V.; SAINT-PAUL, U. Weight-length relationships for intertidal fish fauna in a mangrove estuary in Northern Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, n. 4, p. 325-327, 2006.

GODECKE, M. V.; NAIME, R.H.; FIGUEIREDO, J. A. S.; O consumismo e a Geração de Resíduos Sólidos Urbanos no Brasil. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 8, n. 8, p. 1700-1712, 2012.

GONZALEZ-ABRADELO, D.; PEREZ-LLANO, Y.; PEIDRO-GUZMAN, H.; SANZHESE-CARBENTE, M. R.; FOLCH-MALLOL, J. L.; ARANDA, E.; VAIDYANATHAN, V. K.; CABANA, H.; GUNDE-CIMERMAN, N.; BATISTA-GARCIA, R. A. First demonstration that ascomycetous halophilic fungi (*Aspergillus sydowii* and *Aspergillus destruens*) are useful

in xenobiotic mycoremediation under high salinity conditions. **Boresource Technology**, v. 279, p. 287-296, 2019.

HALEYUR, N.; SHAHSAVARI, E.; JAIN, S. S.; KOSHLAF, E.; RAVINDRAN, V. B.; MORRISON, P. D.; OSBORN, A. M.; BALL, A. S. Influence of bioaugmentation and biostimulation on PAH degradation in aged contaminated soils: Response and dynamics of the bacterial community. **Journal of Environmental Management**, v. 238, p. 49-58, 2019.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. (1-3), p., 2009.

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

HAYDEN, H. L.; GRANEK, E. F. Coastal sediment elevation change following anthropogenic mangrove clearing. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. v. 165, p. 70-74, 2015.

HAZEN, T. C.; PRINC, R. C.; MAHMOUDI, N. Marine Oil Biodegradation. **Environmental Science Technology**, v. 50, n. 5, p. 2121-2129, 2016.

IET - Innovative Environmental technologies, inc. **Patents**: Masking the world safe through innovation. Disponível em: < <http://www.iet-inc.net/patents/> >. Acesso em: 05 dez. de 2018.

IMAM, A.; SUMAM, S. K.; GHOSH, D.; KANAUIJA, P. K. Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. **TrAC Trends in analytical Chemistry**, v. 118, p. 50-64, 2019.

ISAA, P.; ALESSANDRELLO, M. J.; MACEDO, A. J.; ESÉVEZ, M. C.; FERRERO, M, A. Pre-exposition to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enhance biofilm formation and hydrocarbon removal by native multi-species consortium. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 2, p. 1372-1378, 2017.

ITOPF - International Tanker Owners Pollution Federation. Oil Tanker Spill Statistics 2018. Disponível em: < <https://www.itopf.org/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>>. Acesso em: 09/09/2019.

JÚLIO, A. D. L.; FERNANDES, R. C. R.; COSTA, M. D.; NEVES, J. C. L.; RODRIGUES, E. M.; TÓTOLA, M. R. A new biostimulation approach based on the concept of remaining P for soil bioremediation. **Journal of Environmental Management**, v. 207, p. 417-422, 2018.

JUSTIA: **Patentes**. Disponível em: <<https://patents.justia.com/assignee/thermocyclomics-llcUS2013295650>>. Acesso em: 05 dez. 2018.

KONG, L.; GAO, Y.; ZHOU, Q.; ZHAO, X.; SUN, Z. Biochar accelerates PAHs biodegradation in petroleum-polluted soil by biostimulation strategy. **Journal of Hazardous Materials**, v. 343, p. 276-284, 2018.

KOSHLAF, E.; SHASAVARI, E.; ABURTO-MEDINA, A.; TAHA, M.; HALEYUR, N.; MAKADIA, T. H.; MORRISON, P. D.; BALL, A. S. Bioremediation potential of diesel-contaminated Libyan soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 297-305, 2016.

