

CARLA GABRIELA BRAGA DE OLIVEIRA

UTILIZAÇÃO DE FONTES OLEOFÍLICAS DE NITROGÊNIO E
FÓSFORO PARA BIORREMEDIAÇÃO DE PETRÓLEO EM
AREIA DE PRAIA

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O48u
2011

Oliveira, Carla Gabriela Braga de, 1986-
Utilização de fontes oleofílicas de nitrogênio e fósforo
para biorremediação de petróleo em areia de praia / Carla
Gabriela Braga de Oliveira. – Viçosa, MG, 2011.
viii, 38f. : il. ; 29cm.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 36-38

1. Biorremediação. 2. Petróleo. 3. Nutrientes. 4. Areia.
5. Praias. 6. Bactérias. I. Universidade Federal de Viçosa.
II. Título.

CDD 22. ed. 665.5

CARLA GABRIELA BRAGA DE OLIVEIRA

UTILIZAÇÃO DE FONTES OLEOFÍLICAS DE NITROGÊNIO E
FÓSFORO PARA BIORREMEDIAÇÃO DE PETRÓLEO EM
AREIA DE PRAIA

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 05 de setembro de 2011.

Prof. Arnaldo Chaer Borges

Prof. Adriano Guimarães Parreira

Prof^a. Marisa Vieira de Queiroz
(Co-orientadora)

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

Ao Deus incomparável, que não se
esqueceu de mim ao longo
do deserto.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem Ele eu não estaria aqui. Ele me trouxe para Viçosa e cuidou de mim, dando-me forças para continuar caminhando quando eu achava que não era mais capaz.

À minha família, pelo apoio sempre presente apesar da distância, pelas palavras de encorajamento e exortação ao telefone, pelas risadas e orações.

Ao Tetsu, pelo companheirismo constante, por sua paciência surpreendente, pela ajuda em momentos críticos. Você é único!

Aos integrantes e agregados da república *Playground*, Sete, Yurie, Rubens, Keita, Robinho, Lina e Rafael, pela amizade e comidas gostosas.

Aos meus irmãos (quase) gêmeos do trio Petro, Daniel e Guilherme, por tornarem o trabalho do mestrado muito mais divertido, pelos estudos para as provas e cantorias na minha janela. Nunca alguém imaginou que um paulista, uma mineira e um mato-grossense se dariam tão bem.

Aos meus colegas de laboratório, Péricles, Patrícia, Fernanda, Gisele, Fábio, por me ajudarem a realmente me sentir parte da equipe. Foi muito bom trabalhar ao lado de vocês.

À Diana, pelo acompanhamento imprescindível ao longo deste trabalho.

Aos técnicos Karlos, Rita, Jackeline e Regina.

Ao Simão e à Suimara por suas contribuições durante uma das análises.

Às minhas coorientadoras, professora Denise Mara Soares Bazzolli e professora Marisa Vieira de Queiroz, pelos ensinamentos teóricos e práticos e pelas palavras de incentivo.

Ao meu orientador, professor Marcos Rogério Tótola, pela confiança depositava, pelos recursos e pelas soluções apresentadas em tempos oportunos.

Aos membros da banca, os professores Arnaldo Chaer Borges e Adriano Guimarães Parreira.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Microbiologia, pela estrutura e pela oportunidade de fazer parte de um programa de pós-graduação de excelência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela Bolsa de Mestrado.

É melhor haver dois do que um, porque duas pessoas
trabalhando juntas podem ganhar muito mais. Se
uma delas cai, a outra a ajuda a se levantar.”

Eclesiastes 4. 9-10a

BIOGRAFIA

Carla Gabriela Braga de Oliveira, filha de Antônio Carlos de Oliveira e Liliana Braga de Oliveira, nasceu em 12 de setembro de 1986 em Belo Horizonte, Minas Gerais. Iniciou a graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa em março de 2005. Foi membro do Programa de Educação Tutorial no período de outubro de 2005 a junho de 2009, tendo se graduado em julho de 2009. Em agosto do mesmo ano iniciou o mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO	3
3 MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1 Materiais utilizados.....	9
3.2 Seleção dos isolados bacterianos.....	9
3.3 Avaliação da utilização de resinas oleofílicas como fonte de nitrogênio e de fósforo na biodegradação de petróleo cru.....	11
3.4 Comparação entre as fontes oleofílicas e hidrofílicas de nitrogênio e fósforo	12
3.4.1 Enumeração de UFC.mL ⁻¹ na água dos microcosmos.....	14
3.4.2 Avaliação da concentração de nitrogênio e de fósforo na água dos microcosmos.....	14
3.4.3 Quantificação do óleo na água e na areia dos microcosmos	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Utilização de resinas oleofílicas como fonte de nitrogênio e de fósforo na biodegradação de petróleo cru.....	16
4.2 Comparação entre as fontes oleofílicas e hidrofílicas de nitrogênio e fósforo	18
4.2.1 Remoção de nitrogênio e de fósforo	18
4.2.2 Enumeração de UFC.mL ⁻¹ na água dos microcosmos.....	25
4.2.3 Biodegradação do petróleo nos microcosmos	29
5. CONCLUSÕES	35
6. REFERÊNCIAS	36

RESUMO

OLIVEIRA, Carla Gabriela Braga de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2011. **Utilização de fontes oleofílicas de nitrogênio e fósforo para biorremediação de petróleo em areia de praia.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientadoras: Denise Mara Soares Bazzolli e Marisa Vieira de Queiroz.

A degradação de hidrocarbonetos de petróleo por micro-organismos em ambientes costeiros é uma estratégia extremamente interessante de remediação desses compostos enquanto contaminantes ambientais. No entanto, essa biodegradação é frequentemente limitada pela disponibilidade de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo. Neste trabalho foi comparado o efeito da adição de fontes de nitrogênio e fósforo solúveis em água (uréia e KH_2PO_4) e oleofílicas (resina uréia-formaldeído e lecitina de soja) sobre a degradação de petróleo cru, em microcosmos de areia de praia, por micro-organismos nativos ou adicionados em consórcios. As fontes de nutrientes foram ainda comparadas quanto a sua retenção no sedimento contaminado após trocas diárias de água. Para isso, realizou-se contagens de UFC.mL^{-1} e análises da concentração de nitrogênio e de fósforo na água. O óleo remanescente na areia foi extraído com hexano e quantificado por espectrofotometria, sendo a degradação correspondente a diferença entre as quantidades inicial e final de petróleo. Verificou-se que os nutrientes hidrossolúveis não permaneceram no sedimento, mas foram gradativamente lavados pela remoção diária de água. Um comportamento inverso ocorreu para os nutrientes oleofílicos, sendo essa uma característica desejável para sua aplicação em ambientes com intensa ação de ondas e marés. Apesar da maior retenção de nutrientes quando esses são oleofílicos, não se verificou diferenças consideráveis nas contagens microbianas entre os dois tratamentos. Além disso, a degradação do óleo ocorreu principalmente naqueles microcosmos supridos com os nutrientes solúveis em água. Embora os micro-organismos inoculados sejam capazes de utilizar as fontes oleofílicas como nutrientes, estudos mais detalhados da concentração a ser aplicada e da disponibilização desses nutrientes para os micro-organismos são necessários, a fim de se maximizar o estímulo gerado.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Carla Gabriela Braga de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2011. **Utilization of oleophilic sources of nitrogen and phosphorus for petroleum bioremediation in beach sand.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-advisers: Denise Mara Soares Bazzolli and Marisa Vieira de Queiroz.

Degradation of petroleum hydrocarbons by micro-organisms in coastal environments is a very interesting strategy for remediation of these compounds. However, microbial degradation is often limited by nutrients availability, particularly nitrogen and phosphorus. In this work, we compared the effect of addition of water-soluble (urea and KH_2PO_4) or oleophilic (urea-formaldehyde resin and soy lecithin) nitrogen and phosphorus sources on oil degradation by indigenous micro-organisms and bacteria in consortia in microcosms composed by beach sand contaminated with crude oil. The microcosms were submitted to daily water exchanges representing tides activities. We also analysed the retention capability of both nutrient sources in contaminated sediment. For this, we performed UFC.mL^{-1} counts and quantification of nitrogen and phosphorus concentrations in the water during the experiment. The remaining oil in the sand was extracted with hexane and quantified by spectrophotometry, in which the degradation corresponds to the difference between the initial and final amounts of oil. Water-soluble nutrients have been shown to be gradually washed away during the water exchange and not remained in the sediment for bacterial supply. However, an opposite pattern was verified for oleophilic nutrients, which is a desirable feature for application in environments with intense action of waves and tides. Despite the increased retention of oleophilic nutrients, there were no significant differences in microbial counts between both treatments. In addition, oil degradation occurred mainly in those microcosms supplied with water-soluble nutrients. Although the inoculated micro-organisms are able to use the oleophilic nutrient sources, more detailed studies on the concentration of nutrients to be applied and the availability of nutrients for micro-organisms are necessary in order to maximize the stimulus generated.

1 INTRODUÇÃO

Os ambientes marinhos ou sob influência direta do mesmo, a exemplo das regiões costeiras, das águas continentais, das regiões de mangue, dos estuários e das águas oceânicas, são de grande importância ecológica, por abrigarem elevada diversidade de animais, plantas e micro-organismos, além de atividades humanas economicamente relevantes, como turismo, recreação e pesca. Esses ambientes estão sujeitos à contaminação por diferentes classes de produtos relacionados à atividade humana, dentre os quais se destaca o petróleo. Em vista da constante demanda por exploração, estocagem, produção e transporte de petróleo e de seus derivados, derramamentos e vazamentos continuam acontecendo, representando um risco ainda nos dias atuais. Destaca-se, mais recentemente, o vazamento ocorrido em abril de 2010 no Golfo do México, o qual causou a liberação de aproximadamente 4,9 milhões de barris de óleo cru no ambiente. Em vista do grande impacto causado aos ambientes marinhos pelos derramamentos de petróleo, estudos devem ser feitos e estratégias devem ser adotadas para se lidar com tais acidentes e proporcionar a limpeza e a descontaminação dos locais atingidos. Métodos físicos, como barreiras de contenção, remoção mecânica e lavagem usando alta pressão ou água quente, e métodos químicos, como a aplicação de dispersantes e de desmulsificantes, são os mais comumente utilizados, sendo a primeira intervenção com vistas ao tratamento das áreas contaminadas com o óleo. No entanto, esses métodos não proporcionam a total remoção dos contaminantes, havendo ainda preocupação em relação à permanência, no ambiente, dos produtos químicos adicionados. Desde a sua aplicação em larga escala no derramamento do *Exxon Valdez*, em 1989, a biorremediação tem se mostrado uma opção para se lidar com a contaminação de ambientes marinhos por hidrocarbonetos de petróleo. As duas estratégias principais de biorremediação consistem na bioaugmentação (adição de micro-organismos degradadores especializados) e na bioestimulação (adição de nutrientes ou modificação de fatores ambientais, visando estimular populações microbianas autóctones e que possuam rotas de biodegradação dos contaminantes). Diferentes trabalhos apontam a bioestimulação como a estratégia mais efetiva de biorremediação em ambientes marinhos. Nesses ambientes, o derramamento de

óleo gera uma oferta repentina e abundante de carbono e nutrientes essenciais, como nitrogênio e fósforo, tornam-se limitantes para a atividade microbiana. Nas regiões costeiras, o maior desafio é manter concentrações adequadas dos nutrientes em contato com o óleo e biodisponíveis por um período de tempo prolongado. Fontes de nitrogênio e fósforo solúveis em água são facilmente lavadas da areia e rochas, diluindo-se na coluna d'água pela ação das ondas. A aplicação de grande quantidade destes nutrientes solúveis pode ser tóxica para os micro-organismos e a constante reaplicação gera custos adicionais. Uma alternativa para o problema é a utilização de fertilizantes hidrofóbicos de liberação lenta ou de fertilizantes oleofílicos. Esses, por sua característica de hidrofobicidade, associam-se ao óleo, estimulando a biodegradação no seu principal local de ocorrência (interface óleo-água), e não são lavados pela ação das ondas. Dessa forma, é de grande interesse o desenvolvimento de fertilizantes com tais características e que sejam utilizáveis por micro-organismos com potencial de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a utilização de fontes de nitrogênio e fósforo solúveis em água ou oleofílicas em experimentos de biodegradação de óleo cru em areia de praia.

