



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

CIBELE RODRIGUES COSTA

**BIODEGRADAÇÃO DAS FRAÇÕES DO ÓLEO DA BACIA DO RECÔNCAVO  
EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL: AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE  
CONSÓRCIOS FÚNGICOS ASSOCIADOS À FIBRA DE COCO**

Salvador  
2014

CIBELE RODRIGUES COSTA

BIODEGRADAÇÃO DAS FRAÇÕES DO ÓLEO DA BACIA DO RECÔNCAVO  
EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL: AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE  
CONSÓRCIOS FÚNGICOS ASSOCIADOS À FIBRA DE COCO

Trabalho Final de Graduação elaborado como  
requisito final para satisfação da atividade TFG2 –  
Trabalho Final de Graduação, para obtenção do  
título de Bacharel em Oceanografia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Olívia Maria C. de Oliveira

Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Danusia Ferreira Lima

Salvador  
2014

CIBELE RODRIGUES COSTA

BIODEGRADAÇÃO DAS FRAÇÕES DO ÓLEO DA BACIA DO RECÔNCAVO  
EM SEDIMENTO DE MANGUEZAL: AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE  
CONSÓRCIOS FÚNGICOS ASSOCIADOS À FIBRA DE COCO

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Olívia Maria Cordeiro de Oliveira - IGEO/UFBA (Orientadora)

---

Dra. Danusia Ferreira Lima - IGEO/UFBA (Co-orientadora)

---

Profa. Dra. Joana Fidélis da Paixão – IF Baiano

---

Msc. Claudia Yolanda Reyes – IGEO/UFBA

Salvador, 29 de julho de 2014

## Agradecimentos

- A Deus, por ter me iluminado, por ter me dado forças nas horas que fraquejei, sabedoria, paciência e resiliência ao longo dessa árdua jornada;

- A professora Olívia, pela confiança no meu trabalho, pelos ensinamentos e pela orientação;

- A professora Regina, por ter disponibilizado o material para a conclusão do meu trabalho;

- Aos meus pais, que apesar de estarem longe, confiaram no meu potencial e se esforçaram para que os meus objetivos fossem alcançados;

- A Tai, Kati e Nai, minha família fora de casa, que conviveram comigo durante toda a graduação e ofereceram conforto nas horas tristes e motivos para celebrar sempre. Amo vocês!

- A Alexandre, meu melhor amigo, que hoje apesar de longe, foi diversas vezes incentivador de todos os meus projetos. Obrigada por ter me dado tanta força e estar sempre disponível para mim, por sempre arrumar um motivo para sorrir e pelos 7 anos de amizade. Volte logo!

- A Ana Paula, Jessyca, Larissa e Luana pela amizade incondicional, pelos conselhos, pelas farras, pelo companherismo e pela ajuda no laboratório (sacrificar os sábados pela amiga é coisa rara hahahaha). Obrigada por manterem sempre meu pé no chão e acreditarem que ia dar tudo certo a todo momento. Vocês serão muito bem recompensadas! Sem vocês eu não conseguiria!

- A Gisele pela disponibilidade e alegria em resolver qualquer que fosse o meu problema no laboratório. Obrigada minha linda!

- A Sarah por ter me aberto às portas para o NEA e me ensinado tanta coisa nos dois anos de trabalho;

- A Jorginho, Cláudia e Karina pela disponibilidade em me ajudar com análises e as partes logísticas e burocráticas do NEA;

- A Luzimara e Palloma, pelo carinho, amizade e conselhos tão úteis e necessários;

- E a Danusia (Dan), pessoa maravilhosa que Deus colocou no meu caminho e me estendeu a mão em todos os momentos difíceis, oferecendo seus conhecimentos, sua paciência e acima de tudo sua amizade. Obrigada por ter acreditado e ter me colocado na direção certa. Você foi indispensável nessa conquista! Não tenho palavras pra descrever o tamanho da minha gratidão. Muito obrigada pela orientação!

## Resumo

O petróleo é uma mistura de hidrocarbonetos com variados pesos moleculares, largamente utilizado como fonte de energia e matéria prima. Um dos ecossistemas que são considerados altamente sensíveis aos efeitos danosos de derramamentos com petróleo são os manguezais, sendo um dos principais ambientes para onde o óleo converge. Os microrganismos são os principais agentes de ciclagem de carbono na natureza e, alguns deles apresentam a capacidade de degradação das frações do petróleo, como os fungos. Através de associações fúngicas, é possível se obter a degradação completa do petróleo, já que este é uma mistura complexa de componentes. A fibra de coco é uma matéria prima barata e abundante, podendo, potencialmente ser utilizada como fonte nutritiva para esses fungos degradadores. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da biodegradação das frações do óleo da Bacia do Recôncavo, empregando consórcios fúngicos associados à fibra de coco em sedimento de manguezal. Para isto, foi realizada uma coleta representativa num manguezal nos arredores do rio São Paulo, onde foram montados três experimentos, cada um visando a degradação das diferentes frações do petróleo (saturados, aromáticos e NSO).

Cada experimento foi constituído de 32 testes de biodegradabilidade, empregando um consórcio para cada fração, onde havia 8 controles (apenas sedimento e sedimento e óleo), 12 testes com diferentes concentrações de fibra de coco e 12 testes com diferentes quantidades de cápsulas. Foram realizadas coletas periódicas (0, 7, 15 e 30 dias). Posteriores análises foram realizadas para avaliar o comportamento microbiológico (contagem de fungos e bactérias), os níveis de nutrientes (fósforo, carbono orgânico, nitrato e amônio) e os níveis de degradação (extração e cromatografia líquida).

As análises permitiram concluir que os consórcios fúngicos empregados em cada fração foram eficientes na biodegradação. A fibra de coco não demonstrou um comportamento consistente como nutriente e o emprego das cápsulas fúngicas se mostraram bastante eficazes na degradação. Através da análise de componentes principais (ACP) foi possível concluir também que não houve relação dos nutrientes (fósforo e carbono) e da degradação com os teores das formas nitrogenadas nos microcosmos.

## Abstract

The oil is a mixture of hydrocarbons with different molecular weights, widely used as source of energy and feedstock. One of ecosystems that are considered highly sensitive to the harmful effects of oil spills in mangroves are being one of the main environments where oil converges. The microorganisms are the principal agents of carbon cycling in nature and, some of them have the capability of fraction of oil degradation, as the fungi. Through the fungal association, it's possible to obtain the fully oil degradation, once this is a complex mixture of components. The coconut's fiber is an abundant and cheap feedstock, capable of being used as nutriment to these degrading fungi. The objective of this paper was to evaluate the biodegradation efficiency of the oil fractions of the Bacia do Recôncavo, applying fungal consortium associated to the coconut fiber in mangrove's sediment. For this, a representative collection was made in a mangrove on the outskirts of river São Paulo, where three experiments were assembled, each one aiming the degradation of different oil fraction (saturated, aromatics and NSO).

Each experiment was constituted of 32 biodegradability test, applying one consortium for each fraction, where there were 8 controls (only sediment and sediment with oil), 12 test with different concentration of coconut fiber and 12 test with different capsules amount. Periodic collects were made (0,7,15 and 30 days). Later analysis were made for evaluate the microbiologic behavior (fungi count and bacteria), the nutrient level (phosphorus, organic carbon, nitrate, and ammonium) and the degradation level (extraction, liquid chromatography).

The analysis allowed to conclude that the fungal consortium applied in each fraction were efficient for the biodegradation. The coconut fiber did not show consistent behavior as nutrient and the application of the fungi capsules were very effective on the degradation. With the principal component analysis (PCA) was possible to conclude also that there was no relation between the nutrients (phosphorus and carbon) and the degradation, with the levels of the nitrogen forms on the microcosms.

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> – Imagem de satélite do trecho do rio São Paulo (próximo a sua foz) localizado no município de São Francisco do Conde, Bahia e área de coleta. ....	17
<b>Figura 2</b> - Mapa de situação e localização da área de estudo. a) Mapa de situação da BTS; b) imagem de satélite da área em destaque de amarelo .....	18
<b>Figura 3</b> - Coleta do sedimento na área de manguezal localizada nas margens do estuário do rio São Paulo. (a) área de coleta (b) testemunhos .....	25
<b>Figura 4</b> - Testes de biodegradabilidade.....	27
<b>Figura 5</b> – Repique de colônias fúngicas. (a) retirada do fragmento fúngico (b) transferência do fragmento para uma placa com meio BDA .....	27
<b>Figura 6</b> – Suspensão de esporos compondo o consórcio de saturados - triplicata. ....	28
<b>Figura 7</b> – Cápsulas fúngicas a base de fibra de coco .....	29
<b>Figura 8</b> - Câmara de Neubauer .....	29
<b>Figura 9</b> – Procedimento para análise de bactérias. (a) homogeneização da amostra e (b) transferência da amostra para solução A .....	31
<b>Figura 10</b> – Quantificação de unidades formadoras de colônias de bactérias. (a) placa dividida em quadrantes numerados com as diluições (b) contagem das colônias após 24h (círculo vermelho destaca uma unidade formadora de colônia).....	31
<b>Figura 11</b> – Quantificação de unidades formadoras de colônias de fungos. (a) placa com diluições (b) contagem das colônias após 24h (círculo vermelho destaca uma unidade formadora de colônia) .....	32
<b>Figura 12</b> – Extração em Soxhlet. (a) solvente rico em extrato e (b) solvente transparente após extração.....	35
<b>Figura 13</b> – Cromatografia Líquida. (a) eluição da fração de aromáticos e (b) eluição da fração de NSO.....	35
<b>Figura 14</b> - Gráfico para número de células viáveis (UFC). UFC de fungos no experimento 01 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias .....	37
<b>Figura 15</b> - Gráfico para número de células viáveis (UFC). UFC de bactérias no experimento 01 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias .....	38
<b>Figura 16</b> – Gráfico de crescimento fúngico padrão .....	39
<b>Figura 17</b> - Gráfico com variação dos teores de fósforo no experimento 01 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias .....	41
<b>Figura 18</b> - Gráfico com variação dos teores de carbono orgânico (%) no experimento 01 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias .....	42
<b>Figura 19</b> - Gráfico com variação dos teores de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) no experimento 01 nos tempos 0 e 30 dias. ....	42
<b>Figura 20</b> - Gráfico com variação dos teores de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) no experimento 01 nos tempos 0 e 30 dias.....	43
<b>Figura 21</b> - Gráfico de degradação dos compostos do experimento 01 nos tempos 0 e 30 dias .....	44
<b>Figura 22</b> - Diagrama ternário das frações de saturados, aromáticos e NSO do experimento 01 nos tempos 0 e 30 dias .....	46
<b>Figura 23</b> - Gráfico para número de células viáveis (UFC). UFC de fungos no experimento 02 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias .....	47
<b>Figura 24</b> - Gráfico para número de células viáveis (UFC). UFC de bactérias no experimento 02 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias .....	48
<b>Figura 25</b> - Gráfico com variação dos teores de fósforo no experimento 02 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias .....	49
<b>Figura 26</b> - Gráfico com variação dos teores de carbono orgânico (%) no experimento 02 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias .....	50
<b>Figura 27</b> - Gráfico com variação dos teores de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) no experimento 02 nos tempos 0 e 30 dias .....	50

<b>Figura 28</b> - Gráfico com variação dos teores de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) no experimento 02 nos tempos 0 e 30 dias .....	51
<b>Figura 29</b> - Gráfico de degradação dos compostos do experimento 02 nos tempos 0 e 30 dias .....	52
<b>Figura 30</b> - Diagrama ternário das frações de saturados, aromáticos e NSO do experimento 02 nos tempos 0 e 30 dias .....	54
<b>Figura 31</b> - Gráfico para número de células viáveis (UFC). UFC de fungos no experimento 03 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias .....	55
<b>Figura 32</b> - Gráfico para número de células viáveis (UFC). UFC de bactérias no experimento 03 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias .....	56
<b>Figura 33</b> - Gráfico com variação dos teores de fósforo no experimento 03 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias .....	57
<b>Figura 34</b> - Gráfico com variação dos teores de carbono orgânico (%) no experimento 03 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias .....	58
<b>Figura 35</b> - Gráfico com variação dos teores de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) no experimento 03 nos tempos 0 e 30 dias .....	58
<b>Figura 36</b> - Gráfico com variação dos teores de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) no experimento 3 nos tempos 0 e 30 dias .....	59
<b>Figura 37</b> - Gráfico de degradação dos compostos do experimento 03 nos tempos 0 e 30 dias .....	60
<b>Figura 38</b> - Diagrama ternário das frações de saturados, aromáticos e NSO do experimento 03 nos tempos 0 e 30 dias .....	62
<b>Figura 39</b> - Integração dos dados biogeoquímicos (nutrientes, degradação e crescimento fúngico) para os tempos 0 e 30 dias para o experimento 01 .....	63
<b>Figura 40</b> - Integração dos dados biogeoquímicos (nutrientes, degradação e crescimento fúngico) para os tempos 0 e 30 dias para o experimento 02 .....	64
<b>Figura 41</b> - Integração dos dados geoquímicos (nutrientes, degradação e crescimento fúngico) para os tempos 0 e 30 dias para o experimento 03 .....	66
<b>Figura 42</b> - Gráfico de pesos da análise dos componentes principais - experimento 01 .....	68
<b>Figura 43</b> - Gráfico de escores da análise dos componentes principais - experimento 01 .....	68
<b>Figura 44</b> - Gráfico de pesos da análise dos componentes principais - experimento 02 .....	70
<b>Figura 45</b> - Gráfico de escores da análise dos componentes principais - experimento 02 .....	70
<b>Figura 46</b> - Gráfico de pesos da análise dos componentes principais - experimento 03 .....	71
<b>Figura 47</b> - Gráfico de escores de análise dos componentes principais - experimento 03 .....	72

## Lista de quadros

<b>Quadro 1</b> - Codificação empregada para identificação das amostras.....	26
<b>Quadro 2</b> - Quantidade média de esporos encontrados após contagem e quantidade de esporos/ml para cada consórcio utilizado nos experimentos.....	36

## Lista de abreviaturas

- ACP – Análise de Componentes Principais
- ACPO – Associação de Combate aos Poluentes
- BDA – Batata-Dextrose-Ágar
- BTS – Baía de Todos os Santos
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
- CP – Componente Principal
- CO – Carbono orgânico
- DDT – Diclorodifeniltricloroetano
- HPA – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
- LBQM – Laboratório de Biotecnologia e Química dos Microrganismos
- LEPETRO – Laboratório de Estudos do Petróleo
- N – Norte
- NEA – Núcleo de Estudos Ambientais
- RLAM – Refinaria Landulpho Alves
- S – Sul
- UFC – Unidades formadoras de colônias

## SUMÁRIO

Agradecimentos .....	4
Abstract .....	6
Lista de figuras .....	7
Lista de quadros .....	9
Lista de abreviaturas .....	10
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>1.0 Introdução .....</b>	<b>13</b>
1.1 Objetivos .....	16
1.1.1 Objetivo geral .....	16
1.1.2 Objetivos específicos .....	16
<b>2. ÁREA DE AMOSTRAGEM .....</b>	<b>16</b>
<b>2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Origem e composição química do petróleo .....</b>	<b>19</b>
3.1 Biodegradação dos compostos do petróleo .....	20
3.2 Fungos degradadores de hidrocarbonetos .....	21
3.3 Biorremediação .....	23
3.4 Bioaumento e bioestímulo .....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
4.1 Trabalho de escritório .....	24
4.2 Trabalho de campo .....	24
4.3 Trabalho de laboratório .....	27
4.3.1 Obtenção das colônias de fungos .....	27
4.3.2 Montagem do consórcio – suspensão de células .....	28
4.3.3 Montagem das cápsulas .....	28
4.3.5 Análise de bactérias .....	30
4.3.6 Análise de fungos .....	31
4.3.7 Desagregação das amostras .....	32
4.3.8 Determinação de Carbono orgânico .....	32
4.3.9 Determinação de Fósforo inorgânico .....	33
4.3.10 Determinação de Nitrato e Amônio .....	33
<b>4.3.11 Extrações .....</b>	<b>34</b>

4.3.12 Cromatografia líquida .....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
5.1 Contagem de Esporos .....	36
5.2 Experimento 01 (Degradação de Saturados) .....	36
5.2.1 Monitoramento microbiológico .....	37
5.2.2 Monitoramento químico .....	41
5.2.3 Monitoramento geoquímico .....	44
5.3 Experimento 02 (Degradação de Aromáticos).....	46
5.3.1 Monitoramento microbiológico.....	46
5.3.2 Monitoramento químico .....	49
5.3.3 Monitoramento geoquímico .....	52
5.4 Experimento 3 (Degradação de NSO) .....	54
5.4.1 Monitoramento microbiológico.....	54
5.4.2 Monitoramento químico .....	57
5.4.3 Monitoramento geoquímico .....	60
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74

# 1. INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

## 1.0 Introdução

O petróleo é um líquido viscoso caracterizado por uma mistura de diferentes compostos de ocorrência natural. Constituído por diferentes classes de hidrocarbonetos apresenta composição química muito complexa e variável. Sua constituição é, predominantemente, de hidrocarbonetos (parafínicos, isoparafínicos, naftênicos e aromáticos), que podem chegar a 90% de sua composição e, em menor quantidade, de derivados orgânicos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e organometálicos, principalmente de níquel e vanádio. (ZÍLIO; PINTO, 2002; REIS et al., 2005; ACPO, 2006; ROCHA et al., 2010).

Além de ser largamente utilizado como fonte de energia, principalmente para motores de automóveis, devido ao seu alto poder energético, o petróleo é matéria prima para a produção de diversos compostos químicos e materiais como plásticos, polímeros, vinis, tintas, solventes, parafina e nafta, essenciais para a fabricação de produtos industrializados. A crescente demanda por produtos derivados do petróleo, bem como operações envolvendo, por exemplo, seu transporte, refino e extração, tem aumentado a incidência de acidentes com a contaminação dos ambientes (ZÍLIO; PINTO, 2002; REIS et al., 2005; ACPO, 2006; ROCHA et al., 2010).

A Bacia do Recôncavo localiza-se no Estado da Bahia, Nordeste do Brasil, ocupando uma área de aproximadamente 11.500 km<sup>2</sup>. Seus limites são dados pelo Alto de Aporá, a norte e noroeste, pelo sistema de falhas da Barra, a sul, pela falha de Maragogipe, a oeste, e pelo sistema de falhas de Salvador, a leste. O petróleo gerado tem composição predominantemente parafínica, devida à sua gênese, relacionada à matéria orgânica algálica, de paleo-ambiência lacustre. Como consequência, tem-se um produto final de alto valor comercial. (MILHOMEM et al, 2003).

Os manguezais apresentam maior desenvolvimento próximo à linha do Equador, na faixa entre os trópicos de Câncer e de Capricórnio (23°27'N e 23°27'S) (YOKOYA, 1995), sendo presentes na América Central e Caribe, Índia, península da Indochina, Brasil e Austrália (FONSECA; DRUMMOND, 2003). Pela intensa atividade antrópica em áreas costeiras, restam menos de 50% da vegetação original, onde mais da metade dos restantes encontram-se degradados. (DINESH et al., 2004). Encontram-se distribuídos ao longo de praticamente todo o litoral brasileiro, notado desde seu limite ao norte no Oiapoque, Amapá (04°30'N) até Laguna (28°30'S), Santa Catarina, limite austral desse ecossistema (YOKOYA, 1995; REZENDE et al., 2009).

São ambientes localizados em regiões de planícies costeiras de alta temperatura e precipitação. Ecossistemas abrigados, de ocorrência no encontro das águas dos rios com a água do mar (como por exemplo, nas margens de baías, enseadas, barras, desembocaduras de rios, lagunas e reentrâncias costeiras) ou mesmo expostos à linha de costa, sendo assim, submetido diretamente ao regime das marés (CURY, 2002). São ecossistemas que representam importância singular para área de seu desenvolvimento, devido aos serviços ambientais essenciais prestados, como produção de serapilheira, exportação de material particulado e material dissolvido, importante transformador de nutrientes em matéria orgânica, além de oferecer condições ideais para abrigo e reprodução de diversas espécies marinhas, sendo responsável pela manutenção de estoques pesqueiros. Também representam importante barreira biogeoquímica no transporte de alguns poluentes para a região costeira adjacente (como os metais pesados). São sistemas funcionalmente complexos, altamente resilientes e estáveis. (REZENDE et al., 2009).

As características químicas do substrato, sua disposição na zona costeira e variações sazonais podem contribuir para a persistência do óleo sobre o sedimento dos lugares contaminados, aumentando o impacto no meio ambiente. Estão entre os principais locais para onde os derramamentos de óleo convergem, sendo a situação agravada pelo sistema de marés dentro destes ecossistemas, o que favorece a deposição desse material nas raízes e no sedimento (GARRITY et al, 1994; BURNS; CODI, 1998; BOTELHO, 2003).

Segundo BOTELHO (2003), o sistema de raízes aéreas é fator de grande vulnerabilidade do sistema de mangue ao petróleo. Por apresentar características anaeróbicas, a vegetação desenvolveu esta notável adaptação para a realização das trocas gasosas. Essas raízes, expostas ao óleo, sofrem o fechamento das lenticelas e interrompem as passagens de ar interiores, eventualmente bloqueando o sistema respiratório e, por consequência, provocando o sufocamento e até mesmo a morte da planta. Sobre os aspectos toxicológicos, o petróleo apresenta duas vias principais nas quais causa impactos nos organismos marinhos, são os efeitos físicos resultante do recobrimento e os efeitos químicos, associado à toxicidade dos compostos presentes. Todos os impactos observados são resultantes de um e/ou de outro efeito (CETESB, 2007).

Trata-se também de um ecossistema bastante frágil, pois está localizado em áreas onde a população busca se estabelecer, em um número cada vez maior, sendo necessária uma busca constante por recursos, como alimentos, desenvolvimento de indústrias e cidades. Esta gera uma pressão ambiental, que acaba por provocar o

desequilíbrio e a destruição por completo de extensas áreas (FONSECA; DRUMMOND, 2003).

Os microrganismos são os principais agentes responsáveis pela ciclagem do carbono na natureza. Em muitos ecossistemas existem uma comunidade indígena de microrganismos capazes de degradar compostos do petróleo (KATAOKA, 2001). Fungos, bactérias, cianobactérias, leveduras, tem a capacidade de oxidar hidrocarbonetos, ricos em matéria orgânica, se desenvolvendo em sua superfície e os utilizando como doadores de elétrons (DECESARO, 2013). Os fungos são microrganismos resistentes às condições de estresse ambiental, como insuficiência de nutrientes, baixos teores de umidades e valores de pHs extremos (MACEDO et al., 2002; LIMA et al., 2011).

Os fungos são seres eucariotos e heterotróficos (saprofíticos ou parasitas), apresentando uma distribuição nos mais variados ambientes, encontrados desde em solos até em seres humanos (SILVA, 2012). Os fungos filamentosos possuem características que os classificam como bons degradadores de petróleo (MOLLEA, 2005). Como biodegradadores naturais, os fungos encontram as substâncias necessárias para o seu desenvolvimento na natureza, principalmente, macromoléculas insolúveis, que precisam ser primeiramente degradadas em unidade monoméricas solúveis antes de sua assimilação. Esse é o caso de polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, lignina, lipídios e outros compostos de grande peso molecular que não podem ser incorporados diretamente sem antes terem sido reduzidos. Os fungos absorvem nutrientes através da membrana plasmática, para isso, esses organismos secretam enzimas específicas para o meio exterior, conseguindo reduzir o tamanho das moléculas e aumentando a solubilidade das mesmas (SILVA, 2012).

Por ser constituído por diferentes classes de hidrocarbonetos, a degradação dos compostos do petróleo não pode ser realizada por uma única espécie microbiana, sendo necessária a formação de associações, onde, por complementaridade metabólica, os consórcios degradam os compostos, podendo até mesmo chegar à completa degradação (FIORAVANTI, 2013).

A fibra do coco pode oferecer uma atmosfera mais oxigenada que sempre é benéfica aos microrganismos aeróbios, pois ela promove um microambiente mais aerado. Esta ainda se apresenta como não competitiva com o contaminante como fonte de carbono (reduzida biodegradação) (BARROS, 2006). Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada para minimização ou reaproveitamento de resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais, como na indústria agroindustrial. A geração do rejeito da casca, que corresponde a quase 90% do peso do fruto, é notável e em grande escala, devido ao consumo da fruta in natura e a industrialização

da sua água. Gerado tanto como resíduo industrial quanto como lixo urbano, este resíduo já vem sendo empregado no beneficiamento e geração da fibra, utilizada principalmente na agricultura, na indústria de papel, na engenharia de alimentos e na construção civil. Aliar a biorremediação esta matéria prima, de grande disponibilidade, fácil acesso e baixo custo se torna uma alternativa muito viável (COELHO, 2001; BARROS, 2006; SANTOS, 2007).

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo geral**

Avaliar a eficiência da biodegradação das frações do óleo da Bacia do Recôncavo, empregando consórcios fúngicos associados à fibra de coco em sedimento de manguezal.