LANG, F. F.; DESTAIN, J.; DELVIGNE, F.; DRUART, P.; ONGENA, M.; THONART, P. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mangrove Sediments Under Different Strategies: Natural Attenuation, Biostimulation, and Bioaugmentation with *Rhodococcus erythropolis* T902.1. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 227, n. 297, 2016.

LANG, F. S.; DESTAIN, J.; DELVIGNE, F.; DRUART, P.; ONGENA, M.; THORNART, P. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mangrove Sediments Under Different Strategies: Natural Attenuation, Biostimulation, and Bioaugmentation with *Rhodococcus erythropolis* T902.1. **Water, air & Soil Pollution**, v. 227, n. 297, 2016.

LANGE, B.; KREMER, S.; STERNET, O.; ANKE, H. Pyrene Metabolism in *Crinipellis stipitaria*: Identification of trans-4,5-Dihydro-4,5-Dihydroxypyrene and 1-Pyrenylsulfate in Strain JK364t. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 10, p. 2602-3607, 1994.

LEIGHTON, F. A.; PEAKALL, D. B.; BUTLER, R. G. Heinz-body hemolytic anemia from the ingestion of crude oil: a primary toxic effect in marine birds. **Science**, v. 220, p. 871-973, 1983

LI, J.; LI, F.; LIU, Q. PAHs behavior in surface water and groundwater of the Yellow River estuary: Evidence from isotopes and hydrochemistry. **Chemosphere**, v. 178, p. 143-153, 2017.

LIU, Q; LI, Q; WANG, N; LIU, D; ZAN, L; CHANG, L; GOU, X; WANG, P. Bioremediation of petroleum-contaminated soil using aged refuse from landfills. **Waste Management**, 2018.

LIU, Q; LI, Q; WANG, N; LIU, D; ZAN, L; CHANG, L; GOU, X; WANG, P. Bioremediation of petroleum-contaminated soil using aged refuse from landfills. **Waste Management**, 2018.

LIU, S.; ZENG, G.; NIU, Q.; LIU, Y.; ZHOU, L.; JIANG, L.; TAN, X.; ZHANG, C.; CHENG, M. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 25-33, 2017.

IL, C.; WONG, Y.; WANG, H.; TAM, N. F. Anaerobic biodegradation of PAHs in mangrove sediment with amendment of NaHCO₃. **Journal of Environmental Sciences**, v. 30, p. 148-156, 2015.

LOFTHUS, S.; ALMAS, I. K.; EVANS, P. OLIVER, P.; BRKSTAD, O. G. Biodegradation in seawater of PAH and alkylphenols from produced water of a North Sea platform. **Chemosphere**, v. 206, p. 456-473, 2018.

LOUISA, W. P. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, n, 1-3, p. 81-89, 2010.

LUNA, S.; OLIVEIRA, O. M. C.; QUINTELLA, C. M. A. L. T. M. H. **Remediação de solo contaminado com petróleo utilizando extrato vegetal de uma espécie da família das araceae**. Dissertação (Mestrado em Geoquímica) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2018.

MADUEÑO, L.; COPPOTELLI, B. M.; ALVAREZ, H. M.; MORELLI, I. S. Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 2, p. 345-351, 2011.

MADUEÑO, L.; COPPOTELLI, B. M.; ALVAREZ, H. M.; MORELLI, I. S. Isolation and characterization of indigenous soil bacteria for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 2, p. 345-351, 2011.

MANARIOTIS, I. D.; KARAPANAGIOT, H. K.; CHRYSIKOPOULOS, C. V. Degradation of PAHs by high frequency ultrasound. **Water Research**, v. 45, p. 2587-2594, 2011.

MANGWANI, N.; KUMARI, S.; DAS, S. Marine Bacterial Biofilms in Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Under Terrestrial Condition in a Soil Microcosm. **Pedosphere**, v. 27, n. 3, p. 548-558, 2017.

MAYOR, Federico. As biotecnologias no início dos anos noventa: êxitos, perspectivas e desafios. **Estud. Av. São Paulo**, v. 6, n. 16, p. 07-28, Dec. 1992 .

