



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS
CURSO DE OCEANOGRAFIA**

ANA PAULA NASCIMENTO DE CARVALHO

**CONTRIBUIÇÃO DO AGREGADO ÓLEO MATERIAL
PARTICULADO EM SUSPENSÃO (OSA) NO DESENVOLVIMENTO
DE BACTÉRIAS HIDROCARBONOCLÁSTICAS**

Salvador
2014

ANA PAULA NASCIMENTO DE CARVALHO

**CONTRIBUIÇÃO DO AGREGADO ÓLEO MATERIAL
PARTICULADO EM SUSPENSÃO (OSA) NO
DESENVOLVIMENTO DE BACTÉRIAS
HIDROCARBONOCLÁSTICAS**

Monografia apresentada ao Curso de Oceanografia,
Instituto de Geociências, Universidade Federal da
Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau
de Bacharel em Oceanografia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Olívia Maria Cordeiro de
Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr^o Ícaro Thiago Andrade Moreira

Salvador
2014

TERMO DE APROVAÇÃO

ANA PAULA NASCIMENTO DE CARVALHO

CONTRIBUIÇÃO DO AGREGADO ÓLEO MATERIAL
PARTICULADOS EM SUSPENSÃO (OSA) NO
DESENVOLVIMENTO DE BACTÉRIAS
HIDROCARBONOCLÁSTICA.

Monografia aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Ícaro Thiago Andrade Moreira
Doutor em Geologia Ambiental e dos Recursos Hídricos pela Universidade Federal da Bahia
Universidade Federal da Bahia

Claudia Yolanda Reyes
Mestre em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente pela Universidade Federal da Bahia
Universidade Federal da Bahia

Danusia Ferreira Lima
Doutor em Geologia Ambiental e dos Recursos Hídricos pela Universidade Federal da Bahia
Universidade Federal da Bahia

Salvador, 12 de dezembro de 2014

AGRADECIMENTOS

A Deus por simplesmente tudo, principalmente por ter deixado sempre uma luz iluminando meu caminho, mesmo sem saber para onde eu estava indo, sempre tive a certeza que Ele estava ao meu lado.

Aos meus pais e meu irmão por me apoiarem incondicionalmente na minha vida, me ajudaram sempre que precisei, chegar até aqui sem o apoio deles teria sido muito mais difícil. A minha família linda que acompanhou todos os meus passos, compartilhando comigo todos os momentos.

A minha orientadora Olívia pela confiança e ensinamentos acadêmicos.

Ao coorientador desse trabalho Ícaro por acreditar que eu sempre era capaz de ir mais longe, por me desafiar a pensar além do que estava escrito ou que é aceito por verdade, por me colocar sempre na dúvida.

A Danúsia pelos ensinamentos, orientações, pela parceria e por acreditar em todos os momentos que eu iria conseguir.

A equipe do NEA, sem eles esse trabalho não seria possível: Gisele (Gi) sempre linda, Sarah, Jorginho, Jose, Rui, Cláudia, Isabel, Karina, Lismar, Alex, Adriana, Jairo, obrigado pelo apoio e ajuda que sempre tive de vocês.

Aos meus professores do curso de oceanografia que me orientaram no aprendizado e na pesquisa desse curso lindo, cujo o qual sempre haverá o que ser descoberto: Lessa, Clemente, Vanessa, Mauro, Mafalda, Ernande, Chico, Hebe, Ruy, Minervino, Landim. E a Rita, secretária do curso, sempre disposta a ajudar no que fosse preciso.

Aos meus amigos de curso e do laboratório, por compartilharem comigo risadas, viagens, tensões e farras: Cibele, Larissa, Ramilla, Marcos, Mari Rios, Thiago, Jessyca, Verâne, Clarinha, Deco, Lucas, Júlia, Fernada Wândega, Nai, Isa, Andrade, Lucas Cintra, Paloma, Luana Sena, Rodrigo e aos demais que por ventura esqueci.

As minhas CAJAZEIRAS (Lu, Vi e Moi), vocês foram e são indispensáveis em tudo isso. Aos meus amigos Raquel e Rafa pela amizade em todos os momentos, vocês que me acompanharam nesses anos de curso, me apoiaram, dividiram comigo sonhos, conquistas, tensões, diversões, incertezas e me ajudaram sempre.

Aos fornecedores de fomento do programa PERMANECER da universidade, pelo apoio financeiro nas pesquisas durante 3 anos. E a FAPESB pelo apoio financeiro nesse ano de pesquisa.

RESUMO

A mancha de óleo que atinge o ambiente marinho durante um derramamento, sofre alterações em suas características físico-químicas. Essas alterações ocorrem de acordo com alguns parâmetros intrínsecos de cada local como a energia de turbulência do ambiente que fragmenta a mancha em gotículas de óleo, essas por sua vez colidem com o material particulado em suspensão (MPS) formando uma agregação entre a gotícula de óleo e o MPS que é o agregado óleo material particulado em suspensão (OSA). No ambiente pode permanecer na coluna d'água ou sedimentar para o fundo. Essa interação proporciona um aumento na superfície de contato disponível por volume de óleo, que irá facilitar a biodegradação por microrganismos presentes no ambiente. Entre esses microrganismos, temos as bactérias hidrocarbonoclásticas, que são capazes de utilizar os hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono. O presente estudo teve por objetivo avaliar o desenvolvimento de colônias de bactérias hidrocarbonoclásticas dentro deste contexto, para isso foi avaliado o desenvolvimento de unidades formadoras de colônias (UFCs) de bactérias degradadora de petróleo a partir de experimento de formação do OSA formado em superfície e no fundo de cada unidade experimental. Diante da composição da amostra de OSA (agregado de MPS e óleo em solução aquosa), a mensuração de UFCs foi avaliada através de duas técnicas de análise microbiológicas, de plaqueamento por microgota e da membrana filtrante. Os resultados obtidos pela membrana filtrante mostram de um modo geral maior crescimento de UFCs nas amostras de OSA formado no fundo. Na técnica da microgota o desenvolvimento de UFCs foi verificado até a diluição de 10^{-4} , com maior desenvolvimento nas amostras de OSA formado em superfície. Entretanto a representatividade do volume de amostra analisado na técnica da microgota foi de $3,3 \times 10^{-4} \%$, $6,67 \times 10^{-4} \%$ e $1 \times 10^{-3} \%$, nas três condições de proporção de volume de amostra e solução A aplicadas, menor que na técnica da membrana filtrante que apresentou $1 \times 10^{-2} \%$ de volume de amostra analisado pela técnica.

Palavras-chave: Biodegradação; Petróleo; Bactérias

ABSTRACT

The oil slick reaching the marine environment during a spill changes its physical and chemical characteristics. These changes occur according to some parameters, intrinsic to each site, such as environmental turbulence energy, that fragments the stain in oil droplets. These oil droplets ended up colliding with suspended particulate matter (SPM) and forming the oil aggregates - suspended particulate matter (oil-suspended particulate material aggregates – OSAs, which can remain in the environment either at the water column or at the bottom. This kind of interaction provides an increased contact surface per volume of oil available, which facilitates biodegradation by microorganisms present in the environment. Among these organisms, there are the hydrocarbonoclastics bacteria, bacteria that are able to use petroleum hydrocarbons as carbon source. This study aimed to evaluate the development of hydrocarbonoclastics bacteria colonies in this context, it has been reported the development of colony forming units (CFU) of bacteria degrading oil from OSA formation experiment formed in surface and background of each experimental unit. To achieve this goal, the development of oil degrading bacteria colony forming units (CFU) have been assessed through experiments performed with OSA originated both from the water column and the bottom sedimentation of each experimental unit. Given the composition of the sample of OSA (aggregate of MPS and oil in aqueous solution), the measurement of CFU was evaluated through two microbiological analysis techniques, plating by microdrop and the membrane filter. The results obtained by the membrane filtration show, in general, a higher CFU growth in the samples of OSA originated at the bottom sedimentation. While using the microdrop technique, it has been verified the development of CFUs until dilution 10^{-4} , with greater development in the samples of OSA originated in the water column. Nonetheless, the representativeness of the sample volume analyzed in the microdrop technique was 3.3×10^{-4} %, 6.67×10^{-4} % to 1×10^{-3} %, the three conditions of the sample solution and the volume ratio the applied lower than the membrane filter technique showed that 1×10^{-2} % volume of sample analyzed by the technique.

Keywords: Biodegradation; Petroleum; Bacteria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ação intempérica natural da mancha de óleo.	12
Figura 2: Tempo de duração e intensidade dos processos intempéricos naturais.	13
Figura 3: Processo de biodegradação.	16
Figura 4: Área de coleta. Município de São Francisco do Conde, foz do rio Subaé.	20
Figura 5: Coleta de água para obtenção do material particulado em suspensão e mediada de parâmetros físico-químicos <i>in situ</i> .	22
Figura 6: Sistema de refrigeração e decantação para obtenção do MPS.	23
Figura 7: Experimento de formação do OSA	24
Figura 8: Flutuabilidade do OSA no mesocosmo.	25
Figura 9: Fluxograma de preparo do meio nutriente ATGE.	26
Figura 10: Realização das diluições sucessivas nos eppendorfs.	27
Figura 11: Disposição das microgotas na placa de Petri.	27
Figura 12: Fluxograma da membrana filtrante.	28
Figura 13 - Execução da técnica da membrana filtrante.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Metodologias de determinação dos nutrientes.	23
Tabela 2: Condições de análise.	26
Tabela 3: Dados de campo, parâmetros físico-químicos da foz do rio Subaé. pH, Eh, Temperatura (T), Salinidades (S), Condutividade (Cd.), Oxigênio dissolvido (O.D.), Sólidos totais dissolvidos (STD).	30
Tabela 4: Nutrientes analisados.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

APHA - American Public Health Association

ATGE – Ágar, Tripitona, Glicose, Extrato de Levedura

BTS - Baía de Todos os Santos

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

F - Fundo

MF- Membrana Filtrante

MPS - Material Particulado em Suspensão

OSA - Oil Suspended Particulate Material Aggregates

OSA - Agregado óleo-material particulado em suspensão

OSAs - Agregados óleo-material particulado em suspensão

N – Norte

S – Superfície

UFC – Unidades formadoras de colônias

Sumário

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	DERRAMENTO DO ÓLEO NO AMBIENTE MARINHO.....	12
2.2	AGREGADO ÓLEO-MATERIAL PARTICULADO EM SUSPENSÃO	13
2.2.1	Fatores influenciadores na formação do OSA	14
2.3	BIODEGRADAÇÃO E A INFLUÊNCIA DO OSA.....	15
2.4	TÉCNICAS DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	OBJETIVO GERAL	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4	ÁREA DE COLETA	20
5	MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1	AMOSTRAGEM	22
5.2	TRABALHO DE LABORÁTORIO.....	22
5.2.1	Tratamento pré amostral	22
5.2.2	Experimento de formação do OSA	23
5.2.3	Análise microbiológicas	25
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE COLETA	30
6.2	DESENVOLVIMENTO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFCS)	31
6.2.1	Técnica de plaqueamento por microgota	31
6.2.2	Técnica da membrana filtrante	35
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
8	SUGESTÕES	39
9	REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento progressivo das indústrias petrolíferas é um dos destaques no cenário econômico do Brasil. Entretanto, o mesmo crescimento é também a causa de diversos acidentes nos setores de produção, transporte e refino do petróleo que provocam o derramamento do óleo no ambiente (LI et.al. 2000).

O petróleo, proveniente desses incidentes, ao cair no meio marinho pode atingir importantes ecossistemas ao longo da zona costeira como estuários e manguezais. Esses são altamente sensíveis aos contaminantes dos compostos do petróleo, prejudicando diversos nichos ecológicos inerentes ao meio (ZIOLLI, 2002).