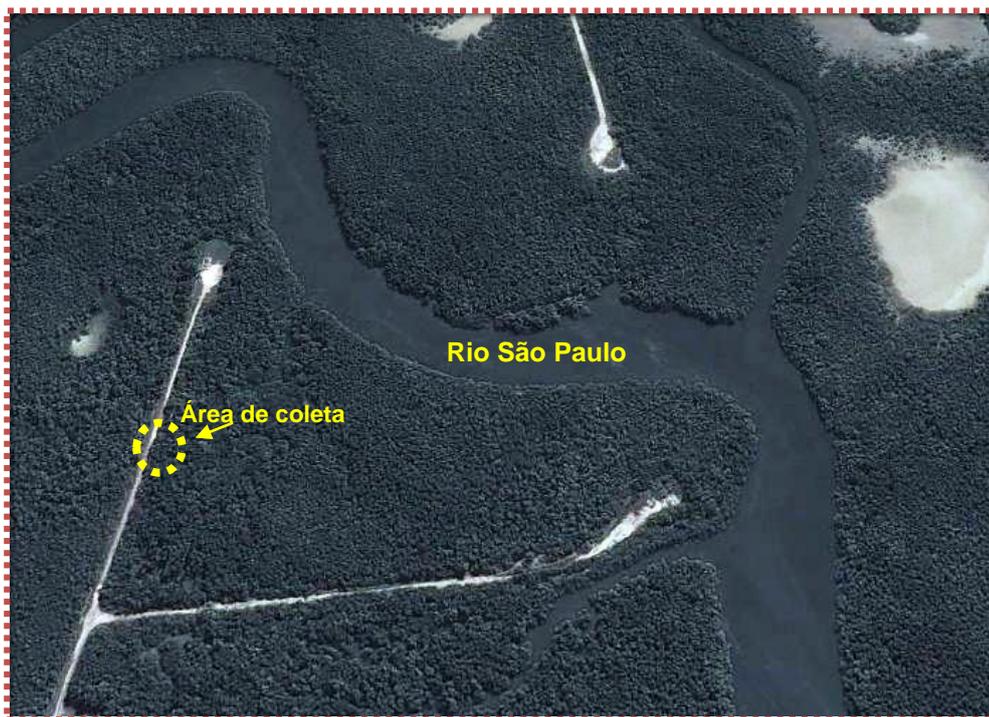
### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Testar a eficiência de consórcios fúngicos específicos imobilizados na degradação das frações do óleo.
- Avaliar a contribuição da fibra de coco para a bioestimulação da microbiota.
- Avaliar a ação da fibra de coco como agente absorvente das frações do óleo.
- Avaliar os processos biogeoquímicos nos experimentos em escala laboratorial.

## **2. ÁREA DE AMOSTRAGEM**

A área de amostragem é representativa do ecossistema manguezal e está localizado nas proximidades do rio São Paulo próximo estação Pedra Branca, nas coordenadas 12° 44' 26,0" (S) e 38° 31' 53,9(W)", o qual deságua na Baía de Todos os Santos (BTS) (Figura 1).

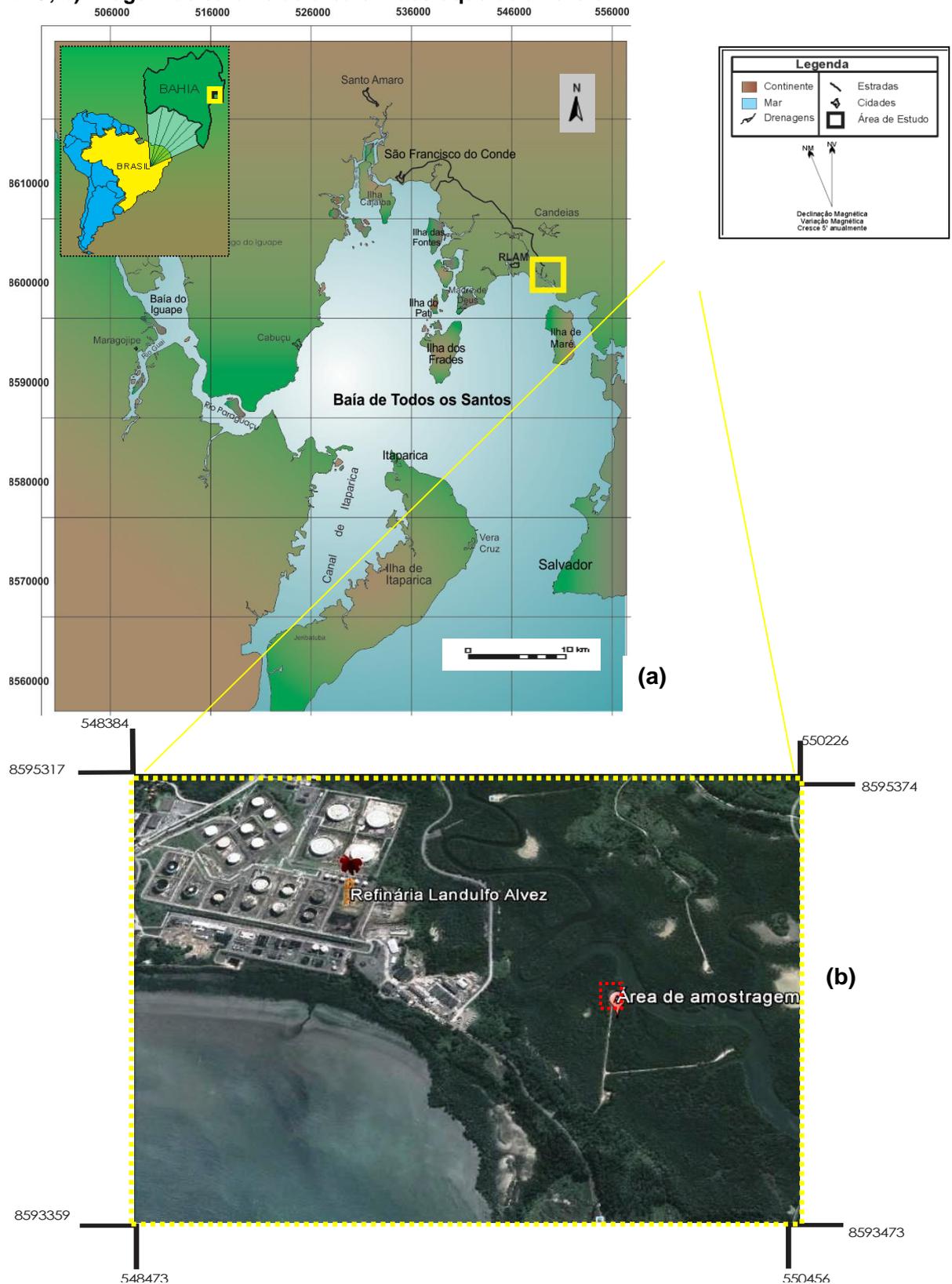
Figura 1 – Imagem de satélite do trecho do rio São Paulo (próximo a sua foz) localizado no município de São Francisco do Conde, Bahia e área de coleta



Fonte: LIMA, 2014.

A área fica compreendida nos limites dos municípios de Madre de Deus, Candeias e São Francisco do Conde. A principal via de acesso à região, a partir de Salvador, é através da BR-324, onde no entroncamento com a BA-522 se toma a direção para Candeia; em seguida segue-se na direção contínua nordeste da BA-522 pela vicinal. Chegando à Refinaria Landulpho Alves (RLAM). Ao acesso à esquerda segue-se até chegar à área de estudo que se encontra sinalizada por placa indicativa e está localizada mais especificamente nas proximidades da Estação de Produção da JO-BA (Petrobras) denominada “*Estação Pedra Branca*”, com uma área de aproximadamente 10 km<sup>2</sup> a NW de Salvador (Figura 2). A RLAM que está instalada na região desde a década de 1950, é responsável por diversas atividades ligadas à indústria petrolífera (campo de produção, refinaria, porto) (LIMA, 2014).

**Figura 2 - Mapa de situação e localização da área de estudo. a) Mapa de situação da BTS; b) imagem de satélite da área em destaque de amarelo**



Fonte: (a) Modificado da folha da Baía de Todos os Santos: SD-24-X-A-IV (BAHIA, 2004); (b) LIMA, 2014).

## 2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Origem e composição química do petróleo

O petróleo pode ser definido como uma mistura complexa de inúmeros compostos orgânicos, de ocorrência natural, com predominância quase absoluta de hidrocarbonetos e, em menor quantidade, de derivados orgânicos sulfurados, nitrogenados, oxigenados e organo-metálicos. (ZÍLIO; PINTO, 2002).

É resultante da deposição de matéria orgânica proveniente de diversos organismos marinhos e terrestres, plâncton, vegetação típica de regiões alagadiças, encontrado em poros e fraturas, em geral de rochas sedimentares, transformado pela ação lenta e constante de microrganismos, de calor e pressão, levando assim milhões de anos para se formar. Sua composição química varia de acordo com sua procedência (MELLO, 2007). É uma substância líquida de aspecto oleoso, inflamável, com cheiro característico e, geralmente, menos denso que a água e com variações de cor entre o negro e o castanho escuro (MELLO, 2006; SOLOMONS, 2005; CRUZ, 2012).

A formação do petróleo é diretamente influenciada pelas condições ambientais, incluindo características físico-químicas, biológicas e geológicas. É dada a partir de matéria orgânica submetida a condições específicas de pressões e temperaturas, desencadeando reações químicas complexas variadas. A transformação da matéria orgânica proveniente da superfície, podendo ser de origem marinha e/ou terrestre, em petróleo depende do gradiente geotermal das camadas sedimentares. Quanto mais profunda no sedimento, maiores serão as temperaturas e pressões sobre esta matéria orgânica, mais ligações químicas serão quebradas e maior será a qualidade do petróleo gerado. A qualidade do petróleo é medida pela sua densidade, quanto menos denso maior a qualidade. (ZÍLIO; PINTO, 2002; REIS et al., 2005; ACPO, 2006; ROCHA et al., 2010).

Os hidrocarbonetos são os principais constituintes do petróleo, fato confirmado através da alta proporção de carbono e hidrogênio existente, podendo ultrapassar de 90% de sua composição. A composição global do petróleo pode ser mais bem definida, dividindo-o em três classes de componentes:

- hidrocarbonetos saturados - compreende os alcanos de cadeia normal e ramificada (parafínicos) e os cicloalcanos (naftênicos), de fórmula geral  $C_nH_{2n+2}$ . Podem ocorrer em estado sólido, líquido ou gasoso, em função do número de átomos de carbono. A maior parte dos alcanos normais presentes no petróleo possui até 40 átomos de carbono. Os isoalcanos estão presentes principalmente com compostos de

até 10 átomos de carbono, embora ocorram com até 25 átomos. Os cicloalcanos podem apresentar até 6 anéis de carbono, cada qual com 5 ou 6 átomos de carbono.

- hidrocarbonetos aromáticos - incluem moléculas aromáticas puras, cicloalcano-aromáticos (naftenoaromáticos) e, usualmente, compostos cíclicos de enxofre. Apresentam cadeia fechada, sendo o mais simples o benzeno (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>). Ocorrem sempre no estado líquido.

- as resinas (piridinas, quinolinas, carbasóis, sulfóxidos e amidas) e os asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetonas, ésteres e porfirinas), que são componentes policíclicos, de alto peso molecular, compreendendo átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio (heteroátomos), também chamados de compostos NSO devido a frequência destes heteroátomos (GIORDANI, 1996; SALANITRO, 2001; ZÍLIO; PINTO, 2002; CARVALHO, 2008; LEMOS et al., 2008; KOLESNIKOVAS et al. 2009; CRUZ, 2012).

### **3.1 Biodegradação dos compostos do petróleo**

Grande parte dos componentes do petróleo, de 60% a 90% é biodegradável. Porém o restante, tanto em estado bruto quanto refinado é resistente, sendo esta parte, mesmo numa porção menor, responsável por impactos importantes, além de serem bioacumulados e biomagnificados na cadeia trófica. O fim desses compostos, após um derramamento irá depender de vários fatores, destacando-se a degradação microbiana. Hidrocarbonetos estão presentes de forma natural em toda a biosfera, o que pode explicar a capacidade de várias espécies microbianas utilizarem estes compostos como fonte de carbono e energia, degradando os compostos do petróleo. (CRAPEZ, 2002; WETLER, 2006; PEDROTI, 2007; SANTESTEVAN, 2008; KOLESNIKOVAS, 2009; TONINI et al, 2010).

A sensibilidade dos componentes do petróleo à biodegradação varia de acordo com o tamanho da molécula do hidrocarboneto e com a concentração do poluente. Em geral, quanto maior a quantidade de átomos de carbono do composto, maior a sua recalcitrância no ambiente, sua evaporação e solubilidades serão mais lentas. (CHOSSON et al., 1991; MARQUES JR., 2002). Os alcanos, por exemplo, que apresentam cadeias entre 10 e 26 carbonos são degradados depressa, enquanto os alcanos de cadeia curta são tóxicos a muitos microrganismos, mas usualmente são volatilizados rapidamente. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), com mais de quatro anéis aromáticos são mais resistentes à biodegradação, devido ao aumento da estabilidade química e hidrofobicidade da molécula proporcionada pela fusão dos anéis benzênicos. São também mais tóxicos que os compostos alifáticos

com o mesmo número de carbonos (CHOSSON et al., 1991; KANALY et al., 2000; TIBURTIUS et al., 2004; YU et al., 2005).

A biodegradação de compostos orgânicos por populações indígenas de microrganismos representa um dos mecanismos primários de eliminação de poluentes, pois estes tem capacidade de sobreviver, crescer e metabolizar em seu habitat e competir com outros membros da comunidade. A transformação do poluente em compostos simples, como CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O, se mostra como o principal ganho deste processo. A degradação do óleo é bem mais lenta no sedimento do que na água. Segundo Oliveira et al (2007), muitos microrganismos são capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo. Alguns são degradadores de alcanos, outros de aromáticos, e alguns conseguem metabolizar ambos. Além dos microrganismos degradadores, das características do local, da concentração e do tipo do contaminante, diversos fatores ambientais influenciam este processo melhorando a degradação do contaminante. Os mais importantes são a temperatura, disponibilidade de nutrientes, teor de umidade, pH e aeração (CURY, 2002; MORAIS, 2005; OLIVEIRA et al, 2007; PEDROTI, 2007; TONINI et al, 2010).

### **3.2 Fungos degradadores de hidrocarbonetos**

Os fungos são microrganismos heterotróficos, unicelulares ou pluricelulares que apresentam uma ampla distribuição na natureza, sendo encontrados na água, no ar, no solo, parasitando seres vivos. Utilizam uma variedade de substratos como fontes de carbono. Secretam enzimas no substrato onde se instalam e absorvem as moléculas resultantes da ação dessas enzimas, obtendo assim nutrientes para o seu desenvolvimento e disponibilizam os compostos resultantes para a ação de outros microrganismos, sendo parte importante dos ciclos do carbono, fósforo, nitrogênio e outros nutrientes (SILVA; COELHO, 2006). Essa produção de enzimas que o torna de importante interesse para a degradação de compostos orgânicos. Apesar de apresentar um crescimento mais lento, toleram inúmeras substâncias tóxicas e admitem situações de estresse ambiental, com grandes variações no pH, temperatura e quantidade de oxigênio. Apresentam ainda um modo de crescimento especial, induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono, o através do alongamento e ramificação das hifas, permitindo a colonização de áreas maiores e a otimização da biodegradação devida ao contato superficial com o contaminante (FARIA et al, 2012; PEREIRA; FREITAS, 2012).

Diversos estudos relatam à aplicação de fungos no processo de biodegradação de substâncias químicas recalcitrantes, baseados na capacidade desses organismos

em degradar diversas moléculas de poluentes orgânicos e outras substâncias tóxicas persistentes, como: DDT, dioxinas, hidrocarbonetos e pesticidas (CRAPEZ et al., 2002; TORTELLA et al., 2005; JACQUES et al., 2007; REZENDE, 2010; TONINI, 2010; SILVA, 2012).

Fungos de podridão-branca são os mais populares com a capacidade de degradar compostos orgânicos. Outros organismos como *Cunninghamella* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus niger* também possuem essa capacidade de degradação, principalmente, dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Acremonium*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Cladosporium* e *Gongronella*, isolados de ambientes contaminados ou não, são citados por serem capazes de degradar hidrocarbonetos do petróleo em taxas de degradação variando de 5 a 49% (MOLLEA, 2005; JACQUES et al 2007; LIMA et al 2011; PEREIRA; FREITAS, 2012; SILVA, 2012).

Segundo Chaineau et al. (1999) as maiores eficiências de degradação de compostos saturados e aromáticos as espécies *Beauveria alba* e *Penicillium simplicissimum*. A degradação de HPAs vem sendo estudada com o emprego do gênero *Penicillium*.

Ravelete e colaboradores (2000) identificaram várias espécies de fungos com capacidade para degradar pireno. As espécies isoladas pertenciam aos gêneros *Mucor*, *Gliocadium*, *Penicillium*, *Phialophora*, *Trichoderma*, *Scopulariopsis* e *Coniothyrium*.

Araújo et al. (2002), realizaram o isolamento e identificação de fungos filamentosos com capacidade de degradação do petróleo. A partir de um solo contaminado com petróleo foram obtidas 80 linhagens, das quais 60 apresentaram capacidade para degradar hidrocarbonetos de petróleo. Dentre estas, foram identificados quatro gêneros fúngicos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*.

Mollea et al. (2005), utilizaram linhagens fúngicas na otimização da biodegradação de HPAs. *Phanerochaete chrysosporium* foi responsável pela biodegradação.

Barbosa et al. (2009), utilizaram *Aspergillus niger* em um reator com o objetivo de tratar água contaminada por BTEX. Os autores concluíram que este microrganismo é capaz de remover benzeno e tolueno de água contaminada por hidrocarbonetos do petróleo.

### **3.3 Biorremediação**

A biorremediação é uma técnica que utiliza processos naturais para remediação de uma área impactada, acelerando a biodegradação natural de contaminantes como hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos perniciosos aos seres humanos, animais e plantas. É realizada por microrganismos, que utilizam os poluentes como fonte de carbono em seus processos metabólicos, reduzindo a concentração e/ou toxicidade desses compostos. Essa técnica tem sido atualmente atrativa devido à sua relação custo-eficácia, disponibilizando como benefício máximo a mineralização de poluentes em gás carbônico, água e formação de biomassa. (CUNHA, 1996; MOLINA-BARAHONA et al., 2004; NAKAGAWA; ANDRÉA, 2006).

A estrutura química dos contaminantes orgânicos tem grande influência na eficiência do metabolismo pelos microrganismos, sendo alguns compostos rapidamente biodegradados e outros persistentes no ambiente (MARIANO, 2007).

A presença dos microrganismos com capacidade metabólica, a disponibilidade do contaminante e as condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade da microbiota são as premissas básicas da biorremediação (MENEGHETTI, 2007; SANTOS, et al., 2007).

Comparada a técnicas tradicionais de remediação, a biorremediação se mostra como uma alternativa de menor custo, mínimo distúrbio ambiental, pode proporcionar a limpeza *in situ*, eliminando o transporte de resíduos perigosos, além de poder ser empregada em conjunto com outras tecnologias de tratamento (DECESARO, 2013). Tendo em vista as vantagens e desvantagens dos métodos de limpeza empregados nos manguezais, considera-se que a biorremediação constitui o melhor método de descontaminação de dessas áreas poluídos com petróleo, evitando-se ocasionar outros danos ao ambiente devido ao pisoteio do sedimento (COLLA et al., 2008; SILVA, 2011).

### **3.4 Bioaumento e bioestímulo**

As duas principais técnicas amplamente empregadas em processos de biorremediação de derramamentos de petróleo são bioaugmentação e bioestimulação. A bioaugmentação envolve a introdução de microrganismos que tem a capacidade de degradar um contaminante específico, possuem um alto nível de atividade enzimática e também a capacidade de competir com populações nativas do ambiente. Esses agentes microbianos não podem ser patogênicos e não devem produzir substâncias tóxicas no processo de biodegradação.

A bioaugmentação pode ocorrer através do isolamento e seleção de microrganismos de locais contaminados, pelo uso de cepas com habilidade previamente comprovada de degradação do composto tóxico ou pelo uso de microrganismos geneticamente modificados (TRINDADE, 2002; MOLINA-BARAHONA et al., 2004; SARKAR et al., 2005; JACQUES et. al, 2007; SANTOS et al., 2007; MARIANO et al., 2008; REGINATTO et al., 2011; DECESARO et al., 2013).

Já a bioestimulação é uma técnica que consiste na correção das condições ambientais, devido ao implemento nos níveis de nutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio e oxigênio) aumentando, simultaneamente, a população microbiana e a degradação nas áreas impactadas (TRINDADE, 2002; MOLINA-BARAHONA et al., 2004; SARKAR et al., 2005; JACQUES et. al, 2007; SANTOS et al., 2007; MARIANO et al., 2008; SILVA, 2012; DECESARO et al., 2013).

Os microrganismos podem ou não, inicialmente, ter como alvo os poluentes como fonte de alimento. Contudo, os compostos oleosos são degradados mais rapidamente do que no processo de degradação natural, devido à elevação da população de microrganismos (SARKAR et al., 2005; SILVA, 2012).

Essas técnicas tem o objetivo de aumentar as taxas de biodegradação e são as mais adotadas em tratamentos de recuperação de áreas impactadas (SARKAR et al., 2005; DECESARO et al., 2013).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 Trabalho de escritório**

O trabalho em escritório consistiu em levantamento bibliográfico de trabalhos publicados relacionados ao tema, dando embasamento ao desenvolvimento das atividades em campo e laboratoriais e na análise estatística dos dados obtidos em laboratório, utilizando os softwares Excel 2010, Statistica 7.0 e Tridraw 2.6.

#### **4.2 Trabalho de campo**

Os trabalhos de campo consistiram na coleta de sedimento e na montagem de três experimentos.

A coleta do sedimento utilizado foi realizada num local de deposição lamosa, na parte do manguezal mais próxima às zonas marginais, em locais geralmente inundáveis (Figura 3). As amostras foram coletadas com auxílio de um testemunhador, um tubo de aço inoxidável de 10 cm de diâmetro e capacidade para coletar

testemunhos de até 30 cm. As amostras foram homogeneizadas e acondicionadas em quentinhas de alumínio, transportadas e refrigeradas em freezer.

**Figura 3 - Coleta do sedimento na área de manguezal localizada nas margens do estuário do rio São Paulo. (a) área de coleta (b) testemunhos**



Os experimentos consistiram avaliação da capacidade de consórcios específicos em degradar as frações (saturados, aromáticos e NSO) do óleo da Bacia do Recôncavo em sedimentos.

Para a montagem dos experimentos, foram pesados em potes o sedimento e a fibra de coco (quantidades determinadas pelo código do teste). Estes foram tampados, embalados e descontaminados em autoclave a 121°C durante 50 minutos, para a eliminação da microbiota existente neste sedimento e aquela que ocasionalmente poderia estar presente na fibra de coco. Após a chegada dos potes a temperatura ambiente, em fluxo laminar, o sedimento foi homogeneizado. As cápsulas foram adicionadas em furos ou recobertas pelo sedimento e a suspensão de células adicionada de forma homogênea. Por fim, foi adicionado o óleo, simulando o derramamento. Os potes foram tampados, evitando o contato com a microbiota externa. O pH do sedimento obtido foi 7,29.

Foram realizados três experimentos, com 32 testes de biodegradabilidade cada (Figura 4), para estudar a degradação em cada fração independente, sendo eles Experimento 01 – Degradação de saturados, Experimento 02 – Degradação de aromáticos e Experimento 03 – Degradação de NSO.

Em cada experimento foram realizadas quatro coletas: tempos 0 (dia da montagem), 7, 15 e 30 dias.

O quadro 1 identifica de forma prática e sucinta a codificação empregada na identificação das amostras, determinando a composição de cada teste. A codificação foi repetida para cada tempo e para cada experimento.

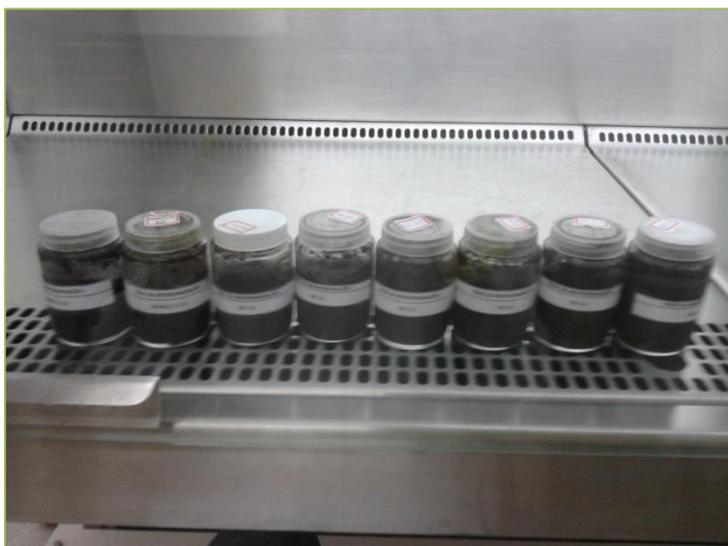
**Quadro 1 - Codificação empregada para identificação das amostras**

Experimento					
Teste	Sedimento (g)	Óleo da Bacia Recôncavo (g)	Suspensão de células (mL)	Fibra de coco (g)	Número de cápsulas
C1	100	-	-	-	-
C2	100	1,0	-	-	-
L1	100	1,0	0,2	1,0	-
L2	100	1,0	0,2	1,0	-
L3	100	1,0	0,2	1,0	-
E1	100	1,0	-	-	10
E2	100	1,0	-	-	30
E3	100	1,0	-	-	50

Cada experimento foi montado de acordo com o quadro, onde foram avaliados o efeito de nutrientes e células livres e nutrientes e células imobilizadas na biodegradação, variando as concentrações de da fibra de coco e a quantidade de cápsulas.