MAZEAS, L.; BUDZINSKI, H. Polycyclic aromatic hydrocarbon 13C/12C ratio measurement in petroleum and marine sediments: Application to standard reference materials and a sediment suspected of contamination from the Erika oil spill. **Journal of Chromatography**, v. 923, p. 164-176, 2001

MAZEAS, L.; BUDZINSKI, H. Polycyclic aromatic hydrocarbon 13C/12C ratio measurement in petroleum and marine sediments: Application to standard reference materials and a sediment suspected of contamination from the Erika oil spill. **Journal of Chromatography**, v. 923, p. 164-176, 2001.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia brasiliensis**, v.11, n. 2, p. 188-201, 2007.

MOGHADAM, M. S.; EBRAHIMPOUR, G.; ABTAHI, B.; GHASSEMPOUR, A.; HASHTROUDI, M. S. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. **Journal Environmental Health Science & Engineering**, v. 12, 2014.

MOREIRA, I. T. A.; OLIVEIRA, O. M. C.; TRIGUIS, J. A.; QUEIROZ, A. F. S.; FERREIRA, S. L. C.; MARTINS, C. M. S.; SILVA, A. C. M.; FALCÃO, B. A. Phytoremediation in mangrove sediments impacted by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's) using *Avicennia schaueriana*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 67, n. 1-2, p. 130-136, 2013.

MUANGCHINDA, C.; PANSRI, R.; WONGWONGSEE, W.; PINYAKONG, O. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation potential in mangrove sediment from Don Hoi Lot, Samut Songkram Province, Thailand. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 5, p. 1311 - 1324, 2013.

MUELLER, J.; SCALZI, M.; KARACHALIOS, A. **Methanogenesis control during environmental applications using antimethanogenic reagents**. Innovative Environmental Technologies Inc. US nº 2018093308. Depósito 29 de novembro de 2017. Publicação 05 de abril de 2018.

NOLAND, S. **Method of in situ remediation of soils using a bioremediation composition including a time release material**. Remediation Product Inc. US nº 20190217354A1. Depósito 18 de julho de 2018. Publicação 22 de março de 2019.

NOLAND, S.; ELLIOT, B. **Compositions for removing hydrocarbons and halogenated hydrocarbons from contaminated environment**. Remediation Products Inc. US nº 20180297871A1. Depósito 18 de junho de 2018. Publicação 18 de outubro de 2018.

NSF - National Science Foundation. NSF FY 2018 Performance and Financial Highlights. Disponível em: https://www.nsf.gov/publications/pub_summ.jsp?ods_key=nsf19003. Acesso em: 07 out. 2019.

NZILA, A.; RAZZAK, S. A.; ZHU, J. Bioaugmentation: An Emerging Strategy of Industrial Wastewater Treatment for reuse and Discharge. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.13, n. 9, 2016.

O'DRISCOLL, K.; SAMBROTTO, R.; DIFILIPPO, R.; PICCILLO, P. **Bioremediation of persistent organic pollutants using thermophilic bacteria**. Thermocyclomics, Llc. WO nº WO2013116830A1. Depósito 04 de fevereiro de 2013. Publicação 08 de agosto de 2013.

ONUBR - Organizações das Nações Unidas no Brasil. **Mangues podem desaparecer nos próximos 100 anos, alerta UNESCO**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/mangues-podem-desaparecer-nos-proximos-100-anos-alerta-unesco/>>. Acesso em: 08/06/2018.

PASSARINI, M. R. Z.; RODRIGUES, M. V. N.; SILVA, M.; SETTE, L. D. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 364-370, 2011.

PEREIRA, T. S.; MOREIRA, I. T. A.; OLIVEIRA, M. O. M. C.; RIOS, M. C.; FILHO, W. A. C. S.; ALMEIDA, M.; CARVALHO, G. S. Distribution and ecotoxicology of bioavailable metals and As in surface sediments of Paraguaçu estuary, Todos os Santos Bay, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 99, n. 1-2, p. 166-177, 2015.

