ESTRATÉGIAS DE BIOESTÍMULO DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL CONTAMINADO COM HIDROCARBONETOS EMPREGANDO FERTILIZANTES DE LIBERAÇÃO LENTA.

RICARDO FURTADO E SILVA

Dissertação Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para a Obtenção do Grau de Mestre em Ciências

ORIENTADOR:

PROFA. SELMA GOMES FERREIRA LEITE, D.SC.

PROF. ALEXANDRE SOARES ROSADO, D.SC.

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Escola de Química

2008

ESTRATÉGIAS DE BIOESTÍMULO DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL CONTAMINADO COM HIDROCARBONETOS EMPREGANDO FERTILIZANTES DE LIBERAÇÃO LENTA.

RICARDO FURTADO E SILVA

Dissertação Apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos para a Obtenção do Grau de Mestre em Ciências (*MSc*)

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Escola de Química
2008

ESTRATÉGIAS DE BIOESTÍMULO DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL CONTAMINADO COM HIDROCARBONETOS EMPREGANDO FERTILIZANTES DE LIBERAÇÃO LENTA.

RICARDO FURTADO E SILVA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências, sob orientação da Prof. Selma Gomes Ferreira Leite.

Aprovada por: ORIENTADORES

_____

Profa. Selma Gomes Ferreira Leite

_____

Prof. Alexandre Soares Rosado

_____

Fábio Vieira de Araujo, *DSc*

_____

Raquel Silva Peixoto, *DSc*

_____

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, *DSc*

Rio de Janeiro, 06 de Junho de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Ricardo Furtado

ESTRATÉGIAS DE BIOESTÍMULO DE SEDIMENTO DE MANGUEZAL CONTAMINADO COM HIDROCARBONETOS EMPREGANDO FERTILIZANTES DE LIBERAÇÃO LENTA.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Escola de Química, Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite.
Alexandre Soares Rosado

1. Biorremediação. 2. Manguezal. 3.Fertilizante de liberação lenta . 4. DGGE. Teses. I. Leite, Selma, Gomes, Ferreira (Orient.). II. Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. III. Título

“Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder

Público o dever de defendê-lo e à coletividade o de preservá-lo para presentes e futuras gerações.” Constituição Federal, promulgada em 05/10/1988–Art. 228

Agradecimentos

A Deus, por ter me dado o dom da vida e pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A Professora Selma, pela orientação, pelos conhecimentos passados e por ter me aturado durantes esses mais de 2 anos.

Ao Professor Alexandre, pela orientação e conhecimentos passados durante todo o desenvolvimento dessa dissertação.

Aos meus pais, Hugo e Sonia, por todo amor, amparo e incentivo e pelo esforço que fizeram para que eu chegasse até aqui;

Aos meu irmãos, Raphael e Fernanda, pelo amparo e carinho em todas os momentos.

Aos amigos da EQ companheiros de disciplinas, almoços e afins: Bianca, Sabrina, Grazy, Diego, Camilo, Felipe, Paulo. Sentirei saudades da convivência diária.

A todos os integrantes do laboratório LEMM e em especial a Flávia, por todo o auxilio prestado na técnica de DGGE e a Raquel por todo as dúvidas e sugestões. Muito obrigado.

Ao CNPq, FAPERJ, CENPES e PETROBRAS pelo suporte financeiro.

RESUMO

Silva, Ricardo Furtado. Estratégias de Bioestímulo de sedimento de manguezal contaminado com hidrocarbonetos empregando fertilizantes de liberação lenta.
Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite; Alexandre Soares Rosado. Rio de Janeiro: UFRJ/ EQ, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências).