Após a montagem, os testes então foram encubados em incubadora a 30°C, exceto os testes correspondentes ao tempo 0 dias, os quais foram coletados assim que a montagem fora findada. A coleta consistiu em frear o desenvolvimento fúngico nos testes, o que pode ser proporcionado pela exposição dos mesmos a temperaturas baixas, para a qual foi utilizado o acondicionamento em geladeira, até as posteriores análises.

**Figura 4 - Testes de biodegradabilidade**



### **4.3 Trabalho de laboratório**

#### **4.3.1 Obtenção das colônias de fungos**

A obtenção das colônias de fungos foi realizada através do repique de colônias preexistentes conservadas. Esse processo tem como finalidade a renovação, reprodução e crescimento em placa das colônias fúngicas (Figura 5).

Em fluxo laminar previamente descontaminado, o meio BDA (batata-dextrose-água) foi vertido em placas de Petri estéreis. Após a secagem do meio, fragmentos das colônias antigas foram retirados, adicionados ao novo meio, na parte central da placa, e as placas foram lacradas. Após esse procedimento, as novas colônias foram encubadas a 30°C durante sete dias, proporcionando material para a posterior montagem dos consórcios.

**Figura 5 – Repique de colônias fúngicas. (a) retirada do fragmento fúngico (b) transferência do fragmento para uma placa com meio BDA**



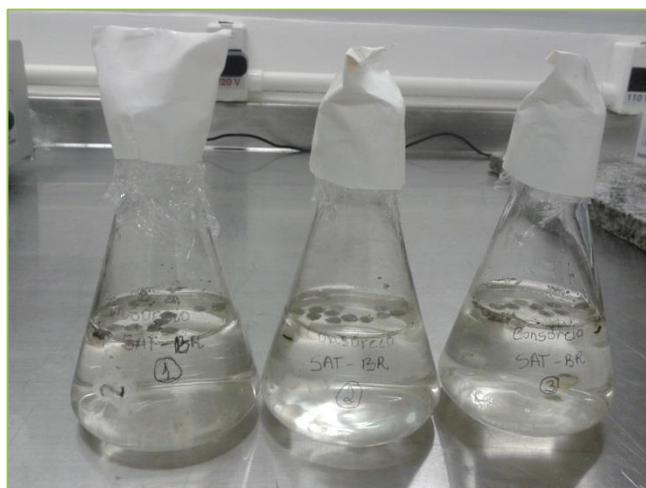
### 4.3.2 Montagem do consórcio – suspensão de células

O consórcio foi obtido a partir da suspensão de células de colônias nativas do sedimento da área de trabalho, previamente isolados, que consiste em uma solução rica em esporos dos fungos biodegradadores em água salina.

Foram utilizados 15 fungos para o consórcio de saturados (Figura 6), 6 fungos para o consórcio de aromáticos e 9 fungos para o consórcio de NSO, identificados com codificação própria, com diferentes capacidades de oxidação, variando de 50% a 100% de biodegradação, selecionados e originários do Laboratório de Microbiologia – LEPETRO – NEA do Instituto de Geociências e Laboratório de Biotecnologia e Química dos Microrganismos (LBQM) do Instituto de Química.

Em fluxo laminar descontaminado, a partir das colônias provenientes do repique mais recente, fragmentos de aproximadamente 0,6mm foram retirados de cada colônia com pipeta de Pasteur, previamente descontaminada, e adicionados a 100 ml de solução salina a 0,9% (g/ml). Posteriormente o crescimento foi promovido, através de agitação, de dois a três dias, em mesa agitadora a 200 RPM, ou através de encubação, de 5 a 7 dias. Cada consórcio foi montado em triplicata.

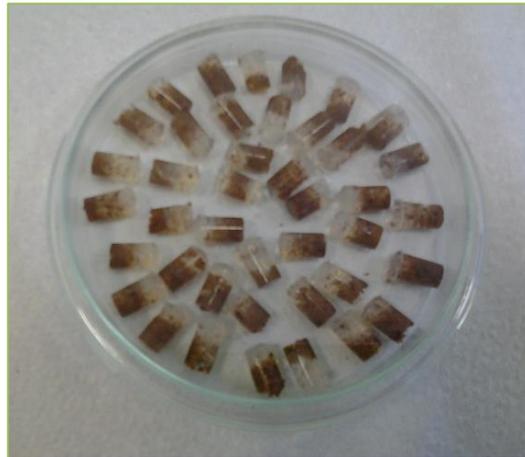
**Figura 6 – Suspensão de esporos compondo o consórcio de saturados - triplicata**



### 4.3.3 Montagem das cápsulas

As cápsulas foram produzidas segundo LIMA, 2014 (Figura 7).

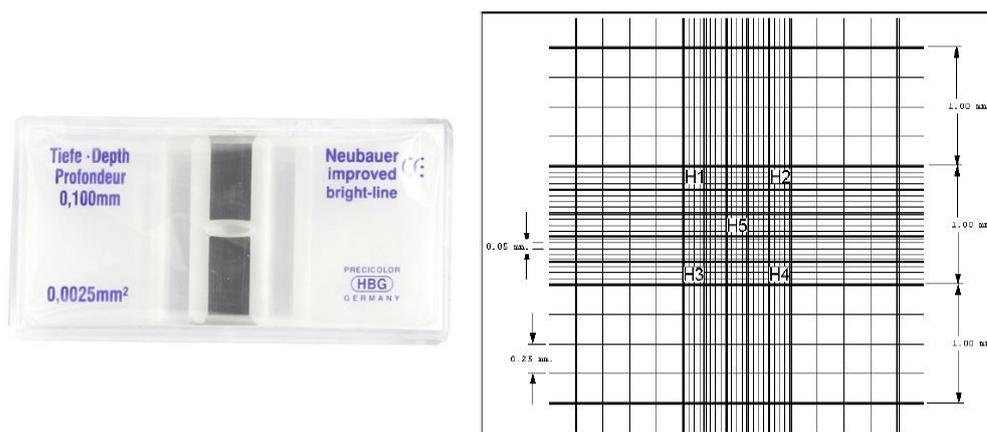
**Figura 7 – Cápsulas fúngicas a base de fibra de coco**



#### 4.3.4 Contagem de esporos

A contagem de esporos foi realizada para estimar a quantidade de esporos em cada mL do consórcio em suspensão. Para esta contagem, foi utilizada a câmara de Neubauer, a qual é dividida em quadrantes (Figura 8). A partir de 0,1 ml de cada suspensão, a contagem foi realizada. A suspensão foi disposta sobre a câmara e recoberta com uma lamínula. A contagem dos esporos foi realizada em cinco dos 25 quadrantes da câmara (1, 2, 3, 4 e central), em réplicas, respeitando os limites determinados pelas linhas no entorno de cada quadrante.

**Figura 8 - Câmara de Neubauer**



Fonte: Adaptado de EMBRAPA, 2012.

#### 4.3.5 Análise de bactérias

Esta análise foi feita como forma de controle de qualidade da esterilidade dos testes de biodegradabilidade. O método adotado foi o da microgota (ROMEIRO, 2007) (Figura 9a e b). Deve ser realizada em até 24h após a coleta, devido à validade das amostras.

No dia anterior a análise, é necessária a realização do Teste de Esterilidade do meio que será utilizado, para garantir que as bactérias que apresentarem crescimento na placa são provenientes exclusivamente dos testes de biodegradabilidade. A preparação do meio consiste na adição de 7,5g de ágar, 0,5g de glicose, 1,25g de extrato de leveduras e 2,5g de triptona em 500 ml de água destilada. Esterilizado em autoclave durante 20 min a 121°C. O meio foi vertido e as placas acondicionadas em incubadora. As placas podem ser utilizadas 24h após a realização deste procedimento.

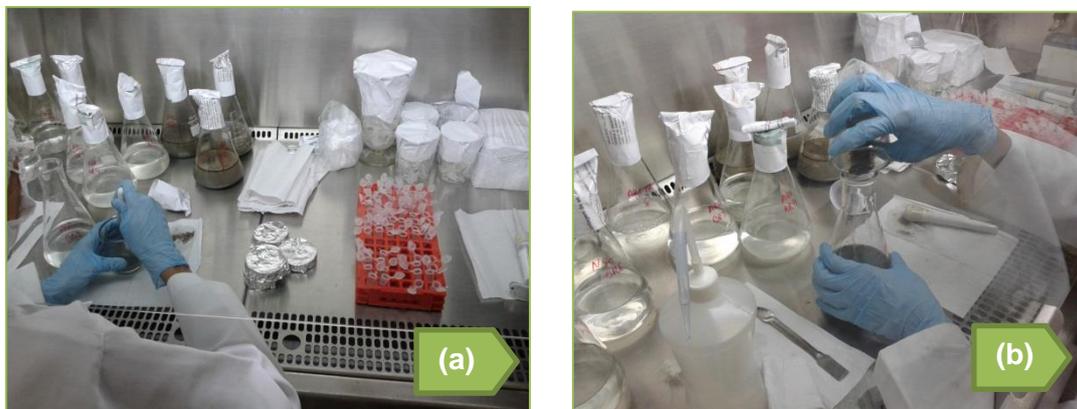
Em erlenmeyers de 500 ml foram pesados 2,25g de cloreto de sódio e adicionados 250 ml de água destilada e 0,750 ml de Tween 80 (Solução A). Foram feitas uma solução para cada amostra e mais uma, a qual foi utilizada para os eppendorfs. Em outro erlenmeyer foi feita a solução para lavagem do gral e pistilo, pesando 2,25g de cloreto de sódio e adicionando 250 ml de água destilada. As soluções foram embaladas, junto com os eppendorfs (8 por amostra), o gral, o pistilo e as placas e foram autoclavadas por 20 min a 121°C.

Após a chegada em temperatura ambiente, em fluxo laminar, foram adicionados 0,9 ml em cada eppendorf. Posteriormente, 25g de amostra foram adicionados ao gral, junto com certa quantidade de solução A e homogeneizada com o pistilo. A solução obtida foi adicionada ao erlenmeyer correspondente. O processo foi repetido até o completo acréscimo da amostra ao erlenmeyer.

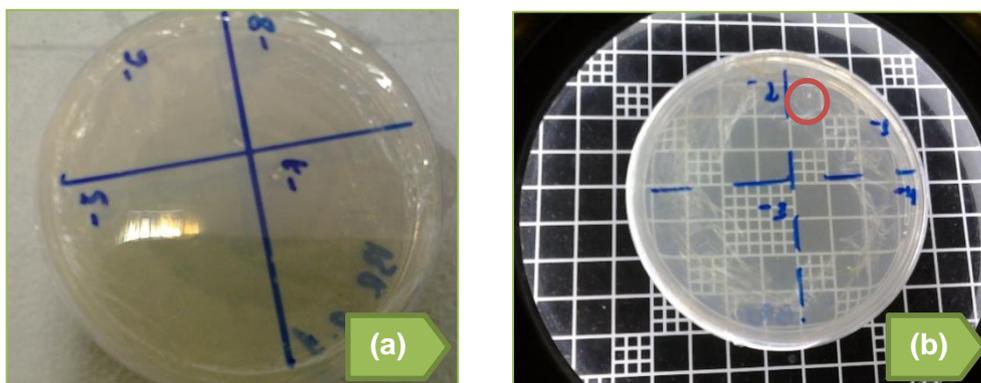
Para a realização das diluições sucessivas, foi coletada uma alíquota 0,1 ml da solução A com a amostra, adicionado no eppendorf correspondente à diluição -1 e homogeneizado. Em sequência, uma alíquota de 0,1 ml foi coletada do primeiro eppendorf e adicionada ao seguinte, assim seguindo até o eppendorf correspondente a diluição -8.

As placas foram divididas em quatro quadrantes, onde em cada um foi adicionado quatro microgotas das diluições correspondentes (Figura 10a). Foi aguardada a secagem com as placas entreabertas, as quais foram lacradas e acondicionadas em incubadora. A contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) se deu com 24h após a montagem das placas (Figura 10b).

**Figura 9 – Procedimento para análise de bactérias. (a) homogeneização da amostra e (b) transferência da amostra para solução A**



**Figura 10 – Quantificação de unidades formadoras de colônias de bactérias. (a) placa dividida em quadrantes numerados com as diluições (b) contagem das colônias após 24h (círculo vermelho destaca uma unidade formadora de colônia)**



#### **4.3.6 Análise de fungos**

A finalidade desta análise foi quantificar o crescimento fúngico em cada teste. Deve ser realizada em no máximo quatro dias após a coleta, devido à validade das amostras. A metodologia utilizada para esse procedimento foi a desenvolvida por GERBA; PEPPER, 2004.

Em um erlenmeyer de 1L, foram pesados 4,5g de cloreto de sódio e adicionados 500 ml de água destilada. Esta solução foi distribuída em 40 tubos de ensaio com tampas, sendo 9 ml em cada tubo. Em erlenmeyers de 125 ml, foram pesados 0,95g de cloreto de sódio e adicionados 95 ml de água destilada, sendo um

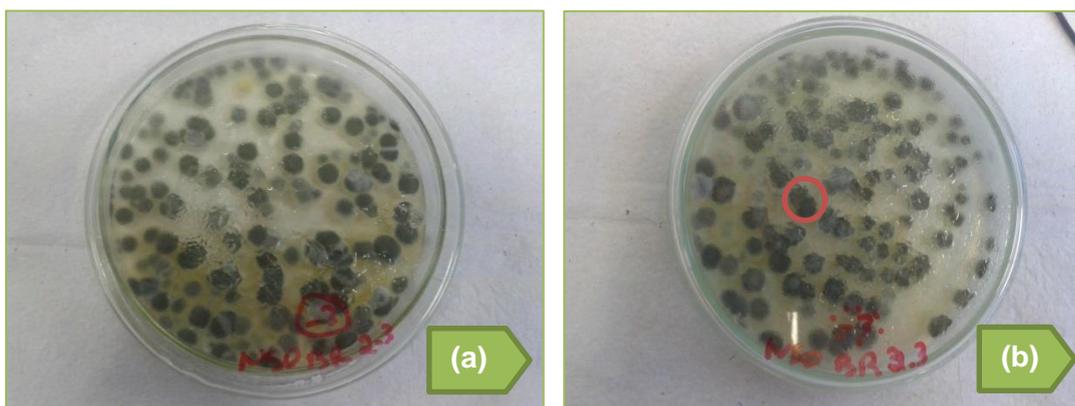
erlenmeyer por amostra. Os tubos, as soluções e 80 placas de Petri foram embalados e autoclavados a 121°C durante 20 min.

Após a chegada a temperatura ambiente, em fluxo laminar, 10g de amostra foram adicionadas ao erlenmeyer correspondente.

Para as diluições sucessivas, foram retiradas alíquotas de 1,0 ml do erlenmeyer e adicionada ao primeiro tubo (diluição -1). A mesma quantidade é retirada do primeiro tubo e adicionada ao segundo, assim sucessivamente até a diluição -5.

Para a montagem das placas, foi adicionado 1,0 ml das soluções de cada tubo e o meio BDA, homogeneizando a placa. Para cada diluição foram feitas réplicas. As placas foram lacradas e acondicionadas em incubadora. A contagem das UFC ocorreu no intervalo de 5 a 7 dias de incubação (Figura 11).

**Figura 11 – Quantificação de unidades formadoras de colônias de fungos. (a) placa com diluições (b) contagem das colônias após 24h (círculo vermelho destaca uma unidade formadora de colônia)**



#### **4.3.7 Desagregação das amostras**

Após as análises microbiológicas, as amostras foram congeladas em freezer e liofilizadas até a sua secagem completa. As amostras então, foram desagregadas utilizando gral e pistilo de porcelana e peneiradas em peneiras de malhas de 2 mm, para a retirada de galhos, raízes e outros materiais provenientes do sedimento que comprometessem as análises realizadas a posteriori.

#### **4.3.8 Determinação de Carbono orgânico**

Para a determinação de Carbono orgânico nas amostras, foi utilizado o método do dicromato de potássio, para amostras com alta concentração (WALKLEY, 1947): em um erlenmeyer de vidro de 500 ml, foram pesados 0,2 g de amostra. Em seguida

adicionou-se uma alíquota de 10 ml de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) a  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  e 20 ml da mistura de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) com o sulfato de prata ( $Ag_2SO_4$ )  $25 \text{ g L}^{-1}$ , sendo deixada em repouso por trinta minutos. Após este intervalo acrescentou-se 200 ml de água destilada, 10 ml de ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), 0,2 g de fluoreto de sódio (NaF) e 0,5 ml de indicador difenilamina. Após a digestão da amostra foi efetuada a titulação com solução de sulfato ferroso amoniacal hexahidratado ( $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ ) à  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  até o aparecimento de uma coloração verde brilhante (JESUS, 2011).

#### **4.3.9 Determinação de Fósforo inorgânico**

Para a determinação do Fósforo inorgânico em sedimento, 0,4 g de amostra foi pesada em um tubo de ensaio graduado de 50 ml. Com a utilização de uma pipetador automático, adicionou-se 10 ml de ácido clorídrico (HCl) à  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . A solução foi submetida à agitação em uma mesa agitadora por um período de 16 h. Em seguida, os tubos de ensaio foram centrifugados por 15 minutos a 3000 RPM. Uma alíquota de 0,1 ml do sobrenadante foi retirada sendo adicionados 10,9 ml de água deionizada, 0,8 ml de solução mista de molibdato e tartarato e 0,2 ml de ácido ascórbico a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Depois de homogeneizada, foi aguardado um intervalo de 10 minutos para a formação do complexo de coloração azul para a determinação do fósforo em espectrofotômetro de Absorção Atômica com Chama (FAAS) com absorbância em 880 nm. Em cada lote analisado foi realizado um branco onde só foram acrescentados os reagentes.

#### **4.3.10 Determinação de Nitrato e Amônio**

Os teores de Nitrato e Amônio nas amostras foram determinados pelo método de Kjeldahl, descrito pela Embrapa (2010). Este método compreende três etapas: a primeira consiste na extração do nitrato e do amônio. A segunda compreende o processo de destilação, feito por arraste de vapor, utilizando um destilador Kjeldahl. A última etapa corresponde à titulação do coletado na etapa anterior. A titulação é realizada utilizando uma solução padrão até a chegada ao ponto de viragem, onde a solução muda de cor.

Para o preparo da solução extratora a  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , 74,5 g de cloreto de potássio (KCl) foram dissolvidas em 1 L de água destilada.

Para o preparo da solução de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) a 2%, foram pesadas em um béquer de 2 L, 40 g de ácido bórico e adicionados 1,6 L de água destilada e agitar até a sua completa dissolução. Adicionar 200 ml de solução indicadora, preparada a partir da dissolução de 0,132g de verde-de-bromocresol e 0,066g de vermelho-de-

metila em 1 L de etanol a 95%. A solução foi transferida para um balão volumétrico e avolumado com etanol a 95% até o volume de 2 L.

Em erlenmeyers de 125 ml foram pesadas 10 g da amostra e adicionados 100 ml de solução de KCl. Estes foram submetidos à agitação em mesa a 259 RPM durante uma hora e posterior repouso por mais uma hora. Após o repouso, foram tomadas duas alíquotas do sobrenadante de 30 ml de cada erlenmeyer e adicionadas a dois tubos de ensaio: um contendo 0,2 g de óxido de magnésio (MgO) para determinação de amônio e outro contendo 0,2 g de liga de devarda, para a determinação de nitrato.

O tubo direcionado a análise de amônio foi agitado e acoplado no destilador Kjeldahl, onde o arrasto de vapores se deu. O condensado foi coletado em erlenmeyer de 125 ml, contendo 5 ml de solução indicadora de ácido bórico a 2%. A destilação ocorre durante 3 min, tempo necessário para que o volume atinja 50 ml.

O tubo para a determinação de nitrato também foi agitado e submetido a destilação por 3 min, onde o seu destilado foi coletado num novo erlenmeyer contendo 5 ml de ácido bórico a 2%. Os condensados, tanto de nitrato quanto de amônio foram titulados posteriormente com uma solução de ácido sulfúrico a  $0,005 \text{ mol L}^{-1}$  até atingirem a coloração azulada, que indica o ponto final da titulação.

#### **4.3.11 Extrações**

Para obtenção dos extratos orgânicos foram realizadas extrações em Soxhlet (Figura 12), onde foram pesadas 5,0 g das amostras dos tempos 0 e 30 de cada experimento em cartuchos feitos com filtros de papel para análise qualitativa. Cada cartucho foi confeccionado utilizando dois filtros, envolvendo bem o sedimento para que não houvesse perdas. Os cartuchos foram acomodados dentro de extratores Soxhlet, acoplados a balões de fundo redondo contendo 90 ml de diclorometano e um fio de cobre, para retenção de possíveis sais de enxofre presente na amostra. As extrações ocorreram até a completa retirada do óleo presente nas amostras, sendo constatada pela aparência transparente do solvente com o decorrer do tempo. Os balões foram pesados antes do procedimento e após a secagem de todo o solvente presente, para a quantificação da massa de extrato final produzida.

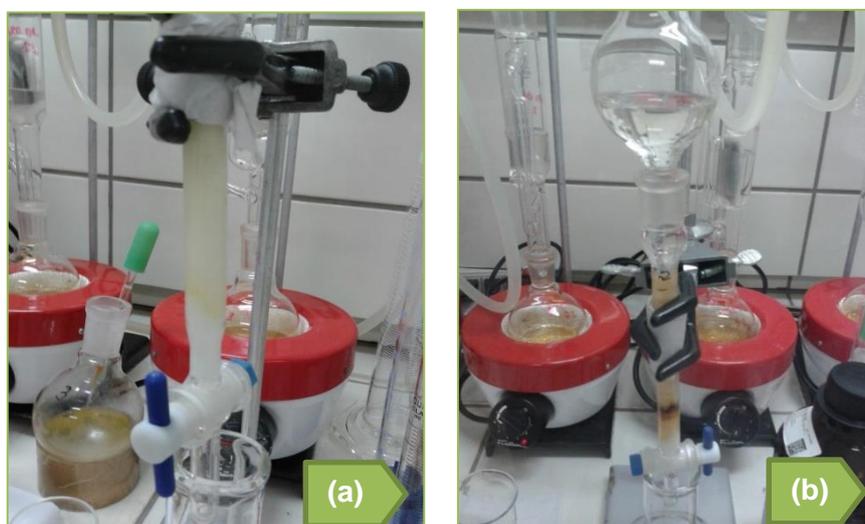
**Figura 12 – Extração em Soxhlet. (a) solvente rico em extrato e (b) solvente transparente após extração**



#### 4.3.12 Cromatografia líquida

A cromatografia foi realizada através do método clássico SAR. O extrato resultante das extrações foi transferido utilizando pipetas de Pasteur para colunas para cromatografia líquida preenchidas com 12 cm de sílica ativada durante duas horas a 300°C. Para a eluição da primeira fração do óleo (saturados) foram utilizados 25 ml de n-hexano. Para a eluição da segunda fração (aromáticos) foram utilizados 30 ml da mistura de n-hexano e diclorometano, na proporção 4:1. Para a eluição da última fração (NSO) foram utilizados 40 ml da mistura de diclorometano e metanol, na proporção de 4:1. As frações foram coletadas em vials de 50 ml previamente pesados. Após a evaporação completa dos solventes, houve uma nova pesagem, para a determinação das massas das frações produzidas através da cromatografia (Figura 13).

**Figura 13 – Cromatografia Líquida. (a) eluição da fração de aromáticos e (b) eluição da fração de NSO**



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Contagem de Esporos

A contagem de esporos foi feita com a finalidade de estimar a quantidade de esporos/ml contidos em cada consórcio. Apesar do consórcio de aromáticos ter sido formado com uma menor quantidade de fungos, foi o que mais teve presença de esporos em sua constituição.

O consórcio de aromáticos, apesar de ter uma menor quantidade de espécimes de fungos utilizados na sua constituição (6 fungos), foi o que apresentou a maior quantidade de esporos em suspensão. Em contrapartida o consórcio que apresentou a menor quantidade de esporos foi o de saturados, o que empregou a maior quantidade de fungos em seu preparo (15 fungos). Não foi possível estabelecer relação entre a quantidade de fungos empregada nos consórcios e a quantidade média de esporos. Segundo Lima (2014), não há relação entre a quantidade de esporos e a eficiência de degradação.

**Quadro 2 - Quantidade média de esporos encontrados após contagem e quantidade de esporos/ml para cada consórcio utilizado nos experimentos**

Consórcio	QM de esporos na câmara	Esporos/ml
Saturados	3,7	9,5
Aromáticos	11,4	28,5
NSO	5,6	14,1

### 5.2 Experimento 01 (Degradação de Saturados)

O experimento 01 – Degradação de saturados – consistiu na montagem de 32 testes de biodegradabilidade empregando o consórcio de saturados, de forma livre (L1, L2 e L3), variando o peso da fibra de coco, e de forma encapsulada (E1, E2 e E3), variando a quantidade de cápsulas. Foram feitos também controles, um apenas com o sedimento (C1) e outro com o sedimento e o óleo (C2).

## 5.2.1 Monitoramento microbiológico

### Quantificação de bactérias e fungos

No gráfico da figura 14 foi representada a quantidade de UFC de fungos em cada teste de biodegradabilidade, para o experimento de degradação de saturados (experimento 01).