A mancha de óleo ao cair em ambiente marinho passa por diversos processos intempéricos que alteram suas características físico-químicas como densidade, composição e viscosidade. Por conta da hidrodinâmica do ambiente essa mancha é quebrada em gotículas de óleo que colidem com material particulado em suspensão (MPS) no meio. As partículas interagem com as gotículas através de ligações iônicas que iram determinar como irá ocorrer essa agregação esta depende de características do MPS e do tipo de óleo derramado (BRAGGA; OWENS, 1995; WEISE, 1997; SOUZA; TRIGÜIS 2006; GONG et. al 2014)

A agregação do material particulado em suspensão com as gotículas de óleo formam o agregado óleo material particulado em suspensão (OSA), o mesmo facilita a dispersão do óleo derramado, estabilizando a gotícula e impedido que a mesma se reaglutine. A formação do OSA aumenta a área de contato do óleo, possibilitado uma melhor degradação pelos microrganismos indígenas do ambiente (LEE et al., 1996; LEE et al., 1997; WEISE 1997; WEISE et al., 1999; GONG et al., 2014).

Os microrganismos degradadores de petróleo, simplificam a complexa cadeia de hidrocarbonetos que compõe o mesmo. Dentro da microbiota capaz de realizar essa degradação temos os fungos, leveduras e bactérias. As bactérias hidrocarbonoclásticas utilizam o petróleo como fonte de carbono em processos como respiração, essas estão presentes no ambiente e estão adaptadas a sobreviverem mediante a toxicidade imposta pelos compostos de hidrocarbonetos (ATLAS, 1995; PEREIRA et al., 2012).

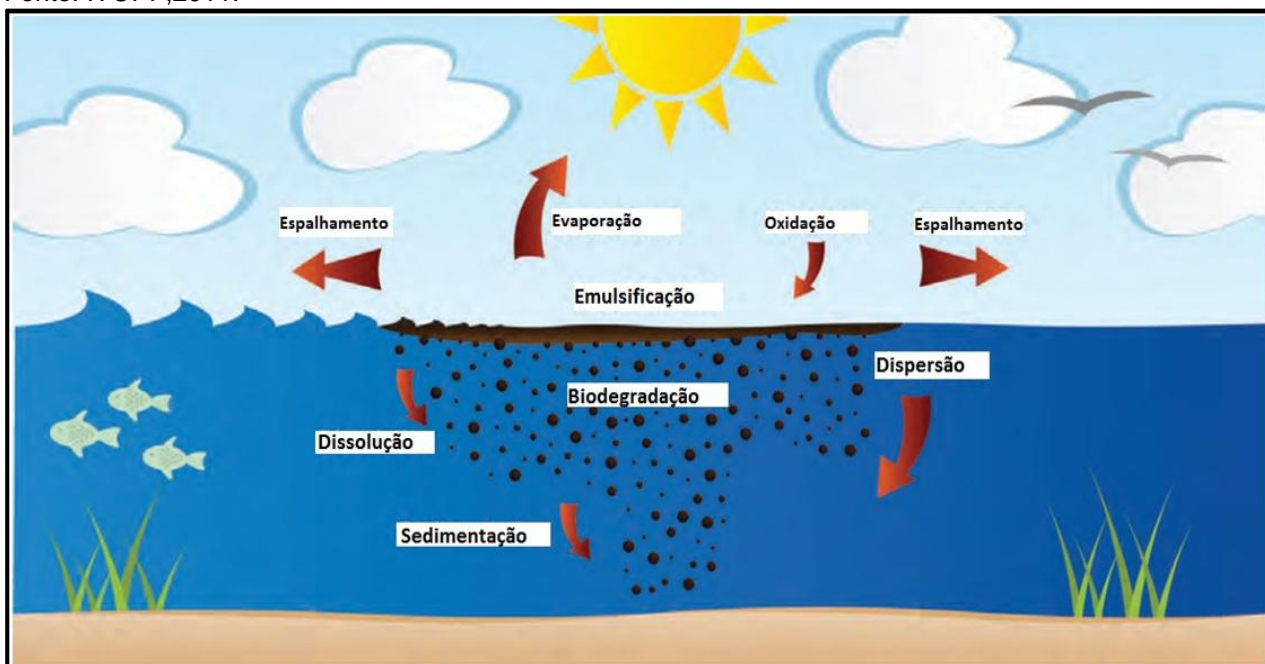
Estudos relatam que a formação do OSA favorece a biodegradação, entretanto há poucas informações de como ocorre o processo pelos microrganismos degradadores de petróleo, sendo necessário estudos dedicados para uma melhor compreensão do mesmo (JEZEQUEL e LEE, 1999; GONG et al., 2014).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DERRAMAMENTO DO ÓLEO NO AMBIENTE MARINHO

O óleo, ao ser derramado no ambiente, sofre intemperismo devido a processos físicos, químicos e biológicos, o que pode remover o óleo ou contribuir para sua persistência no meio (Figura 1). O comportamento da mancha de óleo no ambiente marinho irá depender das características do óleo que são determinadas pela sua quantidade e composição química. Quando ocorre o derramamento, ações naturais agem sobre a mancha, inicialmente o espalhamento altera a coloração e espessura da mancha que também sofre fragmentação (FONSECA, 2009; ITOPF, 2011).

Figura 1: Ação intempérica natural da mancha de óleo.
Fonte: ITOPF,2011.



Os constituintes mais voláteis do petróleo evaporam conforme a temperatura do local e a velocidade do vento. Com a evaporação o remanescente do óleo irá sofrer a influência de processos como dispersão, onde as ações de ondas e turbulência irão quebrar a mancha em gotículas menores. Essas ficarão em suspensão na coluna d'água ou permanecem em superfície e se reaglutinam ficando o filme da mancha mais fino (FONSECA, 2009; ITOPF, 2011).

A mancha de óleo, que sofre com a dispersão, é fragmentada devido à influência da hidrodinâmica do local, levando a formação das gotículas de óleo que podem interagir com partículas de sedimento e matéria orgânica em suspensão, se deslocando para o fundo da coluna d'água por consequência de um aumento da densidade, ocasionando a

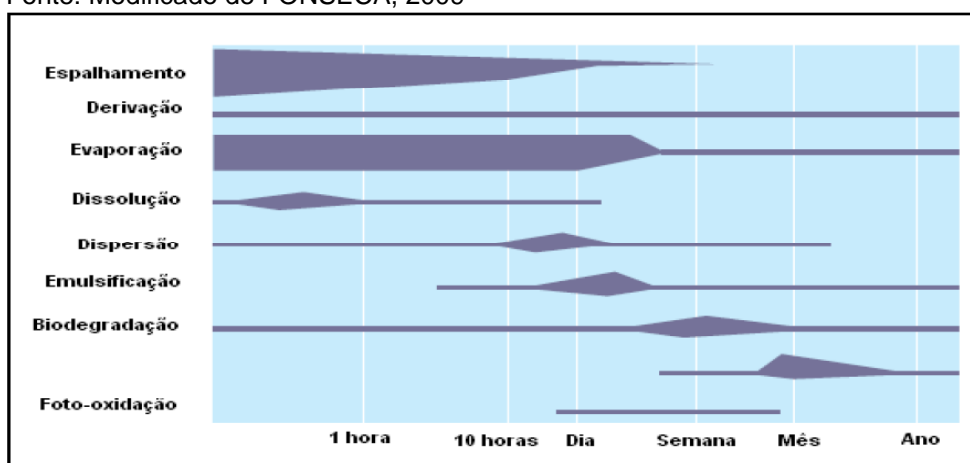
sedimentação das mesmas. O óleo então disperso irá se misturar a quantidades maiores de água, resultando em uma diminuição da concentração do mesmo e provocando um aumento da área de superfície de contato do óleo disperso, o que vai favorecer outras ações como a biodegradação (FONSECA, 2009; ITOFF, 2011; EPA, 2014).

As interações do óleo com a água e o oxigênio junto com a incidência solar oxidam os compostos mais leves e simples do petróleo ficando ainda presente no meio os compostos mais pesados e de difícil degradação natural. Devido à ação das ondas, a turbulência provocada em superfície, ocasiona a incorporação das moléculas de água à mancha formando emulsões, resultando em um material de maior viscosidade, o que dificulta a degradação (FONSECA, 2009; ITOFF, 2011; EPA, 2014).

Os processos intempéricos naturais descritos modificam as características originais do petróleo. Essas alterações ocorrem de acordo com propriedades físico-químicas e composição do óleo derramado, sendo também influenciadas pelas condições meteorológicas e oceanográficas do local atingido (FONSECA, 2009).

Esses processos atuam concomitantemente no ambiente, que de acordo ao tipo de óleo terá tempo e intensidade de ação variável. Na Figura 2 consta o tempo de duração, exibido pelo tamanho da linha, e a intensidade representada pela espessura da linha, de cada processo em um óleo intermediário derramado em ambiente marinho (ITOFF, 2002; FONSECA, 2009).

Figura 2: Tempo de duração e intensidade dos processos intempéricos naturais.
Fonte: Modificado de FONSECA, 2009



2.2 AGREGADO ÓLEO-MATERIAL PARTICULADO EM SUSPENSÃO

Com o derramamento do petróleo, ocorre, entre outros processos, a interação do material particulado em suspensão (MPS), presente na coluna d'água, com as gotículas de óleo que propicia a dispersão da mancha. Essa interação natural pode apresentar denominação floculação óleo-argila ou agregado óleo mineral (OMA), (WEISE, 1997; LEE,

2002). Entretanto, nas pesquisas recentes refere-se por Agregado Óleo-Material Particulado em Suspensão (OSA).

A dispersão do óleo modifica sua densidade. A interação ao material particulado altera as características da gotícula. De acordo com as propriedades adquiridas devido às influências das ações intempéricas sobre o óleo e a hidrodinâmica local. O OSA formado mantém sua estabilidade na coluna d'água podendo adquirir flutuabilidade positiva, permanecendo os agregados em superfície, neutra, estabilizando-se no corpo d'água, e negativa tendo sua densidade alterada para maior que a da água sedimentando no substrato de fundo (LEE et al., 1996; LEE; STOFFYN-EGLI, 2001; OWENS e LEE, 2003; SUN et al., 2014).

A formação do OSA tem influência de fatores como tipo do óleo, concentração do MPS no ambiente, características intrínsecas do material particulado, a energia do local, temperatura e salinidade que irão determinar a taxa de formação e como irá ocorrer a interação iônica que se estabelece entre o material particulado e o óleo durante a agregação (WAISE, 1997; STOFFYN-EGLI e LEE, 2002; KHELIFA et al., 2005, GONG et al., 2014).

2.2.1 Fatores influenciadores na formação do OSA

(a) Tipo de óleo: Características intrínsecas de cada óleo como densidade, composição e viscosidade irão determinar a formação dos agregados óleo-material particulado em suspensão (OSAs). Óleos de maior viscosidade formam os agregados mais dificilmente, uma vez que uma maior viscosidade dificulta a dispersão do óleo no ambiente. Assim a viscosidade é inversamente proporcional a formação do OSA sendo um parâmetro diretamente influenciado pela temperatura do ambiente (LEE et al., 1998; STOFFYN-EGLI; LEE, 2002).

(b) Salinidade: Fator de grande importância que, através da força iônica dos sais dissolvidos, irá determinar a agregação do material particulado em suspensão com as gotículas de óleo, que aumenta diretamente com a salinidade. Resultados experimentais mostram que são necessários sais dissolvidos na água para que ocorra a formação do OSA, mostrando uma salinidade mínima de aproximadamente 2. O que indica que a agregação se dá em ambiente estuarinos com salinidade acima de 2 (LE FLOCH et al., 2002; OEWENS e LEE, 2003).