PINO-HERRERA, D. O.; PECHAUD, Y.; HUGUENOT, D.; ESPOSITO, G.; HULLEBUSCH, E. D. V.; OTURAN, M. A. Removal mechanisms in aerobic slurry bioreactors for remediation of soils and sediments polluted with hydrophobic organic compounds: An overview. **Journal of Hazardous Materials**, v. 339, p. 427-449, 2017.

PONGPIACHAN, S.; HATTAYANONE, M.; TIPMANEE, D.; SUTTINUN, O.; KHUMSUP, C.; KITTIKOON, I.; HIRUNYATRAKU, P. Chemical characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in 2013 Rayong oil spill-affected coastal areas of Thailand, **Environmental Pollution**, v. 233, p. 992 – 1002, 2018.

QUINTELLA, C. M. A. L. T. M. H.; ALMEIDA, P. F.; GONÇALVES, O. **Recuperação terciária de petróleo em reservatório de campos maduros por meio de extratos vegetais**. Universidade Federal da Bahia (BR/BA). BR nº 1020170030520A2. Depósito 15 de fevereiro de 2017. Publicação 25 de setembro de 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.

ROCHA, G. O.; GUARIEIRO, A. L. N.; DE ANDRADE, J. B.; EÇA, G. F.; DE ARAGÃO, N. M.; AGUIAR, R. M.; KORN, M. G. A.; BRITO, G. B.; MOURA, C. W. N.; HATJE, V. Contaminação na Baía de Todos os Santos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 5, p. 583-610, 2012

ROSA, L.H.; VAZ, A.B.M.; CALIGIORNE, R. B.; CAMPOLINA, S.; ROSA, C.A. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). **Polar Biol**, v. 32, p. 161–167, 2009.

SANDILYAN, S.; KATHIRESAN, K. Mangrove conservation: a global perspective. **Biodiversity Conservation**, v. 21, p. 3523-3542, 2012.

SCALZI, M.; KARACHALIOS, A. **Chemical Oxidation and Biological Attenuation Process for the Treatment of Contaminated Media**. Innovative Environmental Technologies Inc. US nº 20170239699A1. Depósito 29 de agosto de 2016. Publicação 24 de agosto de 2017.

SCALZI, M.; KARACHALIOS, A. **Heavy metal stabilization and methane inhibition during induced or naturally occurring reducing conditions in contaminated media.**

Innovative Environmental Technologies Inc. US n° 2015183670. Depósito 02 de novembro de 2014. Publicação 02 de julho de 2015.

SCALZI, M.; KARACHALIOS, A. **Hemmung einer methanproduktion durch anaerobe reduktive dechlorierung.** Innovative Environmental Technologies Inc. EP n° 2969977.

Depósito 02 de maio de 2014. Publicação 20 de janeiro de 2016.

SCALZI, M.; KARACHALIOS, A. **Verfahren für chemische oxidierung und biologische dämpfung zur behandlung verunreinigter medien.** Innovative Environmental Technologies Inc. EP n° 2994428.

Depósito 02 de maio de 2014. Publicação 16 de março de 2015.

SCALZI, M.; MUELLER, J.; KARACHALIOS, A.; **Inhibition of methanogenesis in reducing environments.** Innovative Environmental Technologies Inc. US n° 2018001358.

Depósito 17 de janeiro de 2017. Publicação 04 de janeiro de 2018.

SERAFY, J. E.; SHIDELER, G. S.; ARAÚJO, R. J. ; NAGERLKERKEN, I. Mangroves Enhance Reef Fish Abundance at the Caribbean Regional Scale. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1- 15, 2015.

SHEN, T.; PI, Y.; BAO, M.; XU, N.; LI, Y.; LU, J. Biodegradation of different petroleum hydrocarbons by free and immobilized microbial consortia. **Environmental Science: Process & Impacts**, v.17, n. 12, p. 2022-2033, 2015.