No tempo 0 (montagem), a quantidade de UFC fúngicas manteve-se próxima a zero em todos os tratamentos.

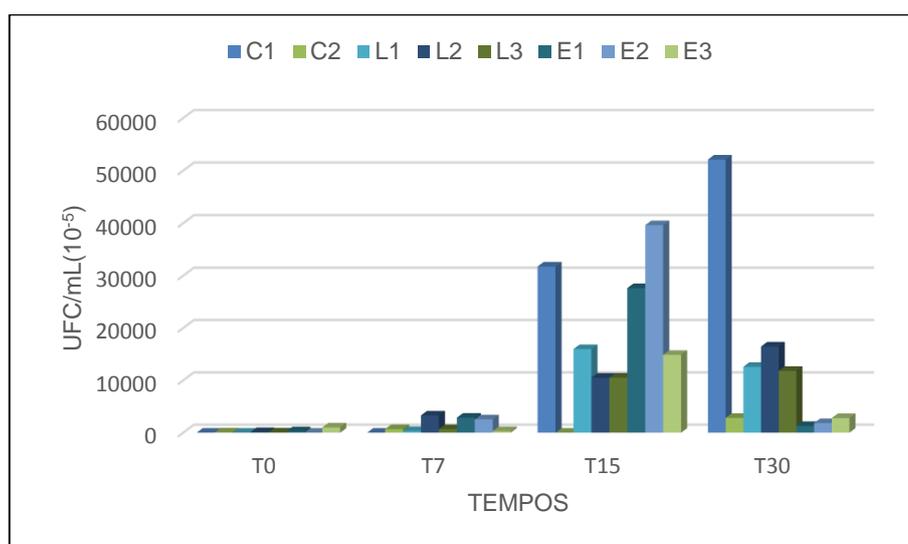
No tempo 7 dias, já é notado um crescimento inicial das colônias, mais acentuado nos tratamentos L2, E1 e E2.

Nos tratamentos do tempo 15 dias, há um marcado crescimento fúngico em todos os tratamentos, se mostrando com maior intensidade nos testes C1, E1 e E2.

No tempo 30 dias, nos controles houve presença de colônias, sendo um número maior no teste C1. Nos testes L1, E1, E2 e E3 houve uma queda evidente no número de UFC, enquanto nos testes L2 e L3 houve um pequeno aumento na quantidade de UFC.

Observando o gráfico de maneira geral é possível inferir que nos primeiros dias há um crescimento mais lento, sendo que no tempo 15 dias há um pico no crescimento e no tempo 30 dias um declínio deste.

**Figura 14 - Gráfico para número de células viáveis (UFC). UFC de fungos no experimento 01 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias**



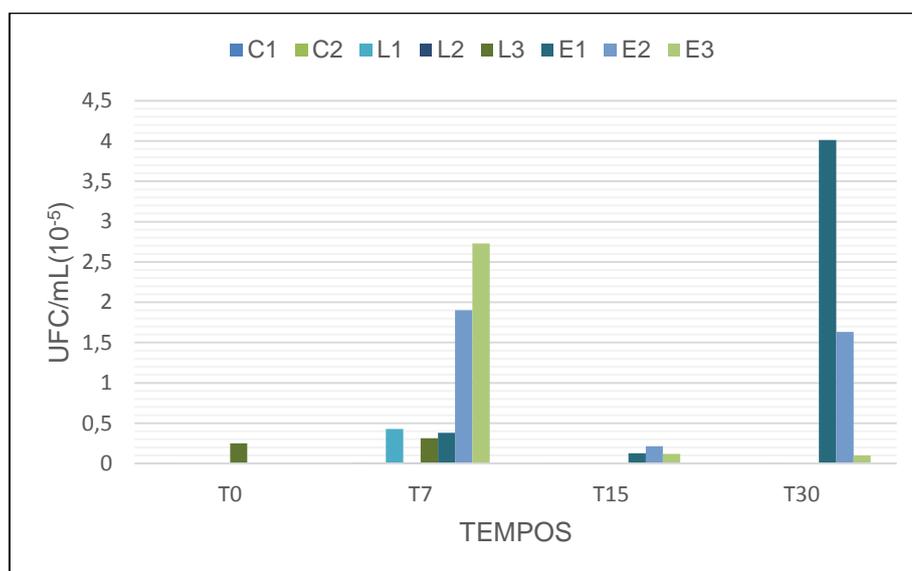
Na figura 15 está representada a quantidade de UFC bacterianas em cada teste. No tempo 0 (montagem), o crescimento de células só foi constatado em dois dos oito testes, sendo que no teste L3 foi de 0,25 UFC/ml.

No tempo 7 dias, houve um pequeno crescimento em todos os testes, variando de 0,00083 UFC/ml, no teste C2, a 2,73 UFC/ml, no teste E3.

No tempo 15 foi observada a queda brusca na quantidade de UFC, comparada a coleta anterior. Houve o crescimento em quatro testes, variando de 0,00125 (C1) a 0,21542 (E2) UFC/ml.

No tempo 30 dias também foi constatado o crescimento em quatro dos oito testes. Este apresentou uma variação maior, de 0,0025 em L1 a 4,01375 em E1 UFC/ml.

**Figura 15 - Gráfico para número de células viáveis (UFC). UFC de bactérias no experimento 01 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias**



Segundo Meira (2009), o crescimento fúngico apresenta quatro fases distintas de crescimento: fase de aclimação, fase exponencial, fase estacionária e fase de declínio (Figura 16).

A fase de aclimação, ou fase “lag”, é um período de adaptação enzimática, onde há produção de proteínas estruturais e enzimas, com aumento na síntese de DNA. Nesse período ocorre intensa atividade metabólica a fim de dar início à metabolização do substrato. Com o aumento da atividade celular e o investimento de energia nesta incubência, não ocorre o aumento significativo do número de microrganismos. O tempo de duração é variável, desta forma, quanto mais aclimatado

estiver o microrganismo, às condições de cultivo, menor será o tempo de duração desta fase (TORTORA et. al., 2000; MARTINS, 2004; MEIRA, 2009).

A fase exponencial ou fase “log” é caracterizada pela velocidade máxima do crescimento. É a fase de maior viabilidade e atividade metabólica das células. A divisão ocorre numa taxa logarítmica constante (TORTORA et. al., 2000; MEIRA, 2009).

A fase estacionária é o período onde a velocidade de crescimento passa a diminuir, chegando a ser nula, onde há o equilíbrio entre as taxas de reprodução e de mortalidade. Posteriormente, há a diminuição do número de microrganismos, devido ao esgotamento dos substratos, acúmulo de substâncias tóxicas e/ou falta de nutrientes essenciais. Esta é a fase de declínio (TORTORA et. al., 2000; MARTINS, 2004; MEIRA, 2009).

**Figura 16 – Gráfico de crescimento fúngico padrão**



Oliveira (2008) realizou ensaios para biorremediação de solo contaminado por petróleo utilizando atenuação natural, com o objetivo de determinar o melhor período para a realização de bioaumento. Determinou que este seria quando a microbiota nativa fúngica fosse predominante em números. Foi constatado um crescimento desta microbiota obedecendo às fases de crescimento dos microrganismos. Bisognin (2012) também corroborou os resultados de crescimento microbiano dentro do padrão para UFC fúngicas e bacterianas em seus ensaios.

No experimento de degradação de saturados foi possível observar essas fases com clareza, onde no tempo 7 dias o crescimento foi restrito, justificável pela preparação e adaptação das células para a disponibilização do novo substrato, o que eventualmente seria referente ao período “lag” desses microrganismos. No tempo 15 dias possivelmente pode ser caracterizada a fase “log”, com o crescimento da

quantidade de UFC em todos os testes. Já no tempo 30 dias houve um decréscimo do número de colônias, caracterizando possivelmente a fase de declínio dos microrganismos.

A contagem das UFC bacterianas foi feita com o interesse de parâmetro de qualidade. Quanto menor a quantidade de bactérias nos testes, maior a confiabilidade de que a biodegradação ocorrida foi responsabilidade apenas dos consórcios. Além de não competirem com os fungos por espaço e nutrientes, o seu número reduzido no tempo 0 dias indica a eficiência da esterilização utilizada antes da montagem dos experimentos.

Foi observado que o crescimento microbiano foi maior nos testes onde foi empregado o encapsulamento, justificável pela quantidade do consórcio empregada nestes ser maior que a utilizada nos testes com as células livres, apesar das células estarem encapsuladas. Porém, no teste E3, que apresenta maior quantidade de cápsulas, foi observado um crescimento menor, podendo ser atribuído à competição entre os espécimes empregados na constituição das cápsulas, já que apresentam um número maior (MEYER, 2011; SILVA, 2011).

Observando os controles, foi possível constatar um crescimento pequeno de UFC fúngicas, apesar de não haver acréscimo de consórcio. Este crescimento é atribuído à resistência de esporos liberados por algumas espécies fúngicas, necessitando maiores temperaturas para que estes sejam desativados.

Foi possível observar também que, apesar do reduzido número de colônias desenvolvidas, as bactérias apresentaram um pequeno crescimento durante o tempo 7 e o tempo 30 dias, coincidindo com as fases “lag” e de declínio, onde foram favorecidas devido a baixa competição por espaço e por nutrientes. Isso pode ser confirmado através da observação dos testes do tempo 15, onde houve a brusca queda na quantidade de UFC bacterianas. O crescimento bacteriano se mostrou presente nos testes devido à resiliência de algumas espécies, provavelmente provenientes do sedimento, que necessitam de uma maior temperatura de esterilização.

A disponibilidade do substrato e a complexidade de suas moléculas podem facilitar ou dificultar a biodegradação. A fração de saturados é composta, em sua maior parte, por cadeias carbônicas menores e abertas, sendo mais fáceis de degradar (CHAIENAU et al.1999). O fato dos microrganismos completarem as fases do seu crescimento, neste caso, é devido a esta disponibilidade facilitada, favorecendo o cumprimento de todo o ciclo.

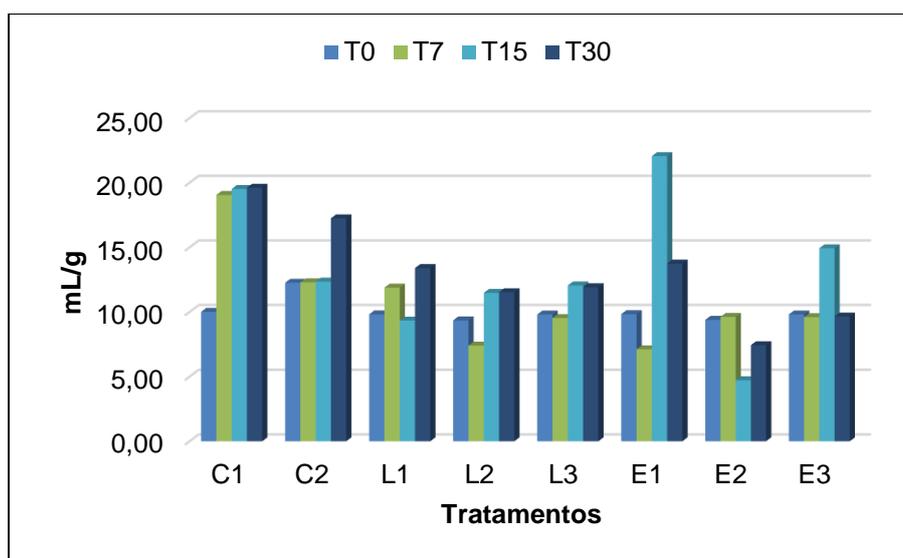
## 5.2.2 Monitoramento químico

A figura 17 representa os teores de fósforo obtidos no experimento 01. Em C1, C2, L2 e L3 houve um notável aumento nos valores de fósforo ao longo do tempo. Em L1, E1 e E3, do tempo 0 para o tempo 7 dias houve um aumento com sequente diminuição no tempo 15 dias e um novo acréscimo, superando o primeiro no tempo 30 dias.

Em E2 houve um leve aumento entre os tempos 0 e 7 dias, um decréscimo no tempo 15 dias e um novo aumento, este acentuado, no tempo 30 dias.

De forma geral, os valores de fósforo aumentaram ao longo do tempo, excetuando os testes E1 e E3.

**Figura 17- Gráfico com variação dos teores de fósforo no experimento 01 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias**



O gráfico da figura 18 representa a variação dos teores de carbono orgânico no experimento 01. Em C1 houve um aumento seguido por uma queda brusca e um realçado aumento.

C2 e E2 apresentaram um alto valor de carbono (próximo a 12%) no tempo 0 dias. No tempo 7 houve uma queda, no tempo 15 houve um aumento seguido de um novo decréscimo no tempo 30 dias.

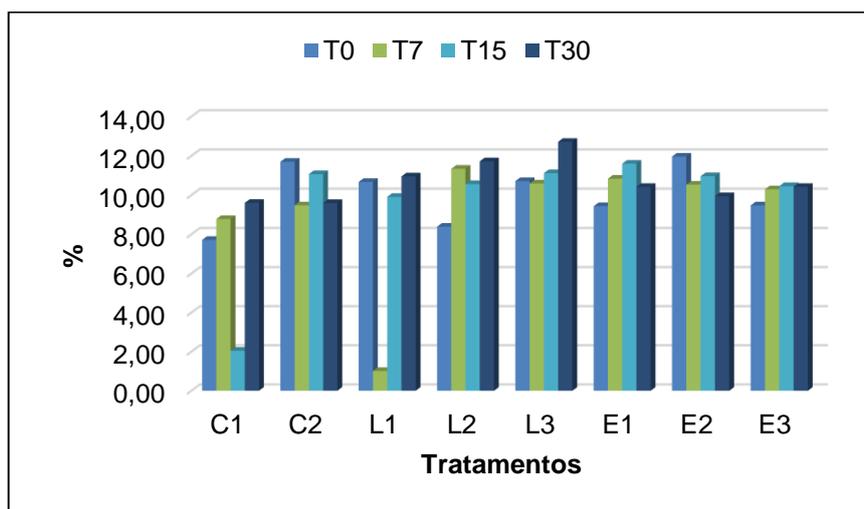
Em L1 e L3 entre os tempos 0 e 7 dias houve uma queda e sequente aumento nos outros períodos.

Em L2, houve aumento até o tempo 7 dias, uma pequena queda no tempo 15 dias e um novo crescimento no tempo 30 dias.

Nos testes E1 e E3, houve um progressivo aumento até o tempo 15 dias, sendo notada uma queda no tempo 30 dias, sendo em E3 bastante suave.

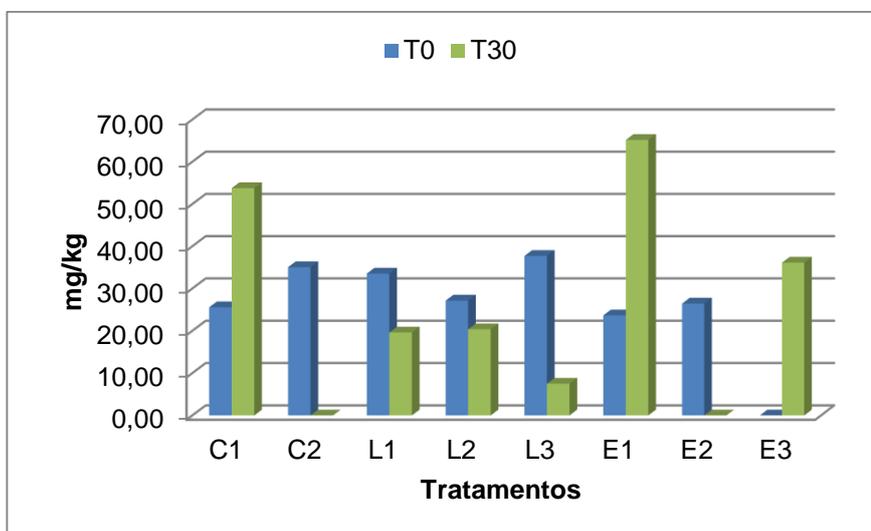
De forma geral, os teores de carbono orgânico aumentaram ao longo do tempo nos testes.

**Figura 18 - Gráfico com variação dos teores de carbono orgânico (%) no experimento 01 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias**



Os valores de nitrato encontrados no experimento 1 estão representados no gráfico da figura 19. Nos testes C2 e E2 do tempo 30 dias e no E3 do tempo 0 dias não foi possível a realização da análise, devido a problemas com a quantidade de amostra disponível. Em C1 e E1 é possível observar um grande aumento na quantidade de nitrato. Já em L1, L2 e L3 há uma queda considerável.

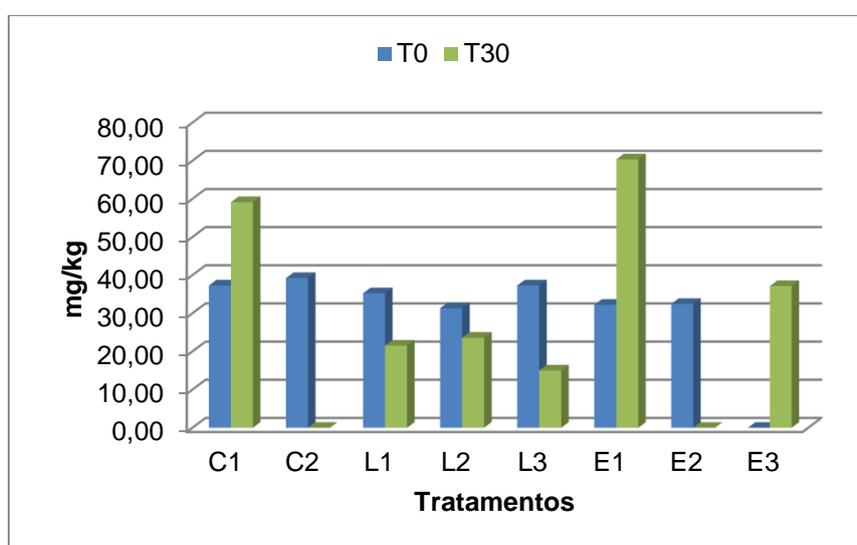
**Figura 19 - Gráfico com variação dos teores de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) no experimento 01 nos tempos 0 e 30 dias**



Na figura 20 onde estão representados os teores de amônio encontrados no experimento 01, foi possível observar um grande aumento na quantidade de nitrato ao longo do tempo em C1 e E1. Já em L1, L2 e L3 há uma queda considerável.

Nos testes C2 e E2 do tempo 30 dias e no E3 do tempo 0 dias também não foi possível a realização da determinação, devido a problemas com a massa de amostra disponível para a análise.

**Figura 20 - Gráfico com variação dos teores de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) no experimento 01 nos tempos 0 e 30 dias**



Em sedimento de manguezal, a quantidade de carbono orgânico é alta, fósforo e nitrogênio são muito variáveis e as formas nitrogenadas nitrato e amônio apresentam comportamentos semelhantes (CURY, 2002). O comportamento dos nutrientes ao longo do experimento 01 de maneira geral sofreu uma queda nos tempos iniciais e uma retomada de crescimento no tempo 30 dias.

Segundo Vallejo et al. (2005) os valores de fósforo ao longo do experimento são diminuídos pelo fato da microbiota consumir no início da biodegradação. Nos tempos 0 e 7 dias, período “lag” identificado neste experimento, a microbiota presente passou pelo período de adaptação, onde há o investimento das células em crescimento e produção de enzimas. Nesta fase houve um grande consumo de nutrientes essenciais, como fósforo e nitrogênio, já que estes são constituintes importantes das células.

Os íons nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) são as principais formas utilizadas pelos produtores primários, apresentam-se em equilíbrio dinâmico e suas concentrações são governadas pelos aportes de nitrogênio na bacia e por processos biológicos, bem

como reações de oxidação e redução realizadas pelos microrganismos (PETERSON et al, 2001).

No tempo 30 dias, houve aumento nas quantidades dos nutrientes carbono e fósforo independente dos testes utilizarem o encapsulamento ou não, devido a redistribuição destes para o ambiente, coincidindo com a fase de declínio da população presente nos microcosmos. As formas nitrogenadas, de maneira geral, apresentaram queda, indicando o consumo preferencial do fósforo, seguido do consumo do nitrato e do amônio, ainda em andamento no tempo 30 dias.

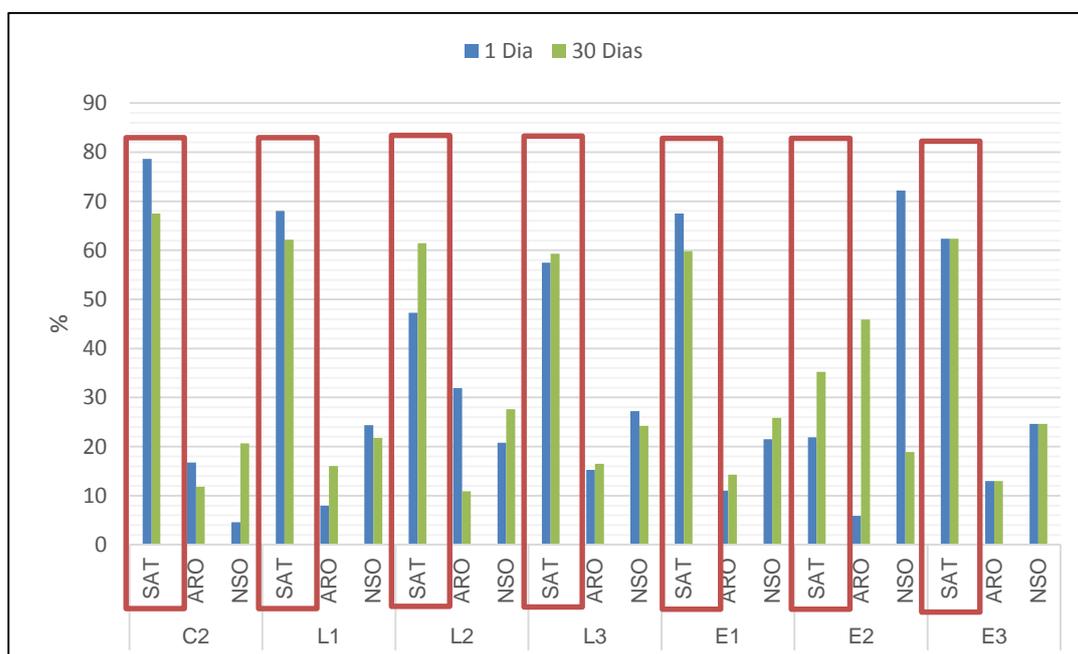
As variações das quantidades de fibra de coco não demonstraram influencia sobre a quantidade de nutrientes, apresentando um comportamento bastante semelhante entre os testes.

### 5.2.3 Monitoramento geoquímico

A figura 21 representa o nível de degradação dos compostos saturados no experimento 01. O teste C1 apresentou queda na quantidade de todos os compostos. C2 apresentou queda nos saturados e aromáticos e aumento na fração NSO.

Os testes L1 e E2 apresentaram queda nas frações de saturados e NSO. Houve um aumento na fração aromática. Em L2 houve aumento nos saturados e nos NSO, enquanto os aromáticos apresentaram queda. Em L3 houve acréscimo em todas as frações. Em E1 e E2 houve queda nos saturados e aumento nos aromáticos e NSO.

**Figura 21 - Gráfico de degradação dos compostos do experimento 01 nos tempos 0 e 30 dias**



Houve queda na quantidade da fração de saturados em seis dos oito testes do experimento 01. Houve um aumento na quantidade de saturados nos testes L2 e L3, podendo ser justificado pelo fato de ter ocorrido degradação das demais frações, sendo que alguns fungos presentes no consórcio de saturados também apresentam capacidade de degradação dos demais componentes do petróleo.

A degradação se mostrou mais eficiente nos testes que foram empregados os consórcios encapsulados, devido a maior quantidade de consórcio empregado nestes testes, variando de 1 ml (10 cápsulas) a 5 ml (50 cápsulas).

A degradação não pôde ser relacionada com a quantidade de fibra de coco, devido à falta de estabelecimento de um padrão.

A biodegradação dos compostos do petróleo apresenta uma ordem preferencial, sendo os saturados os degradados preferencialmente (CHAINEAU et al. 1999).

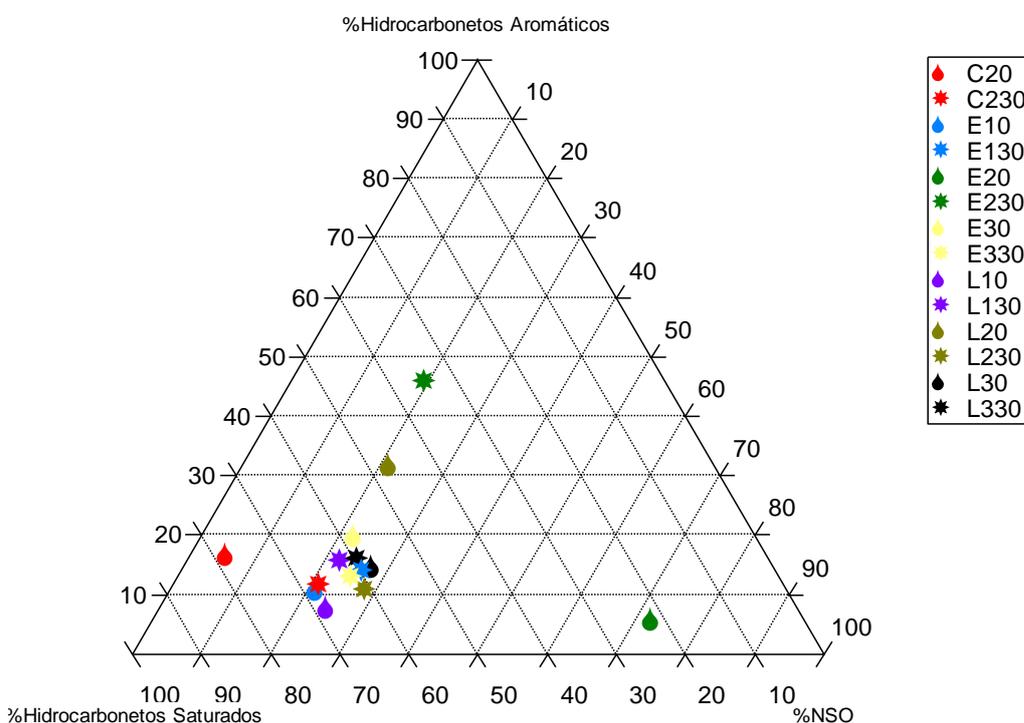
Para reforçar os dados geoquímicos, foi gerado também um diagrama ternário (Figura 22), explicitando mais claramente a degradação. Os pontos marcados no diagrama pelo símbolo da gota indica o óleo utilizado no tempo 0 dias, enquanto os pontos marcados por uma estrela indica o óleo resultante após 30 dias do experimento.