(c) Características do MPS: Esses fatores atuam na formação do OSA controlando sua taxa de formação. Os OSAs são formados com MPS de granulometria inferior a 5 µm,

sendo $< 2 \mu\text{m}$ (argila) mais frequente em função da maior área de superfície específica (SUN; ZHENG, 2009). A mineralogia do MPS também deve ser considerada na concentração do agregado. As propriedades dos minerais comumente encontrados em ambiente marinho possuem uma tendência em aprisionar moléculas orgânicas, minerais de argila como a montmorilonita, devido a sua elevada capacidade de troca catiônica que favorece a formação do agregado (STOFFYN-EGLI; LEE, 2002). Sedimento com alta concentração de matéria orgânica apresenta elevado potencial de agregação (MUSCHENHEIM; LEE, 2002; SILVA, 2014; MOREIRA et al., 2015).

(d) Energia de turbulência do local: O nível de energia de turbulência assim como sua duração, associado a ação hidrodinâmica das ondas e correntes é considerado um fator de extrema relevância na formação dos OSAs. Este é o parâmetro responsável pela quebra da mancha de óleo que irá originar as gotículas, agindo também como fator de ressuspensão do material particulado e sua permanência na coluna d'água. A energia de turbulência também irá promover as colisões entre as gotículas de óleo e o MPS (SERGY et al., 2003; NIU et al., 2010).

Algumas pesquisas mostram que é necessário ocorrer um nível de energia de turbulência moderado, assim como é possível a formação do agregado em ambientes de locais mais abrigados (JÉZÉQUEL e LEE 1999; SUN et al., 2014). Trindade (2011) relata que a energia de turbulência deve ser suficiente para que ocorra a agregação, não podendo ser elevada demais para que não ocorra quebra das interações entre o MPS e as gotículas de óleo, o que impossibilitaria a dispersão e biodegradação na zona eufótica.

2.3 BIODEGRADAÇÃO E A INFLUÊNCIA DO OSA

A biodegradação consiste na degradação de xenobióticos por organismos vivos. A microbiota possui elevado potencial em degradar compostos orgânicos, em destaque o petróleo e seus derivados. O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos, sendo cerca de 60 a 90 % dos compostos os hidrocarbonetos alifáticos, de cadeia simples e passíveis de serem biodegradados com maior facilidade (SANTOS,2007; TONINI et al, 2010; COSTA 2014) sendo que sua composição depende das características de cada tipo de óleo.

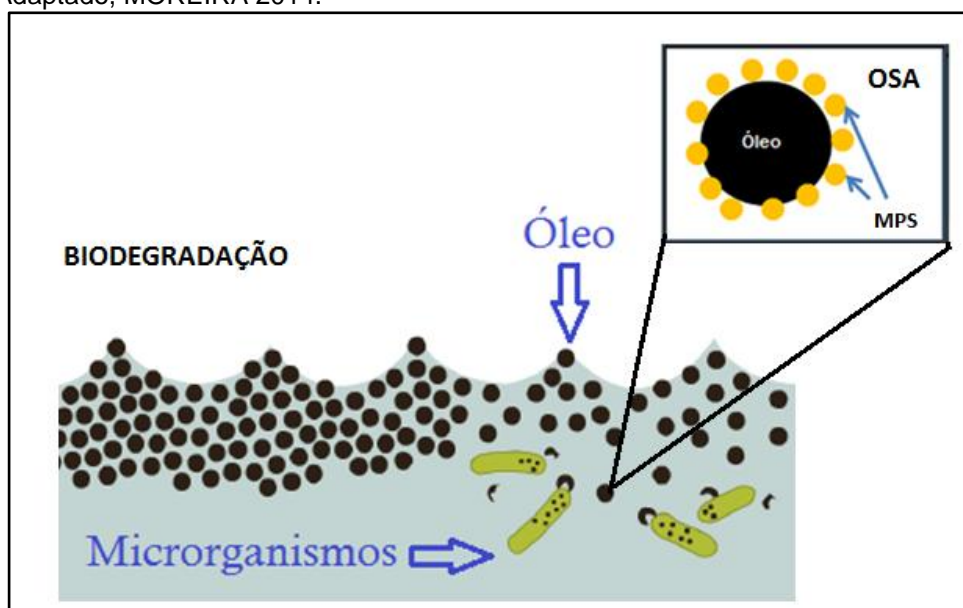
A biodegradação dos hidrocarbonetos ocorre em diversas etapas, que tem por finalidade simplificar as cadeias de carbono em compostos de menor complexidade, obtendo-se em uma biodegradação completa em condições ótimas de desenvolvimento microbianos, os produtos finais CO_2 e H_2O (SANTOS,2007; PEREIRA; FREITAS, 2012; COSTA 2014).

Microrganismos degradadores de petróleo presentes no ambiente marinho transformam os hidrocarbonetos em compostos mais simples através da oxidação bioquímica. O processo é, apesar de lento, extremamente significativo e sofre influência de fatores como temperatura, nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo) e disponibilidade de oxigênio (JÉZÉQUEL et al., 1999; FERNANDES, 2001; CARDOSO, 2007; ALLER et al., 2014).

A biodegradação por microrganismos presente no ambiente é facilitada pela agregação do MPS ao óleo, a formação do OSA aumenta a área superficial de contato disponível por volume de óleo, viabilizando o contato com o oxigênio e a atividade dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo, como bactérias hidrocabonoclasticas (Figura 3) (LEE et al., 1996; OWENS; LEE, 2003). Dessa forma o processo de formação do OSA além de dispersar o óleo derramado atua também contribuindo na biodegradação das frações do petróleo (LEE et al., 1996; WAISE et al., 1999).

Bactérias, fungos e leveduras têm sido relatados com elevada capacidade em degradar diferentes tipos de contaminantes, dentre eles o petróleo e seus derivados. O processo de biodegradação é considerado extremamente importante na degradação de petróleo derramado no ambiente marinho. (LINDSTROM; BRADDOCK, 2002; MICHAUD et al., 2004; SANTOS et al., 2011; PEREIRA; FREITAS, 2012).

Figura 3: Processo de biodegradação.
Fonte: Adaptado, MOREIRA 2014.



A biodegradação em ambiente marinho é realizada por uma grande diversidade de bactérias. No ambiente impactado apenas os microrganismos capazes de se adaptar aos

poluentes, passando a utilizá-los como fonte de carbono, iram sobreviver (PEREIRA et al., 2012).

Bactérias indígenas de ambientes já contaminados por hidrocarbonetos de petróleo, possui maior potencial em se reproduzir e biodegradar mais facilmente esses compostos, existe um aumento na população de bactérias que já possuem plasmídios contendo genes que utilizam hidrocarbonetos (ATLAS 1995; MACIEL 2009; PEREIRA et al., 2012).

2.4 TÉCNICAS DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS

Nos estudos realizados, algumas são as técnicas aplicadas para quantificar as bactérias presentes em matrizes como água e sedimento. Diversos são os objetivos para as quais são realizadas as contagens.

Azevedo e Rizzo (2005) avaliaram as melhores condições para obter uma alta eficiência na remoção de poluente orgânico do solo, através da “Retro-Inoculação”. No estudo foram quantificados os microrganismos degradadores de óleo cru pela técnica do número mais provável (NMP) e os microrganismos heterotróficos totais pela técnica de *pour plate*.

A técnica de *pour plate* ou inoculação em profundidade, consiste em adicionar o meio de cultura, fundido e em temperatura de aproximadamente 45° C, sobre a amostra, nesse caso o crescimento das colônias de bactérias ocorre de baixo do meio para cima (CETESB, 2006).

A técnica do número mais provável ou a dos tubos múltiplos é uma técnica estatística, que se estima a densidades dos microrganismos da amostra, que é submetida a diluições seriadas, seu resultado é relatado como positivo ou negativo nas diluições (CUNHA, 2006; CETESB, 2007 (a); LIMA et al., 2011).

Li et al. (2000) mostra como um dos resultados da pesquisa, sobre atenuação natural e aumento da biorremediação de solo contaminado com resíduo de petróleo, a determinação de populações bacterianas através da técnica do número mais provável, os resultados sugerem que a maioria das bactérias aeróbias do solo tem a capacidade para a biodegradação de hidrocarbonetos.

Majolo et al. (2013) determinou a intensidade de atividade de inibição bacteriana e intensidade de atividade de inativação bacteriana em extratos hidroetanólicos e hídricos de sementes de *Bixa orellana* (urucum), utilizando a técnica da microgota (ROMEIRO, 2007), para uma avaliação da concentração inicial de microrganismos e diluições seriadas foram realizadas até 10^{-12} , considerando o valor final a média das contagens das gotas triplicadas.

A técnica de plaqueamento por microgota é utilizada por Silva et al. (2007) para isolar, quantificar e identificar bactérias presentes em diferentes tipos de solos utilizados como cobertura do cultivo do cogumelo *Agaricus blazei*, seu resultado, assim como no presente estudo, foi expresso em unidades formadoras de colônias (UFC).

A técnica da membrana filtrante é utilizada para amostras de água ou diluídas, em que são filtrados volumes representativos, através de membranas filtrantes de porosidade de 0,45 µm, os microrganismos ficam retidos sobre a membrana e essa é transferida para placas com meio de cultura (CETESB, 2007 (b); LIMA et al., 2011). A metodologia da membrana filtrante é utilizada há muito tempo, Clark (1952) realizou um teste de qualidade da técnica e concluiu sua eficiência na retenção de bactérias de amostras de água.

Guerra et al. (2006) analisou amostra de água potável utilizando a técnica da membrana filtrante, para determinar a ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras. Vaz (2010) utilizou a metodologia em uma das etapas de seu estudo para isolar bactérias contidas em mistura de diesel/biodiesel (B3) e biodiesel (B100). Brandão et al. (2012) fez um teste comparativo entre a técnica do número mais provável e a membrana filtrante para avaliar a qualidade microbiológica de água potável.

3 OBJETIVOS

Diante do exposto e do fato de que há uma insuficiência na literatura a respeito de como ocorre a biodegradação do petróleo através de bactérias hidrocarbonoclásticas a partir da formação natural do OSA no ambiente os objetivos desse trabalho seguem a baixo.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desenvolvimento de colônias de bactérias hidrocarbonoclásticas a partir da formação do Agregado Óleo Material Particulado em Suspensão (OSA).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

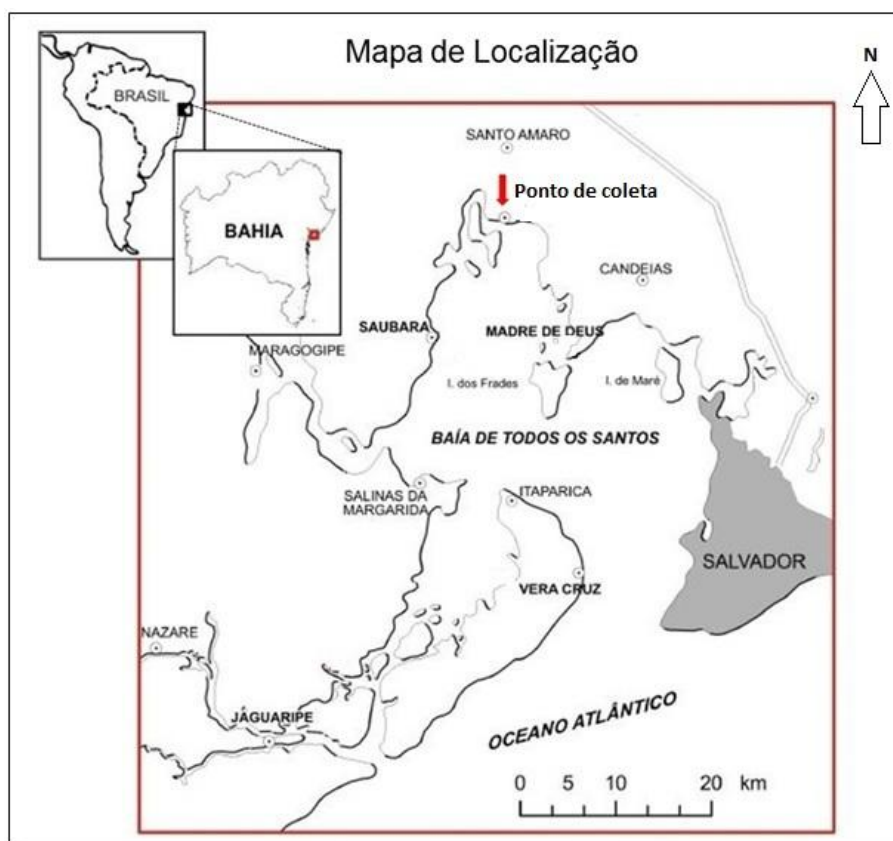
- (a) Obter uma metodologia avaliativa do desenvolvimento de colônias de bactérias hidrocarbonoclásticas devido a formação do OSA;
- (b) Caracterização de nutrientes do MPS obtido da área de coleta;
- (c) Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFCs) de bactérias degradadoras de óleo na formação do OSA em flutuabilidade negativa e neutra.