2 REVISÃO

A costa marítima é um ambiente extremamente importante, tanto do ponto de vista da biodiversidade quanto em relação a atividades econômicas, como turismo, recreação e pesca. Ao longo da história, diversos derramamentos de óleo ocorreram em regiões costeiras, causando impactos ambientais que podem durar décadas. Em 24 de março de 1989, o navio *Exxon Valdez* colidiu com um recife no canal *Prince William*, no Alasca, acarretando o derramamento de aproximadamente 37.000 toneladas de óleo. Inicialmente o óleo se espalhou pelo canal e posteriormente afetou também a costa, em uma extensão estimada de 1.800 km no canal e ao longo da costa sul do Alasca. O acidente atraiu grande atenção, pois foi o maior derramamento de óleo em águas americanas até então registrado e atingiu uma área com importante atividade de pesca e vida selvagem. Somente no primeiro ano após o acidente foram gastos mais de \$ 2 bilhões com a limpeza (ITOPF, 2010b). De 2000 a 2010, verificou-se a ocorrência de, em média, 3,3 grandes derramamentos de óleo (acima de 700 toneladas) por ano (ITOPF, 2010a). No primeiro semestre de 2010, ocorreu no Golfo do México um dos maiores vazamentos marinhos de óleo. A explosão do *Deepwater Horizon*, em 20 de abril, deu início ao vazamento de óleo explorado do assoalho marítimo. O vazamento foi interrompido somente em 15 de julho, quando o volume de óleo liberado já ultrapassava a marca de 4,9 milhões de barris de óleo cru. Também no Brasil podem ser citados eventos de vazamento de óleo causando impactos em regiões costeiras. Em janeiro de 2000, na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro-RJ, um oleoduto procedente da Refinaria Duque de Caxias rompeu, em razão de processo de corrosão, liberando 1.300 m³ de óleo. As manchas de óleo espalharam-se e impactaram extensas áreas de praias, costões rochosos, manguezais, ilhas, pontos turísticos e atingiram a fauna local. Em fevereiro de 2004, ocorreu um vazamento de petróleo gerado por uma fenda no oleoduto em São Sebastião-SP. O vazamento atingiu o rio Guaecá e também a praia de Guaecá e outros ambientes, como a Mata Atlântica ciliar (CETESB, 2004). O volume de óleo perdido não foi estimado. Em vista da constante demanda por exploração, estocagem e transporte de óleo, a ocorrência desses derramamentos e vazamentos ainda é um problema em potencial nos dias atuais.

Métodos convencionais (físicos e químicos) de tratamento da área afetada – água do mar e praia – normalmente são os primeiros a serem aplicados. Dentre os métodos físicos, destacam-se a utilização de barreiras de contenção para evitar o espalhamento do óleo, a adição de materiais hidrofóbicos absorventes, a remoção mecânica da superfície contaminada com óleo, a lavagem usando alta pressão ou água quente, a realocação do sedimento contaminado e a combustão *in situ*. Dentre os métodos químicos, incluem-se a aplicação de dispersantes, desemulsificantes, solidificantes e agentes formadores de filme. No entanto, esses métodos raramente possibilitam uma completa limpeza do óleo e, além disso, a aplicação de produtos químicos gera preocupações relacionadas à toxicidade e permanência do produto no ambiente (ZHU e VENOSA, 2001). Desde a sua aplicação em larga escala no derramamento do *Exxon Valdez* em 1989, a biorremediação se mostra uma segunda opção extremamente promissora (ZHU e VENOSA, 2005). A biorremediação consiste em estimular a atividade de micro-organismos capazes de biodegradar compostos poluentes. Duas estratégias principais são utilizadas: bioaugmentação e bioestimulação.

A bioaugmentação consiste na adição de micro-organismos degradadores especializados. É uma estratégia utilizada quando o local a ser tratado não apresenta populações microbianas nativas com a capacidade de degradação necessária ou esses micro-organismos não se encontram em número suficiente (TYAGI et al., 2011). A adição pode ser efetuada com culturas puras ou com consórcios microbianos, embora existam relatos de que a adição de consórcios seja mais eficiente (WANG et al., 2011; TYAGI et al., 2011), uma vez que, normalmente, uma única linhagem não é capaz de metabolizar todos os contaminantes presentes no ambiente. A permanência dos micro-organismos adicionados é um desafio, pois eles devem ser capazes de degradar o(s) poluente(s) nas condições existentes no ambiente, competindo com os micro-organismos indígenas. Ainda, em áreas com histórico de contaminação, é comum a presença de populações microbianas nativas com capacidade de degradação de hidrocarbonetos, cuja abundância tende a se elevar após o aumento da quantidade de óleo. Bactérias e fungos são os principais agentes na degradação de hidrocarbonetos. Em ambientes marinhos, as bactérias predominam no processo de biodegradação dessa classe de contaminantes (SAADOUN e AL-GHZAWI, 2005). Linhagens bacterianas

degradadoras de petróleo nesses ambientes são normalmente isoladas como degradadoras de alcanos e de alguns compostos aromáticos, como tolueno e naftaleno. Várias dessas bactérias marinhas foram isoladas nos últimos anos e são pertencentes aos gêneros *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Marinobacter*, *Neptunomonas*, *Oleiphilus* e *Oleispira* (grupo γ -Proteobacteria) e *Planococcus* (Firmicutes). Muitas dessas bactérias são tidas como “degradadoras profissionais”, pois isolados do gênero *Alcanivorax*, por exemplo, crescem em *n*-alcanos e alcanos ramificados, mas não usam nenhum açúcar ou aminoácido como fonte de carbono (HARAYAMA et al., 2004).

A bioestimulação consiste na adição de nutrientes limitantes ou na alteração de fatores ambientais, como concentração de oxigênio, pH e temperatura a fim de favorecer o processo de degradação. O óleo cru é composto basicamente por carbono e hidrogênio, com pequena quantidade de nitrogênio (0,1-2%) e essencialmente ausência de fósforo. Na maioria dos ambientes, N e P são limitantes, sendo importante a adição desses nutrientes para a ocorrência da biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (RON e ROSENBERG, 2010; WANG et al., 2011; TYAGI et al., 2011). Comumente, esses nutrientes são adicionados na proporção C:N:P de 100:5:1, embora existam modificações (ZHU e VENOSA, 2005). Diferentemente do que é observado em relação à bioaugmentação, parece haver um maior consenso em relação à efetividade da adição de nutrientes como estratégia de biorremediação em ambientes costeiros, especialmente na orla marítima.

Silva e colaboradores (2009) avaliaram o efeito da adição de um fertilizante comercial NPK na biodegradação da fração pesada de um óleo em sedimento arenoso da região da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro-RJ. Quando foi realizada a bioestimulação, 65 % da fração pesada do óleo foram degradados após 60 dias. Em contrapartida, no controle não-tratado, foram degradados 47,3 % no mesmo período. Esse resultado mostra a necessidade e importância da adição de nutrientes, em proporção adequada, para maximizar a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo mais complexos.

Brito e colaboradores (2009) avaliaram a degradação de petróleo em manguezal inoculando um consórcio bacteriano em microcosmos montados *in situ* também na região da Baía de Guanabara, Rio de Janeiro-RJ. Embora o consórcio fosse composto por bactérias isoladas do próprio local e tivessem capacidade

comprovada de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, não houve estímulo significativo da degradação de óleo em comparação com controles não-inoculados. Os autores concluíram que as condições naturais do manguezal influenciaram a degradação nos microcosmos, devido à disponibilidade de outras fontes de carbono. Isso confirma a complexidade dos trabalhos realizados *in situ* e a necessidade de avaliação das particularidades do local a ser biorremediado, a fim de adotar a estratégia mais efetiva.

Vazamentos de óleo que ocorrem em alto-mar normalmente contaminam o terço superior da zona entre-marés, na qual a ação das ondas é grande. Dessa forma, um dos maiores desafios da bioestimulação em regiões costeiras é manter concentrações adequadas de nutrientes em contato com os micro-organismos e o óleo (VENOSA e ZHU, 2003). Wrenn e colaboradores (1997) avaliaram a influência de ondas e marés no transporte de nutrientes, acompanhando o transporte de nitrato de lítio em uma praia de alta-energia (ondas de 0,3 a 1 m de altura) e em outra de baixa-energia (ondas com menos de 3 cm de altura). Na praia com alta-energia, apenas 15 % do lítio aplicado foram recuperados após a primeira maré alta, enquanto 60 % foram recuperados na praia de baixa-energia. O lítio foi completamente removido da praia com alta-energia em quatro dias. Em contrapartida, lítio ainda estava presente na praia de baixa-energia após duas semanas. Assim, a aplicação dos nutrientes na superfície da areia torna-se ineficaz em praias de alta-energia.

As fontes de N e P utilizadas podem ser divididas em três categorias. As fontes solúveis em água, como KNO_3 , NaNO_3 , NH_3NO_3 , K_2HPO_4 , MgNH_4PO_4 , são prontamente disponíveis e fáceis de manipular. No entanto, são facilmente lavadas ou diluídas pela ação de ondas e marés, devendo ser adicionadas com mais frequência. Há ainda o risco dos nutrientes, se adicionados em excesso, terem efeito tóxico para os micro-organismos presentes. As fontes granulares de liberação lenta normalmente consistem em nutrientes inorgânicos cobertos por um material hidrofóbico, como parafina ou óleo vegetal. Essa forma garante um contínuo suprimento do nutriente, evitando o problema de lavagem que ocorre com as fontes hidrossolúveis. Neste caso, o desafio é controlar a taxa de liberação do nutriente. O uso de fontes oleofílicas também é uma solução para a rápida lavagem dos nutrientes solúveis em água. Neste caso, pela característica de hidrofobicidade dos

nutrientes, eles se aderem ao óleo e são constantemente fornecidos na interface óleo-água, local principal de ocorrência de biodegradação do óleo. Uma desvantagem é que os fertilizantes oleofílicos contêm carbono, que pode ser utilizado preferencialmente em relação aos hidrocarbonetos de petróleo (ZHU e VENOSA, 2005).

Rosa e Triguis (2007) montaram um experimento em Macaé, Rio de Janeiro-RJ, simulando um processo de biorremediação de óleo em areia de praia, avaliando quatro fertilizantes como estimulantes da atividade microbiana de degradação: farinha de peixe, melação, fosfato de amônio e um fertilizante de plantas NPK. Somente os dois últimos promoveram aumento de degradação do óleo, possivelmente devido à baixa disponibilidade de N e P no substrato contaminado e à preferência dos micro-organismos por outros compostos orgânicos presentes nos dois primeiros (farinha de peixe e melação). Em razão de seu baixo custo, o fertilizante NPK foi apontado como preferencial. Além disso, não gera toxicidade no meio e estimula crescimento de populações microbianas degradadoras do óleo. Ainda, essa fonte de nutrientes não satura o ambiente, em virtude da sua alta solubilidade em água e ação diária das marés.

Pritchard e colaboradores (1992) citam quatro critérios principais para a escolha do tipo de nutriente a ser utilizado para bioestimulação: (1) facilidade de aplicação, (2) capacidade de retenção nas praias, (3) características de liberação dos componentes nutritivos e (4) ação duradoura. Os mesmos pesquisadores avaliaram a capacidade de um fertilizante oleofílico em estimular a biodegradação de óleo, fazendo experimentos em praias do canal *Prince William*, contaminadas pelo acidente com o *Exxon Valdez*. O fertilizante escolhido foi o Inipol EAP22, um produto comercial produzido em larga escala. Ele consiste em uma micro-emulsão estável composta por uréia (fonte de nitrogênio) envolvida por ácido oléico (carreador). Tri(4-lauril)fosfato (surfactante e fonte de fósforo) age como estabilizante da emulsão e butoxietanol reduz a viscosidade. Os autores constataram que a aplicação desse fertilizante oleofílico promoveu biodegradação do óleo em menos tempo do que nos controles não-tratados com o fertilizante, sendo possível observar visualmente a diferença 10 a 14 dias após a aplicação. No entanto, seu efeito foi fortemente associado ao aporte inicial de nitrogênio e não necessariamente à sua

característica oleofílica (manutenção dos nutrientes próximos aos micro-organismos degradadores).

Rosenberg e colaboradores (1992) realizaram experimentos em laboratório e em campo utilizando um fertilizante hidrofóbico de liberação controlada referido como F-1. Esse é um polímero de uréia-formaldeído que foi utilizado como fonte de nitrogênio e fósforo. Para testar e comparar sua capacidade de retenção junto ao óleo, os pesquisadores misturaram o fertilizante (ou nutrientes hidrossolúveis) com o óleo e água do mar, sendo posteriormente removida a fase aquosa e substituída por nova água do mar sem aditivos. Esse procedimento foi realizado duas vezes. Posteriormente, foram inoculadas culturas microbianas na água e feita a incubação por 120 h. Nas culturas contendo o fertilizante F-1 as contagens foram de 10^7 - 10^8 UFC.mL⁻¹, enquanto nas culturas com nutrientes solúveis em água (sulfato de amônio e tampão fosfato), as contagens foram na ordem de 10^6 UFC.mL⁻¹, mostrando que o fertilizante F-1 foi capaz de suportar elevado crescimento microbiano, mesmo após as trocas de água (diferentemente do tratamento com nutrientes hidrossolúveis, que foram lavados). Em experimentos de campo, duas áreas foram delimitadas em uma praia de Haifa, Israel: em uma delas foram aplicados o fertilizante F-1 e um consórcio bacteriano e a outra permaneceu inalterada. Na área tratada, após 25 dias de avaliação, foi constatada a biodegradação de 84,5 % do óleo contaminante, enquanto que na área-controle, a degradação foi de apenas 15,6 %. A utilização do fertilizante F-1 como fonte de N e P é dependente da degradação microbiana do mesmo, ocorrendo assim uma liberação controlada dos nutrientes. Como nem todos os micro-organismos metabolizam esse fertilizante, sua eficiência no ambiente é garantida com a aplicação conjunta de micro-organismos selecionados para sua utilização e degradação do poluente alvo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA), localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, Minas Gerais.