Em C2, L1, E1 e E3 foi observada degradação, onde houve deslocamento dos pontos do tempo 30 dias em relação aos pontos do tempo 0 dias e em direção a fração NSO.

Já em L2 e L3 não foi observada degradação.

Em E2, há uma discrepância do dado, pois o óleo da Bacia do Recôncavo, caracterizado como leve, foi classificado como degradado, apresentando uma maior teor da fração de NSO no tempo 0. Há discordância também no tempo 30 deste teste, onde o ponto representante foi deslocado em direção à fração de aromáticos (MILHOMEM et al, 2003).

**Figura 22 - Diagrama ternário das frações de saturados, aromáticos e NSO do experimento 01 nos tempos 0 e 30 dias**



### 5.3 Experimento 02 (Degradação de Aromáticos)

O experimento 02 – Degradação de aromáticos – consistiu na montagem de 32 testes de biodegradabilidade empregando o consórcio de aromáticos, de forma livre (L1, L2 e L3), variando o peso da fibra de coco, e de forma encapsulada (E1, E2 e E3), variando a quantidade de cápsulas. Foram feitos também controles, um apenas com o sedimento (C1) e outro com o sedimento e o óleo (C2).

#### 5.3.1 Monitoramento microbiológico

##### *Quantificação de bactérias e fungos*

No gráfico da figura 23 foi representada a quantidade de UFC de fungos em cada teste de biodegradabilidade, para o experimento de degradação de aromáticos (experimento 02).

No tempo 0 (montagem), a quantidade de UFC fúngicas manteve-se próxima a zero em todos os tratamentos, onde apenas em quatro testes houve o crescimento de colônias.

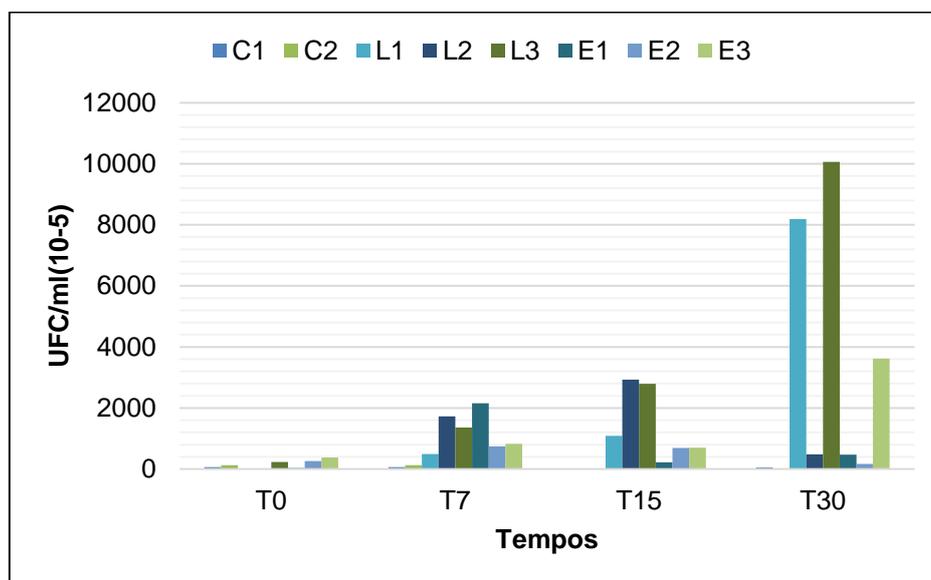
No tempo 7 dias, já é notado um crescimento inicial das colônias, mais acentuado nos tratamentos L2, L3 e E1.

Nos tratamentos do tempo 15 dias, há um crescimento fúngico em relação a coleta anterior, mas ainda se mostrando brando. Destaque para o crescimento em L1, L2 e L3. Não houve crescimento fúngico nos controles.

No tempo 30 dias, os testes L1, L3 e E3 apresentaram crescimento bem maior do que nas coletas anteriores. Já L2, E1 e E2 sofreram uma queda importante na quantidade de UFC. Não houve crescimento fúngico nos controles.

Em linhas gerais, L1, L3 e E3 apresentaram crescimento contínuo ao longo do experimento, enquanto L2, E1 e E2 apresentaram um crescimento até 15 dias e uma queda no tempo 30 dias.

**Figura 23 - Gráfico para número de células viáveis (UFC). UFC de fungos no experimento 02 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias**

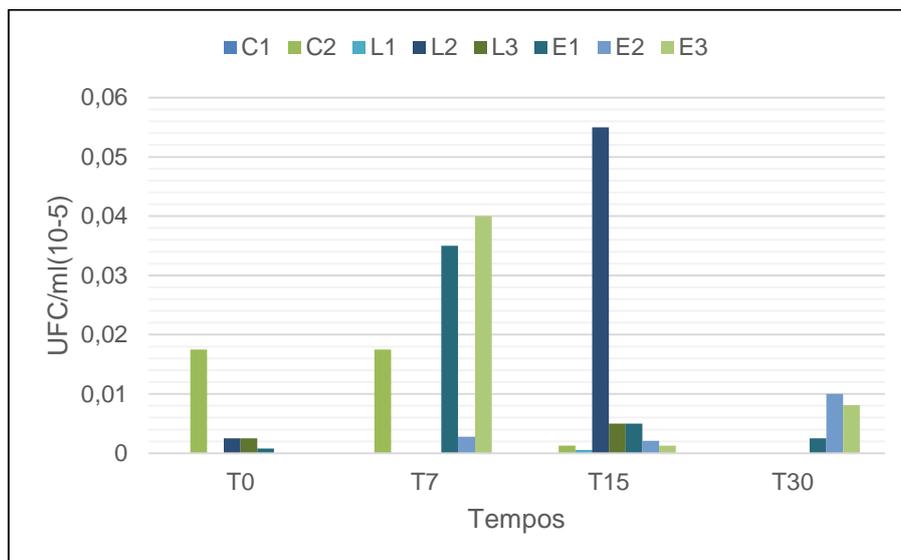


No gráfico da figura 24 foi representado o número de UFC bacterianas para o experimento 02. Nos tempos 0 e 7 dias, houve crescimento de bactérias em quatro testes: C2, L2, L3 e E1 e C2, E1, E2 e E3 respectivamente. O valor máximo encontrado nestes testes foi de 0,04 UFC/ml.

No tempo 15 dias houve crescimento em todos os testes, sendo que L2 apresentou um pico na quantidade de UFC de 0,055 UFC/ml.

No tempo 30 dias só houve crescimento em três dos oito testes (E1, E2 e E3).

**Figura 24 - Gráfico para número de células viáveis (UFC). UFC de bactérias no experimento 02 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias**



No experimento de degradação de aromáticos de forma geral também respeitou a curva de crescimento padrão fúngico. De forma individualizada, os testes L1, L3 e E3 possivelmente apresentaram a fase “log” tardia, somente no tempo 30 dias, mesmo apresentando crescimento também nos outros tempos coletados.

A contagem das UFC bacterianas foi feita com o interesse de parâmetro de qualidade. O número de UFC bacterianas neste experimento também se manteve baixo e controlado, tendo seu crescimento inibido pela alta proliferação fúngica. Houve crescimento de algumas UFC, sendo estas resultantes daquelas que resistiram a esterilização. O crescimento foi muito menor do que no experimento 01 (degradação de saturados).

Nos controles, houve crescimento tanto bacteriano quanto fúngico, atribuído à resistência das espécies a desinfecção.

Foi observado que o crescimento microbiano foi maior nos testes em que as células estavam livres, devido a disponibilidade dessas células para o crescimento.

As colônias bacterianas que conseguiram se desenvolver foram presentes nos períodos onde houve um crescimento menor das colônias de fungos, presentes principalmente no tempo 7 dias (possível período “lag”) diminuindo consideravelmente no tempo 30 dias.

Rocha (2010) observou o mesmo perfil de crescimento em experimentos feitos com *Aspergillus niger* para a otimização da produção de enzimas degradadoras.

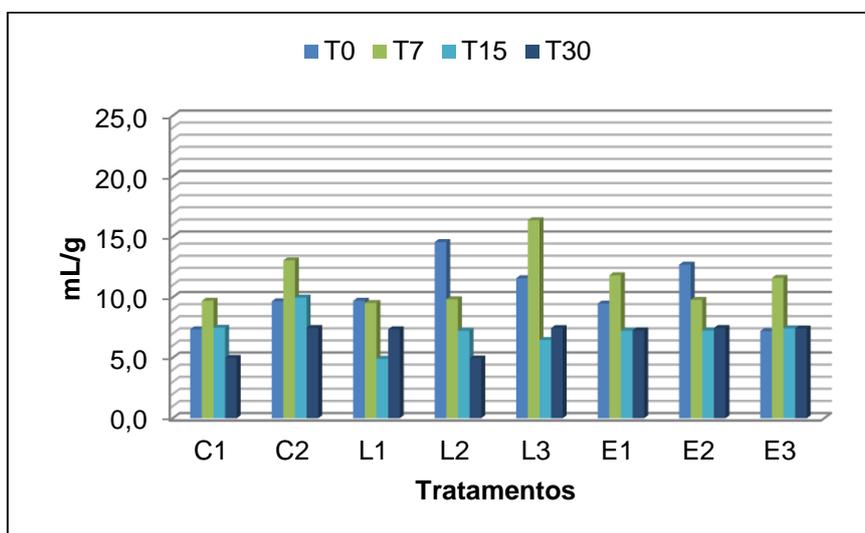
Seabra (2005) também observou o padrão de crescimento fúngico utilizando biopilhas para a remediação de solos contaminados com petróleo.

### 5.3.2 Monitoramento químico

Na figura 25 estão representados os valores de fósforo obtidos no experimento 02. Em C1, C2 e E3, houve um aumento entres os tempos 0 e 7 dias, seguido de uma queda até o tempo 30 dias. Em L1 e E2, houve uma queda até o tempo 15 dias, retornando o aumento no tempo 30 dias.

Em L2 houve um decréscimo continuo ao longo do tempo. Já em L3 e E1 houve um crescimento do tempo 0 para o tempo 7 dias, uma queda no tempo 15 dias e novamente um crescimento no tempo 30 dias.

**Figura 25 - Gráfico com variação dos teores de fósforo no experimento 02 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias**



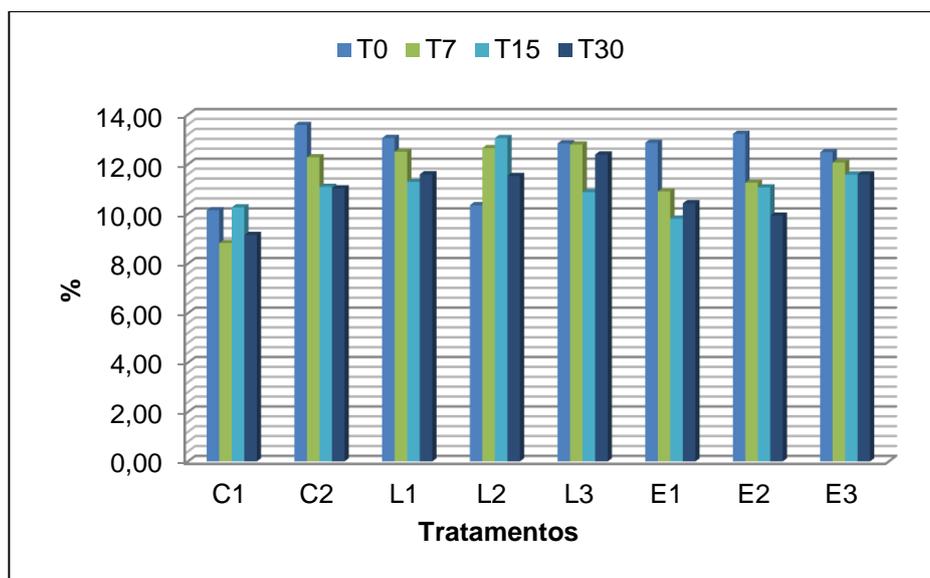
No gráfico da figura 26 estão representados os teores de carbono orgânico obtidos no experimento 02.

Em C1 houve uma queda, um aumento e uma nova queda nas quantidades de carbono. Em C2, E2 e E3 houve uma progressiva queda do tempo 0 ao tempo 30 dias.

Nos testes L1, L3 e E1, os valores sofreram um decréscimo até o tempo 15 dias, sendo que na coleta consecutiva (30 dias) os teores tornaram a crescer.

No teste L2, houve um aumento até o tempo 15 dias, onde no tempo 30 dias a quantidade de carbono foi reduzida.

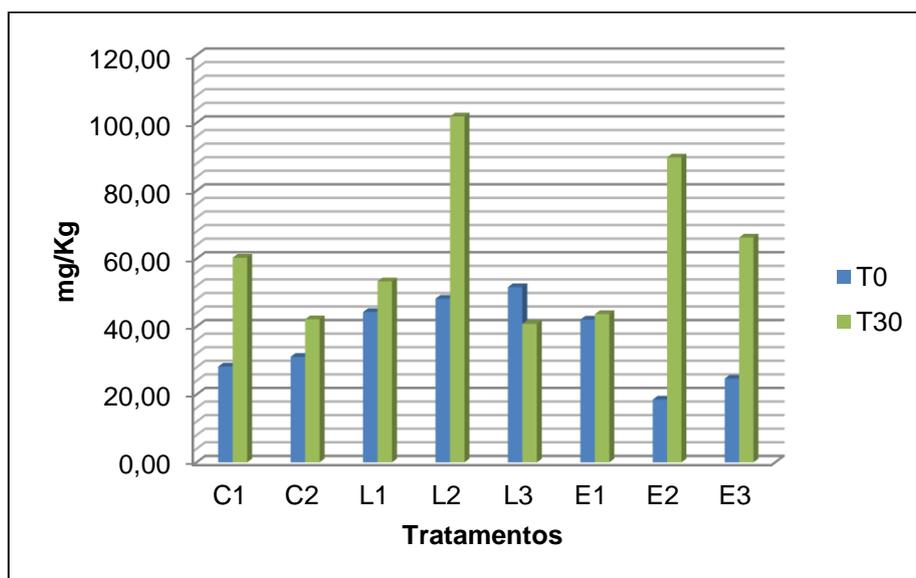
**Figura 26 - Gráfico com variação dos teores de carbono orgânico (%) no experimento 02 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias**



No gráfico da figura 27, estão representados os teores de nitrato no experimento 02.

Os valores de nitrato aumentaram ao longo do tempo em sete dos oito testes. No teste L3 houve queda na quantidade de nitrato na amostra.

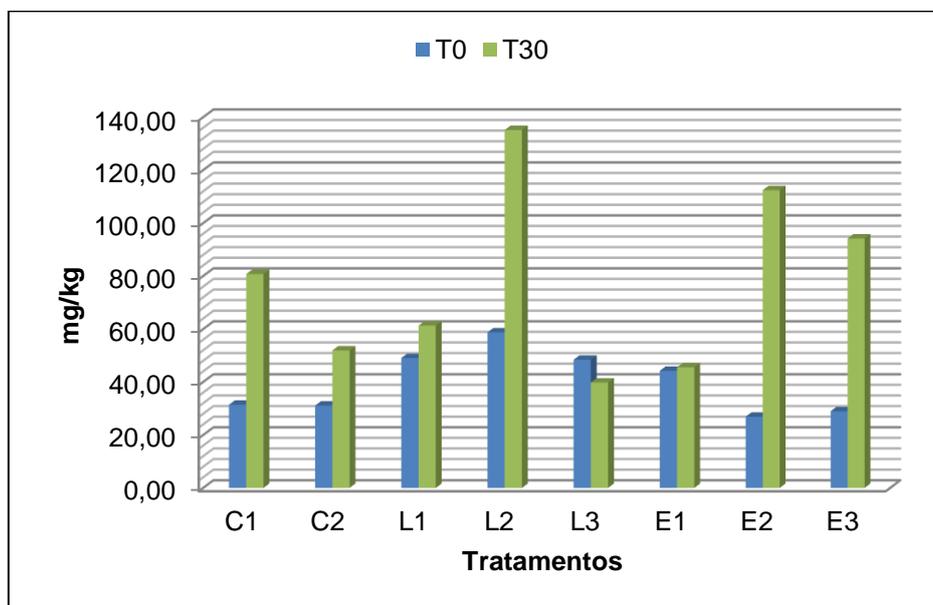
**Figura 27 - Gráfico com variação dos teores de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) no experimento 02 nos tempos 0 e 30 dias**



No gráfico da figura 28, estão representados os teores de amônio no experimento 02.

Os valores de amônio aumentaram ao longo do tempo em sete dos oito testes. No teste L3 houve queda na quantidade na amostra, situação idêntica a dos tores de nitrato.

**Figura 28 - Gráfico com variação dos teores de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) no experimento 02 nos tempos 0 e 30 dias**



Os manguezais são considerados importantes transformadores de nutrientes em matéria orgânica, apresentando altos teores. Os nutrientes no sedimento variam espacial e temporalmente. (BERNINI; REZENDE, 2010).

Os nutrientes ao longo do experimento 02 apresentaram um comportamento de queda, para fósforo e carbono orgânico e aumento para as formas nitrogenadas estudadas, indicando, para a degradação desta fração, o consumo preferencial do fósforo, devido à forma da cadeia dos compostos.

O fósforo e o carbono seguiram o padrão descrito por Vallejo e colaboradores (2005), de queda com a biodegradação justificável pelo consumo pelos microrganismos. Os íons nitrato e amônio apresentaram um acúmulo que pode ser explicado pela capacidade que esses apresentam de acumular no sedimento. O amônio é relativamente estável no sedimento de manguezal, devido as condições de baixa oxigenação. Já o nitrato pode ser biologicamente acumulado e pode ser utilizado como aceptor de elétrons (MANINI et al. 2003; NEALSON; BERELSON, 2003).

O aumento das formas nitrogenadas também pode ser atribuído à presença da fibra de coco, que por ser rica em nitrogênio pode ter disponibilizado esses íons para o

ambiente. O comportamento dos testes que apresentam variação na quantidade de fibra de coco é bem parecido em relação aos nutrientes.

### 5.3.3 Monitoramento geoquímico

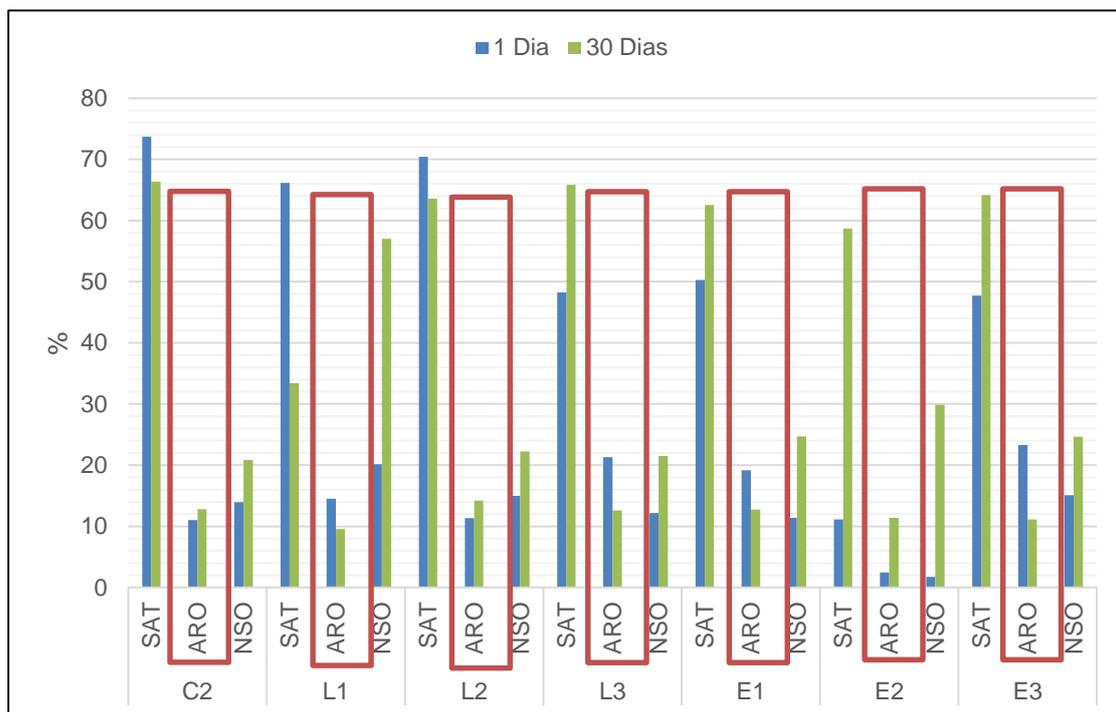
No gráfico da figura 29 estão representados a degradação de cada fração do petróleo para o consórcio de aromáticos (experimento 02).

Em C2 e L2, a quantidade de aromáticos e NSO apresentaram aumento, enquanto a fração de saturados apresentou decréscimo.

Em L1, os aromáticos e saturados foram aumentados, enquanto os NSO foram diminuídos. Em L3 e E1, os aromáticos e NSO apresentaram uma queda e os saturados um aumento.

E2 apresentou queda em todas as frações, enquanto E3 apresentou queda nos aromáticos e aumento nos saturados e NSO.

**Figura 29 - Gráfico de degradação dos compostos do experimento 02 nos tempos 0 e 30 dias**



Dentro da ordem preferencial de degradação dos compostos de petróleo, os compostos que representam a fração de aromáticos aparecem como substâncias com certa dificuldade de degradação, devido a sua estrutura molecular complexa (CHAIENAU et al. 1999). A hidrofobicidade das moléculas também é fator limitante da

biodegradação, devido à adsorção das moléculas a matéria orgânica oriunda do sedimento (TRINDADE, 2002).

A degradação desses compostos esta inversamente relacionada com o aumento do número de anéis e com a baixa solubilidade em água. Dessa forma, compostos com um menor número de anéis apresentam a capacidade de degradação aumentada (LEMOS et al. 2009).

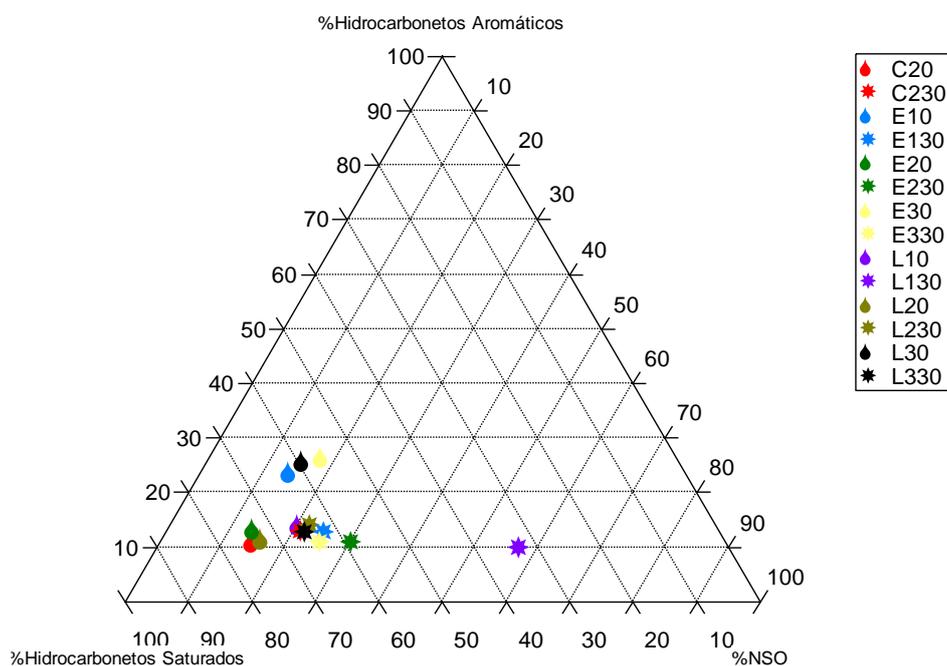
Houve queda na quantidade da fração de aromáticos em cinco dos oito testes do experimento 02. Houve um aumento na quantidade de aromáticos nos testes L1 e L2, podendo ser justificado pelo fato de ter ocorrido degradação das demais frações, principalmente saturados, sendo que alguns fungos presentes no consórcio de aromáticos também apresentam capacidade de degradação dos demais componentes do petróleo.