4 ÁREA DE COLETA

A área de coleta localiza-se a nordeste da Baía de Todos os Santos (BTS), no município de São Francisco do Conde, na foz do rio Subaé (Figura 4). O rio Subaé possui uma extensão de 46 km até sua foz na BTS, em São Francisco do Conde (BAHIA, 2004) e com uma área de drenagem de 660 Km² e uma vazão média de 4,4 m³. s⁻¹ (SANTOS, 2005).

O rio Subaé destaca-se como importante provedor fluvial de material particulado em suspensão terrestre para a Baía de Todos os Santos (BTS), seguido do rio São Paulo (BAHIA, 2004).

Figura 4: Área de coleta. Município de São Francisco do Conde, foz do rio Subaé.
Fonte: Adaptado de Hadlich et al., 2010.



O município é ligado ao setor industrial em torno da BTS. Na região, desenvolve-se a fabricação de produtos químicos de derivados de petróleo, transporte e fabricação de produtos metálicos, comercialização de combustíveis e gás liquefeito de petróleo. (BAHIA, 2004).

O local é marcado historicamente por incidentes ocasionados pela atividade petrolífera desenvolvida na região, como derramamento de óleo e seus derivados, assim como de gás natural. A área possui suas águas e sedimentos contaminados principalmente por hidrocarbonetos de petróleo. (BAHIA, 2004).

A foz do rio Subaé compõe uma zona estuarina margeada por um dos ecossistemas mais sensíveis, que é o manguezal (BAHIA, 2002). Tal ambiente é responsável pelo equilíbrio de diversos nichos ecológicos, abrigando muitas espécies juvenis.

O clima da região é úmido, não possuindo uma estação seca bem definida, apresentando temperatura anual média de aproximadamente 25° C, com precipitações mais intensas nos meses de abril a julho em torno de 300 mm/mês, nos meses de janeiro fevereiro e março a precipitação fica maior que 120 mm/mês (BAHIA, 1994; KIRIMURÊ, 2014).

Geologicamente, o estuário do rio Subaé está inserido na bacia sedimentar do Recôncavo Baiano do cretáceo, que apresenta sedimentos com predominância argilosa e arenosa depositados em um sistema limitado por grandes falhas (BAHIA, 1994).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAGEM

Para aquisição do MPS foi realizada uma coleta de água em 26 de agosto de 2014, durante a maré baixa, em 10 garrafões de 20 L, o mesmo foi utilizado para o experimento e para as análises geoquímicas. A amostragem ocorreu em um ponto na foz do rio Subaé. Parâmetros físico-químicos da água (temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, pH e Eh) foram medidos *in situ* com um sonda multiparâmetros Horiba modelo D – 45 (Figura 5).

Figura 5: Coleta de água para obtenção do material particulado em suspensão e mediada de parâmetros físico-químicos *in situ*.



5.2 TRABALHO DE LABORÁTÓRIO

5.2.1 Tratamento pré amostral

A amostra de água coletada foi conservada em um sistema de resfriamento montado com caixas de isopor e gelo, que foi repostado de acordo a necessidade para que mantivesse uma temperatura de 5 à 15°C. O material particulado foi obtido através de um sistema de

decantação (Figura 6). Parte da massa total adquirida foi destinada para uso no experimento de formação do OSA e para as análises dos nutrientes (Tabela 1).

Figura 6: Sistema de refrigeração e decantação para obtenção do MPS.



Tabela 1: Metodologias de determinação dos nutrientes.

Parâmetros	Análise\Determinação
Nitrato e amônio	Método Kjeldahl, seguindo recomendação da Embrapa (2010).
Fósforo assimilável	Métodos de Grasshoff et al. (1983) e Aspilla (1976).
Carbono Orgânico	Método do dicromato (WALKEY-BLACK, 1947)

Essas metodologias apresentadas são comumente utilizadas para determinar tais parâmetros em matriz de sedimento. Entretanto nesse estudo foram aplicadas para as análises dos nutrientes do MPS, obtido por decantação da água coletada na zona intermareal do estuário do rio Subaé, os resultados obtidos não foram encontrados a baixo do limite de detecção.

5.2.2 Experimento de formação do OSA

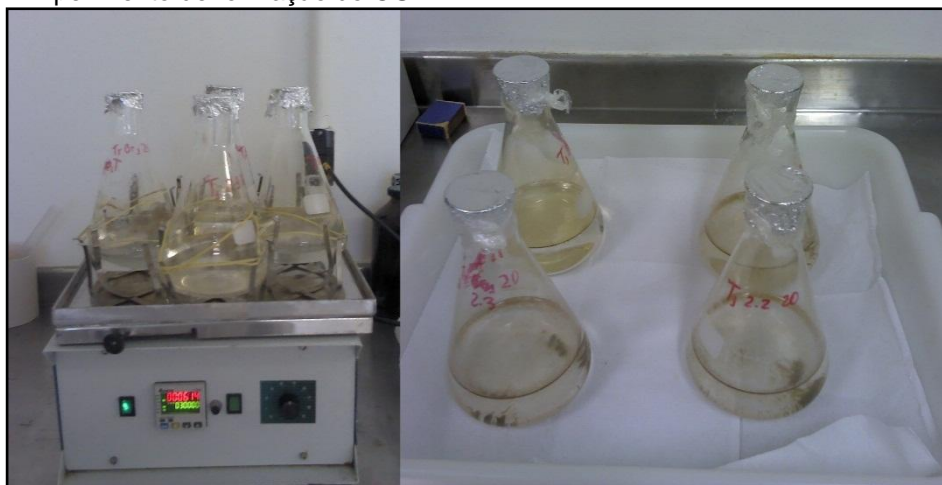
O experimento de formação do OSA tem por base o protocolo experimental desenvolvido por Moreira (2014), sendo utilizados erlenmeyers de 500 ml contendo 250 ml de água salina. Com adição de aproximadamente 50 mg/L de óleo (Bacia de Campos) em cada mesocosmo. A densidade média do óleo é de 0,8823 g/ ml e com uma viscosidade média de 36,44 mPa s.

Através de resultados obtidos por Moreira et al. (2015) em relação a dispersão de hidrocarbonetos, o experimento, ocorreu em salinidades de 30 e 300 mg/L de material particulado em suspensão. Nesta condição é observada a melhor dispersão do óleo através

de análise cromatográfica que avalia os hidrocarbonetos de petróleo dispersos nas unidades experimentais.

Foram feitas triplicatas de cada unidade experimental com dois brancos, um contendo água e MPS (BR1) e outro contendo água e óleo (BR2). Os mesocosmos foram submetidos a uma agitação constante de 126 ciclos/min, em uma mesa reciprocante, por 3 horas e sob temperatura de 24°C, posteriormente os mesmos ficaram sem agitação, “overnight” (Figura 7).

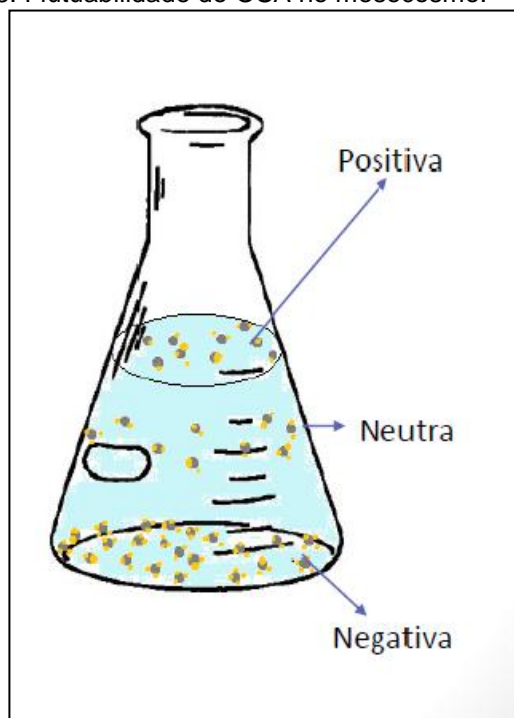
Figura 7: Experimento de formação do OSA



Após o período experimental descrito foi separado 50 ml de amostra, do OSA formado nos mesocosmos, da fluabilidade neutra e negativa, considerado nesse estudo OSA de superfície e OSA de fundo respectivamente (Figura 8).

O volume de 50 ml da amostra é justificado no estudo realizado por Moreira e colaboradores (2015), pois é o volume utilizado na avaliação de dispersão de hidrocarbonetos, assim foi mantido o volume no intuito de posteriores comparações e estudos.

Figura 8: Flutuabilidade do OSA no mesocosmo.



5.2.3 Análise microbiológicas

Os volumes de amostra de cada mesocosmo, contendo o OSA formado em ambas flutuabilidades, foram transferidos para béqueres e utilizado nas análises.

No estudo as unidades formadoras de colônia (UFCs) foram quantificadas para observar e avaliar o desenvolvimento de microrganismos no experimento de formação do OSA. A contagem das UFCs ocorreu com o auxílio de uma lupa eletrônica.

Com isso se propõe a utilização de duas técnicas para quantificar as UFCs, com o propósito de observar possíveis variações de resultados e avaliar qual a melhor resposta para o objetivo proposto. A amostra foi aplicada às técnicas de análise microbiológica de modo que o MPS não interferisse na leitura dos resultados nas placas de Petri.

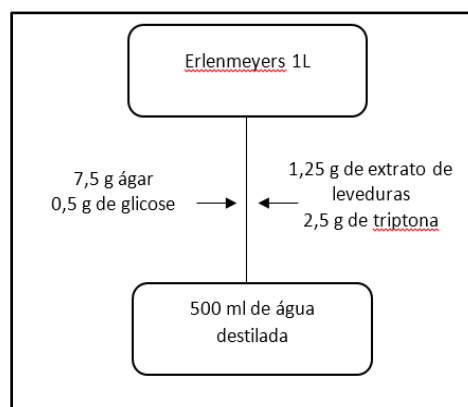
(a) Técnica de plaqueamento por microgota adaptado (ROMEIRO, 2007).

- Dia 1

Os procedimentos para análise se iniciaram com o preparo do meio nutriente ATGE (ágar, triptona, glicose e extrato de levedura) conforme Figura 9. O meio foi homogeneizado e autoclavado a 121°C por 20 minutos, juntamente com a quantidade de placas necessárias. Depois sob temperatura ambiente o meio foi vertido nas placas dentro do fluxo laminar,

previamente esterilizado. As placas foram então incubadas à 30°C para teste de esterilidade, por 24 horas, para garantir a não contaminação dessas por fungos ou bactérias não oriundas das amostras de interesse. Essas placas foram utilizadas no dia posterior.

Figura 9: Fluxograma de preparo do meio nutriente ATGE.