SIKIMAKI, J.; SANCHIRICO, J. N.; JARDINE, S. L. Global economic potential for reducing carbon dioxide emissions from mangrove loss. **Proceeding os the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 36, p. 14369-14374, 2012.

SILVA, M. G.; ALMEIDA, D. G.; MIRANDA, R. C. M.; MACIEL, C. C. S.; GUSMÃO, N. B. Produção da enzima lignina peroxidase por fungos filamentosos utilizando óleo diesel como substrato. **Scientia Plena**, v. 7, n. 10, 2011.

SILVA-CAMACHO, D. S.; GOMES, R. S.; SANTOS, J. N. S.; ARAÚJO, F. G. Distribution of benthic fauna in sediment grains and prop roots of a mangrove channel in south-eastern Brazil. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 97, n. 2, p. 377-385, 2017.

SINGH, R.; PAUL, D.; JAIN, R. K. Biofilms: implications in bioremediation. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 389-397, 2006.

SONG, H.; WANG, Y.-S.; SUN, C. -C, WANG, Y.-T.; PENG, Y.-L; CHENG, H. Effects of pyrene on antioxidant systems and lipid peroxidation level in mangrove plants, *Bruguiera gymnorrhiza*. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 6, p. 1625-1632, 2012.

TAM, N. F. Y.; KE, L.; WANG, X. H.; WONG, Y. S. Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangrove swamps. **Environmental Pollution**, v. 114, n.2, p. 255-263, 2001.

TERCEIRO, A, M.; SANTOS, J. J. S.; CORREIRA, M. M. F. Caracterização da sociedade, economia e meio ambiente costeiro atuante à exploração dos manguezais no estado do maranhão. **Revista de Administração e Negócios da Amazônia**, v. 5, n.3, p. 94-111, 2013.

TISSOT, B.P., WELTE, D.H. The Composition and Classification of Crude and the Influence of Geological Factors, Cap 1 Composition of Crude Oils. **Petroleum Formation and Occurrence**. Berlim, Ed. Springer-Verlag, 1984, p. 375 - 414/1984, 2.. Berlim.

VIAMAJALA, S.; PEYTON, B. M.; RICHA, L. A.; PETERSEN, J. N. Solubilization, solution equilibria, and biodegradation of PAH's under thermophilic conditions. **Chemosphere**, v. 66, n. 6, p. 1094-1106, 2007.

WANG, C.; WANG, F.; WANG, T.; BIAN, Y.; YANG, X.; JOANG, X. PAHs biodegradation potential of indigenous consortia from agricultural soil and contaminated soil in two-liquid-phase bioreactor (TLPB). **Journal os Hazardous Materials**, v. 176, n. 1-3, p. 41-47, 2010.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A., GELFAND, D.H., SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. (Eds.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. San diego: Academic Press, p. 315-322, 1990.

WIPO - World Intellectual Property Organizations. 4220. (US20180297871) **Composições para remoção de hidrocarbonetos e hidrocarbonetos halogenados a partir de ambientes contaminados.** Disponível em:

<https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?jsessionid=4C3C9A054A889035F785C48FC84FAC6F.wapp2nC?docId=US231858547&recNum=4220&office=&queryString=&prevFilter=&sortOption=Pub+Date+Desc&maxRec=71343184>. Acesso em: 04 dez. de 2018.

WOLSKA, L.; MECHLIŃSKA, A.; ROGOWSKA, J.; NAMIEŚNIK, J. Sources and fate of PAHs and PCBs in the marine environmet. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 1172-1189, 2012

WU, M.; DICK, W .A.; LI, W.; WNAG, X.; YANG, Q.; WANG, T.; XU, L.; ZHANG, M.; CHEN, L. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. **Internationl Biodeterioration & Biodegradation**, v. 107, p. 158-164, 2016.