A degradação se mostrou mais eficiente nos testes que foram empregados os consórcios encapsulados devido ao volume de consórcio utilizado ser maior, variando de 1 ml (10 cápsulas) a 5 ml (50 cápsulas).

Para reforçar os dados geoquímicos, foi gerado também um diagrama ternário (Figura 30), explicitando mais claramente a degradação. Os pontos marcados no diagrama pelo símbolo da gota indica o óleo utilizado no tempo 0 dias, enquanto os pontos marcados por uma estrela indica o óleo resultante após 30 dias do experimento.

Em todos os testes foi observada degradação, onde houve deslocamento dos pontos do tempo 30 dias em relação aos pontos de tempo 0 dias e em direção a fração NSO (MILHOMEM et al, 2003).

**Figura 30 – Diagrama ternário das frações de saturados, aromáticos e NSO do experimento 02 nos tempos 0 e 30 dias**



#### 5.4 Experimento 3 (Degradação de NSO)

O experimento 03 – Degradação de NSO – consistiu na montagem de 32 testes de biodegradabilidade empregando o consórcio de NSO, de forma livre (L1, L2 e L3), variando o peso da fibra de coco, e de forma encapsulada (E1, E2 e E3), variando a quantidade de cápsulas. Foram feitos também controles, um apenas com o sedimento (C1) e outro com o sedimento e o óleo (C2).

##### 5.4.1 Monitoramento microbiológico

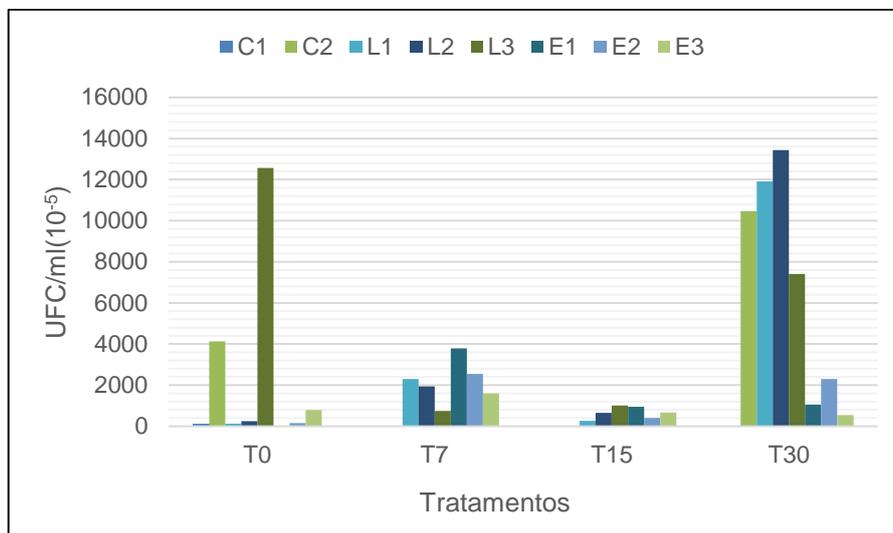
###### *Quantificação de bactérias e fungos*

A figura 31 representa a quantidade de UFC fúngicas no experimento 03. Em C2, L3 e E3, no tempo 0 dias, houve um crescimento notável de UFC. Os testes restantes dessa coleta registraram valores pequenos de crescimento.

No tempo 7 dias já é visível uma importante quantidade de colônias, as quais cresceram em sete testes, destacando-se L1, L2, E1, E2 e E3. No tempo 15 dias, o número de colônias apresenta um forte declínio em todos os testes.

No tempo 30 dias houve um crescimento importante também em todos os testes, com destaque para C2, L1 e L2.

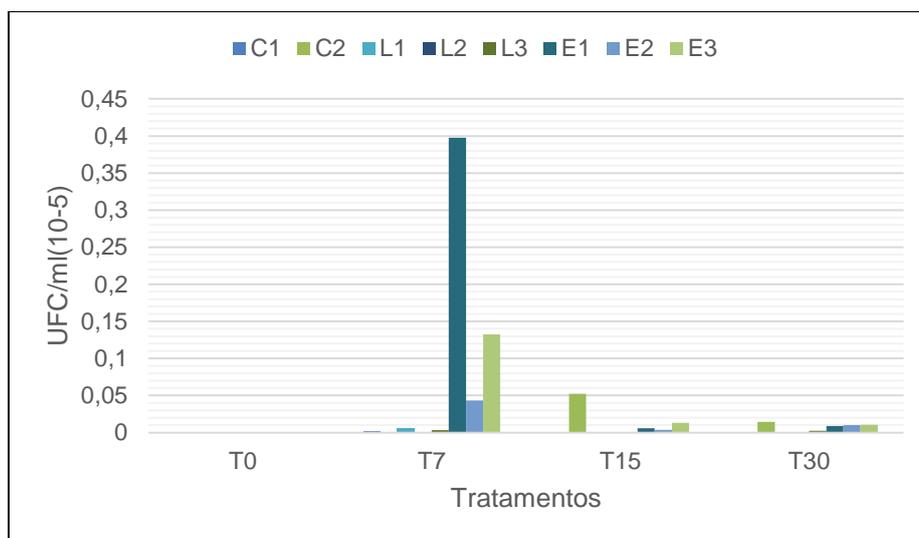
**Figura 31 - Gráfico para número de células viáveis (UFC). UFC de fungos no experimento 03 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias**



No gráfico da figura 32, estão representadas as quantidades de células viáveis bacterianas no experimento 03.

No tempo 0 dias não houve crescimento bacteriano. No tempo 7 dias houve crescimento em sete dos oito testes, ocorrendo um pico em 0,3975 UFC/ml no teste E1. No tempo 15 dias quase não houve crescimento bacteriano, sendo o máximo representado pelo teste C2, com 0,0525 UFC/ml. No tempo 30 dias o crescimento das bactérias foi praticamente cessado, alcançando o máximo de 0,01438 UFC/ml em C2.

**Figura 32 - Gráfico para número de células viáveis (UFC). UFC de bactérias no experimento 03 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias**



Foi observado que o crescimento microbiano foi maior nos testes onde foram utilizadas as células livres, justificável pela disponibilidade destas para o ambiente ser maior do que as encapsuladas.

Neste experimento, todos os testes possivelmente apresentaram a fase “log” no tempo 30 dias, podendo ser explicado pela complexidade das moléculas alvo da biodegradação, exigindo um maior período de adaptação ao stress da população de microrganismos. Porém, no teste E3, que apresenta maior quantidade de cápsulas, foi observado um crescimento significativamente menor, podendo ser atribuído à competição entre os espécimes empregados na constituição das cápsulas, já que estes apresentam um número maior (MEYER, 2011; SILVA, 2011).

O crescimento bacteriano mostrou-se bastante reduzido, apresentando um pico no tempo 7 dias, período provavelmente integrante da fase “lag” do experimento, podendo ser justificado pela resistência a temperatura de algumas espécies bacterianas. Nas outras coletas, a presença bacteriana foi quase inexistente, comprovando a eficiência da esterilização e o domínio fúngico sobre os microcosmos. Este experimento foi o que apresentou menor número de UFC bacterianas.

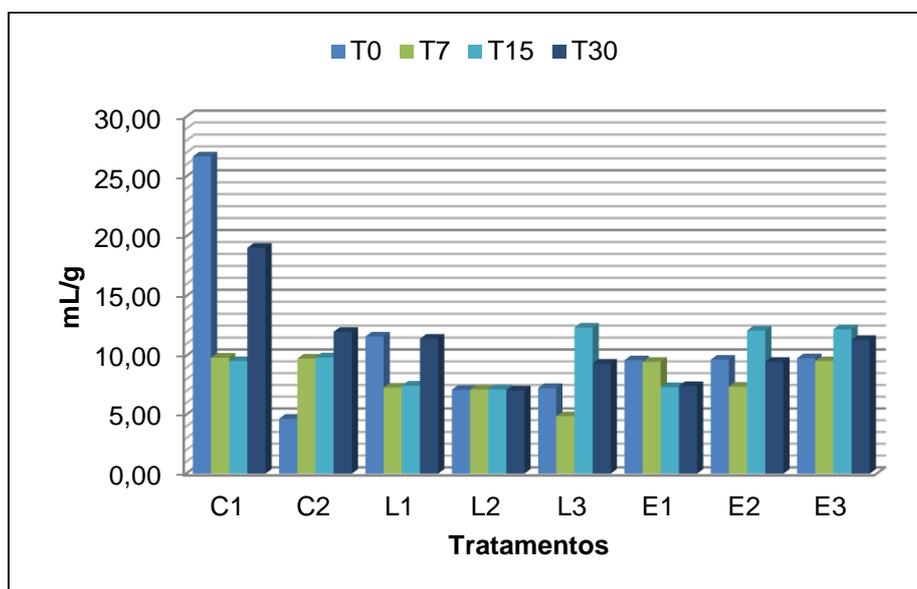
Wetler (2006) constatou o mesmo padrão de crescimento nos seus microcosmos, tanto nos controles, sem adição de petróleo, quanto nos testes com o sedimento contaminado com petróleo. Silva (2007), também constatou crescimento semelhante, mesmo utilizando adição de metais nos microcosmos, elementos tóxicos para grande parte dos microrganismos.

#### 5.4.2 Monitoramento químico

O gráfico da figura 33 mostra as variações nos teores de fósforo no experimento 03. Em C1 e E1 houve uma queda dos valores até o tempo 15 dias e um novo acréscimo no tempo 30 dias. Em C2 houve um crescimento progressivo ao longo do experimento. Em L1 houve um decréscimo até o tempo 7 dias seguido de um crescimento até o tempo 30 dias.

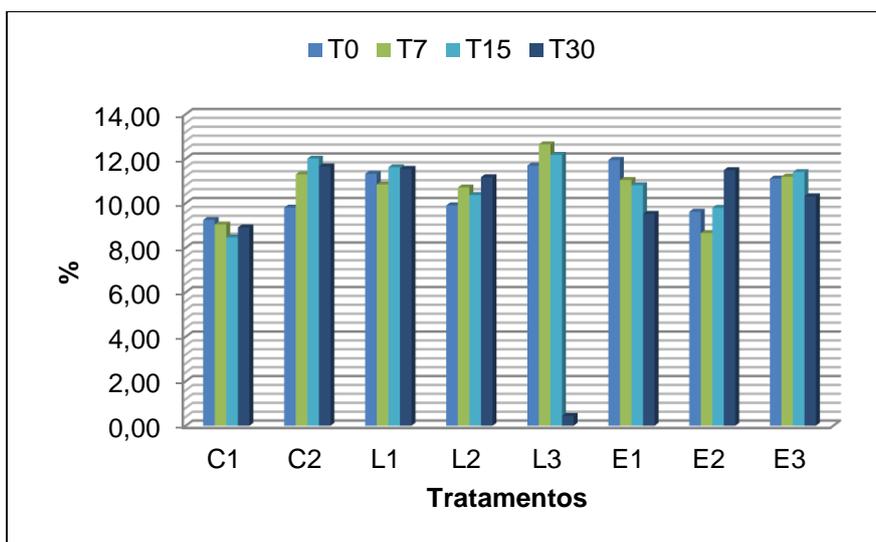
No teste L2 foi observada uma constância nos valores de fosforo ao longo do tempo. Em L3, E2 e E3 houve uma oscilação ao longo do tempo, com valores menores nos tempos de 7 e 30 dias e valores maiores em 0 e 15 dias.

**Figura 33 - Gráfico com variação dos teores de fósforo no experimento 03 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias**



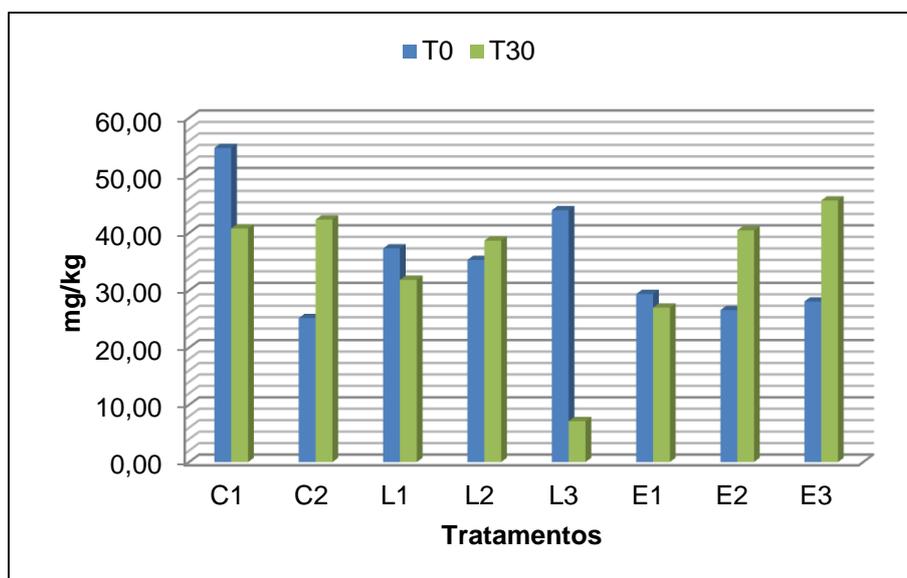
O gráfico da figura 34 mostra as variações dos teores de carbono orgânico durante o experimento 03. Em C1 houve uma queda até o tempo 15 dias, voltando a ter um aumento no tempo 30 dias. Em C2, L3 e E3 houve um crescimento até o tempo 15 dias, com uma redução no tempo 30 dias. Em L1 e L2 os valores foram oscilantes, sendo que em L1 os máximos foram em 0 e 15 dias e em L2, em 7 e 30 dias. Em E1 houve um decréscimo ao longo do tempo experimental. Já em E2 houve uma queda dos valores do tempo 7 em relação aos do tempo 0 e posteriormente uma subida progressiva dos valores.

**Figura 34 - Gráfico com variação dos teores de carbono orgânico (%) no experimento 03 nos tempos 0, 7, 15 e 30 dias**



O gráfico da figura 35 mostra as variações dos teores de nitrato encontrados no experimento 03. Os valores encontrados nos testes C2, L2, E2 e E3 apresentaram um aumento na quantidade de nitrato presente, enquanto nos testes C1, L1, L3 e E1 apresentaram queda.

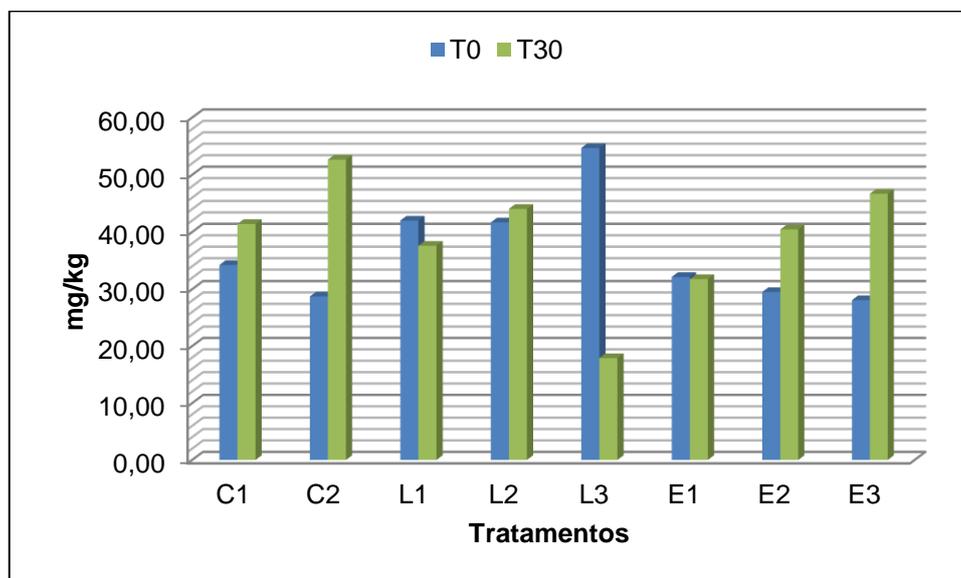
**Figura 35 - Gráfico com variação dos teores de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) no experimento 03 nos tempos 0 e 30 dias**



O gráfico da figura 36 mostra as variações dos teores de amônio encontrados no experimento 03.

Os valores encontrados nos testes C1, C2, E2 e E3 apresentaram um aumento na quantidade de amônio presente, enquanto nos testes L1, L2, L3 e E1 apresentaram queda.

**Figura 36 - Gráfico com variação dos teores de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) no experimento 3 nos tempos 0 e 30 dias**



Segundo Cury (2002), a quantidade de carbono orgânico em sedimento de manguezal é alta. Os íons de nitrogênio, nitrato e amônio, apresentam comportamentos semelhantes e os nutrientes, fósforo e nitrogênio são muito variáveis. Os nutrientes ao longo do experimento 03 apresentaram um comportamento altamente heterogêneo.

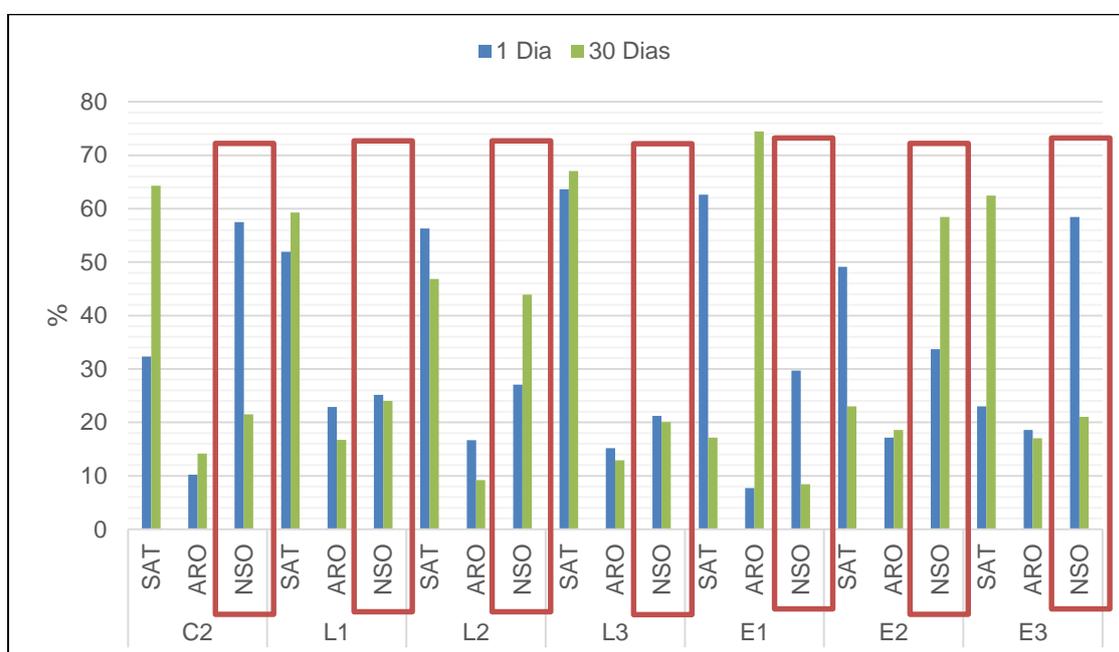
O fósforo e o carbono apresentaram variados comportamentos nos testes ao longo dos 30 dias. Esse perfil não definido se deve a fase logarítmica do crescimento microbiano ter se apresentado tardiamente, onde o consumo e a disponibilização desses nutrientes não ficaram bem definidos. Os íons nitrato e amônio também apresentaram um comportamento atípico, sem um padrão definido, podendo ser justificado, além do consumo microbiano, pela participação ativa dessas formas nitrogenadas no ciclo do nitrogênio (LUVIZOTTO, 2013; REIS, 2013).

Os testes onde foi empregada a fibra de coco apresentaram comportamentos altamente heterogêneos em relação aos nutrientes, não sendo possível estabelecimento de padrões nem atribuição de disponibilização de nutrientes a esta.

### 5.4.3 Monitoramento geoquímico

Os gráficos da figura 37 representam a degradação dos compostos NSO no experimento 03. Em C1 não houve detecção de compostos NSO. Já a quantidade de saturados e aromáticos aumentou. Em C2 houve queda nos NSO e nos aromáticos, enquanto houve um acréscimo nos saturados. Em L1 houve o acréscimo nos NSO e nos saturados, enquanto houve decréscimo nos aromáticos. Em L2 e E3 houve diminuição em todas as frações. Em L3 e E2 houve aumento em todas as frações. Em E1 houve queda nos NSO e saturados e um aumento nos aromáticos.

**Figura 37 - Gráfico de degradação dos compostos do experimento 03 nos tempos 0 e 30 dias**



Dentro da ordem preferencial de degradação dos compostos de petróleo, os compostos que representam a fração de NSO aparecem como as substâncias mais recalcitrantes presentes (CHAIENAU et al. 1999).

Houve queda na quantidade da fração de NSO em cinco dos oito testes do experimento 03. Houve um aumento na quantidade de NSO também nos testes L1, L3 e E2, podendo ser justificado pelo fato de ter ocorrido degradação das demais frações, principalmente aromáticos, sendo que alguns fungos presentes no consórcio de aromáticos também apresentam capacidade de degradação dos demais componentes do petróleo. No teste E3, o resultado obtido não foi analisado, devido a um erro durante o processo, que gerou como resultado uma massa negativa, o que não é pertinente à análise realizada.

A degradação se mostrou mais eficiente nos testes que foram empregados os consórcios encapsulados também neste experimento, onde há a maior quantidade de consórcios nos testes devido ao emprego das cápsulas, cada uma com 100 µl de suspensão.

Segundo Ortiz e colaboradores (2006), os compostos com alto peso molecular necessitam de maiores períodos de tempo para a biodegradação, em torno de 120 dias, justificando possivelmente o período de crescimento caracterizado neste experimento (“log”), onde ainda está havendo a utilização do substrato pelos microrganismos.

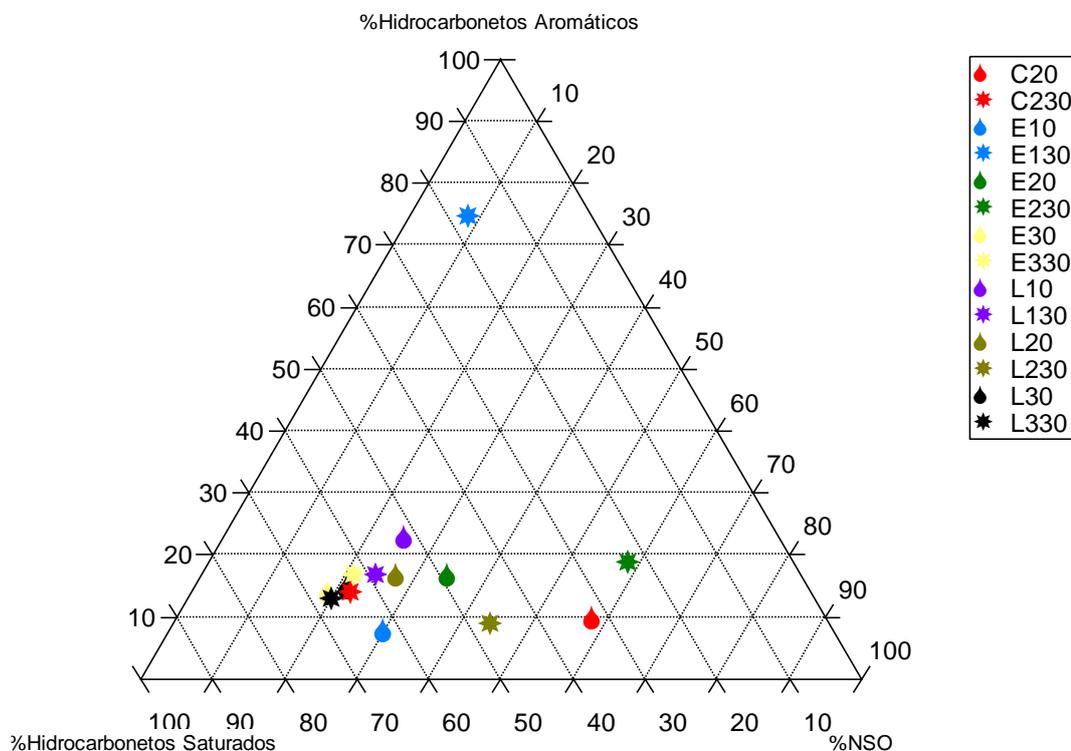
Para reforçar os dados geoquímicos, foi gerado também um diagrama ternário (Figura 38), explicitando mais claramente a degradação. Os pontos marcados no diagrama pelo símbolo da gota indica o óleo utilizado no tempo 0 dias, enquanto os pontos marcados por uma estrela indica o óleo resultante após 30 dias do experimento.

Em L2, E2 e E3 foi observada uma pequena degradação, onde houve deslocamento dos pontos do tempo 30 dias em direção à fração NSO.

Em E1, houve degradação preferencial da fração de saturados, onde houve uma grande redução na sua quantidade. Foi notado também um leve deslocamento em direção à fração NSO do óleo.

Em C2 e L3, há uma discrepância dos dados, pois o óleo da Bacia do Recôncavo, caracterizado como leve, foi classificado como degradado, apresentando uma maior teor da fração de NSO no tempo 0 (MILHOMEM et al, 2003).

**Figura 38 - Diagrama ternário das frações de saturados, aromáticos e NSO do experimento 03 nos tempos 0 e 30 dias**



## 5.5 Integração dos dados geoquímicos dos experimentos

### 5.5.1 Experimento 01

Os gráficos na figura 39 representam as variações dos nutrientes frente à degradação das frações do óleo no experimento 01.