- Dia 2:

Foi realizado o preparo da solução A através da dissolução de 2,25g de NaCl em 250 ml de água destilada e adicionado 0,750 ml de Tween 80 em erlenmeyers de 500 ml. Esta solução foi preparada para 5 mesocosmos. O Tween 80 tem a função na solução de dispersar as colônias de bactérias presentes na amostra.

Uma solução A foi preparada, separadamente da mesma forma descrita acima, juntamente com eppendorfs foi autoclavada a 121 °C por 20 min. Após esse material ser autoclavado a solução A foi distribuída em eppendorfs, onde ocorreram as diluições sucessivas.

O volume de 50 ml de cada amostra de superfície e fundo foi adicionado à solução A. O estudo aplicou a técnica da microgota sob três condições de análise, denominadas experimento A, B e C, onde são variadas as proporções de volume entre a amostra, que foi para todas as condições 50 ml, e a solução A (Tabela 2).

Tabela 2: Condições de análise.

EXPERIMENTO	PROPORÇÃO
A	1:5
B	1:2
C	1:1

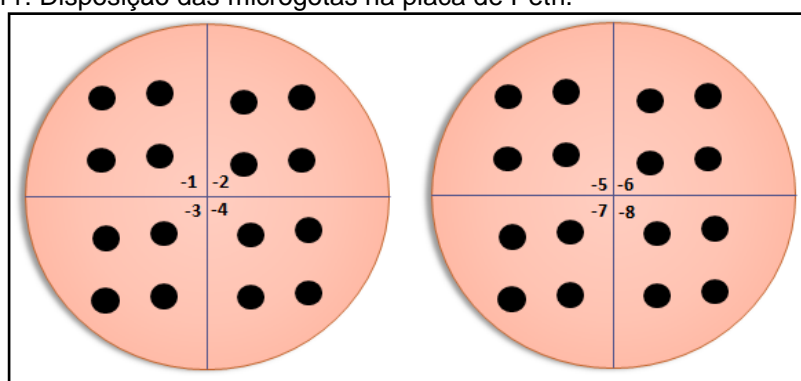
Nos três experimentos foram realizadas as diluições sucessivas. Sendo tomadas um alíquota de 0,1 ml da solução com a amostra e adicionado ao eppendorf de diluição -1 e devidamente homogeneizados, desse foi tomado 0,1 ml e adicionado ao próximo eppendorf de diluição -2. E assim sucessivamente até a diluição de -8 (Figura 10)

Figura 10: Realização das diluições sucessivas nos eppendorfs.



De cada diluição foram adicionados 4 gotas as placas de Petri, previamente identificadas e divididas em quadrantes (Figura 11). Essas placas foram incubadas, em temperatura de 28° C e submetidas a contagem de UFC após 24 horas.

Figura 11: Disposição das microgotas na placa de Petri.



A análise foi realizada também para a amostra sem diluição, assim foram adicionadas 4 gotas em placas de Petri, previamente identificadas, diretamente do erlenmeyer que continha a solução A mais a amostra.

(b) Técnica da membrana filtrante adaptado (APHA,1981 e CETESB L5.214,2007).

- Dia 1:

Da mesma forma que feito na técnica da microgota é preparado o meio nutriente ATGE, que foi vertido em placas de Petri, para o teste de esterilidade. As placas foram então incubadas por 24 horas. O meio nutriente utilizado é o mesmo na presente técnica para que seja possível a comparação dos resultados de crescimento das UFCs na técnica de plaqueamento por microgota.

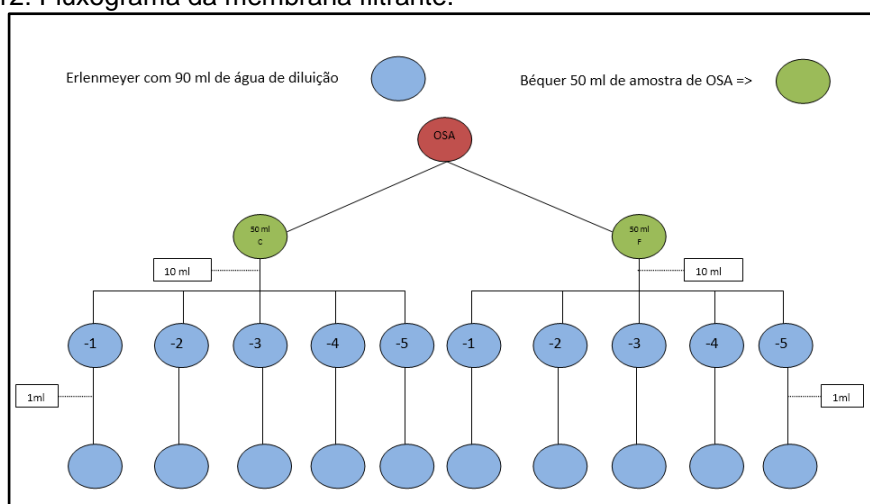
- Dia 2:

Foi realizado o preparo da solução A igualmente como já descrito e o material também foi autoclavado sob as mesmas condições.

Do volume de 50 ml da amostra de superfície e fundo foi adicionado 10 ml à 90 ml de solução A em erlenmeyers previamente identificados com as diluições de -1 a -5, estava feita a primeira diluição ou diluição decimal. Os procedimentos seguem tomando dessas diluições uma alíquota de 1 ml e transferindo para erlenmeyers identificados contendo 90 ml de solução A, sendo feita a segunda diluição (Figura 12).

As diluições nessa metodologia segue até -5, mediante resultados observados previamente no crescimento das UFCs no método de plaqueamento da microgota.

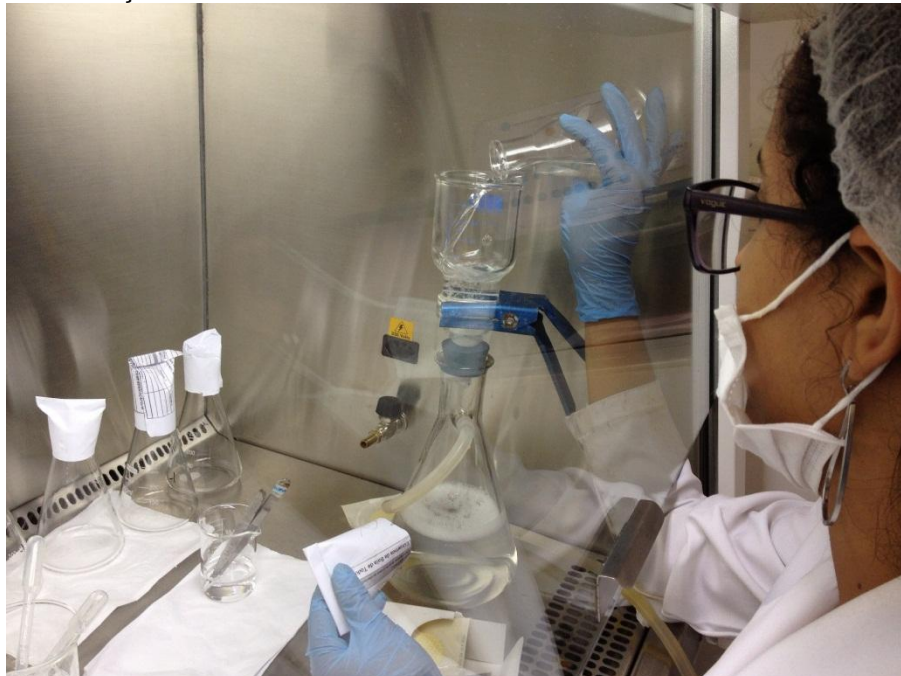
Figura 12: Fluxograma da membrana filtrante.



Após o preparo das diluições, os volumes contidos nos erlenmeyers foram filtrados, o da primeira diluição, após ser retirado o volume de 1 ml, e o da segunda diluição. A filtração

ocorreu utilizando um kit de filtração e membrana filtrante de nitrato celulose com porosidade de 0,45 μm (Figura 13) (APHA,1981 e CETESB, 2007).

Figura 13 - Execução da técnica da membrana filtrante.



Feita a filtração, a membrana foi colocada cuidadosamente na placa de Petri, contendo o meio nutriente ATGE, com o auxílio de um pinça previamente esterilizada, de forma que não formasse bolhas de ar por baixo da membrana. Para cada diluição foi utilizada uma única placa. As placas foram incubadas em 28°C e feita a contagem de UFC após 24 horas.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE COLETA

- Parâmetros físico-químicos

Os valores dos parâmetros físico-químicos, fornecidos pela sonda multiparâmetro utilizada para água do ponto de coleta estão exibidos na tabela 3.

O pH encontrado é típico de ambiente de características estuarinas. O valor de Eh encontrado é característico de ambiente redutor, que proporciona uma conservação da matéria orgânica no sedimento (SILVA, 2011).

Tabela 3: Dados de campo, parâmetros físico-químicos da foz do rio Subaé. pH, Eh, Temperatura (T), Salinidades (S), Condutividade (Cd.), Oxigênio dissolvido (O.D.), Sólidos totais dissolvidos (STD).

Parâmetros físico-químicos	pH	Eh (Mv)	T (°C)	S	Cd. (mS)	O.D (mg/L)	STD
	8.43	-85	30,83	30	45,8	7,68	28

- Parâmetros nutriente

Os resultados obtidos possibilitam descrever brevemente os nutrientes do material particulado em suspensão coletado e utilizado no experimento de formação do OSA (Tabela 4).

Nutrientes inorgânicos são fatores importantes na quantidade de microrganismos que podem crescer em qualquer sistema aquático (PEREIRA, 2006).

Tabela 4: Nutrientes analisados.

Nutriente	Amônio (mg /Kg)	Nitrato (mg /Kg)	Fósforo assimilável (mg/kg)	Carbono Orgânico (%)
Média	57,26	56,38	14.75	4,02

As concentrações de íons de nitrato e amônio podem ser provenientes de reações de oxidação e redução do nitrogênio por microrganismos, assim suas concentrações são determinadas pela presença de nitrogênio no ambiente (PEREIRA, 2006; COSTA, 2014).

Avaliando resultados encontrados em ambientes similares de características estuarinas, o valor de fósforo assimilável encontrado foi baixo, considerando variações (40,93 a 230,56 mg.Kg⁻¹) encontradas por Pereira (2014), seguindo a mesma metodologia de determinação, em sedimento do rio Paraguaçu, um local pobre em nutrientes (EIA, 2009).

Tendo como base valores carbono orgânico, determinado pela mesma metodologia por Santana, 2011, em sedimento, que encontrou valor máximo de 6,94% para o rio São Paulo que, assim como o rio Subaé, é um o ambiente estuarino, desembocando na baía de Todos os Santos, o valor encontrado deve ser considerado alto.

Esses valores de nutrientes encontrados no MPS do ponto de coleta não podem ser considerados como influenciadores dos resultados quantitativos de unidades formadoras de colônia dos mesocosmos experimentais desse estudo. Para se avaliar tal influência seria necessário um monitoramento nas unidades experimentais.

6.2 DESENVOLVIMENTO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (UFCs)

Os resultados que serão discutidos, estão exibidos em forma da média das UFCs obtidas nas triplicatas.