3.1 Materiais utilizados

A água e a areia utilizadas foram coletadas na praia de Copacabana, Rio de Janeiro-RJ, em maio de 2011. As mesmas foram mantidas sob refrigeração até o momento da sua utilização.

O petróleo (14,4 °API) utilizado foi previamente aquecido a 210 °C (aumento de 10 °C a cada 5 min) em bloco digestor colocado em capela de exaustão, para volatilização de componentes tóxicos de baixo peso molecular. O objetivo desse procedimento foi simular a modificação na composição do óleo que ocorre por volatilização naturalmente no ambiente.

As resinas avaliadas foram preparadas no LBBMA como polímeros de uréia-formaldeído ou uréia-formaldeído-KH₂PO₄ (LEITE et al., 2008). Elas contêm entre 27-31% de N e foram utilizadas na forma de pó. Na preparação da resina uréia-formaldeído-KH₂PO₄ foi considerada a proporção N:P de 10:1.

3.2 Seleção dos isolados bacterianos

O Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) possui uma coleção de linhagens bacterianas isoladas de locais com histórico de contaminação com hidrocarbonetos de petróleo. A partir dessa coleção, foram selecionados aqueles isolados estudados em consórcios em outros trabalhos

de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo desenvolvidos no LBBMA (PARREIRA, 2005; JÚLIO, 2010). Esses isolados selecionados foram avaliados quanto à sua capacidade de utilização das resinas a partir do seu cultivo no meio mineral Bushnell-Haas (extrato de levedura 0,01 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,2 g.L⁻¹; CaCl₂ 0,02 g.L⁻¹; FeCl₃.6H₂O 0,05 g.L⁻¹) suprido com os polímeros de uréia-formaldeído (com ou sem lecitina de soja) como fontes de N (1,0 g.L⁻¹) e P (2,0 g.L⁻¹) e glicose 1 % como fonte de C. A Tabela 1 traz a relação dos isolados que apresentaram resultado positivo no teste de utilização das resinas, além de sua origem, método de isolamento e identificação.

Tabela 1: Isolados bacterianos, pertencentes à coleção de culturas do LBBMA, que apresentaram resultado positivo¹ no teste de utilização das resinas uréia-formaldeído (mais lecitina de soja) ou uréia-formaldeído-KH₂PO₄ como fonte de N e P em meio mineral Bushnell-Haas contendo glicose como fonte de C, sua origem, método de isolamento e identificação

Código do isolado	Origem	Tipo de isolamento	Identificação²
01	Solo de <i>ladfarming</i> REGAP ³	Isolamento direto	<i>Bacillus cereus</i>
20	Água de lagoa aerada REGAP	Isolamento direto	<i>Bacillus megaterium</i>
53	Solo de <i>ladfarming</i> REGAP	Cultura de enriquecimento em petróleo	<i>Acinetobacter</i> sp.
58	Solo de <i>ladfarming</i> REGAP	Cultura de enriquecimento em gasolina A ⁴	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
63	-	-	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
75	Solo de <i>ladfarming</i> REGAP	Cultura de enriquecimento em petróleo	<i>Pseudomonas balearica</i>
88 B	Solo de <i>ladfarming</i> REGAP	Cultura de enriquecimento em gasolina C ⁵	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
91	Solo de <i>ladfarming</i> REGAP	Cultura de enriquecimento em gasolina A	<i>Pseudomonas</i> sp.
92	Solo da oficina mecânica UFV ⁶	Isolamento direto	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
101 B	Solo da oficina mecânica UFV	Isolamento direto	<i>Burkholderia caryophylli</i>
112 A	Sedimento de mangue REDUC ⁷	Cultura de enriquecimento em petróleo	<i>Staphylococcus intermedius</i>
161	Solo REDUC	Isolamento direto	-
193	Borra oleosa RECAP ⁸	Isolamento direto	<i>Pseudomonas balearica</i>
195	Borra oleosa RECAP	Isolamento direto	-
ES 11	Solo de <i>ladfarming</i> REGAP	Isolamento direto	<i>Acinetobacter baumannii</i>

¹ Foi considerado resultado positivo quando foi observada turvação do meio de cultura após, no máximo, 110 h de incubação em temperatura ótima de crescimento sob agitação.

² Identificação realizada pelo método MIDI-FAME.

³ Refinaria Gabriel Passos, Betim, Minas Gerais.

⁴ Gasolina pura.

⁵ Gasolina adicionada de 20 % de álcool.

⁶ Universidade Federal de Viçosa.

⁷ Refinaria Duque de Caxias, Duque de Caxias, Rio de Janeiro.

⁸ Refinaria de Capuava, Mauá, São Paulo.

3.3 Avaliação da utilização de resinas oleofílicas como fonte de nitrogênio e de fósforo na biodegradação de petróleo cru

Os 15 isolados bacterianos selecionados no teste de utilização das resinas (Tabela 1) foram avaliados em respirômetro quanto à sua capacidade de utilizar as mesmas resinas como fonte de nutrientes para a degradação de petróleo em areia de praia. Os tratamentos que receberam a aplicação da resina uréia-formaldeído foram suplementados com lecitina de soja (Doremus Alimentos Ltda) como fonte de fósforo. Em frascos respirométricos de 100 mL, foram colocados 10 g de areia de praia e 4 mL de uma mistura de pentano (Sigma-Aldrich[®]) e 200 mg de petróleo (com ou sem lecitina). As fontes de nutrientes foram adicionadas de modo a suprirem 2 g de N e 0,2 g de P/100 g de óleo cru. Os frascos foram deixados abertos em banho-maria a 60 °C, em capela de exaustão, por aproximadamente 12 h, para evaporação do pentano. Os isolados bacterianos foram cultivados em caldo nutriente por aproximadamente 17 h, a 35 °C e 200 rpm. Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas a 14.000g por 2 min. Os pellets foram submetidos a duas lavagens com 1 mL de água do mar autoclavada. Em cada frasco respirométrico, foram adicionados 9,1 mL de água do mar e 500 µL das suspensões bacterianas (um isolado por frasco). Foram ainda preparados dois controles para cada tipo de resina: um controle com petróleo e outro sem petróleo. A emissão de CO₂ foi avaliada durante cinco dias, à temperatura ambiente, empregando-se um respirômetro dotado de detector de CO₂ a infra-vermelho (Sable Systems[®], Las Vegas, USA), com fluxo de ar atmosférico de 300 mL.min⁻¹.

3.4 Comparação entre as fontes oleofílicas e hidrofílicas de nitrogênio e fósforo

Foi realizado um estudo de simulação de condições de biodegradação de petróleo cru em região costeira, usando fontes oleofílicas e hidrofílicas de nitrogênio e fósforo como estimulantes da atividade microbiana. Para montagem dos microcosmos, em tubos Falcon[®] de 50 mL, foram medidos 10 mL de areia de praia (aproximadamente 15 g de areia úmida). As fontes de nutrientes foram adicionadas superficialmente, considerando-se a proporção de 2 g de N e 0,2 g de P/100 g de petróleo. As fontes oleofílicas utilizadas foram a resina uréia-formaldeído e lecitina de soja e as fontes hidrofílicas foram uréia e KH_2PO_4 . Em cada tubo, foram adicionados 3 mL de uma mistura de hexano e petróleo (com ou sem lecitina), correspondendo a uma distribuição de 300 mg de petróleo por tubo. Esse procedimento permitiu uma completa contaminação da areia com o petróleo. Os tubos foram deixados abertos em capela de exaustão até completa evaporação do hexano. Transcorrido esse período, os tubos foram autoclavados a 121 °C por 20 min (com exceção de alguns tubos-controle). Os isolados selecionados no experimento de respirometria foram crescidos em caldo nutriente a 35 °C e 200 rpm por aproximadamente 17 h. Um volume de 1 mL de cada cultura foi centrifugado a 14.000g por 2 min, lavando-se as células por duas vezes com 1 mL de água do mar autoclavada. Em cada tubo foram adicionados 20 mL de água do mar estéril (alguns controles receberam água do mar não-autoclavada) e 20 µL de cada suspensão bacteriana. Foram feitas três repetições para cada consórcio. Na Figura 1 é apresentado o esquema dos consórcios bacterianos avaliados; na Tabela 2 são descritos os controles estabelecidos.

Diariamente, a água dos tubos era removida e substituída por igual volume de água do mar (estéril ou não), simulando o processo de lavagem da areia por ação das ondas. A água removida era primeiramente vertida em tubo Falcon[®] contendo 10 mL de hexano, agitada e então descartada ou recolhida para análise de nitrogênio e de fósforo. A passagem pelo hexano teve como objetivo recolher o óleo removido juntamente com a água, para posterior quantificação. O volume de hexano foi acertado nos tubos a cada dois dias. Os microcosmos foram mantidos abertos à temperatura ambiente, durante 31 dias. Nesse período, foram realizadas contagens

de UFC.mL⁻¹ e análises da concentração de nitrogênio e de fósforo na água. Ao final, foi quantificado o óleo recolhido com a água e o óleo remanescente na areia. A partir do 21º dia não foi mais realizada troca de água. No 25º dia, N e P foram novamente adicionados aos microcosmos tratados com as fontes hidrossolúveis.

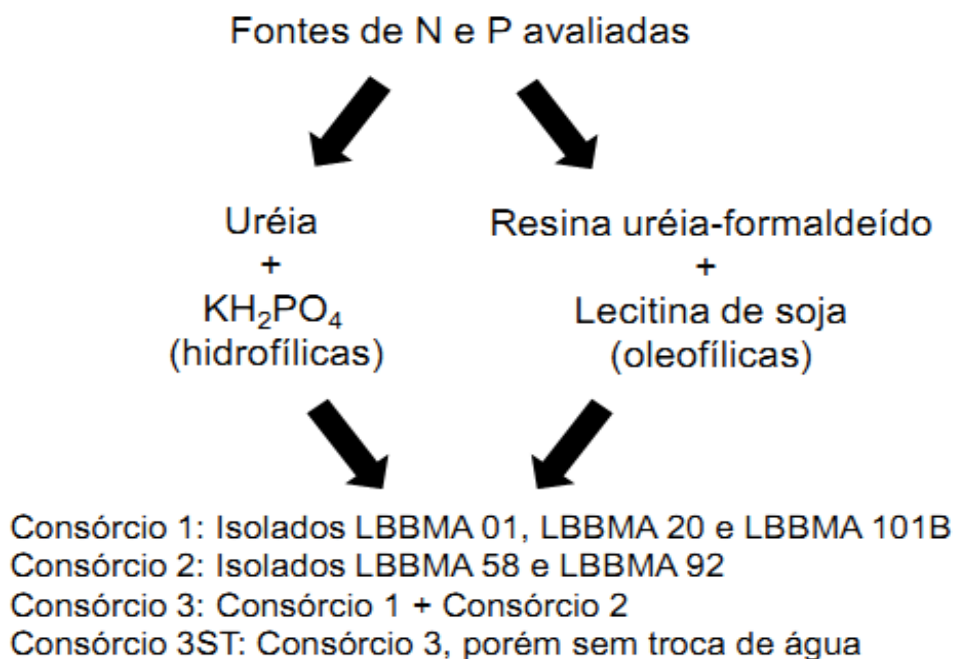


Figura 1: Consórcios bacterianos avaliados no estudo comparativo de fontes hidrofílicas e oleofílicas de N e P como estimulantes de biorremediação em microcosmos de areia de praia e água marinha contaminados com petróleo cru. Cada consórcio foi avaliado em triplicata com cada um dos tipos de fontes de nutrientes.

Tabela 2: Controles experimentais estabelecidos no estudo comparativo de fontes hidrofílicas e oleofílicas de N e P como estimulantes de biorremediação em microcosmos de areia de praia e água marinha contaminados com petróleo cru

Nutrientes	Composição do microcosmo
Com adição de N e P (hidrossolúveis ou oleofílicos)	Areia e água estéreis
	Areia e água não-estéreis
	Somente água estéril
	Somente areia estéril
Sem adição de N e P	Areia e água não-estéreis
	Areia e água não-estéreis + Consórcio 3

*Os tratamentos-controle foram conduzidos com apenas uma repetição.

3.4.1 Enumeração de UFC.mL⁻¹ na água dos microcosmos

Inicialmente a cada dois dias e posteriormente a cada três dias, retirou-se uma alíquota da água contida nos microcosmos para a realização de diluição seriada em água do mar e plaqueamento pela técnica de microgotas (MORTON, 2001) em Agar TSA preparado com água do mar. As placas foram incubadas a 35 °C (exceto as placas inoculadas com os tratamentos-controle, que foram incubadas a 30 °C) por 48 h, seguindo-se as contagens das colônias.