Em C1 houve aumento nas concentrações de todos os nutrientes e uma diminuição na quantidade da fração de saturados.

Em C2 houve o aumento na quantidade de fósforo. Não há como inferir os comportamentos do nitrato e do amônio neste teste, devido a falta de dados no tempo 30 dias. No carbono orgânico houve uma diminuição, seguida da queda da quantidade de saturados.

Em L1 e L3 houve um aumento nas concentrações de fósforo e carbono orgânico enquanto houve queda nas quantidades de nitrato e amônio. A fração de saturados apresentou um acréscimo.

Em L2 houve um aumento nas quantidades de fósforo e carbono, nitrato e amônio apresentaram assim como a fração de saturados.

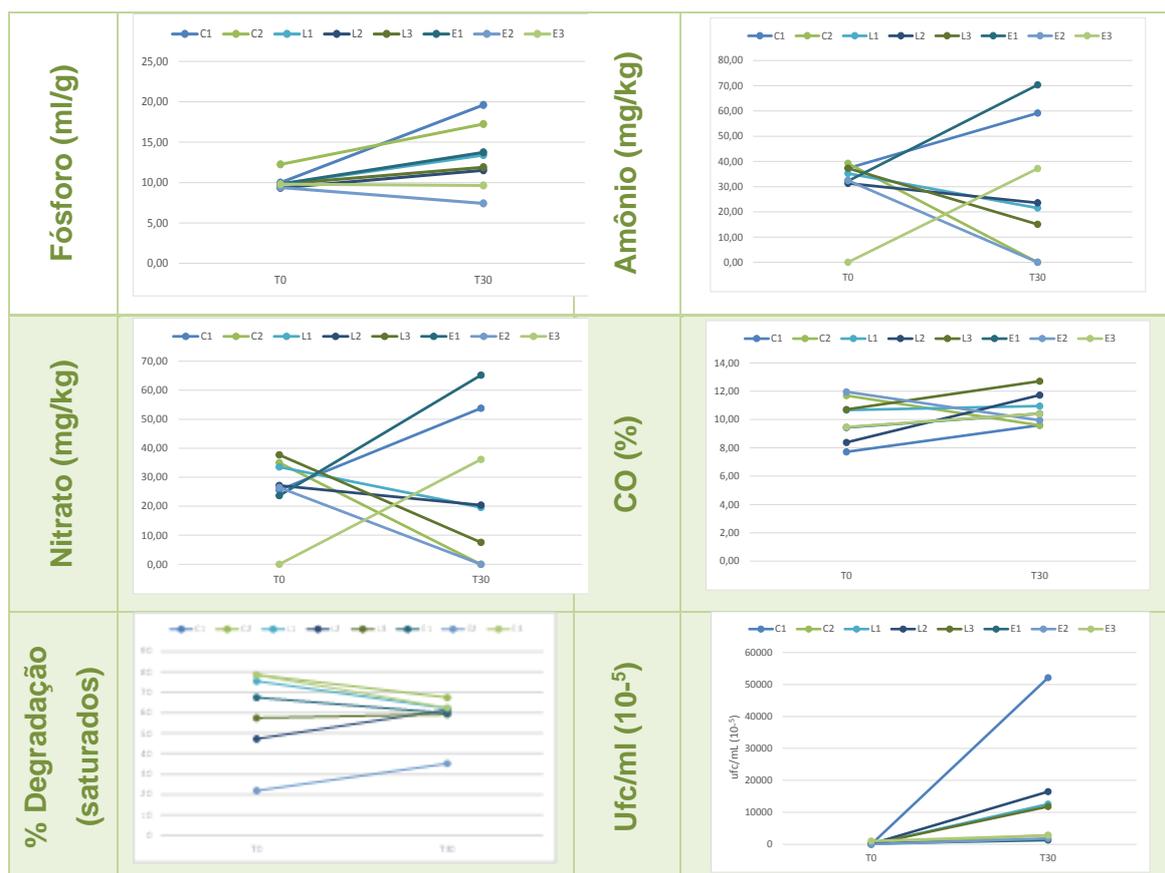
Em E1 ocorreu o aumento em todas as concentrações de nutrientes e também na quantidade de saturados.

Em E2 houve queda nos nutrientes fósforo e carbono, aumento no amônio e uma queda na fração de saturados. As análises de nitrato e amônio para este teste não foram realizadas para o tempo 30 dias, não sendo possível inferir os comportamentos ao longo o tempo.

Já em E3, houve queda apenas na quantidade de fósforo e aumento na quantidade de carbono orgânico. Os outros nutrientes não puderam ser inferidos devido a falta de dados no tempo 0 dias para este tratamento.

Em todos os testes foi observado o aumento do número de UFC fúngicas.

**Figura 39 - Integração dos dados biogeoquímicos (nutrientes, degradação e crescimento fúngico) para os tempos 0 e 30 dias para o experimento 01**



A partir da integração feita dos dados de nutrientes e degradação para os tempos 0 e 30 dias para o experimento 01 foi possível inferir que os nutrientes, nos

testes em geral, apresentaram um crescimento ao longo dos 30 dias, acompanhados do aumento da quantidade de UFC e do aumento da biodegradação da fração de saturados. Esses são os indicativos de que os nutrientes disponíveis foram utilizados para estabelecimento da microbiota e o declínio desta proporcionou que estes nutrientes fossem disponibilizados novamente ao ambiente.

### 5.5.2 Experimento 02

Os gráficos na figura 40 representam as variações dos nutrientes frente à degradação das frações do óleo no experimento 02.

Nos testes C1 e C2 houve queda nos nutrientes fósforo e carbono, aumento no nitrato e amônio e queda na quantidade dos aromáticos.

Em L1, E1 e E2 houve diminuição nas quantidades de fósforo e carbono e aumento nas quantidades de nitrato, amônio e aromáticos.

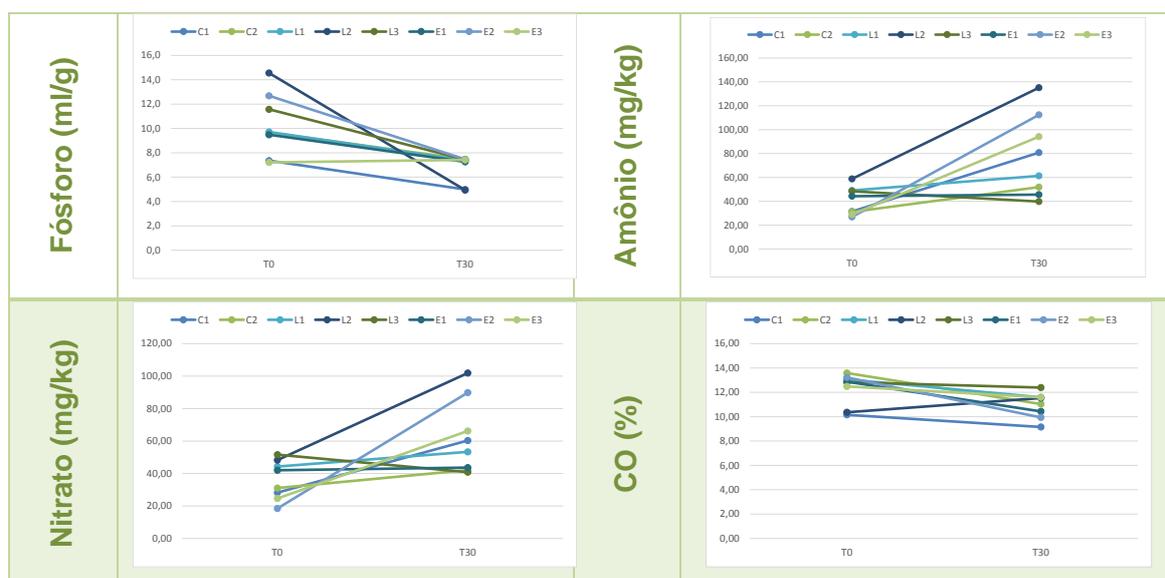
Em L2 houve diminuição apenas no nutriente fósforo. Nos demais houve aumento. Houve queda também na quantidade de aromáticos.

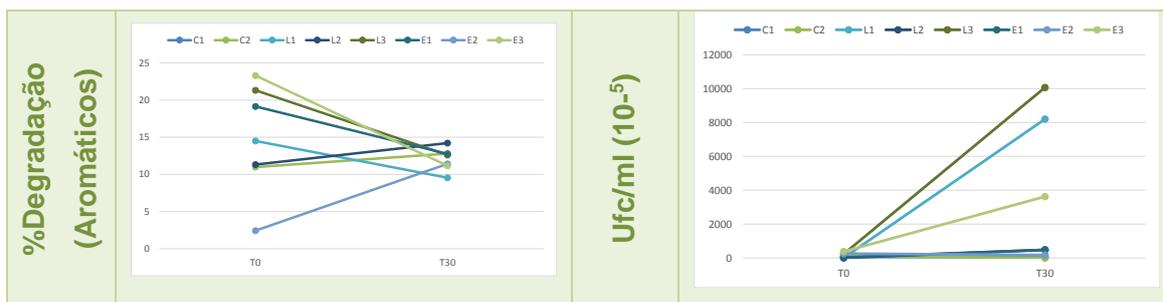
Em L3 houve decréscimo nas quantidades de todos os nutrientes enquanto houve aumento na quantidade de aromáticos.

Já em E3 houve queda apenas no carbono orgânico. Os demais nutrientes e os aromáticos apresentaram aumento.

Houve aumento no número de UFC fúngicas em todos os testes.

**Figura 40 - Integração dos dados biogeoquímicos (nutrientes, degradação e crescimento fúngico) para os tempos 0 e 30 dias para o experimento 02**





Observada a integração dos dados do experimento 02, foi possível concluir que os níveis de carbono orgânico e fósforo nos testes mantiveram o padrão de queda, enquanto as espécies nitrogenadas apresentaram aumento, justificável pela capacidade de acúmulo do nitrato e do amônio em condições de pouca oxigenação, característica de sedimento de manguezal. A biodegradação dos compostos aromáticos apresentou em sua maioria um aumento, acompanhados pelo aumento de UFC, porém em uma parte dos testes apresentou resultados contrários, devido a características específicas dos compostos, que acabam por retardar/dificultar a degradação.

### 5.5.3 Experimento 03

Os gráficos na figura 41 representam as variações dos nutrientes frente à degradação das frações do óleo no experimento 03. Em C1 apenas o amônio aumentou. Os restantes nutrientes apresentaram queda, assim como a quantidade de NSO.

Em C2 houve aumento de todos os nutrientes e queda na quantidade de NSO.

Em L1 houve queda nas quantidades de fósforo, amônio e nitrato. O aumento se deu nas quantidades de carbono orgânico e nos compostos NSO.

Em L2 houve queda nas quantidades de fósforo. Amônio, nitrato e carbono orgânico aumentaram. A quantidade de compostos NSO diminuiu.

Em L3 as quantidades de fósforo e compostos NSO aumentaram. Os demais nutrientes apresentaram queda.

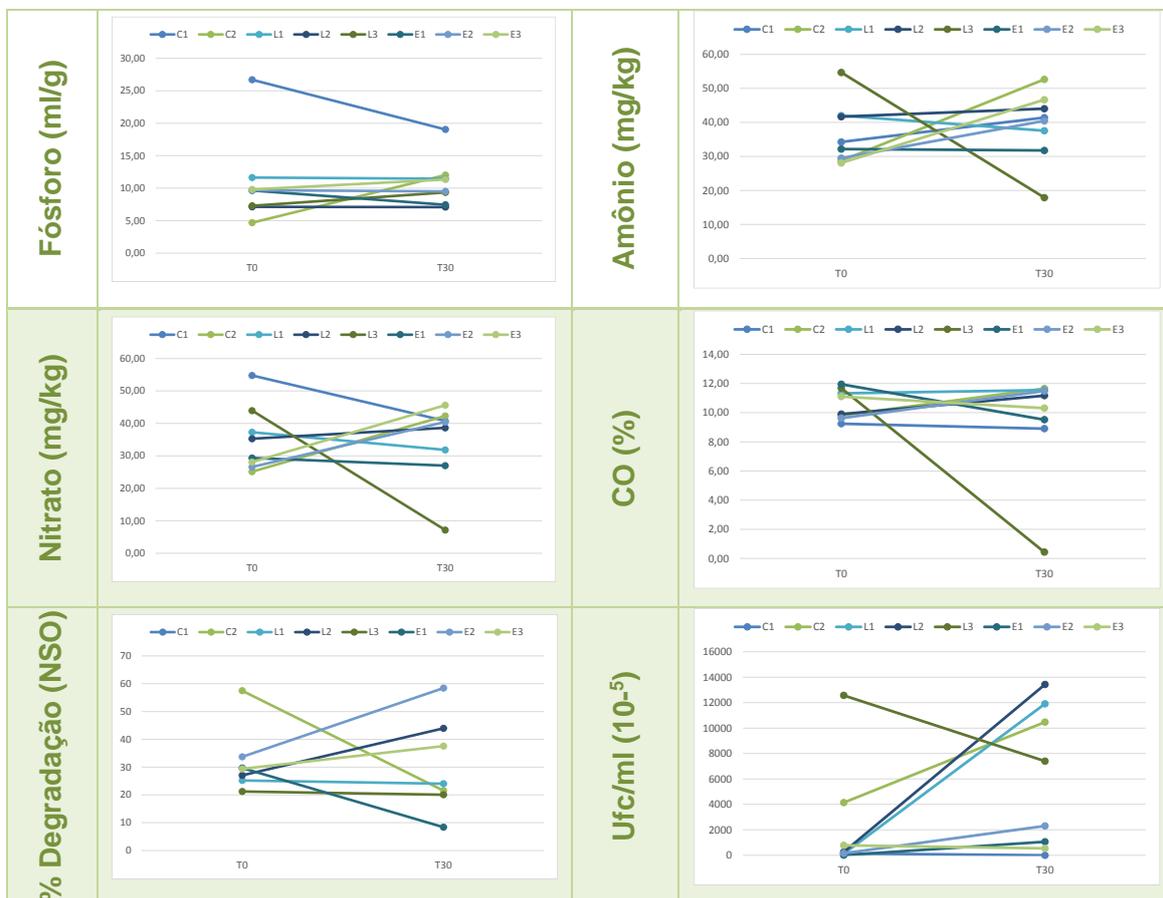
No teste E1 houve queda em todas as quantidades de nutrientes e nos compostos NSO.

Em E2 apenas o fósforo apresentou queda. Nitrato, amônio, carbono e compostos NSO apresentaram aumento.

Já em E3 houve aumento nas quantidades de fósforo, amônio e nitrato. Carbono orgânico e compostos NSO apresentaram queda.

Houve aumento na quantidade de UFC na maioria dos testes, excetuando-se o L3.

**Figura 41 - Integração dos dados geoquímicos (nutrientes, degradação e crescimento fúngico) para os tempos 0 e 30 dias para o experimento 03**



Observada a integração dos dados para o experimento 03, notou-se uma heterogeneidade nos dados. O comportamento esperado pelos nutrientes ao longo dos 30 dias não foi observado, onde os teores observados apresentaram grandes variações. As taxas de biodegradação também foram variáveis, mas presentes. O tempo em que foi promovida não foi suficiente para a total degradação, mas demonstrou um princípio de biodegradação, devido a grande recalcitrância dos compostos NSO.

## 5.6 Análise dos Componentes Principais (ACP)

### 5.6.1 Experimento 01

A análise dos componentes principais (ACP) dos parâmetros biogeoquímicos (fósforo, nitrato, amônio, carbono orgânico, degradação e quantidade de UFC) monitorados no experimento 01, pode ser explicada por 100% de variância entre os dois fatores (Figuras 42 e 43).

No gráfico de pesos em CP1, todas as variáveis tendem a localizar-se mais à direita do diagrama, mostrando que essas estão correlacionadas positivamente (Figura 42). Analogamente no CP2, T0 está correlacionado negativamente com a variável T30, pois esta tende a localizar-se na parte inferior, enquanto que T0 tende a se localizar na parte superior do gráfico.

A Figura 43 mostra o gráfico dos escores nas duas primeiras componentes. A primeira componente (82,94% da informação) pode ser interpretada de forma que podem ser observados 4 grupos. Os parâmetros: nitrato e amônio, que correspondem ao primeiro grupo são os que apresentam maior peso positivo em relação ao fósforo, ao carbono e a degradação. O grupo 2 representado pelos dados restantes do nitrato e do amônio. O grupo 3 representado pelo fósforo, carbono orgânico e degradação está correlacionado negativamente com nitrato e amônio. O grupo 4 apresentou correlação negativa com os grupos 1 e 2 em relação ao PC2. De modo geral foi possível observar que no grupo 1 e 2, as concentrações de nitrato e amônio provavelmente não influenciaram a degradação, o que foi observado para fósforo e carbono orgânico.

Figura 42 – Gráfico de pesos da análise dos componentes principais – experimento 01

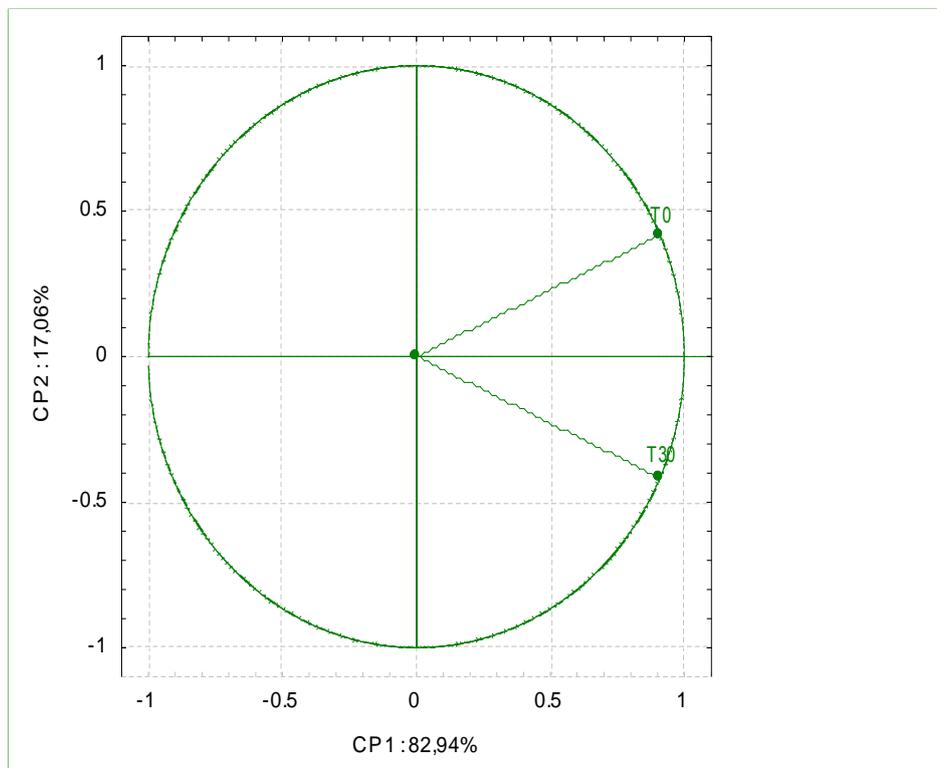
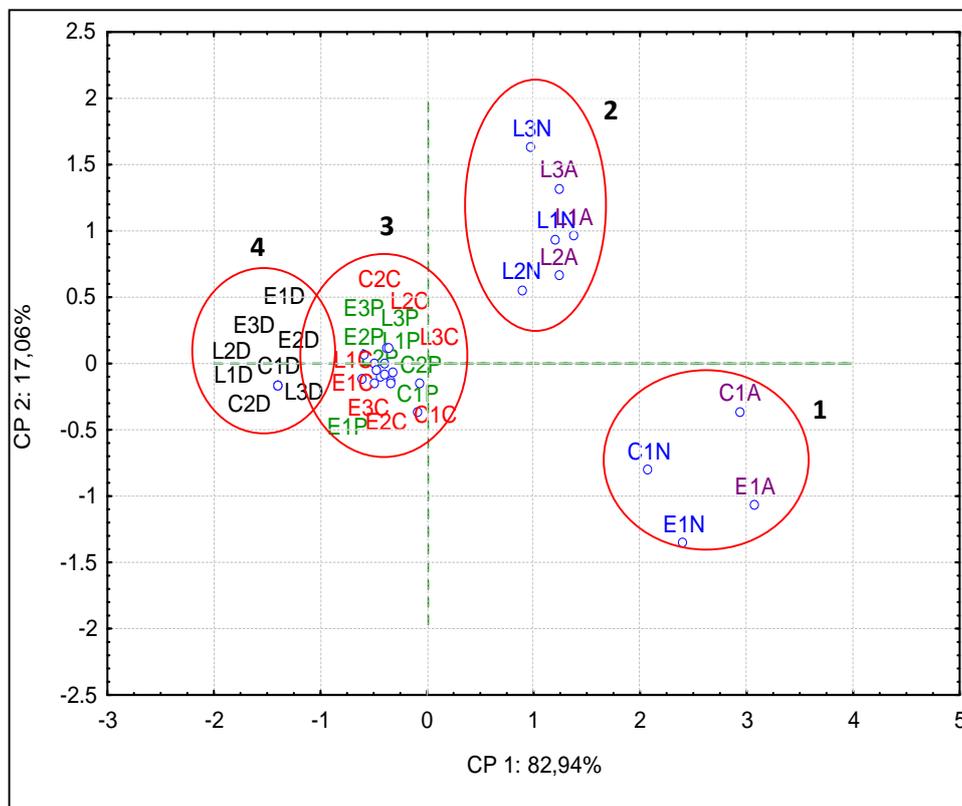


Figura 43 - Gráfico de escores da análise dos componentes principais – experimento 01



### 5.6.2 Experimento 02

A análise dos componentes principais (ACP) dos parâmetros biogeoquímicos (fósforo, nitrato, amônio, carbono orgânico, degradação e quantidade de UFC) monitorados no experimento 02, pode ser explicada por 100% de variância entre os dois fatores (Figuras 44 e 45).

No gráfico de pesos em CP1, todas as variáveis tendem a localizar-se mais à direita do diagrama, mostrando que essas estão correlacionadas positivamente (Figura 44). Analogamente no CP2, T0 está correlacionado negativamente com a variável T30, pois esta tende a localizar-se na parte inferior, enquanto que T0 tende a se localizar na parte superior do gráfico.

A Figura 45 mostra o gráfico dos escores nas duas primeiras componentes. A primeira componente (88,49% da informação) pode ser interpretada de forma que podem ser observados 2 grupos. Os parâmetros nitrato e amônio, que correspondem ao primeiro grupo são os que apresentam maior peso positivo em relação ao fósforo, ao carbono e a degradação. O grupo 2 representado pelas variáveis fósforo, carbono orgânico e degradação está correlacionado negativamente com nitrato e amônio para PC2. De modo geral foi possível observar que no grupo 1, as concentrações de nitrato e amônio não influenciaram a degradação, o que foi observado para fósforo e carbono orgânico (grupo 2).