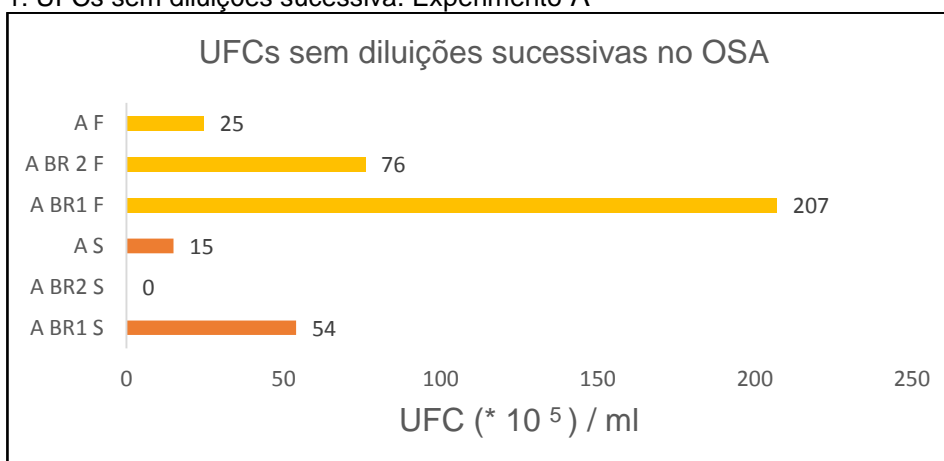
6.2.1 Técnica de plaqueamento por microgota

As amostras sem diluições sucessivas exibiram um crescimento da densidade de colônias dos microrganismos elevado, de modo a impossibilitar a contagem, sendo considerado nesse estudo um crescimento infinito, para os experimentos B e C, padrão observado na amostra de OSA formado em superfície (S) e fundo (F).

A contagem das UFCs para o experimento A, mostrou um maior desenvolvimento para o OSA de fundo, o mesmo possui um crescimento menor que os brancos (BR), apresentando o BR 1 (água e MPS) de fundo maior densidade de bactérias, tratando-se dos microrganismos totais do MPS, assim temos que nem todos seriam tolerantes a condição de formação do OSA. O crescimento do OSA formado no fundo (A F) apresentou menor densidade de colônias até mesmo que o BR 2 (água e óleo) de fundo (Gráfico 1).

Ainda no Gráfico 1 é possível observar que no OSA formado em superfície ocorre um desenvolvimento pequeno das UFCs, apresentando-se até mesmo a densidade de colônias em BR 1 S é menor quando comparada ao fundo.

Gráfico 1: UFCs sem diluições sucessiva. Experimento A



Realizadas as diluições conforme descrito, os dados de crescimento de UFCs na formação do OSA de superfície e fundo mostra uma variabilidade nas condições proposta em cada experimento.

As condições experimentais (A, B e C) exibem uma variação no crescimento das UFCs. O crescimento de UFCs é nulo sob as condições do experimento A, proporção 1:5 de volume de amostra para o volume de solução A, no OSA formado em superfície e no fundo, (Gráficos 2).

Entre as flutuabilidades de formação do OSA analisadas há um maior desenvolvimento de colônias em superfície, com menor desenvolvimento de UFCs das bactérias hidrocarbonoclásticas no fundo (Gráficos 2 (a) e (b)). É visto que o desenvolvimento das colônias nas diluições das amostras com OSA de superfície atingem seu crescimento até a diluição de -4 e para o OSA de fundo esse crescimento é interrompido antes da mesma (Gráficos 3 (a), (b) e (c)).

Estudo sobre o destino do óleo na coluna d'água possibilita o entendimento que apenas as bactérias hidrocarbonoclásticas tolerantes a toxicidade submetida no fundo e as condições de formação do OSA, conseguiriam se desenvolver. Relatada a maior dispersão do OSA, para o fundo da coluna d'água (MOREIRA et al.2015) e que elevadas quantidades de resíduo oleoso inibe o crescimento de populações microbianas (COSTA, 2010).

De acordo Jezequel e Lee, 1999 e Muschenheim e Lee, 2002 é mais favorável a permanência do OSA na coluna d'água. A degradação de óleo sedimentado é exibida em taxas menores, no ambiente a oxigenação parece desempenhar um importante papel na biodegradação dos compostos de petróleo. Por sua vez a escala em que se apresentam os experimentos realizados nesse estudo, não é suficiente para que se possa inferir a falta de oxigenação que justifique o menor desenvolvimento de UFCs na amostra de OSA de fundo.

Se faz necessário também análises mais detalhadas a respeito de quanto de toxicidade proveniente do petróleo utilizado nesse estudo atinge as bactérias degradadoras

de petróleo presentes no fundo desses mesocosmos, em relação ao proposto em cada experimento (A, B e C).

A maior densidade de colônias é observada no experimento B (proporção 1:2), do mesmo modo, na formação do OSA de superfície e fundo. O experimento C (proporção 1:1), sob condição de menor diluição do volume de amostra do OSA formado para a solução A, mostra um crescimento menor que a diluição intermediária de B (Gráficos 2 (a) e (b)).

As condições sob as quais estavam o experimento C, concentra mais os contaminantes do petróleo, o que pode ter interferido diretamente sobre o desenvolvimento das bactérias hidrocarbonoclásticas. A biodegradação não se mostrou eficiente em estudo que varia a percentagem de resíduo oleoso, apresentando maior degradação o meio com 5 % (v/v) de resíduo em comparação a meio com 10% (v/v) do mesmo (URURAHY, 1998).

Gráfico 2: Desenvolvimento de UFC no OSA de superfície (a) e de fundo (b).

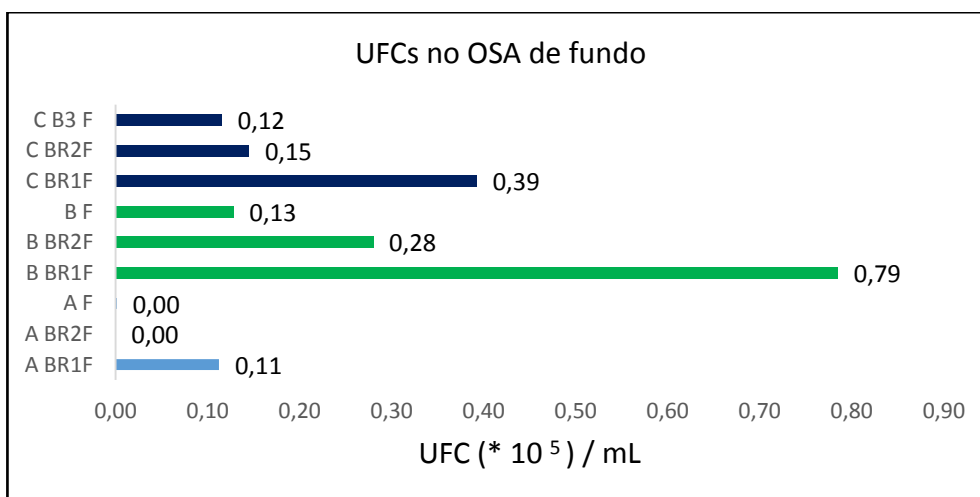
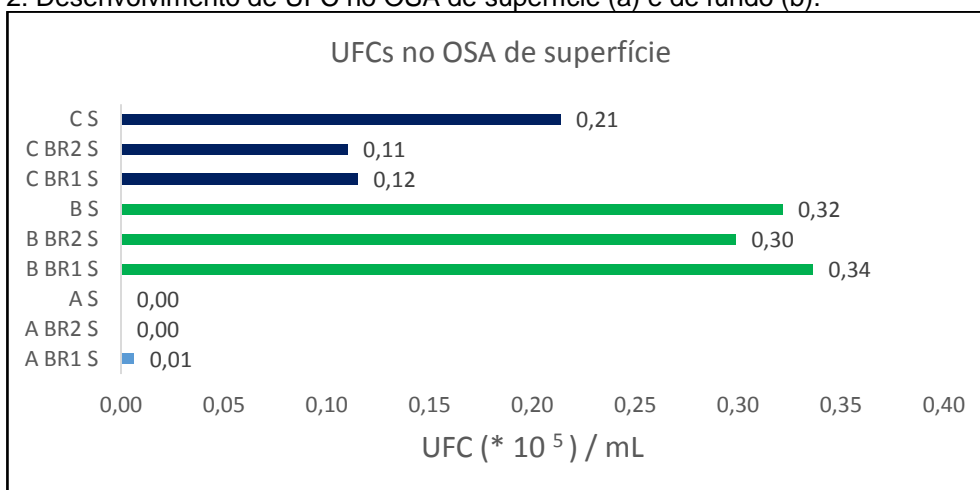
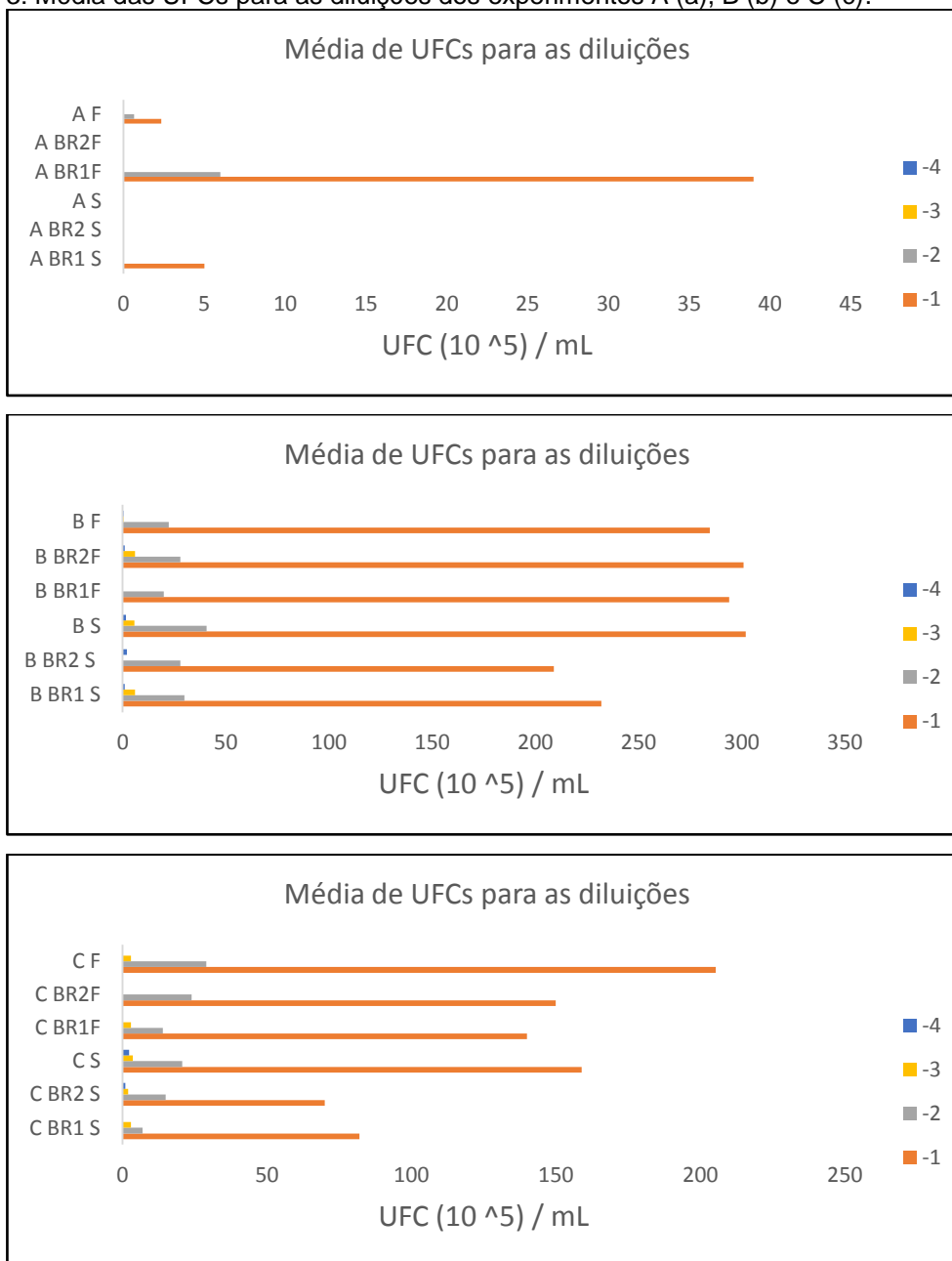


Gráfico 3: Média das UFCs para as diluições dos experimentos A (a), B (b) e C (c).