WU, M.; DICK, W .A.; LI, W.; WNAG, X.; YANG, Q.; WANG, T.; XU, L.; ZHANG, M.; CHEN, L. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial

community in a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 107, p. 158-164, 2016.

WU, Q.; LEUNG, J. Y. S.; TAM, N, F. Y.; CHEN, S, MAI, B.; ZHOU, X; XIA, L.; GENG, X. Biological risk and pollution history of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Nansha mangrove, South China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, n. 1, p. 92-98, 2014.

YE, J.; YIN, H.; QIANG, J.; PENG, H.; QIN, H.; ZHANG, N.; ELE, B. Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 185, n. 1, p. 174-181, 2011.

ZAFRA, G.; ABSALÓN, À. E.; DEL CARMEN CUEVAS, M.; CORTÉS-ESPINOSA, D. V. Isolation and Selection of a Highly Tolerant Microbial Consortium with Potential for PAH Biodegradation from Heavy Crude Oil-Contaminated Soils. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 225, n. 1826.

ZENG, Q.; JEPPESEN, E.; GU, X; MAO, Z.; CHEN, H. Distribution, fate and risk assessment of PAHs in water and sediments from an aquaculture- and shipping-impacted subtropical lake, China. **Chemosphere**, v. 201, p. 612-620, 2018.

ZHANG, J.; ZUE, Q.; GAO, H.; WNAG, P. Degradation of crude oil by fungal enzyme preparations from *Aspergillus* spp. for potential use in enhanced oil recovery. **Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 865-875, 2016.

ZJU - Zhejiang University. **Research**. Disponível em: <www.zju.edu.cn/english/research/list.htm>. Acesso em: 09 de Out. 2019.

OLIVEIRA, L. D. Da Eco-92 à Rio +20: uma breve avaliação de duas décadas. **Boletim Capineiro de Geografia**, v. 2, n. 3, p. 479 - 499. 2012

LUNA, S.; SANTOS, M. A.; BARBOSA, R. M.; QUINTELLA, C. M. CENÁRIO TECNOLÓGICO PARA REMEDIAÇÃO DE ÁREAS AFETADAS COM. **Caderno de Prospecção**, v. 8, n. 3, p. 531-543, 2015.

QUINTELLA, C. M.; MATA, A. M.; LIMA, L. C. P. Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. **Journal of Environmental Management**, v. 241, p. 156-166, 2019.

Instituto Brasileiro de Petróleo e Gás - IBP. Maiores consumidores de petróleo e LGN em 2019. Disponível em: <https://www.ibp.org.br/observatorio-do-setor/snapshots/maiores-consumidores-de-petroleo-e-lgn-em-2019/>. Acesso em 21 ago. 2020.

APÊNDICE A

Tabela 1 - Valores de Nitrogênio Total (NT), Fósforo Assimilável (FA), Fósforo Total (FT) e Nitrogênio Amoniacal (NA) em água nos tempos 0, 7, 29 e 45 de coleta nas diferentes condições experimentais. LQM = Limite de Quantificação do Método. LQM FT = 0,5 mg L⁻¹, LQM FA = < 0,005 mg L⁻¹.

Dias	Parâmetros	BG	BS	IB	BGS
0	NT (mg L ⁻¹)	05,34	4,59	5,15	6,24
	NA (mg L ⁻¹)	1	1	1	3,9
	FT (mg L ⁻¹)	<LQM	<LQM	0,17	<LQM
	FA (mg L ⁻¹)	<LQM	<LQM	<LQM	0,1
7	NT (mg L ⁻¹)	6,8	6,76	6,58	5,8
	NA (mg L ⁻¹)	1,3	1,3	1	1,3
	FT (mg L ⁻¹)	<LQM	292,1	<LQM	0,17
	FA (mg L ⁻¹)	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM
29	NT (mg L ⁻¹)	12,5	11,63	13	12,73
	NA (mg L ⁻¹)	1,1	1,1	1,1	1
	FT (mg L ⁻¹)	0,13	0,15	0,1	0,16
	FA (mg L ⁻¹)	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM
45	NT (mg L ⁻¹)	11,49	NA	NA	12,65
	NA (mg L ⁻¹)	1	1	1	0,9
	FT (mg L ⁻¹)	<LQM	<LQM	NA	0,39
	FA (mg L ⁻¹)	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM

Elaboração: Autor, 2019

Tabela 2 - Valores de Nitrogênio Total (NT), Fósforo Assimilável (FA), Fósforo Total (FT) e Carbono Orgânico Total (COT) no sedimento em todos os tempos de coleta nas diferentes condições experimentais. LQM = Limite de Quantificação do Método. LQM NT = 0,10 %. LQM

Dias	Parâmetros	BG	BS	IB	BGS
0	NT (%)	0,2	<LQM	<LQM	<LQM
	FA (mg kg ⁻¹)	149,66	NA	145,3	178,23
	FT (mg kg ⁻¹)	302,9	312,4	293,4	301,1
	COT (%)	1,78	1,69	1,31	1,61
7	NT (%)	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM
	FA (mg kg ⁻¹)	179	181,7	147,5	189,23
	FT (mg kg ⁻¹)	302,6	292,1	285,8	311,9
	COT (%)	2,38	1,61	1,47	1,7
15	NT (%)	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM
	FA (mg kg ⁻¹)	166,6	173,4	165,5	165,83
	FT (mg kg ⁻¹)	320,4	294,3	301,5	306,36
	COT (%)	1,61	1,48	1,37	1,59
29	NT (%)	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM
	FA (mg kg ⁻¹)	173,6	177,4	162,8	169
	FT (mg kg ⁻¹)	311,5	287	NA	305,46
	COT (%)	1,59	1,51	1,45	1,58
45	NT (%)	<LQM	<LQM	<LQM	<LQM
	FA (mg kg ⁻¹)	NA	151,6	164,7	145,4
	FT (mg kg ⁻¹)	335,8	296,9	309,5	322,26
	COT (%)	1,68	1,49	1,51	1,77

Elaboração: Autor, 2019.

Tabela A3 - Concentração dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos estudados, encontrados nas amostras de sedimento em $\mu\text{g kg}^{-1}$ referente as condições experimentais BG - Bioaumentação e BGS – Bioaumentação associado a bioestimulação e recuperação do padrão analíticos utilizado em porcentagem

Composto	Concentração dos HPAs									
	BG					BGS				
	0	7	15	29	45	0	7	15	29	45
Naftaleno	152,42	211,06	1,67	1,55	54,84	86,14	170,79	5,06	17,60	14,79
Acenaftileno	30,95	24,54	24,80	26,57	30,30	26,16	26,44	22,55	19,70	20,33
Acenafteno	35,03	35,61	86,68	71,64	22,02	70,68	23,21	20,50	14,39	11,79
Fluoreno	473,55	512,54	188,00	170,88	314,72	373,09	370,61	327,54	231,43	202,69
Fenantreno	1780,41	1806,59	1481,80	1408,46	1332,96	1704,65	1349,49	1320,59	1060,25	910,14
Antraceno	147,18	115,91	101,22	104,79	127,10	130,27	97,37	73,69	92,40	106,68
Fluoranteno	64,99	55,05	54,42	45,23	37,32	47,53	50,46	41,47	29,98	41,17
Pireno	177,18	166,70	152,83	145,20	120,21	151,78	135,19	131,82	97,28	97,32
Benzo(a)Antraceno	195,65	276,67	253,05	234,75	227,40	236,12	221,97	203,12	170,05	172,41
Criseno	98,63	94,71	91,73	84,02	118,27	87,37	76,74	77,01	98,62	93,62
Benzo(b)Fluoranteno	116,24	109,49	108,52	91,95	74,70	89,45	82,72	81,85	58,61	69,50
Benzo(k)Fluoranteno	13,79	14,25	12,87	10,64	12,18	11,03	12,20	10,59	9,88	13,77
Benzo(a) Pireno	44,07	33,42	41,39	35,50	55,37	32,56	25,15	29,25	41,72	52,01
Indeno(1,2,3cd)Pireno	33,73	21,21	35,60	27,09	23,98	21,05	18,27	17,81	16,59	20,83
Dibenzo(ah)Antraceno	4,17	5,65	6,15	4,58	6,73	2,67	1,10	3,53	5,00	6,01
Benzo(ghi)Perileno	30,17	23,57	36,92	26,10	38,80	19,89	18,70	16,42	26,45	28,07
TERFENIL D14	87,39	77,37	89,66	74,25	82,47	71,41	69,42	80,68	76,23	74,85