Figura 44 – Gráfico de pesos da análise dos componentes principais – experimento 02

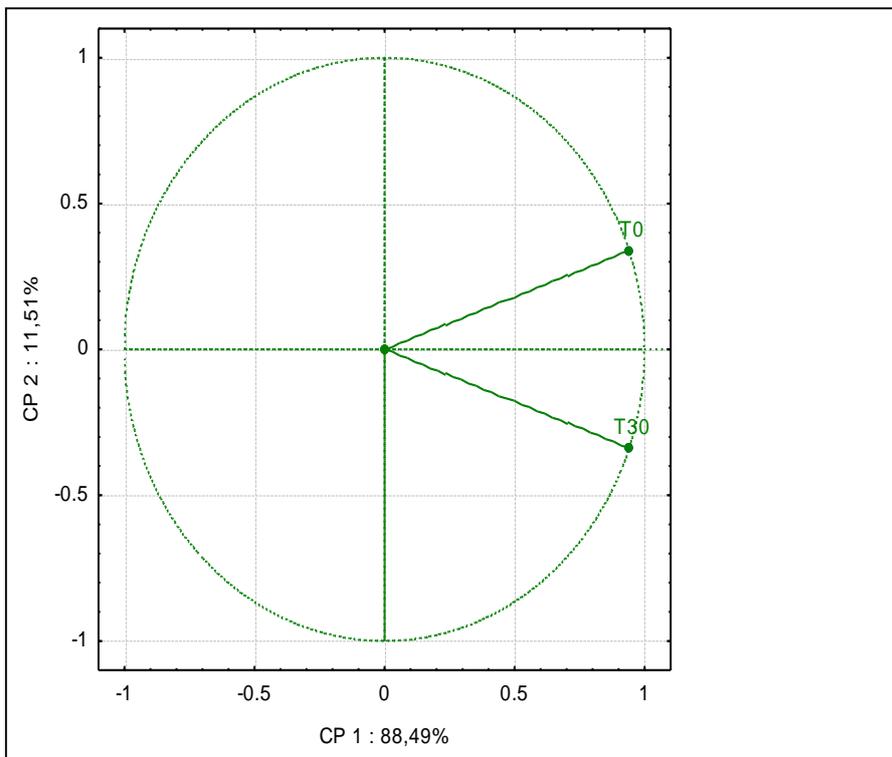
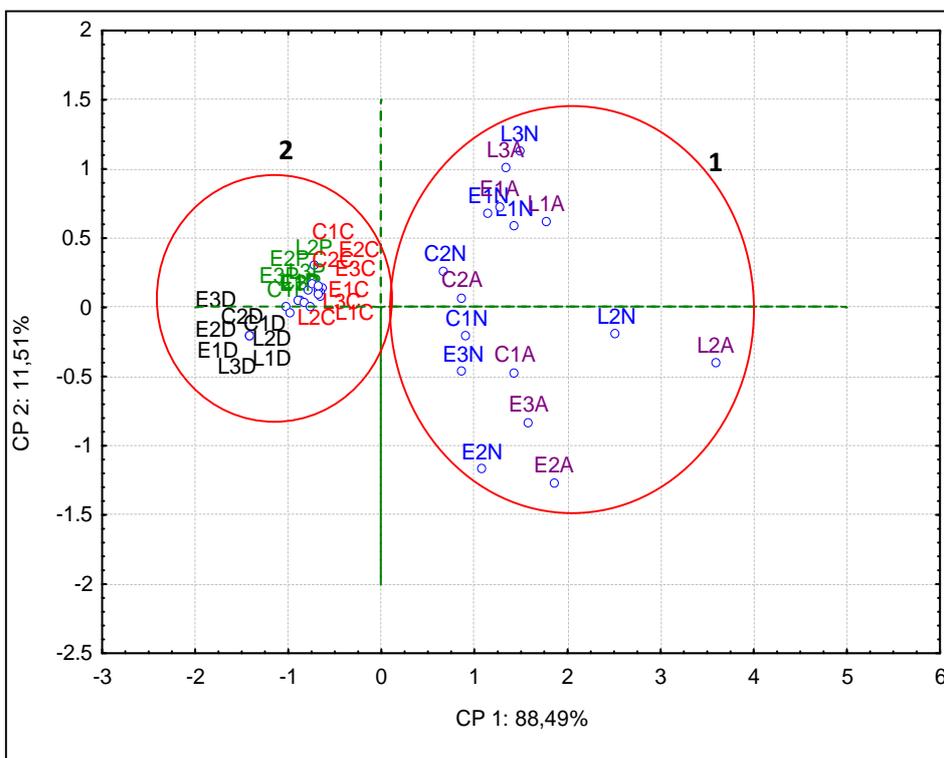


Figura 45 – Gráfico de escores da análise dos componentes principais – experimento 02



### 5.6.3 Experimento 03

A análise dos componentes principais (ACP) dos parâmetros biogeoquímicos (fósforo, nitrato, amônio, carbono orgânico, degradação e quantidade de UFC) monitorados no experimento 02, pode ser explicada por 100% de variância entre os dois fatores (Figuras 46 e 47).

No gráfico de pesos em CP1, todas as variáveis tendem a localizar-se mais à direita do diagrama, mostrando que essas estão correlacionadas positivamente (Figura 46). Analogamente no CP2, T0 está correlacionado negativamente com a variável T30, pois esta tende a localizar-se na parte inferior, enquanto que T0 tende a se localizar na parte superior do gráfico.

A Figura 47 mostra o gráfico dos escores nas duas primeiras componentes. A primeira componente (88,08% da informação) pode ser interpretada de forma que podem ser observados 2 grupos. Os parâmetros correspondentes ao primeiro grupo (nitrato e amônio) apresentam maior peso positivo em relação ao fósforo, ao carbono e a degradação. O grupo 2 representado pelas variáveis fósforo, carbono orgânico e degradação está correlacionado negativamente com o grupo 1 para PC2. De modo geral foi possível observar que no grupo 1, as concentrações de nitrato e amônio não influenciaram a degradação, o que foi observado para fósforo e carbono orgânico (grupo 2).

**Figura 46 – Gráfico de pesos da análise dos componentes principais – experimento 03**

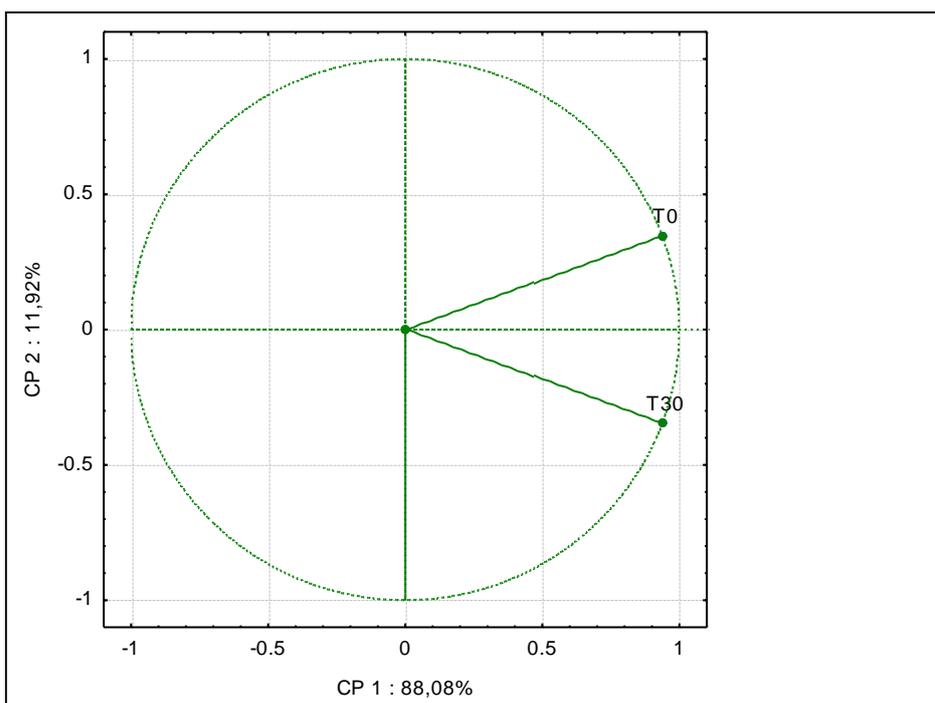
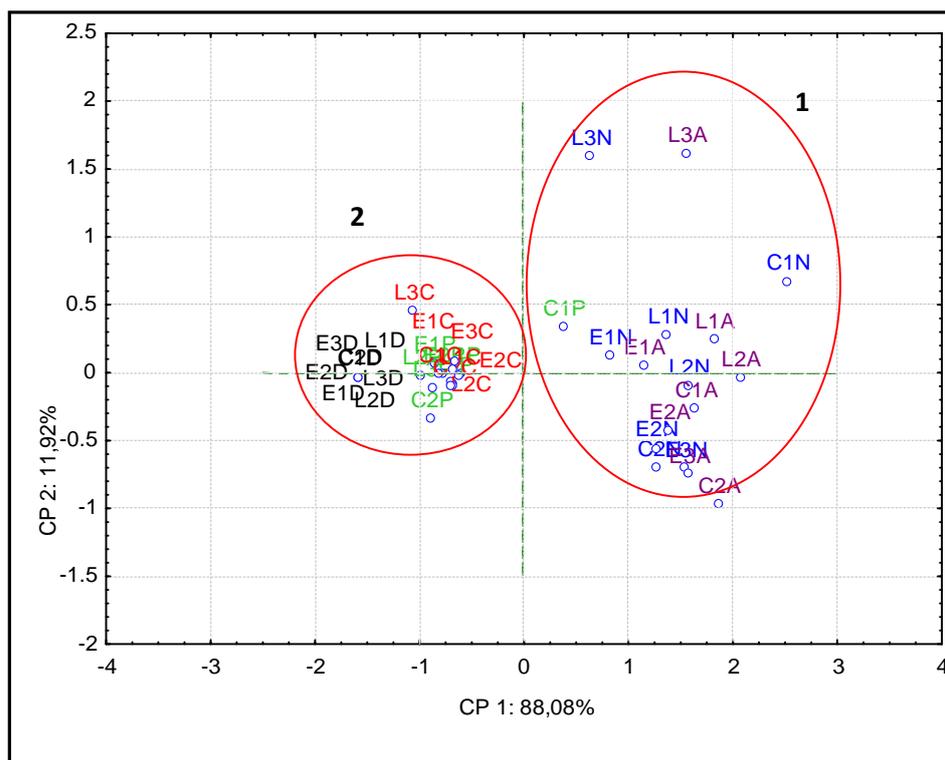


Figura 47 – Gráfico de escores de análise dos componentes principais – experimento 03



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através das análises realizadas, foi possível observar que o emprego do encapsulamento dos fungos se apresentou bastante eficiente, onde a utilização das cápsulas proporcionou um maior nível de degradação das frações do óleo nos testes de biodegradabilidade, se mostrando alternativa de uso para a biorremediação *in situ*.

O desenvolvimento da microbiota empregada nos experimentos foi satisfatório, resultando num número expressivo de unidades formadoras de colônias ao fim dos 30 dias.

A utilização da fibra de coco como nutriente não pôde ser corroborada, devido ao não estabelecimento de padrões entre a quantidade da fibra e a intensidade da biodegradação, devido ao comportamento variável dos nutrientes nestes testes. Outros ensaios precisam ser realizados para a complementação/confirmação desta capacidade deste material.

Pôde-se inferir que a biodegradação ocorreu ao longo do curto período de experimento (30 dias), o qual foi suficiente para demonstrar a eficácia dos consórcios adotados neste processo. Extrapolando os resultados de biodegradação obtidos para

um tempo maior, será possível que o processo se dê de forma completa, expondo o óleo aos consórcios durante mais tempo.

A análise de ACP relacionou os possíveis fatores ligados diretamente à degradação. Foram agrupados os nutrientes fósforo e carbono com a biodegradação, mostrando uma possível relação entre os fatores e uma maior contribuição nesta biodegradação.

Contudo, foi possível observar que os consórcios fúngicos empregados durante o experimento, se mostraram satisfatoriamente eficientes para a realização da biorremediação em sedimento de manguezal impactado por óleo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACPO - ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AOS POLUENTES. **Associação de Consciência à Prevenção Ocupacional**. CGC: 00.034.558/0001-98. São Sebastião - SP. 2006.

ARAÚJO, F. S. M. e LEMOS, J. L. S. **Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo**. In: X Jornada de Iniciação Científica, Centro de Tecnologia Mineral – CETEM/MCT. 2002.

ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; ELSAS, J.D. van; VUURDE, J.W.L. van; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4906-4914, 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.

BARROS, C. A. **Um Estudo sobre Biorremediação: uma ciência levada à sala de aula**. Monografia apresentada no final do curso de Licenciatura em Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. 60 p. 2006.

BERNINI, E; REZENDE, C. E. Estrutura da vegetação em florestas de mangue do estuário do rio Paraíba do Sul, Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasiliensis**, v. 18, n.3, p. 491-502. 2004.

BISOGNIN, R.P. **Análise do potencial microbiano de uma biopilha na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos**. Dissertação de mestrado. Santa Cruz do Sul. 2012.

BOTELHO, A. L. **Análise da contaminação por óleo na APA de Guapimirim – RJ Aspectos Geoquímicos e socioambientais**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ. 2003.

BURNS, K. A.; CODI, S.; SWANNELL, R. J. P. & DUKE, N. C. Assessing the Oil Degradation Potential of Endogenous Microorganisms in Tropical Marine Wetlands. **Mangroves and Salt Marshes** 3: 155-164. 1999.

CARVALHO, L. V. M.. **Estudo da qualidade da água superficial em zona estuarina no Rio São Paulo – Região de Candeias- Ba**. 129f. Dissertação (Mestrado em Geologia), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas\\_contaminadas/etapas.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/etapas.asp)>. 2007.

CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas\\_contaminadas/Capitulo\\_X.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/Capitulo_X.pdf)>. 2007.

CHAINEAU, C. H.; MOREL, J.; DUPONT, J.; BURY, E.; OUDOT, J. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. **Sci Total Environ**, v. 227, n. 2-3, p. 237-47, 1999.

CHOSSON, P.; LANAU, C.; CONNAN, J. & DESSORT, D. Biodegradation of refractory hydrocarbon biomarkers from petroleum under laboratory conditions. **Nature**, 351: 640–642. 1991.

COELHO, M.A.Z. et al. **Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais: Produção de Enzimas a partir da Casca de Coco Verde**. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 3342. 2001.

COLLA, L.M.; PRIMAZ, A.L.; LIMA, M.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciênc. agrotec.** Lavras, v. 32, n. 3, p. 809-813, maio/jun., 2008.

COLLA, T. S. **Avaliação da biorremediação de solo contaminado pela mistura b10 por consórcio bacteriano**. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) – Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. Derrames de Óleo no Mar e os Ecossistemas Costeiros. São Paulo. **Apostila de Curso**. 2002.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. Derrames de Óleo no Mar e os Ecossistemas Costeiros. São Paulo. **Apostila de Curso**. 2002.

CRAPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S. & PEREIRA, D.C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência hoje**, 30: 179. 2002.

CRUZ, G.F.; MARSAIOLI, A.J. Processos naturais de biodegradação do petróleo em reservatórios. **Quim. Nova**, Vol. 35, No. 8, 1628-1634, 2012.

CUNHA, C.D. **Avaliação da Biodegradação de Gasolina em Solo**. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brazil, 97p.1996.

CURY, J. C. **Atividade Microbiana e Diversidade Metabólica e Genética em solo de Mangue Contaminado com Petróleo**. Monografia. Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” – Universidade de São Paulo. 2002.

DECESARO, A. **Bioestimulação de solo contaminado por compostos oleosos com biomassa microalgal inativa**. Monografia. Passo Fundo, 2013.

DINESH, R.; CHAUDHURI, S.G.; GANESHAMURTHY, A.N.; PRAMANIK, S.C. Biochemical properties of soils of undisturbed and disturbed mangrove forests of South Andaman (India). **Wetlands Ecology and Management**, v. 12, pp. 309–320, 2004.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Análise de Nitrato e Amônio em Solo e Água**. ISSN 1518-4277. Dezembro, 2010.

FARIAS, T.; ALVES, E.; COSTA, I.; SARAIVA, L.; BARRETO, R.; LIMA, S.M.M. **Utilização de fungos na degradação de compostos fenólicos de derivados de petróleo**. Congresso Norte Nordeste de pesquisa e inovação. 2012.

FIORAVANTI, K.L. **Seleção de consórcios microbianos de sedimentos de manguezais com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo**. Dissertação. Salvador, 2013.

FONSECA, S. M.; DRUMMOND, J. A. Reflorestamento de manguezais e o valor de resgate para o seqüestro de carbono atmosférico. **História, Ciência, Saúde – Manguinhos. Nota de Pesquisa**. Vol. 10(3): 1071-1081, set.-dez. 2003.

GIORDANI, D.S. **Estudo do equilíbrio de fases sólido-líquido em sistemas modelo de hidrocarbonetos de alto peso molecular**. Dissertação de mestrado. Campinas. Maio de 1996.

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

JESUS, R. S. **Metais traço em sedimento e no molusco bivalve *Anomalocardia brasiliiana* (GMELIN, 1791), municípios de Madre de Deus e de Saubara, Bahia**. 100 p. Dissertação (Mestrado em Geoquímica: Petróleo e Meio Ambiente). Bahia. 2011.

KANALY, R.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. **Journal Bacteriology**, v. 182, p. 2059–2067, 2000.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming”**. Tese (Doutor) – Instituto de Biociências,Unesp – Rio Claro, 2001.

KOLESNIKOVAS, C. et al. Avaliação de risco toxicológico para hidrocarbonetos totais de petróleo em forma fracionada aplicada à gestão e monitoramento de água subterrânea em um complexo industrial. **Revista Águas Subterrâneas**, v.23, n.01, p.31-44, 2009.

LE MOS, J.L.S.; BARROS, C.A.; OLIVEIRA, S.D.; REICHE, A.P. **Fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs)**. Rio de Janeiro, 2008.

LE MOS, J.L.S.; OLIVEIRA, S.D.; BARROS, C. A.; SCHLITTER, L.A.F.S. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPS), propriedades que afetam sua degradação. **Diálogos & Ciência** – Revista da rede de ensino FTC. Ano III, n. 11, dez. 2009.

LIMA, D. F. **Biorremediação em sedimentos impactados por petróleo na Bahia de Todos os Santos, Bahia: avaliação na degradação de hidrocarbonetos saturados**. 2010, 234f. Dissertação (Mestrado em Geologia), Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA, 2010.

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, Novembro, 2011.

LIMA, D.F.; **Avaliação de processos geoquímicos e da eficiência de consórcios fúngicos em testes de simulação da biorremediação em sedimentos de manguezal contaminados com óleo.** 2014, 229f. Tese (Doutorado em Geologia), Universidade Federal da Bahia, Salvador- BA, 2014.

LUVIZOTTO, D.M. **Transformações do nitrogênio e diversidade de *Planctomycetes* em sedimentos de manguezais.** Tese de doutorado. 2013.

MACEDO, R.C.; BERBERT, V.H.C.; LEMOS, J.L.S.; TRINDADE, P.V.O.; RIZZO, A.C.L. **Biorremediação de solos impactados por óleo cru utilizando fungos filamentosos.** Nilópolis.

MARIANO, A. P.; TOMASELLA, R. C.; MARCONDES DE OLIVEIRA, L.; CONTIERO, J.; DE ANGELIS, F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology.** v.7, n 9, p.1323-1328, 2008.

MARIANO, A.P.; KATAOKA, A.P.A.G.; ANGELIS, D.F. & BONOTTO, D.M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38: 346-353.

MARQUES JR., A. N.; MORAES, R. B. C.; MAURAT, M. C. Poluição Marinha. **Biologia Marinha.** 2ªed. Rio de Janeiro. Ed. Interciência, Cap. 21. p.505-528.631.2009.

MARTINS, B.A.D. **Avaliação da cinética de biodegradação do etanol em concentrações mínimas necessárias dos nutrientes nitrogênio e fósforo.** Tese de mestrado. Florianópolis, Santa Catarina. Março, 2004.

MEIRA, R. C. **Estudo biodegradativo dos resíduos sólidos urbanos das cidades de Campina Grande – PB em escala experimental.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Campina Grande, 2009.

MELLO, J.M.M. **Biodegradação dos compostos BTEX em um reator com biofilme.** 05/2007.152f. Dissertação de (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2007.

MELLO, P.S; FABRIN-NETO, J.B; DE MOARES, S.G; ASSALIN, M.R; DURAN, N; HAUN, M. Comparative toxicity of effluents processed by diferente treatments in V79 fibroblast and the *Algae Slenastrum capricornutum*. **Chemosphere**, v.62, p.1207-1213, 2006.

MENEGHETTI, L. **Biorremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel.** Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Área de concentração: Infra-estrutura e Meio Ambiente – Faculdade de Engenharia e Arquitetura, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2007.

MEYER, D.D. **Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e de biodiesel (B0, B20, B100) em dois solos com diferentes granulometrias.** Tese de mestrado. Porto Alegre. Março de 2011.

MILHOMEM, P. S. et al. Bacias Sedimentares Brasileiras: Bacia do Recôncavo. **Fundação Paleontológica Phoenix**, v. 5, n. 51, 2003.

MOLINA-BARAHONA, L. et al. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, 27: 165–175. 2004.

MOLLEA, C.; BOSCO, F. & RUGGERI, B. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. **Chemosphere**, 2005.

MORAIS, E. B. **Biodegradação de Resíduos Oleosos Provenientes de Refinaria de Petróleo Através do Sistema de Biopilhas**. Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. 2005.

NAKAGAWA, L. E.; ANDRÉA, M.M. Efeito de Alterações nas Características do Solo sobre a Degradação de Hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 30, 575-582. 2006.

OLIVEIRA, S. D.; BAISCH, P. R.; MACHADO, M. I. **Degradação do petróleo em ambiente estuarino na Lagoa dos Patos através de um derrame induzido**. 4º PDPETRO, Campinas, 7 p., out. 2007.

OLIVEIRA, S.D. **Avaliação das técnicas de bioaumento fúngico e bioestímulo em processos de biorremediação utilizando solo contaminado por petróleo**. Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado. 2008.

OLIVEIRA, S.D. **Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por petróleo**. Rio de Janeiro. Serie Tecnológica Ambiental. v.45. 67p. CETEM/MCT. 2008.

OLIVEIRA, S.D. **Emprego de fungos filamentosos na biorremediação de solos contaminados por petróleo: estado da arte**. Rio de Janeiro, 2008.

ORTIZ, I., VELASCO, A., REVAH, S. Effect of toluene as gaseous cosubstrate in bioremediation of hydrocarbon-polluted soil. **Journal of Hazardous Materials**, B131:112–117. 2006.

PEDROTI, G. I. **Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos**. Dissertação (Mestre em Engenharia Ambiental) - Pós – Graduação em Engenharia Ambiental do Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2007.

PEDROTI, G. I. **Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos**. Vitória, UFES, 2007.

PEREIRA, A.R.B.; FREITAS, D.A.F. Uso do microorganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v(6), nº 6, p. 975 – 1006, (e-ISSN: 2236-1170). Lavras, 2012.

RAVELET, C., KRIVOBOK, S., SAGE, L., STEIMAN, R. Biodegradation of Pyrene by Sediment Fungi, **Chemosphere**, v. 40, pp. 557-563. 2000.

REGINATTO, C.; KORF, P.E.; THOMÉ, A.; COLLA, L.M. **Biorremediação de solo contaminado com óleo de soja através de atenuação natural e**

**bioaumentação por *Aspergillus fumigatus*.** Resumo expandido. XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos. Caxias do Sul – RS. 2011.

REZENDE, C. E.; LACERDA, L. D.; BERNINI, E.; SILVA, C. A. R., OVALLE, A. R. C., ARAGON G. T. Ecologia e Biogeoquímica de Manguezal. **Biologia Marinha**. 2ª ed., Rio de Janeiro. Ed. Interciência. Cap. 15, p. 361-382. 631. 2009.

REZENDE, C. E.; LACERDA, L. D.; BERNINI, E.; SILVA, C. A. R., OVALLE, A. R. C., ARAGON G. T. Ecologia e Biogeoquímica de Manguezal. **Biologia Marinha**. 2ª ed., Rio de Janeiro. Ed. Interciência. Cap. 15, p. 361-382. 631. 2009.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H. e CARDOSO, Arnaldo A. **Introdução à Química Ambiental**. 2ª.ed. Porto alegre: Brookman, 2010.

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.

SALANITRO, J. P. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil. **Advances in Agronomy**, 72: 53-105. 2001.

SANTESTEVAN, V.A. **Caracterização de frações de petróleo brasileiro por cromatografia gasosa**. Monografia. Porto Alegre, 2008.

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.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, v. 136, n. 1, p. 187 – 195, 2005.

SEABRA, P.N.C. **Aplicação de Biopilha na Biorremediação de Solos Argilosos Contaminados com Petróleo**. Tese. Rio de Janeiro, 2005.

SILVA, A.M.F.D. **Biodegradação de petróleo e produção de biossurfactante por bactérias nativas do sedimento do manguezal de Gargaú, São Francisco do Itabapoana – RJ**. Monografia. Universidade Estadual do Norte Fluminense. Darcy Ribeiro – UENF. Campo dos Goytacazes. 2011.

SILVA, R.R.; COELHO, G.D. **Fungos – Principais grupos e aplicações biotecnológicas**. São Paulo, outubro de 2006.

SILVA, T. R.; VALDMAN, E.; VALDMAN, B.; LEITE, S. G. F. Salicylic acid degradation from aqueous solutions using *Pseudomonas fluorescens* HK44: parameters studies and application tools. **Brazilian Journal of Microbiology**. n. 38, p. 39-44. 2007.

SOLOMONS, T.W.G., FRYHLE, C.B. **Química orgânica**. 8. ed., 2v, Rio de Janeiro, 2005.

TIBURTIUS, E.R.L.; ZAMORA, P.P.; LEAL, E.S. Contaminação de águas por BTXs e Processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Quim. Nova**. v. 27, p. 441-446, 2004.

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): 1027-1035, 2010.

TORTELLA, G.R.; DIEZ, M.C.; DURÁN, N. Fungal Diversity and Use in Decomposition of Environmental Pollutants. **Critical Reviews in Microbiology**, v.3, p.197-212, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed. Artmed. 827p. 2000.

TRINDADE, P. V. O. **Avaliação das técnicas de bioaugmentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.

VALLEJO, V.; SALGADO, L.; ROLDAN, F.. Evaluacion de la bioestimulacion em la biodegradacion de TPHs em suelos contaminados com petróleo. Bioestimulation process during the biodegradation of THH in oil contaminated soil. **Rev. colomb. Biotecnol**. Vol. VII no. 2, p.67-78, 2005.

WALKLEY, A. 1947. A critical examination of a rapid method for determining organic carbon m soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. **Soil Sci**. 63:251-263. 1947.

WETLER, R. M. C. **Prospecção de microrganismos responsáveis pela degradação de compostos de petróleo no sedimento de um manguezal localizado no sul da Bahia (Brasil)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – BA. 85p. 2006.

YOKOYA, N. S. Distribuição e Origem In: SCHAEFFER-NOVELLI, Y. (Org.). Manguezal: ecossistema entre a terra e o mar. **Caribbean Ecological Research**. São Paulo. 64p. 1995.

YU, S.H.; KE, L.; WONG, Y.S. & TAM, N.F.Y. Degradation of polycyclic sediments. **Environment International**, 31: 149-154. 2005.

ZÍLIO, E. L. & PINTO, U. B. Identificação e distribuição dos principais grupos de compostos presentes nos petróleos brasileiros. **Boletim Técnico PETROBRAS**, Rio de Janeiro, 45 (1): 21-25, jan./mar. 2002.