6.2.2 Técnica da membrana filtrante

Foi realizada através da membrana filtrante uma análise que compreende a filtração de todo o volume de 50 ml da amostra contendo o OSA formado de superfície e fundo, sem a realização da diluição do volume de 50 ml da amostra. O resultado foi um crescimento infinito sem a possibilidade de contagem das UFCs. Diante desse resultado foi tomada a decisão de fazer a diluição da amostra.

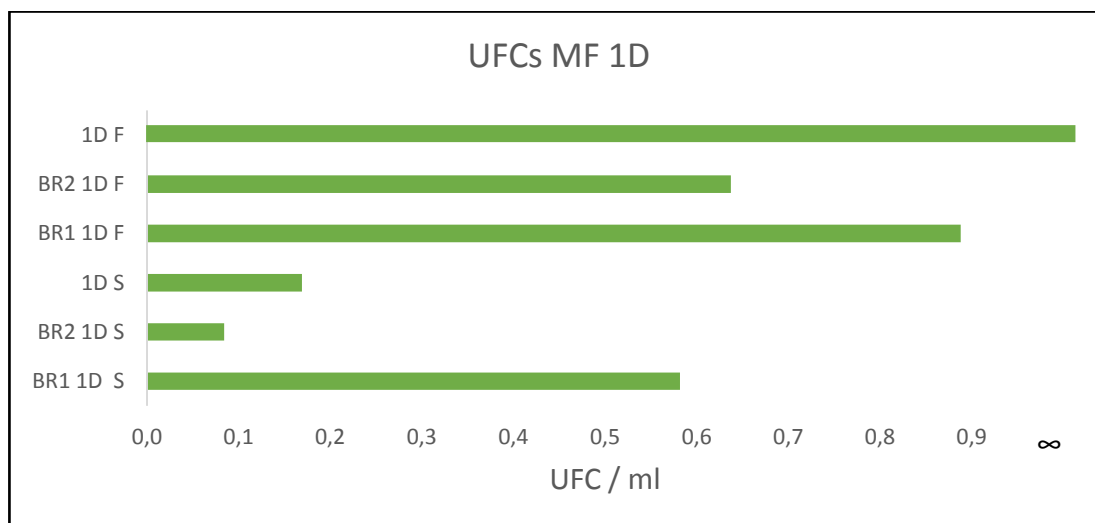
O padrão de desenvolvimento das unidades formadoras de colônias utilizando a membrana filtrante, foi alterado em relação a técnica de plaqueamento por microgota.

Apresentando maior crescimento das colônias no fundo do que em superfície, o que é visto na primeira e segunda diluição realizada, de acordo com o que já foi descrito na metodologia.

Na primeira diluição (1D) realizada nas análises da membrana filtrante (MF) é visto um crescimento infinito, para o OSA formado no fundo e um desenvolvimento bem menor para o OSA de superfície. Para o fundo o desenvolvimento de colônias no mesocosmo de formação do OSA foi superior ao que se desenvolveu nos brancos, evidenciando um estímulo a reprodução das bactérias (Gráfico 4).

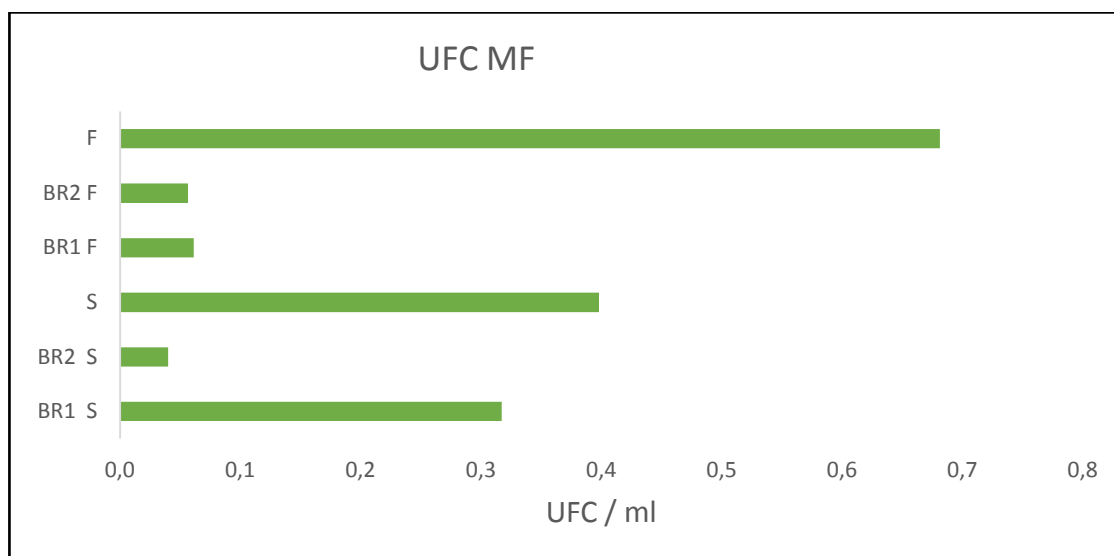
Em superfície a densidade das UFCs se desenvolveu em menor quantidade quando comparado ao BR1, o que exibe a possibilidade de que nem todas as bactérias heterotróficas do MPS seriam hidrocarbonoclasticas e seu desenvolvimento apresentou-se maior que seu branco BR2, mostrando que a formação do OSA favorece a biodegradação (Gráfico 4), estimulando a reprodutibilidades das bactérias degradadoras de petróleo, o que também foi observado para o OSA formado no fundo do mesocosmo.

Gráfico 4:Desenvolvimento de UFCs para primeira diluição nos amostras de OSA. Membrana filtrante (MF).



Na segunda diluição é observada a mesma tendência de crescimento das UFCs, Maior desenvolvimento de UFCs no fundo que em superfície é um indicio de estímulo ao desenvolvimento das UFCs de bactérias hidrocarbonoclasticas, ocasionada pela formação do OSA, com maior dispersão do mesmo para o fundo do mesocosmo. De forma similar é observado o desenvolvimento, em relação aos brancos BR1 e BR2.

Gráfico 5:Desenvolvimento de UFC na formação do OSA, 2ª diluição. Membrana filtrante (MF).



Os resultados exibidos corroboram com pesquisas feitas a respeito da biodegradação, que é favorecida pela formação dos agregados materiais particulados em suspensão (LEE et al., 1996; JÉZÉQUEL et al. 1999; WAISE 1997). No estudo de Lee et al. (1996) a biodegradação é comprovada por análise cromatográfica em que é observada a concentração de hidrocarbonetos nos agregados ao longo de um tempo de 56 dias.

Observando os resultados do desenvolvimento das UFCs de superfície na técnica da microgota (Gráfico 2 (a)) e na técnica da membrana filtrante (Gráfico 4 e 5) é possível verificar um aumento no número de colônias em relação ao mesocosmo BR2, assim a presença do material particulado em suspensão na formação de OSAs possui influência evidente no número de bactérias.

Jézéquel et al. (1999) conduz o entendimento da influência das partículas de argila na taxa de biodegradação do óleo, em mesocosmos que simulam a agregação do óleo ao particulado de argila, quantificando o número de bactérias, pela contagem em placas, hidrocarbonetos e o agregado na coluna d'água. O estudo relata um aumento no número de bactérias em mesocosmos com a presença de partículas de argila.

É possível ver que o número de UFCs nas amostras do OSA de fundo na técnica da membrana filtrante também mantém esse aumento em relação ao mesocosmo BR2 (Gráfico 4 e 5). Esse aumento no número de colônias apenas não é visto nos resultados para o OSA de fundo obtidos pela técnica da microgota com e sem as diluições sucessivas (Gráficos 1 e 2 (b)), onde é verificado que a quantidade de UFCs diminui.

Os dados exibidos pela técnica da microgota estão sujeitos a incertezas da metodologia, em suas etapas de execução, além de ser analisado ao fim um volume que

exibe a formação do OSA correspondente a $3,3 \times 10^{-4} \%$ para o experimento A, $6,67 \times 10^{-4} \%$ e $1 \times 10^{-3} \%$ para os experimento B e C respectivamente.

A técnica da membrana filtrante ao fim consegue exibir um resultado que avalia melhor a representatividade da amostra de OSA formado nas diluições realizadas, em $1 \times 10^{-2} \%$ em cada mesocosmo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo consegue verificar o crescimento de bactérias degradadoras de petróleo a partir do experimento de formação do OSA. Na avaliação entre as duas técnicas utilizadas para avaliar o crescimento de UFCs e verificar que a população de bactérias consegue se reproduzir dentro das condições experimentais utilizadas, a técnica da membrana filtrante consegue responder melhor, avaliando a representatividade do volume de amostra analisado.

Entretanto ainda é necessário um aprofundamento nos estudos que avaliem a influência da toxicidade do óleo no desenvolvimento das bactérias a partir da formação do OSA que sedimenta para o fundo da coluna d'água. Assim como observar como ocorre o desenvolvimento da biodegradação dos compostos de hidrocarbonetos conjuntamente com a evolução da atividade degradadora das bactérias.

É necessário ressaltar as limitações vistas durante a execução das análises para a técnica da microgota, em suas diversas etapas, que podem facilmente inferir erros de operação, como na homogeneização da amostra pelo operador e na tomada da alíquota da amostra para a aplicação da microgota na placa de Petri. Na técnica da membrana filtrante é observado um menor erro de operação durante suas etapas de execução.

8 SUGESTÕES

Estudos futuros podem contribuir no isolamento, identificação e imobilização desses microrganismos para a aplicação na remediação de petróleo em zonas costeiras.

A realização do monitoramento das condições utilizadas para a formação do OSA, ao longo do crescimento das colônias degradadoras de petróleo, pode ser realizado para que se avalie em quais melhores condições se obtém uma maior eficiência do processo de biodegradação.

9 REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 15^o th ed. Washington, D.C, 1981.

ALEER S.; ADETUTU E. M.; WEBER J.; BALL A. S.; JUHASZ A. L. Potential impact of soil microbial heterogeneity on the persistence of hydrocarbons in contaminated subsurface soils. **Journal of Environmental Management**. n. 136 p. 27-36, 2014.

ATLAS R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**. v. 31, n 4-12, p 178-182, 1995.

AZEVEDO B. M. S.; RIZZO A.C.L. Utilização da “Retro-Inoculação” como nova estratégia metodológica de Biorremediação de solos contaminados por petróleo. **Comunicação Técnica a XIII Jornada de Iniciação Científica do CETEM**, Rio de Janeiro, RJ, 2005.

BAHIA. Secretaria do Planejamento, Ciência e Tecnologia Companhia de Desenvolvimento da Região Metropolitana de Salvador (BA). Banco Mundial. **Plano Diretor de Limpeza Urbana-PDLU: Candeias, Madre de Deus e São Francisco do Conde**. Salvador, 1994b v.1 tomo 3, 1994.

BAHIA. Centro de Recursos Ambientais. **Avaliação da qualidade das águas costeiras da Baía de Todos os Santos**: relatório técnico, Avaliação ambiental. Salvador, 2^o semestre 2002.

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

BRAGG, J.R., OWENS, E.H., **Shoreline cleansing by interactions between oil and fine mineral particles**. In: Proceedings of the 1995 International Oil Spill Conference. American Petroleum Institute, Washington, DC, Publication no. 4620, pp. 219–227. 1995.

BRANDÃO M. L. L.; ROSAS C. O.; MEDEIROS V. M.; WARNKEN M. B.; BRICIO S. M. L.; SILVA A. M. L.; AZEREDO D.R.P. Comparação das técnicas do número mais provável (NMP) e de filtração em membrana na avaliação da qualidade microbiológica de água mineral natural. **Rev Inst Adolfo Lutz**. 71(1):32-9, 2012.