3.4.2 Avaliação da concentração de nitrogênio e de fósforo na água dos microcosmos

As amostras de água, removidas dos microcosmos em diferentes dias ao longo do experimento, foram analisadas quanto à concentração de nitrogênio e de fósforo. A concentração de fósforo foi avaliada espectrofotometricamente com leituras de absorvância a 725 nm, empregando-se o método desenvolvido por Braga e Defelipo (1974, adaptado). A concentração de nitrogênio foi avaliada pelo método de Kjeldahl.

3.4.3 Quantificação do óleo na água e na areia dos microcosmos

Para a quantificação do óleo recolhido da água removida diariamente dos microcosmos, a mistura óleo-hexano foi transferida para tubo Falcon[®] de 50 mL, previamente tarado, e esse deixado em capela de exaustão para a evaporação do solvente. A massa final dos tubos foi determinada após apresentar valor constante. Para a quantificação do óleo residual na areia, foi adicionada uma quantidade de hexano equivalente a, aproximadamente, 3 vezes a quantidade de areia. Os tubos foram tampados e mantidos em agitador orbital tipo *shaker* por 1 h a 60 °C e 300

rpm, em posição horizontal. Posteriormente, foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 min (Centrífuga MR23i, Jouan[®] S.A., France, rotor AM 50.14). De cada tubo foi retirada uma alíquota de 20 µL, diluída em 980 µL de hexano, seguindo-se a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 450 nm. Curva-padrão com diferentes concentrações do petróleo em hexano foi previamente obtida. A biodegradação ocorrida em cada microcosmo foi estimada como:

Biodegradação (mg de petróleo) = quantidade inicial de petróleo (mg) – óleo removido na água (mg) – óleo remanescente na areia (mg).

Os valores foram corrigidos considerando-se a porcentagem de recuperação do óleo presente na areia alcançada com a técnica utilizada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Utilização de resinas oleofílicas como fonte de nitrogênio e de fósforo na biodegradação de petróleo cru

Nenhum dos isolados foi capaz de utilizar a resina uréia-formaldeído-KH₂PO₄ como fonte de nitrogênio e de fósforo nas condições avaliadas (dados não-mostrados). Nos tratamentos que receberam aplicação de resina uréia-formaldeído e lecitina de soja, detectou-se atividade metabólica (estimada como emissão de CO₂) de cinco isolados, a saber: LBBMA 01, LBBMA 20, LBBMA 58, LBBMA 92 e LBBMA 101B (Figura 2). Todos pertencem a espécies comumente associadas com a utilização de hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono e de energia (Tabela 1). Embora esses isolados não sejam originários de ambiente marinho, as condições impostas no experimento (utilização de areia de praia e água marinha) não se mostraram limitantes. Somente esses isolados e a resina uréia-formaldeído e lecitina de soja foram utilizados na etapa posterior de comparação entre fontes oleofílicas e hidrossolúveis de N e P.

A razão da diferença entre os resultados obtidos com a resina uréia-formaldeído-KH₂PO₄ e com a resina uréia-formaldeído mais lecitina de soja não é conhecida. No caso da resina uréia-formaldeído-KH₂PO₄, não se sabe ao certo como o grupo fosfato encontra-se associado à sua estrutura, podendo estar em uma forma não facilmente utilizável pelos micro-organismos estudados. Mesmo utilizando-se uma fonte de fósforo prontamente disponível nos tratamentos com lecitina de soja, somente 5 dentre os 15 isolados bacterianos avaliados apresentaram metabolismo detectável (Figura 2). Os resultados demonstram que nem todos os isolados são capazes de utilizar a resina como fonte de nitrogênio. Resultado similar foi descrito por Rosenberg e colaboradores (1996), em trabalho em que utilizaram um fertilizante hidrofóbico, também baseado em resina uréia-formaldeído. Micro-organismos isolados em cultura de enriquecimento contendo o fertilizante hidrofóbico foram capazes de utilizá-lo satisfatoriamente como fonte de N e de P. Ao contrário, *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-I não apresentou crescimento

quando se utilizou fertilizante hidrofóbico, embora apresentasse crescimento em meio suplementado com petróleo, como fonte de carbono, e com sulfato de amônio e sais de fosfato. Os autores argumentam que o fato seria favorável, uma vez que a fonte hidrofóbica de nutriente estimula a atividade de um grupo específico de micro-organismos adicionados para biorremediação do óleo, conferindo uma vantagem competitiva aos mesmos. Uma questão semelhante foi colocada por Atlas e Bartha (1973), os quais afirmaram que fontes de N e P solúveis em água podem causar afloramentos de algas, associados à eutrofização. Desse modo, a seletividade gerada pelas fontes hidrofóbicas de N e P pode reduzir ou suprimir a contribuição de determinados micro-organismos degradadores, mas também evita o consumo por micro-organismos não-relacionados com a eliminação do óleo.

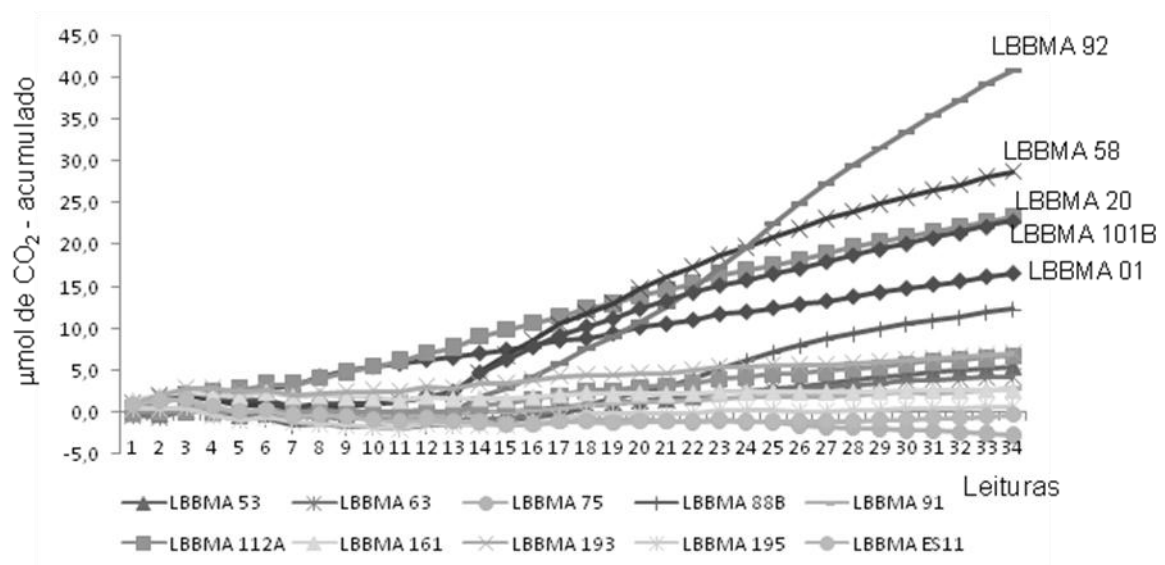


Figura 2: Atividade respiratória de isolados bacterianos, em microcosmos de areia de praia contendo petróleo ($20.000 \text{ mg kg}^{-1}$) como fonte de carbono e fontes oleofílicas de N (resina uréia-formaldeído) e P (lecitina de soja). Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente e avaliados por cinco dias.

4.2 Comparação entre as fontes oleofílicas e hidrofílicas de nitrogênio e fósforo

4.2.1 Remoção de nitrogênio e de fósforo

Houve remoção de fósforo nas quatro primeiras trocas de água, nos tratamentos em que foi utilizada a fonte hidrossolúvel (Figura 3a). A partir da 5ª troca de água, a remoção de P foi insignificante. Nos tratamentos inoculados com os consórcios 1 e 3, 0,36 e 0,34 mg de P foi removido após 21 trocas de água, respectivamente (Figura 3b), o que representa 60 e 56,7 % da quantidade de P adicionada inicialmente (0,6 mg). No tratamento inoculado com o consórcio 2, a remoção de P foi de 46,7 % (0,28 mg) da quantidade inicial. Nos tratamentos que receberam fonte hidrossolúvel de N, verificou-se uma dinâmica de remoção similar à descrita para o fósforo (Figura 3c). No entanto, todo o nitrogênio adicionado inicialmente parece ter sido removido (Figura 3d), sendo os padrões de remoção nos tratamentos com os consórcios 2 e 3 similares.

Os resultados obtidos nos tratamentos-controle (sem inoculação) demonstram a ocorrência de remoção de P e de N também nas quatro primeiras trocas de água (Figuras 4a e 4b). Nos controles *estéril* e *não-estéril* ocorreu remoção de 80,8 % e 94,7 % do N adicionado, respectivamente. No controle em que se utilizou água estéril, ocorreu remoção de todo o nitrogênio adicionado. Já no tratamento-controle com areia estéril, houve remoção de 8,56 mg de N, ou seja, foram removidos 2,56 mg além dos 6 mg inicialmente adicionados (Figura 4c). Tal valor inesperado de remoção pode ter sido decorrente de contaminação com nitrogênio durante a análise. No entanto, observando-se o gráfico de remoção acumulada de P, e considerando-se somente os controles com pelo menos um componente não-estéril (água do mar ou areia), é possível perceber que o padrão de remoção é inverso. No controle *não-estéril* (água e areia não-esterilizados), no qual houve menor remoção de N, houve maior remoção de P (92,8 %). Em contrapartida, no controle *areia estéril*, no qual houve remoção de N além do esperado, ocorreu remoção de apenas 34,7 % de P (Figura 4d).

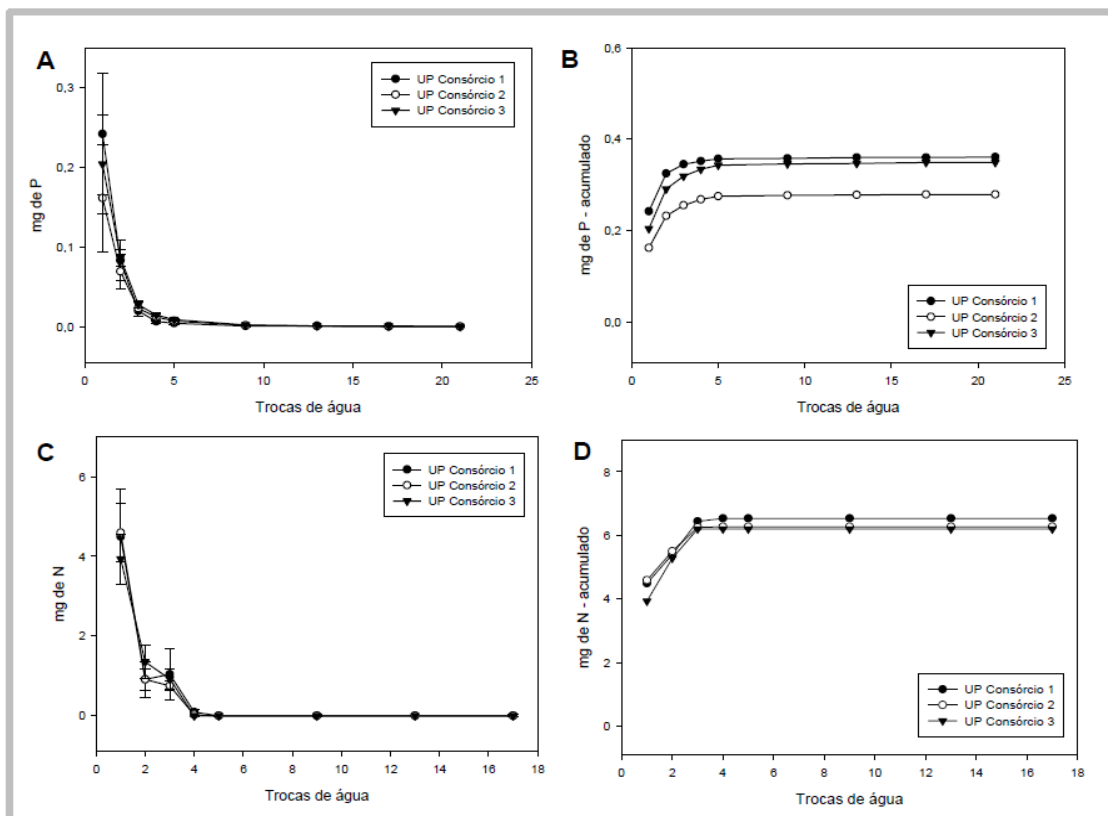


Figura 3: Quantidade de fósforo e nitrogênio removidos a cada troca de água dos microcosmos de areia contaminada com petróleo suplementados com 6 mg de N (13 mg de uréia) e 0,6 mg de P (3 mg de KH_2PO_4). Os microcosmos foram incubados abertos à temperatura ambiente. Cada curva corresponde a um consórcio bacteriano inoculado em microcosmos previamente autoclavados (areia, óleo, nutrientes e água estéreis). Os valores correspondem à médias de três repetições. UP — uréia e KH_2PO_4 adicionados como fonte de nitrogênio e de fósforo, respectivamente. **(A)** mg de P em 20 mL de água removida; **(B)** mg de P em 20 mL de água removida considerando-se os valores acumulados; **(C)** mg de N em 20 mL de água removida; **(D)** mg de N em 20 mL de água removida considerando-se os valores acumulados.