Tabela A4 - Concentração dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos estudados, encontrados nas amostras de sedimento em $\mu\text{g kg}^{-1}$ referente as condições experimentais BS – Bioestimulação e IB – Biorremediação Intrínseca e recuperação do padrão analíticos utilizado em porcentagem.

Composto	Concentração dos HPAs									
	BS					IB				
	0	7	15	29	45	0	7	15	29	45
Naftaleno	13,06	84,12	1,08	8,64	6,53	3,26	17,17	5,93	12,82	31,55
Acenaftileno	31,76	34,41	19,87	18,34	18,46	24,91	23,64	23,82	20,27	21,85
Acenafteno	25,04	25,56	22,46	15,80	13,21	21,33	10,47	26,66	16,01	17,81
Fluoreno	373,10	433,14	311,87	201,07	207,00	277,75	369,80	283,75	222,90	241,97
Fenantreno	1401,11	1591,96	1185,18	1101,65	972,51	1220,57	974,45	1220,01	1093,20	1062,74
Antraceno	102,36	105,17	84,21	93,71	57,56	55,96	133,69	74,84	86,87	113,15
Fluoranteno	36,94	54,01	42,37	31,37	33,26	37,80	84,57	38,65	32,55	31,06
Pireno	135,98	161,08	122,60	100,25	91,85	129,95	130,17	130,46	98,37	93,87
Benzo(a)Antraceno	206,79	261,45	174,91	175,25	166,42	195,55	296,64	176,68	172,84	177,07
Criseno	75,64	90,42	65,49	100,43	95,01	69,38	107,18	63,67	100,33	101,83
Benzo(b)Fluoranteno	71,36	90,77	65,06	54,54	59,65	59,80	118,64	59,18	53,53	49,36
Benzo(k)Fluoranteno	8,32	12,06	8,77	9,72	9,93	7,58	17,28	7,12	8,57	8,02
Benzo(a) Pireno	24,33	29,95	23,94	42,43	41,35	20,26	46,71	20,29	37,99	28,54
Indeno(1,2,3cd)Pireno	11,08	17,85	11,48	14,77	13,29	10,66	24,79	10,14	10,70	9,67
Dibenzo(ah)Antraceno	1,99	3,45	2,02	4,69	4,61	2,50	4,80	1,87	3,88	3,83
Benzo(ghi)Perileno	12,82	17,43	11,66	21,78	18,63	11,17	21,82	10,55	15,82	14,08
TERFENIL D14	76,77	72,69	79,80	83,25	83,34	77,37	68,22	77,68	70,75	76,89

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

C268 Cardoso Filho, Milton Santos

Biorremediação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos - HPAs em sedimento de manguezal assistida em biorretores através do fungo *Aspergillus* sp. e de extrato vegetal / Milton Santos Cardoso Filho. – Salvador, 2020.

68 f.

Orientadora: Prof. Dr. Ícaro Thiago Andrade Moreira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Geociência, 2020.

1. Geoquímica. 2. Extrato vegetal. 3. Petróleo 4. Biorremediação. I. Moreira, Ícaro Thiago Andrade. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 550.4