CARDOSO, A. M. **Sistema de Informações para Planejamento e Resposta a Incidentes de Poluição Marítima por Derramamento de Petróleo e Derivados**. 2007. 148f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Planejamento Energético), UFRJ, Rio de Janeiro. 2007.

CETESB (a). **Coliformes termotolerantes: Determinação em amostras ambientais pela técnica de tubos múltiplos com meio A1 -método de ensaio**. (NTL5.406) São Paulo, 2007.

CETESB (b). **Coliformes totais-determinação pela técnica da membrana filtrante:método de ensaio**. (NTL5.214) São Paulo, 2007.

CETESB. **Contagem de bactérias heterotróficas: método de ensaio**. (NTL5.20) São Paulo, 2006.

CLARK H.F.; KABLER P.W. The membrane filter in water quality tests. *American Journal of Public Health*. V 42,1952.

COSTA C.C. **Avaliação da biodegradabilidade de petróleo utilizando microrganismos isolados do estuário do rio Potengi (RN)**. Dissertação, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010.

COSTA C. R. **Biodegradação das frações do óleo da bacia do recôncavo em sedimento de manguezal: avaliação da eficiência de consórcios fúngicos associados à fibra de coco**. Monografia (Graduação em Oceanografia), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

CUNHA M. A.; SILVA M. R. Métodos de detecção de microrganismos indicadores. **Saúde & Ambiente em Revista**, v.1, n.1, p.09-13, Duque de Caxias, 2006.

ESTUDO DE IMPACTO AMBIENTAL - EIA, **Estaleiro do Paraguaçu**. Salvador, 2009.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. rev. atual. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1997.

EPA, Understanding Oil Spills and Oil Spill Response. **Disponível em: <http://www.epa.gov/oem/content/learning/pdfbook.htm>**. Acesso em: 19/06/2014.

FERNANDES, R. M. **Modelação de Derrames de Hidrocarbonetos**; Trabalho de Graduação (Graduação em Engenharia Ambiental) – Instituto Superior Técnico, 124f. 2001.

FONSECA, S.A.R. **Análise de estratégias de contingência ao derramamento de óleo: Estudo de caso do Campo Golfinho, Espírito Santos – Brasil**. Monografia: Graduação em Oceanografia do Departamento de Oceanografia e Ecologia. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais, Vitória, 2009.

GONG Y.; ZHAO X.; CAI Z.; O'REILLY S.E.; HAO X.; ZHAO D. A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: Influence on the fate, transport and remediation of oil spills. **Marine Pollution Bulletin**. v. 79, p.16–33, 2014.

GUERRA N. M. M.; OTENIO M. H.; SILVA M. E. Z.; GUILHERMETTI M; NAKAMURA C. V.; UEDA-NAKAMURA T. E BENEDITO; FILHO B. P. Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v. 28, n. 1, p. 13-18, Maringá, 2006.

IOPF – Fate of marine oil spills – **Technical Information Paper n.2**, 2011.

JÉZÉQUEL, R. MERLIN, F. and LEE, K. The influence of microorganisms on oil-mineral fine interactions in low energy coastal environment. **International Oil Spill Conference**, 1999.

KIRIMURÊ – Instituto Kirimurê. **Baía de Todos os Santos**. Disponível em: <<http://www.btsinstitutokirimure.ufba.br/?p=4>>. Acesso em: 26/06/2014.

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

LE FLOCH, S., GUYOMARCH, J., MERLIN, F.X., STOFFYN-EGLI, P., DIXON, J., LEE, K., The influence of salinity on oil–mineral aggregate formation. **Spill Science & Technology Bulletin** 8 (1), 65–71. 2002.

LEE, K., STOFFYN-EGLI, P., **Characterization of oil–mineral aggregates**. In: Proceedings of 2001 International Oil Spill Conference. American Petroleum Institute, Washington, DC, pp. 991–996, Publication No. 14710. 2001.

LEE, K.; WEISE, A. M.; ST-PIERRE, S. Enhanced Oil Biodegradation with Mineral Fine Interaction. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 3, n. 4, p. 263-267, 1996.

LEE, K., LUNEL, T., WOOD, P., SWANNELL, R., **Shoreline cleanup by acceleration of clay–oil flocculation processes**. In: Proceedings of the 1997 International Oil spill Conference. American Petroleum Institute, Washington, DC, Publication No 4651, pp. 235–240. 1997.

LEE, K.; STOFFYN-ENGLI, P. WOOD, P.; LUNEL. T. **Formation and structure os oil-mineral fines aggregates in coastal environments**. In: **Proceedings of the 21st Arctic and Marine oilspill Program (AMOP)**. Technical Seminar, p. 911-921, Enviroment Canada, Ottawa.

LEE, K., STOFFYN-EGLI, P., OWENS, E.H., The OSSA II pipeline oil spill: natural mitigation of a riverine oil spill by oil–mineral aggregate formation. **Spill Science and Technology Bulletin**. v. 7, n. 3-4, p. 149–154, 2002.

LI G.; HUANG W.; LERNER D. N.; ZHANG X. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. **Water. Res.** v 34 n 15. p. 3845-3853., 2000

LIMA D. F.; OLIVEIRA O. M. C.; CRUZ M.J. M. Utilização dos fungos na biorremediação de substratos contaminados por petróleo: estado da arte. **Cadernos de Geociências**, v. 8, n. 2, p 113-121, 2011.

LINDSTROM, J.E.; BRADDOCK, J.F. Biodegradation of petroleum hydrocarbons at low temperature in the presence of the dispersant Corexit 9500. **Marine Pollution**, n. 44, 739–747, 2002.

MAJOLO C.; CARVALHO H.H; WIEST J. M. Atividade antibacteriana “in vitro” de diferentes acessos de urucum (*Bixa orellana* L.) e sua relação com o teor de bixina presente nas sementes. **B.CEPPA**, v. 31, n. 1, p. 115-124, Curitiba, 2013.

MACIEL A. B. Isolamento de bactérias degradadoras de petróleo e produtoras de biossurfactantes a partir do sedimento do manguezal rio paraíba do sul - Rio de Janeiro. MNOGRAFIA (Graduação em Ciências biológicas) - Universidade Estadual Norte Fluminense Drsy Ribeiro, 2009.

MOREIRA, Í. T. A. **Avaliação da eficiência de técnicas de remediação em sedimentos de ecossistema manguezal impactado por atividades petrolíferas**. 2010. 54f. Dissertação (mestrado em geoquímica) - Petróleo e Meio Ambiente, da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011

MOREIRA, Í. T. A. **Investigação de possíveis impactos ecológicos do petróleo sobre comunidades biológicas estuarinas na Baía de Todos os Santos e no sul da Bahia: OSA como uma ferramenta a norteadora**. Tese (Doutorado em Geologia), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

MOREIRA I. T. A.; OLIVEIRA O. M. C.; SILVA C.S.; RIOS M.C.; QUEIROZ A.F.S.; ASSUNÇÃO R. V.A., CARVALHO A. P.N. Chemometrics applied in laboratory study on

formation of oil-spm aggregates (OSAs) — A contribution to ecological evaluation. **Microchemical Journal**. v. 118, p. 198–202, 2015.

MICHAUD L., GIUDICE A.L., SAITTA M., DOMENICO M., BRUNI V. The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experimente. **Marine Pollution**, n. 49, 405-409, 2004.

MUSCHENHEIM D.K.; LEE K. Removal of oil from the sea surface through particulate interactions: review and prospectus. **Spill Science & Technology Bulletin**, v.8, n. 1, p 9–18, 2002.

NIU, H.; LI, Z.; LEE, K.; KEPKAY, P.; MULLIN, J. V. 2010. Modelling the transport of oil–mineral-aggregates (OMAs) in the marine environment and assessment of their potential risks. **Environ Model Assess**, 2010.

OWENS, E. H.; LEE, K. Interaction of oil and mineral fines on shorelines: review and assessment. **Marine Pollution Bulletin**, n.47 p. 397-405. 2003.

PEREIRA C.T.C. **Caracterização hidrogeoquímica do estuário do rio curuçá (município de Curuçá – NE do Pará)**. Dissertação. Geologia e Geoquímica, Universidade Federal do Pará, 2006.

PEREIRA T. S. **Biodisponibilidade de metais no estuário do rio paraguaçu, baía de todos os santos, Bahia**. Monografia. (Graduação em Oceanografia) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2014.

PEREIRA A.R.B.; FREITAS D. A. F. Uso de microrganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, nº 6, p 975 – 1006, 2012.

PEREIRA D. S.; GOMES R. C.; SEMÊDO L. T. A.S. Potencial das actinobactérias na biodegradação de hidrocarbonetos. **Revista Eletrônica TECCEN**. v. 5, n. 2 p. 71-96, Vassouras, 2012.

ROY A.; PAL S., KAZY S. K.; SARKAR P.; SAR P.; GHOSHAL A. K. Characterization of culturable bacterial communities in petroleum hydrocarbon contaminated sludge of oil refineries and oil exploration sites. **Journal of Environmental Research and Development**. v.8 n. 3, 2014.

ROMEIRO, R. S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Roteiro das aulas práticas. 2007.

SANTOS C.B. **Contribuição aos estudos da carga sedimentar em suspensão na Baía de Todos os Santos**. Trabalho Final de Graduação (Geologia), Universidade Federal da Bahia, 2005.

SANTOS, R. M. **Avaliação da adição do pó da casca do coco verde, como material estruturante, na biorremediação de solo contaminado por petróleo**. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil. 2007.

SANTOS, H. F; CARMO, F.L; PAES, J. E. S; ROSADO, A. S; PEIXOTO, R. S. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. **Water, air, soil pollution**, v. 216, p. 329-350, 2011.

SILVA V. A.; DIAS E. S.; VALE R.H. P.; SILVA R., MOREIRA G. F. Isolamento e identificação de bactérias presentes nos solos de cobertura utilizados no cultivo do cogumelo *Agaricus Blazei* murril. **Ciênc. agrotec.**, v. 31, n. 5, p. 1364-1373, Lavras, 2007.

SILVA, C. S. **Hidrocarbonetos saturados em sedimentos da zona intermareal na Baía de Todos Santos – Bahia**. Monografia (Graduação em Oceanografia) – Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2011.

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

STOFFYN-EGLI, P.; LEE, K. Formation and characterization of oil– mineral aggregates. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 8, n.1, p. 31 – 44, 2002.

SUN J.; KHELIFA A.; ZHAO C.; ZHAO D.; WANG Z. Laboratory investigation of oil–suspended particulate matter aggregation under different mixing conditions. **Science of the Total Environment**. (473–474), p. 742–749, 2014.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRAVITOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**. 14(4), p. 1027-1035, 2010.

TRINDADE, M.C.L.F. **Formação e caracterização de agregados óleo-mineral em diferentes energias hidrodinâmicas**. Monografia de Graduação: Oceanografia, Instituto de Geociências, UFBA, p. 57. 2011.

URURAHY, A. F. P. **Biodegradação de Resíduo Oleoso Proveniente de Refinaria de Petróleo**. Tese. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.

VAZ F. S. **Bactérias degradadoras de biodiesel, diesel e misturas em tanques de armazenamento**. Dissertação. Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2010.

WEISE, A. M. **The significnce of clay-oil flocculation processes to oil biodegradation**. Degree of Master of Science. Canadá, 1997.

WEISE, A.M., NALEWAJKO, C., LEE, K. Oil–mineral fine interactions facilitate biodegradation in seawater. **Environmental Technology**. 20, 811–824. 1999.

ZIOLLI, R. L. Aspectos ambientais envolvidos na poluição marinha por petróleo. **Revista Saúde e Ambiente**. v.3 n.2 p.32-41, 2002.