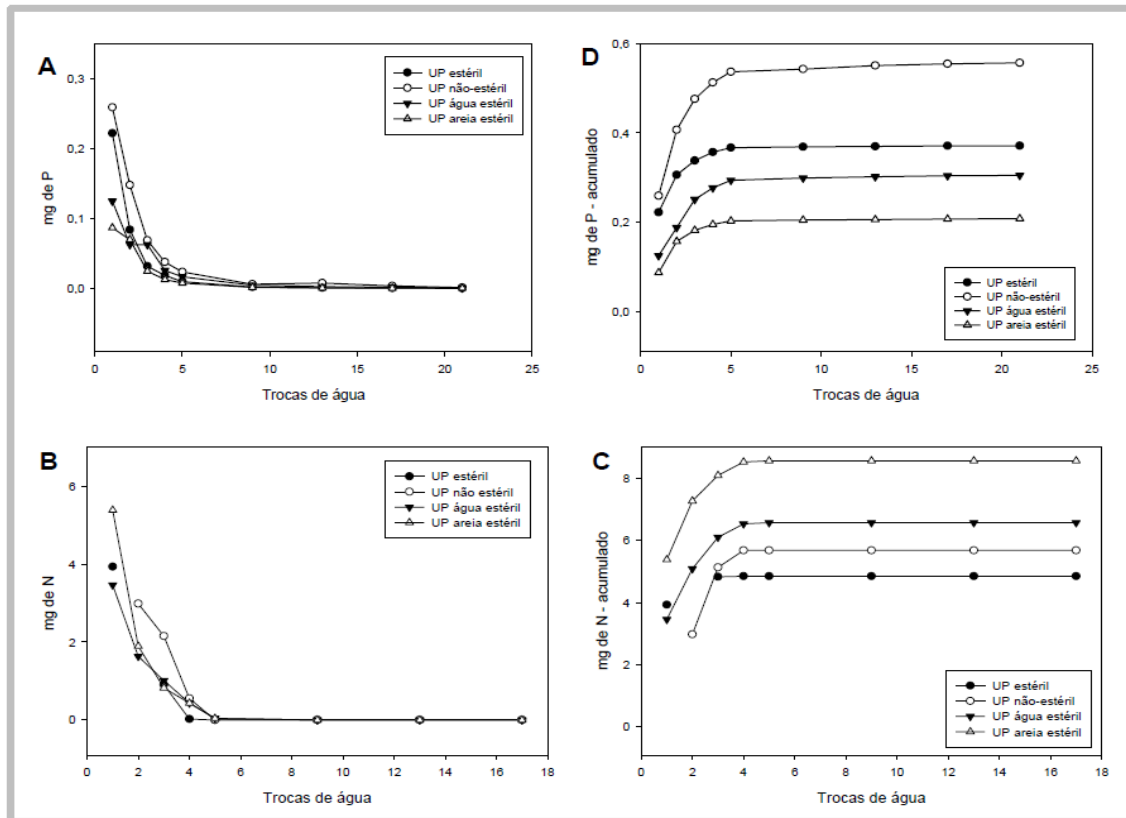


Figura 4: Quantidade de fósforo e nitrogênio removidos a cada troca de água dos microcosmos de areia contaminada com petróleo suplementados com 6 mg de N (13 mg de uréia) e 0,6 mg de P (3 mg de KH_2PO_4). Os microcosmos foram incubados abertos à temperatura ambiente. Cada curva corresponde a um microcosmo não-inoculado. UP – uréia e KH_2PO_4 adicionados como fonte de nitrogênio e de fósforo, respectivamente; Estéril – areia, óleo, nutrientes e água autoclavados; Não-estéril – nenhum componente foi previamente autoclavado; Água estéril – somente a água foi autoclavada; Areia estéril – areia, óleo e nutrientes autoclavados. **(A)** mg de P em 20 mL de água removida; **(B)** mg de N em 20 mL de água removida; **(C)** mg de N em 20 mL de água removida considerando-se os valores acumulados; **(D)** mg de P em 20 mL de água removida considerando-se os valores acumulados.

Nos tratamentos-controle nos quais não foi feita adição de nutrientes, ocorreu uma remoção acumulada de até 0,95 mg de nitrogênio (Figura 5d) e de até 0,002 mg de fósforo (Figura 5b), o que representa as quantidades desses nutrientes naturalmente presentes nas amostras de areia e de água do mar utilizadas.

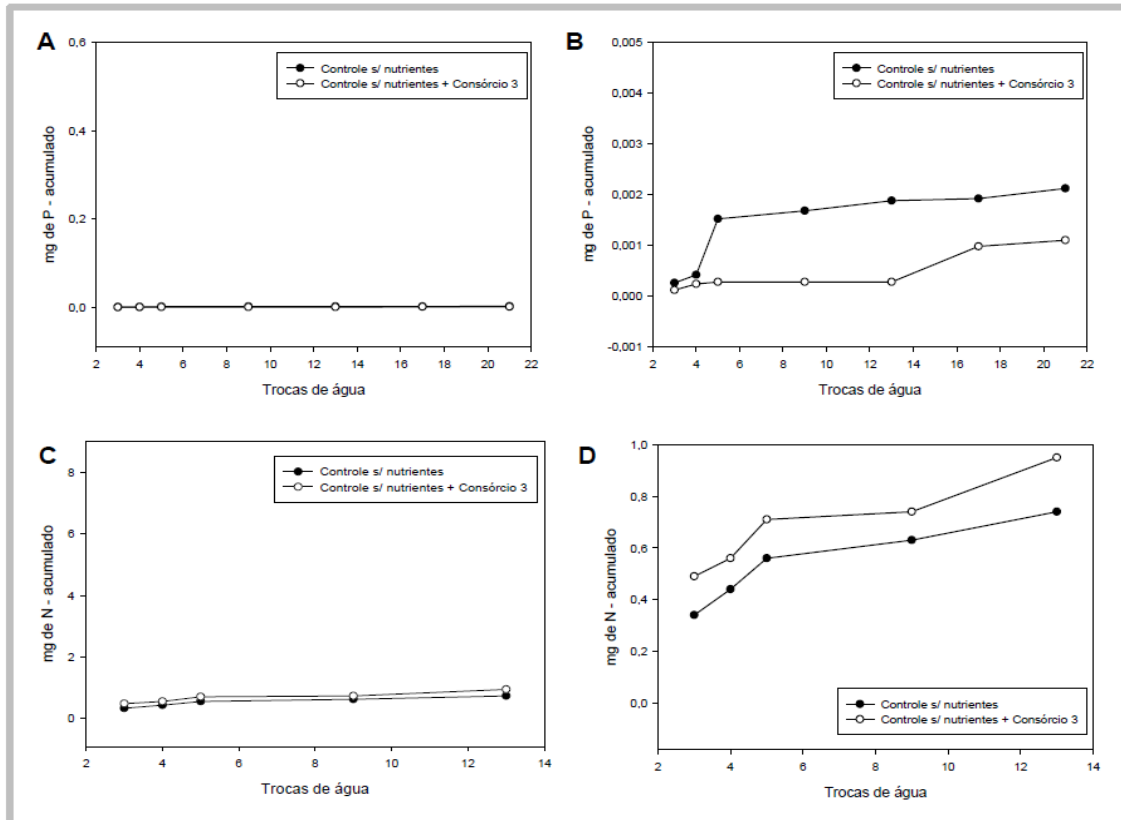


Figura 5: Quantidade de fósforo e nitrogênio removidos a cada troca de água dos microcosmos de areia contaminada com petróleo. Os microcosmos foram incubados abertos à temperatura ambiente. Cada curva corresponde a um microcosmo ao qual não foi feita adição de nutrientes. Nenhum componente dos microcosmos foi previamente autoclavado. A um deles foi adicionado o consórcio bacteriano 3. **(A)** mg de P em 20 mL de água removida considerando-se os valores acumulados; **(B)** mg de P em 20 mL de água removida considerando-se os valores acumulados – gráfico com escala detalhada ; **(C)** mg de N em 20 mL de água removida considerando-se os valores acumulados; **(D)** mg de N em 20 mL de água removida considerando-se os valores acumulados – gráfico com escala detalhada.

A remoção dos nutrientes N e P, nos tratamentos que receberam as fontes oleofílicas, foi bem inferior à verificada nos microcosmos tratados com as fontes hidrossolúveis (Figuras 6 e 7). Praticamente não houve remoção de fósforo (máximo de 0,64 % da quantidade inicialmente aplicada). Houve uma pequena remoção de nitrogênio durante as três primeiras trocas de água, correspondendo, no máximo, a 0,751 mg ou 12,5 % da quantidade inicialmente aplicada. Essa remoção pode corresponder à perda de uréia livre residual do processo de síntese da resina.

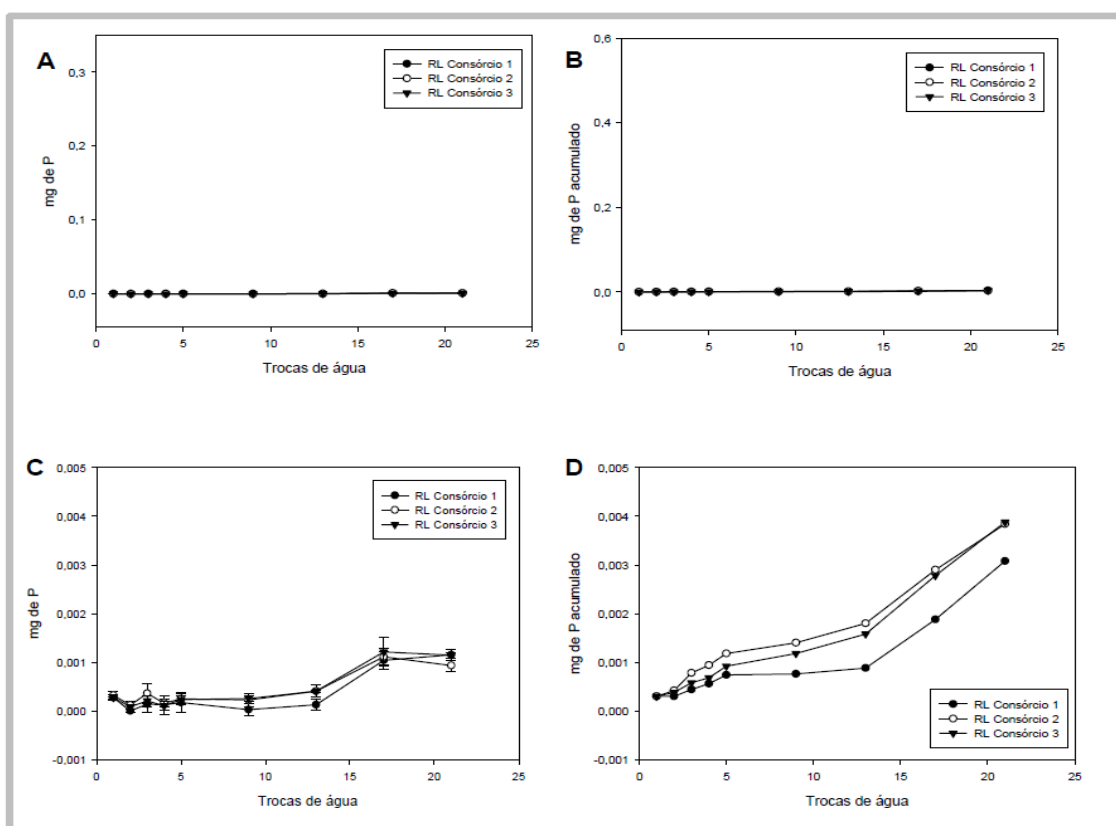


Figura 6: Quantidade de fósforo removido a cada troca de água dos microcosmos de areia contaminada com petróleo suplementados com 0,6 mg de P (21 mg de lecitina de soja). Os microcosmos foram incubados abertos à temperatura ambiente. Cada curva corresponde a um consórcio bacteriano inoculado em microcosmos previamente autoclavados (areia, óleo, nutrientes e água estéreis). Os valores correspondem à médias de três repetições. RL — resina uréia-formaldeído e lecitina de soja adicionadas como fonte de nitrogênio e de fósforo, respectivamente. **(A)** mg de P em 20 mL de água removida; **(B)** mg de P em 20 mL de água removida considerando-se os valores acumulados; **(C)** mg de P em 20 mL de água removida – gráfico com escala detalhada; **(D)** mg de P em 20 mL de água removida considerando-se os valores acumulados – gráfico com escala detalhada.

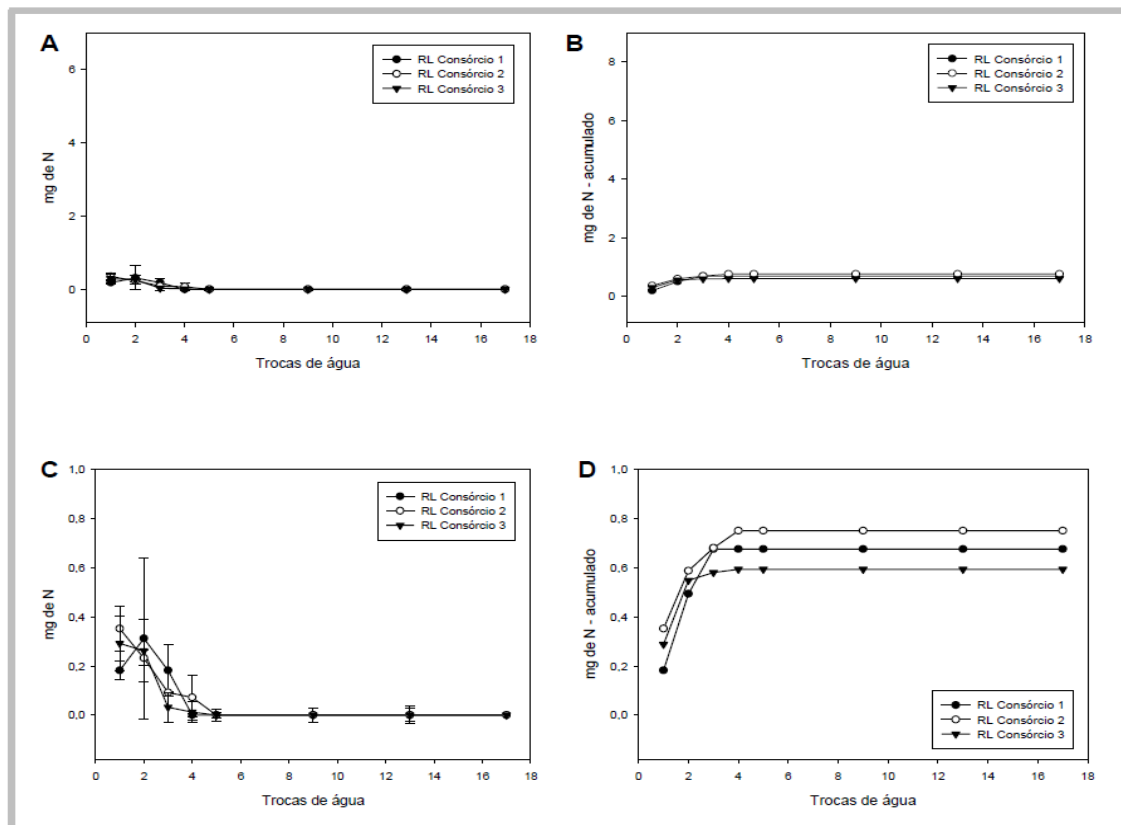


Figura 7: Quantidade de nitrogênio removido a cada troca de água dos microcosmos de areia contaminada com petróleo suplementados com 6 mg de N (19 mg de resina uréia-formaldeído). Os microcosmos foram incubados abertos à temperatura ambiente. Cada curva corresponde a um consórcio bacteriano inoculado em microcosmos previamente autoclavados (areia, óleo, nutrientes e água estéreis). Os valores correspondem à médias de três repetições. RL — resina uréia-formaldeído e lecitina de soja adicionadas como fonte de nitrogênio e de fósforo, respectivamente. **(A)** mg de N em 20 mL de água removida; **(B)** mg de N em 20 mL de água removida considerando os valores acumulados; **(C)** mg de N em 20 mL de água removida – gráfico com escala detalhada; **(D)** mg de N em 20 mL de água removida considerando os valores acumulados – gráfico com escala detalhada.

Em relação aos controles, a remoção também é quase nula em comparação com as fontes hidrossolúveis (Figura 8a e 8b). Em comparação com os microcosmos inoculados com os consórcios, houve remoção de uma quantidade um pouco mais elevada de fósforo (máximo de 0,017 mg acumulado – controle *não-estéril*) e de uma quantidade menor de nitrogênio (máximo de 0,315 mg acumulado – controle *areia estéril*) (Figura 8c e 8d). Os micro-organismos que compunham os consórcios foram selecionados quanto à sua capacidade de utilizar a resina como fonte de nitrogênio. Assim, parte do nitrogênio lavado inicialmente também pode ser originado da

utilização da resina. Os micro-organismos autóctones da água e da areia parecem não possuir a mesma capacidade de utilização da resina, resultando numa liberação menor de nitrogênio na água. Nos controles nos quais houve menor remoção de N, houve maior remoção de P. No controle *estéril*, não houve remoção de nitrogênio e foi observada uma pequena remoção de fósforo, indicando que a liberação do N contido na resina e do P ligado à lecitina de soja está associada à atividade microbiana, e que o P contido na lecitina é lentamente liberado por mecanismos não-biológicos.

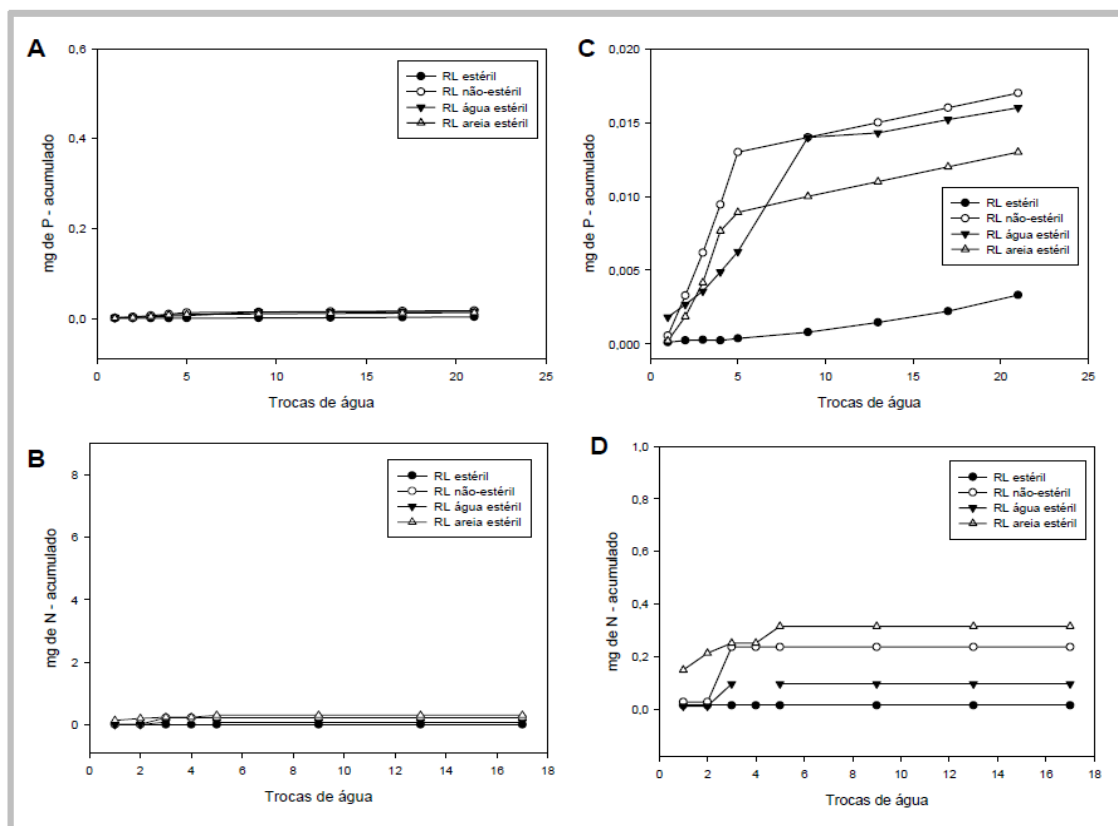


Figura 8: Quantidade de fósforo e nitrogênio removidos a cada troca de água dos microcosmos de areia contaminada com petróleo suplementados com 6 mg de N (19 mg de resina uréia-formaldeído) e 0,6 mg de P (3 mg de lecitina de soja). Os microcosmos foram incubados abertos à temperatura ambiente. Cada curva corresponde a um microcosmo não-inoculado. RL – resina uréia-formaldeído e lecitina de soja adicionadas como fonte de nitrogênio e de fósforo, respectivamente. Estéril – areia, óleo, nutrientes e água autoclavados; Não-estéril – nenhum componente foi previamente autoclavado; Água estéril – somente a água foi autoclavada; Areia estéril – areia, óleo e nutrientes autoclavados. **(A)** mg de P em 20 mL de água removida considerando-se os valores acumulados; **(B)** mg de N em 20 mL de água removida considerando-se os valores acumulados; **(C)** mg de P em 20 mL de água removida considerando-se os valores acumulados – gráfico com escala detalhada; **(D)** mg de N em 20 mL de água removida considerando-se os valores acumulados – gráfico com escala detalhada.

4.2.2 Enumeração de UFC.mL⁻¹ na água dos microcosmos

As contagens microbianas na fase aquosa dos tratamentos que receberam as fontes hidrossolúveis dos nutrientes, mantiveram-se relativamente constantes ao longo do experimento (Figura 9). O resultado foi diferente do esperado (redução das contagens), tendo em vista a remoção dos nutrientes desses microcosmos durante as trocas de água. A manutenção da água nos microcosmos, a partir do 21º dia, não resultou em aumento das contagens microbianas. O resultado foi atribuído à limitação dos nutrientes N e P, os quais foram removidos durante as substituições da água (Figura 9). No 25º dia, os nutrientes foram novamente adicionados aos microcosmos, nas mesmas concentrações iniciais. A adição não resultou em aumento significativo das contagens de micro-organismos, a não ser nos microcosmos inoculados com o consórcio 3, cuja contagem aumentou duas ordens de magnitude entre o 25º e o 29º dias. Supostamente, a disponibilidade de outros nutrientes essenciais estava abaixo dos valores requeridos para crescimento microbiano ótimo, como resultado de seu baixo teor na água do mar utilizada e da possível remoção de outros nutrientes, além do N e do P, durante as substituições da água contida nos microcosmos. Nos microcosmos com o consórcio 3ST foi realizada uma única contagem 1 mês após o início do experimento. O resultado foi de $8,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ (valor médio), ou seja, aproximadamente uma ordem de magnitude acima da última contagem feita para os demais tratamentos inoculados (Figura 9). Como não foi realizada nenhuma troca de água, os nutrientes adicionados não foram removidos dos microcosmos, assim como as células microbianas presentes na água.

Nos tratamentos-controle, as contagens microbianas variaram ao longo dos dias, não mostrando também relação direta com a interrupção nas trocas de água ou com a nova adição dos nutrientes N e P (Figura 10). A partir do 15º dia, o tratamento-controle *estéril* foi o que apresentou as maiores contagens, mostrando que, de alguma forma, ocorreu contaminação desse microcosmo.

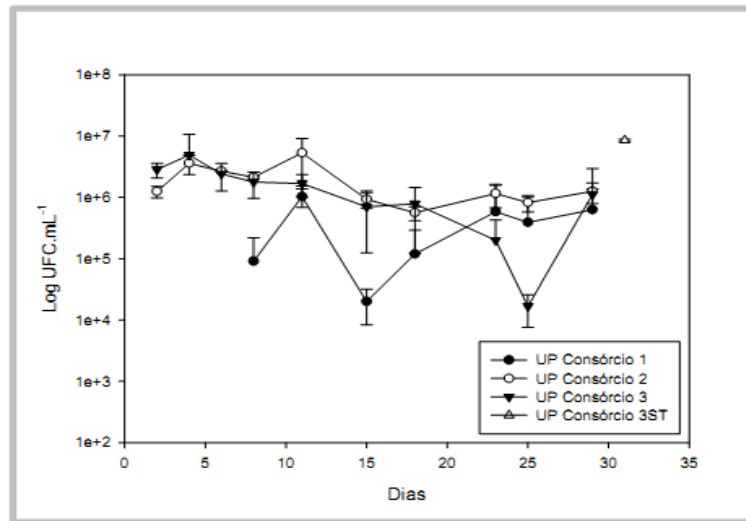


Figura 9: Contagens bacterianas (UFC.mL⁻¹) da água dos microcosmos de areia contaminada com petróleo suplementada com fontes hidrossolúveis de N e P. A partir do 21º dia não foram mais realizadas trocas de água. No 25º dia os nutrientes foram novamente adicionados à água nas mesmas concentrações iniciais. Nos microcosmos com o consórcio 3ST foi realizada somente uma contagem no 31º dia. Cada curva corresponde a um consórcio bacteriano inoculado em microcosmos previamente autoclavados (areia, óleo, nutrientes e água estéreis). Os valores correspondem à médias de três repetições. UP – uréia e KH₂PO₄ adicionados como fonte de nitrogênio e de fósforo, respectivamente; Consórcio 3ST corresponde ao consórcio 3 sem troca de água ao longo de todo o experimento.

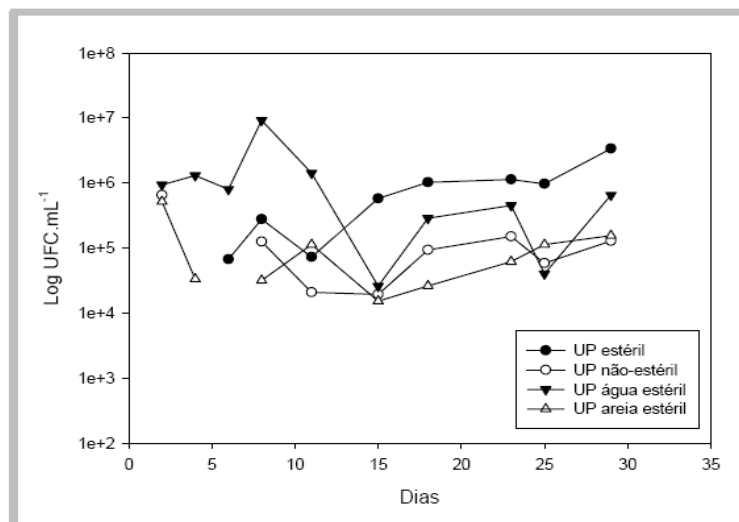


Figura 10: Contagens bacterianas (UFC.mL⁻¹) da água dos microcosmos de areia contaminada com petróleo suplementada com fontes hidrossolúveis de N e P. A partir do 21º dia não foram mais realizadas trocas de água. No 25º dia os nutrientes foram novamente adicionados à água nas mesmas concentrações iniciais. Cada curva corresponde a um microcosmo não-inoculado. UP – uréia e KH₂PO₄ adicionados como fonte de nitrogênio e de fósforo, respectivamente; Estéril – areia, óleo, nutrientes e água autoclavados; Não-estéril – nenhum componente foi previamente autoclavado; Água estéril – somente a água foi autoclavada; Areia estéril – areia, óleo e nutrientes autoclavados.

As contagens microbianas, obtidas de alíquotas da fase aquosa dos tratamentos que receberam as fontes oleofílicas dos nutrientes, variaram entre 10^6 e 10^7 UFC.mL⁻¹ durante a maior parte do experimento, mostrando uma sutil tendência de queda nas últimas contagens (Figura 11). Nos microcosmos inoculados com o consórcio 3ST, a contagem média no 31º dia foi de $2,0 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, valor próximo àquele obtido com as fontes hidrossolúveis de N e P.

De maneira geral, as contagens microbianas na água dos microcosmos inoculados com os consórcios foram similares entre os tratamentos com fontes hidrossolúveis e oleofílicas de N e P (Figuras 9 e 11).

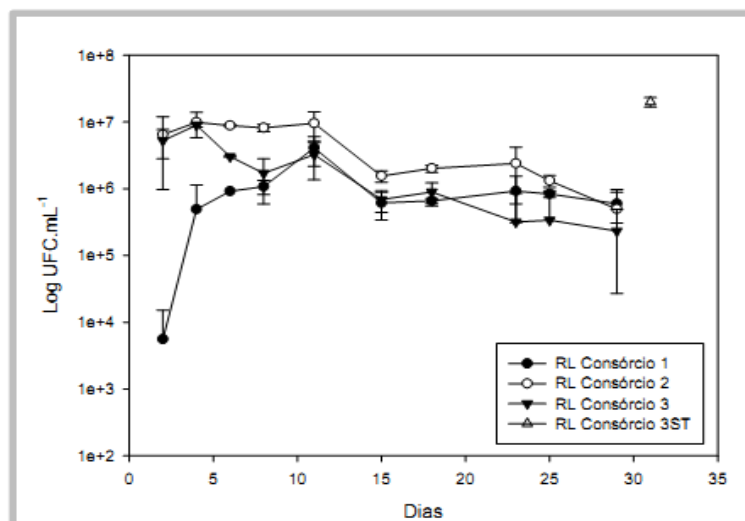


Figura 11: Contagens bacterianas (UFC.mL⁻¹) da água dos microcosmos de areia contaminada com petróleo suplementada com fontes oleofílicas de N e P. A partir do 21º dia não foram mais realizadas trocas de água. Nos microcosmos com o consórcio 3ST foi realizada somente uma contagem no 31º dia. Cada curva corresponde a um consórcio bacteriano inoculado em microcosmos previamente autoclavados (areia, óleo, nutrientes e água estéreis). Os valores correspondem à médias de três repetições. RL – resina uréia-formaldeído e lecitina de soja adicionadas como fonte de nitrogênio e de fósforo, respectivamente; Consórcio 3ST corresponde ao consórcio 3 sem troca de água ao longo de todo o experimento.

Entre os tratamentos-controle que receberam a aplicação das fontes oleofílicas de N e P, o controle *estéril* foi o que apresentou as maiores contagens, demonstrando que neste caso também ocorreu contaminação do microcosmo. O controle *não-estéril* teve as contagens mais baixas, atingindo cerca de 10^4 UFC.mL⁻¹ no 29º dia (Figura 12).

Nos microcosmos que não receberam adição de nutrientes, as contagens foram menores que as obtidas nos tratamentos com adição de nutrientes (tanto oleofílicos quanto hidrossolúveis), ficando abaixo de 10^6 UFC.mL⁻¹ ao longo de todo o experimento (Figura 13). Não houve diferença considerável entre esses controles.

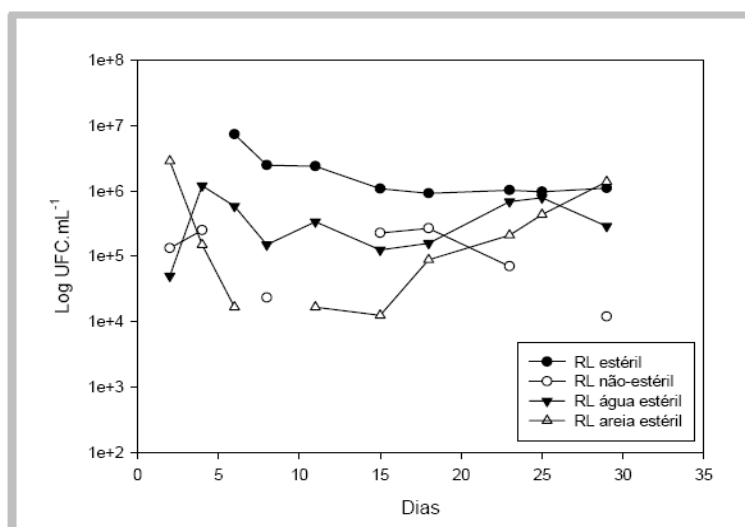


Figura 12: Contagens bacterianas (UFC.mL⁻¹) da água dos microcosmos de areia contaminada com petróleo suplementada com fontes oleofílicas de N e P. A partir do 21º dia não foram mais realizadas trocas de água. Cada curva corresponde a um microcosmo não-inoculado. RL – resina uréia-formaldeído e lecitina de soja adicionadas como fonte de nitrogênio e de fósforo, respectivamente; Estéril – areia, óleo, nutrientes e água autoclavados; Não-estéril – nenhum componente foi previamente autoclavado; Água estéril – somente a água foi autoclavada; Areia estéril – areia, óleo e nutrientes autoclavados.

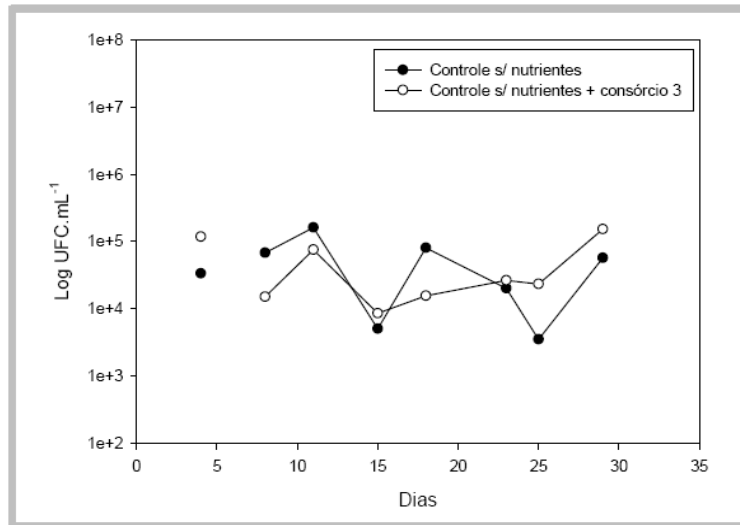


Figura 13: Contagens bacterianas (UFC.mL⁻¹) da água dos microcosmos de areia contaminada com petróleo. A partir do 21º dia não foram mais realizadas trocas de água. Cada curva corresponde a um microcosmo, ao qual não foi feita adição de nutrientes. Nenhum componente dos microcosmos foi previamente autoclavado. A um deles foi ainda adicionado o consórcio bacteriano 3.

4.2.3 Biodegradação do petróleo nos microcosmos

Houve degradação de petróleo nos tratamentos com fontes hidrossolúveis de N e P inoculados com os consórcios 1 e 3. A quantidade de petróleo degradado nesses tratamentos foi similar (4,0 e 4,7% do petróleo adicionado, Tabela 3). Não foi detectada degradação no tratamento inoculado com o consórcio 2. Conclui-se que os isolados bacterianos do consórcio 1, também presentes no consórcio 3, foram os responsáveis pela degradação nos tratamentos com esse consórcio. Quando foi inoculado o consórcio 3 e não foram realizadas trocas de água (consórcio 3ST), a degradação de óleo foi cerca de 3 vezes superior ao tratamento com o mesmo consórcio onde a água foi substituída diariamente (Tabela 3). O resultado foi atribuído à remoção de nutrientes essenciais à manutenção do crescimento e da atividade microbiana nos tratamentos submetidos às trocas de água, conforme demonstrado anteriormente (Figura 3).

Houve degradação de óleo em todos os tratamentos-controle (Tabela 3). As porcentagens de degradação foram quase sempre superiores às obtidas nos microcosmos inoculados com os consórcios, o que demonstra que existem micro-

organismos nativos com capacidade de degradação do petróleo. Além disso, eles estão mais bem adaptados às condições existentes nos microcosmos. Por outro lado, os micro-organismos utilizados nos consórcios foram previamente cultivados em condições ótimas e então transferidos para o meio com água do mar, com o petróleo como fonte de carbono e mantidos à temperatura ambiente. Supostamente, a diversidade de micro-organismos degradadores nativos é maior do que a existente nos consórcios, proporcionando maior degradação de diferentes frações do óleo. Surpreendentemente, o controle *estéril* foi o que apresentou a segunda maior porcentagem de degradação. Esse tratamento, juntamente com o controle *água estéril* (maior porcentagem de degradação), foram aqueles em que foram obtidas as maiores contagens microbianas (Figura 10). Esses mesmos tratamentos, juntamente com o controle *areia estéril* (terceira maior degradação), foram também aqueles em que houve menor remoção de fósforo (Figura 4). Vale destacar que, dentre os três controles com maior degradação, a porcentagem degradada foi mais elevada no controle que não teve a areia esterilizada. O controle *não-estéril* foi o que apresentou menor porcentagem de degradação, inclusive menor do que a degradação ocorrida no microcosmo inoculado com o consórcio 3 sem troca de água. O resultado é atribuído ao fato de que, nesse controle, ocorreu remoção de quase 100 % de N e de P (Figura 4).

Tabela 3: Degradação de petróleo em microcosmos de areia de praia e água marinha tratados com 6 mg de N, na forma de uréia, e 0,6 mg de P, na forma de KH_2PO_4 . Os microcosmos foram inoculados com três diferentes consórcios bacterianos. Aqueles não-inoculados são referidos como controle. Os microcosmos foram incubados abertos à temperatura ambiente por 31 dias e submetidos à troca diária da água (com exceção do consórcio 3ST)

Consórcio	Quantidade inicial de óleo na areia (mg)	Quantidade de óleo recuperado na areia e na água (mg) ¹	Degradação (mg)
Consórcio 1	300	288 (\pm 4,95)	12 (4 %)
Consórcio 2	300	301 (\pm 14)	-
Consórcio 3	300	286 (\pm 15,6)	14 (4,7 %)
Consórcio 3ST	300	254 (\pm 26,7)	46 (15,3 %)
Controle estéril	300	227	73 (24,3 %)

Controle não-estéril	300	264	36 (12 %)
Controle água estéril	300	203	97 (32,3 %)
Controle areia estéril	300	245	55 (18,3 %)

¹ Nos microcosmos inoculados com os consórcios, os valores correspondem a médias de duas ou três repetições. Nos tratamentos-controle, os resultados correspondem a apenas um microcosmo.

Nos microcosmos que receberam a adição das fontes oleofílicas de N e P, houve degradação do óleo nos tratamentos inoculados com o consórcio 1 e com o consórcio 3 sem troca de água (consórcio 3ST) (Tabela 4). Quando foi inoculado o consórcio 1, a degradação foi 3 vezes maior que a obtida com o mesmo consórcio no tratamento com fontes de nutrientes hidrossolúveis (Tabela 3). O resultado demonstra que a manutenção dos nutrientes nos microcosmos tratados com as fontes oleofílicas (Figuras 6 e 7) favorece a biodegradação quando se adiciona o consórcio 1. No entanto, neste caso, o desempenho na degradação do óleo apresentado pelos isolados do consórcio 1 não foi mantido quando os mesmos foram inoculados com outros isolados (consórcio 3). Da mesma forma, no tratamento com o consórcio 3ST, a porcentagem de degradação foi mais baixa que a obtida com as fontes hidrossolúveis (1,3 %). Ainda, essa mesma observação pode ser feita em relação aos tratamentos-controle (menores porcentagens de degradação). A maior porcentagem de degradação ocorreu no controle *não-estéril* (7 %). Como as altas contagens de UFC.mL⁻¹ na água não necessariamente corresponderam à maior ocorrência de degradação do óleo, uma possibilidade é que os micro-organismos, especialmente os nativos, que não foram selecionados para utilização da resina, estivessem utilizando a lecitina como fonte de carbono. Essa mesma possibilidade foi levantada por Lee e Tremblay (2005) ao avaliarem o efeito de um fertilizante orgânico derivado de peixe, o qual foi eficiente para promover o crescimento dos micro-organismos, mas não para promover degradação do óleo. Além disso, a resina uréia-formaldeído e lecitina de soja são fontes que se associam eficientemente ao óleo, mas outros fatores devem ser considerados para que isso resulte em estímulo à remoção de óleo. Dois fatores importantes e relacionados são

a concentração do nutriente e a taxa de liberação dos nutrientes para os micro-organismos. Valores em torno de 1-5 % de N por peso de óleo têm sido utilizados, com uma razão N:P entre 5 e 10:1. Neste trabalho as fontes hidrossolúveis foram adicionadas considerando-se aproximadamente 2 % de N e uma razão N:P de 10:1, ou seja, dentro dos parâmetros gerais, o que realmente demonstrou ter algum efeito em termos de degradação de petróleo. A resina e a lecitina também foram adicionadas considerando esses mesmos valores, mas pensando nas quantidades de N e P em sua matriz. No entanto, ainda não se tem informações de como se dá essa disponibilização para os micro-organismos. Foi avaliada a quantidade de N e P na água sobre a areia, mas não na água intersticial do sedimento. É possível que seja necessário adicionar maior quantidade de resina e de lecitina para garantir que as quantidades de N e P disponíveis sejam suficientes para promover maior atividade microbiana.

Tabela 4: Degradação de petróleo em microcosmos de areia de praia e água marinha tratados com 6 mg de N, na forma de resina uréia-formaldeído, e 0,6 mg de P, na forma de lecitina de soja. Os microcosmos foram inoculados com três diferentes consórcios bacterianos. Aqueles não-inoculados são referidos como controle. Os microcosmos foram incubados abertos à temperatura ambiente por 31 dias e submetidos à troca diária da água (com exceção do consórcio 3ST)

Consórcio	Quantidade inicial de óleo na areia (mg)	Quantidade de óleo recuperado na areia e na água (mg) ¹	Degradação (mg)
Consórcio 1	300	263 (\pm 30,6)	37 (12,3 %)
Consórcio 2	300	309 (\pm 36,1)	-
Consórcio 3	300	314 (\pm 20,5)	-
Consórcio 3ST	300	296 (\pm 4,9)	4 (1,3 %)
Controle estéril	300	299	1 (0,3 %)
Controle não-estéril	300	279	21 (7 %)
Controle água estéril	300	290	10 (3,3 %)
Controle areia estéril	300	389	-

¹ Nos microcosmos inoculados com os consórcios, os valores correspondem a médias de duas ou três repetições. Nos tratamentos-controle, os resultados correspondem a apenas um microcosmo.

Dentre os tratamentos aos quais não foram adicionados nutrientes (N e P), foi detectada degradação dos hidrocarbonetos de petróleo somente no controle não-inoculado (Tabela 5). Novamente, a adição de micro-organismos mostrou efeito negativo sobre a degradação de petróleo. Os micro-organismos inoculados competem com, e podem até mesmo inibir, micro-organismos degradadores nativos. Apesar de não ter sido adicionado nenhum fertilizante, ocorreu 12 % de degradação do óleo (controle sem inoculante).

Tabela 5: Degradação de petróleo em microcosmos de areia de praia e água marinha aos quais não foi feita adição de nutrientes. Os microcosmos foram incubados abertos à temperatura ambiente por 31 dias e submetidos à troca diária da água. O inoculante corresponde ao consórcio bacteriano 3

Controle	Quantidade inicial de óleo na areia (mg)	Quantidade de óleo recuperado na areia e na água (mg) ¹	Degradação (mg)
Com inoculante	300	300	-
Sem inoculante	300	264	36 (12 %)

¹ Os resultados correspondem a apenas um microcosmo.

A praia de Copacabana, local onde foi feita a coleta da água e da areia utilizadas neste trabalho, encontra-se próxima à Baía de Guanabara, região do litoral do Rio de Janeiro com reconhecido histórico de contaminação com hidrocarbonetos de petróleo, uma vez que é um local no qual se encontram plantas de refinaria de petróleo e ocorrem atividades de estocagem e transporte do mesmo. Brito e colaboradores (2006) realizaram isolamento de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo a partir de amostras de sedimento da praia de Boa Viagem, localizada na entrada da Baía de Guanabara e exposta à poluição crônica com óleo, e do manguezal Guapimirim, uma área preservada na mesma baía. Realizando estudo filogenético a partir das sequências de rDNA 16S, verificou-se a

associação dos isolados obtidos com espécies pertencentes a três grupos bacterianos. No grupo γ -Proteobacteria houve associação com membros dos gêneros *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Pseudomonas* e *Microbulbifer*. No grupo α -Proteobacteria as linhagens isoladas foram associadas com espécies do gênero *Sphingomonas* e com isolados de fendas hidrotermais. E no grupo Actinobacteria, houve ligação com as espécies *Micrococcus luteus*, *Cellulomonas variformis*, *Dietzia maris* e *Gordonia polyisoprenivorans*. Os isolados obtidos são filogeneticamente relacionados a linhagens com reconhecida capacidade de degradação de hidrocarbonetos, mas também a linhagens não previamente detectadas em locais contaminados, como as linhagens do gênero *Microbulbifer* e os isolados de fendas hidrotermais. De qualquer forma, os resultados indicaram a presença de populações bacterianas com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Da mesma forma, a degradação de petróleo observada neste trabalho nos microcosmos não-inoculados pode ser resultado da ação de populações bacterianas nativas semelhantes a essas.

5 CONCLUSÕES

As fontes hidrossolúveis de N e P são removidas da areia à medida que são realizadas as trocas de água, o que não ocorre com as fontes oleofílicas, que permanecem associadas ao óleo. Entre os consórcios avaliados, o consórcio 1 foi o que apresentou os melhores resultados, em termos de degradação de óleo. Micro-organismos degradadores estão naturalmente presentes na areia e água do mar do local amostrado. A ação desses micro-organismos é mais eficiente que a de micro-organismos adicionados, uma vez que estão mais bem adaptados às condições e sua atividade sobre diferentes frações do óleo, possivelmente, é mais diversa. No entanto, essa atividade foi maximizada pela adição de nutrientes, especialmente os nutrientes hidrossolúveis. As fontes oleofílicas são seletivamente utilizadas, não sendo metabolizadas igualmente por todos os micro-organismos (adicionados ou nativos). A contagem de micro-organismos na água não foi uma medida ideal do estímulo gerado pela adição de nutrientes na areia, uma vez que alta contagem de micro-organismos não necessariamente correspondeu à ocorrência significativa de degradação, o que foi observado principalmente com as fontes oleofílicas de N e P. A avaliação do efeito de diferentes concentrações da resina uréia-formaldeído e de lecitina de soja sobre a degradação de óleo pode conduzir à maximização do estímulo gerado por esses nutrientes oleofílicos.

6 REFERÊNCIAS

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizer. **Environmental Science & Technology**, v. 7, n. 6, p. 538-541, 1973.

BRAGA, J. M.; DEFELIPO, B. V. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solo e material vegetal. **Revista Ceres**, vol. 21, p. 73-85, 1974.

BRITO, E. M. S. et al. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 752–762, 2006.

BRITO, E. M. S. et al. A case study of *in situ* oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 418-423, 2009.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Principais acidentes. Disponível em:
<http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/dutos/principais_acidentes.asp>. Acesso em: 07 dez. 2010.

HARAYAMA, S.; KASAI, Y.; HARA, A. Microbial communities in oil-contaminated seawater. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 15, p. 205–214, 2004.

HEAD, I. M.; SWANNELL, R. P. J. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, p. 234–239, 1999.

International Tanker Owners Pollution Federation Limited (ITOPF). 2010a. Number of oil spills. Witherby, London.

International Tanker Owners Pollution Federation Limited (ITOPF). 2010b. Major oil spills. Witherby, London.

JÚLIO, A. D. L. Produção de biocatalisadores visando à biorremediação de efluentes contaminados com gasolina. Viçosa, MG, 2010. Relatório de pesquisa.

LEE, K.; TREMBLAY, G. H. Bioremediation of oiled beach sediments: Assessment of inorganic and organic fertilizers. International Oil Spill Conference-IOSC, 2005.

LEITE, A. A. L.; LEITE, C. A.; NOGUEIRA, V. F. Padronização da técnica utilizada no preparo de resina à base de uréia-formaldeído para as aulas práticas de Química. **Anuário da Produção Acadêmica Docente**, vol. 2, nº 3, p. 31-40, 2008.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. *In*: F. P. Downes & K. Ito (Eds.), **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4ª edição, p. 209–215, 2001. Washington: APHA.

MUSAT, F.; HARDER, J.; WIDDEL, F. Study of nitrogen fixation in microbial communities of oil-contaminated marine sediment microcosms. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1834-1843, 2006.

PARREIRA, A. G. **Consórcio bacteriano para biorremediação de solo contaminado com gasolina**. 2005. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

PRITCHARD, P. H. et al. Oil spill bioremediation: experiences, lessons and results from the *Exxon Valdez* oil spill in Alaska. **Biodegradation**, vol. 3, p. 315-335, 1992.

RON, E; ROSENBERG, E. Role of fertilizers: Biostimulation. *In*: Timmis, K. N. (Ed.) **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. cap. 6, p. 2501-2504.

ROSA, A. P.; TRIGUIS, J. A. Bioremediation process on Brazil shoreline. Laboratory experiments. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 14, nº 7, p. 470–476, 2007.

ROSENBERG, E. et al. Petroleum bioremediation – a multiphase problem. **Biodegradation**, vol. 3, p. 337-350, 1992.

ROSENBERG, E. et al. Oil bioremediation using insoluble nitrogen source. **Journal of Biotechnology**, v. 51, p. 273-278, 1996.

SAADOUN, I.M.K.; AL-GHZAWI, Z. D. Bioremediation of petroleum contamination. *In*: Fingerman, M. (Ed.); Nagabhusanam, R. (Ed.) **Bioremediation of Aquatic and Terrestrial Ecosystem**. Plymouth: Science Publishers, Inc, 2005. cap. 6, p. 173-212.

SÁNCHEZ, O. et al. Molecular characterization of an oil-degrading cyanobacterial consortium. **Microbial Ecology**, v. 50, p. 580–588, 2005.

SILVA, A. C. et al. Bioremediation of marine sediments impacted by petroleum. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 153, p. 58-66, 2009.

TYAGI, M. et al. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, vol. 22, p. 231-241, 2011.

VENOSA, A. D.; ZHU, X. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. **Spill Science & Technology Bulletin**, vol. 8, n. 2, p. 163–178, 2003.

WANG, Q. et al. Potencial approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution. **Journal of Environmental Protection**, vol. 2, p. 47-55, 2011.

WRENN, B. A. et al. Nutrient transport during bioremediation of crude oil contaminated beaches. *In: In-Situ and On-Site Bioremediation*, vol. 4. Battelle Press, Columbus, OH, pp. 267–272, 1997.

ZHU, X; VENOSA, A. D. Guidance for the bioremediation of marine shorelines and freshwaters wetlands. *In: Fingerman, M. (Ed.); Nagabhushanam, R. (Ed.) Bioremediation of Aquatic and Terrestrial Ecosystem*. Plymouth: Science Publishers, Inc, 2005. cap. 5, p. 141-172.

ZHU, X. et al. Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwaters wetlands. U.S. Environmental Protection Agency – EPA, Cincinnati, 2001.