Diversas metodologias têm sido propostas com o objetivo de remediar áreas contaminadas por poluentes de origem antrópica. No entanto, sabe-se pouco a respeito do que realmente ocorre com a comunidade microbiana do ambiente ao longo do processo de contaminação e degradação do poluente. Os manguezais são ecossistemas costeiros que possuem diversas funções naturais de grande importância ecológica e econômica. Atualmente, os manguezais vêm sofrendo diversas agressões que ameaçam a sua sobrevivência, como o lançamento de esgotos industriais e domésticos, aterros e derrames de petróleo e seus derivados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tratamentos de biorremediação no perfil da comunidade microbiana (PCR 16S/DGGE) de um sedimento de manguezal impactado por petróleo utilizando microcosmos. Foi avaliada a utilização de dois fertilizantes comerciais de liberação lenta, OSMOCOTE e BASACOTE (0,03 e 0.8%) como fontes de N e P. A Atenuação Natural parece ser a melhor estratégia de remediação para o Sedimento de manguezal em questão, atingindo 54,0% de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs). Os índices de degradação foram avaliados para o sedimento com contaminação antiga e simulando um novo derramamento de petróleo. A nova contaminação por óleo levou a um aumento da degradação de HTPs no tratamento da Atenuação Natural, atingindo 71,14% de degradação. Esses resultados contrastam com os índices obtidos para o OSMOCOTE (0,8%), quando foi atingido um índice de degradação de 6,49%, mostrando que altas concentrações de nutrientes apresentam um efeito inibitório na degradação de HTPs. Os resultados obtidos pela técnica de DGGE mostraram que as variáveis alteradas nesse trabalho, nutrientes e óleo, parecem não apresentar qualquer efeito sobre a estrutura dominante da comunidade bacteriana.

Abstract

Silva, Ricardo Furtado. Estratégias de Bioestímulo de sedimento de manguezal contaminado com hidrocarbonetos empregando fertilizantes de liberação lenta. Orientadores: Selma Gomes Ferreira Leite; Alexandre Soares Rosado. Rio de Janeiro: UFRJ/ EQ, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências).

Several technologies have been proposed to remediate contaminated areas by anthropogenic activities. However, little is known about the microbial dynamic under a bioremediation process. Mangroves ecosystems are very important natural and economical places having unique features such as high primary productivity and abundant detritus, making these places important to protect. Nowadays, mangrove ecosystems have been exposed to anthropogenic contamination of oil spill, waste water, disposal and many other sources. The aim of this work was to evaluate the effect of different bioremediation treatments on the microbial structure in a petroleum mangrove contaminated sediment microcosm using a molecular approach (PCR/DGGE 16S). Two commercial slow release fertilizers (OSMOCOTE e BASACOTE – 0.03 and 0.8%) were added to the systems to maintain a continuous source of N and P.

The Natural attenuation seems to be the best strategy to remediate these mangrove contaminated sediment reaching 54% of final TPHs degradation. The biodegradation and mineralization was evaluated in ancient contaminated sediment and in a new recent contamination. This recent petroleum contamination enhanced TPHs degradation to 71.19%.in Natural Attenuation Process.

The TPH results obtained for 0,8% OSMOCOTE treatment reached 6.49% suggesting that high concentrations of nutrients have an inhibitory effect on petroleum compounds biodegradation.

DGGE 16S results showed that the variables nutrient and oil added to system did not affect the dominant bacterial structure.

Abreviaturas

BTEX – Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

DGGE - Eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes

DNA - ácido desoxirribonucleico

g - gramas

h - hora

HPAs – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HRP – Hidrocarbonetos Resolvidos do Petróleo

HTPs – Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

L - litro

mg - miligrama

mM - milimolar

MTBE - éter metil-terciário butílico

NMP – Número mais provável

OAL – Óleo Árabe Leve

PCR – Reação da Polimerase em Cadeia

pH - potencial hidrogeniônico

ppm - partes por milhão

RBS – Reator em batelada seqüencial

RNA – ácido ribonucléico

rRNA – RNA ribossômico

UCM - Mistura não resolvida Complexa

UPGA - Unweighted pair-group average

USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos EUA

Índice de tabelas

Tabela 1: Estrutura Química e Biodegradabilidade 10
Tabela 2 - Vulnerabilidade dos ecossistemas costeiros a danos causados por derramamentos de óleo no mar. Fonte: Elaborado a partir de GUNDLACH e HAYES, 1978 e PEBG, 1999. 14
Tabela 3: Principais operações e/ou processos físicos e químicos utilizados para o tratamento de resíduos sólidos 19
Tabela 4 - Custos das tecnologias de Remediação de solos e águas subterrâneas 32
Tabela 5 - Concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR – 16S (U968-L1401) 54
Tabela 6 - Caracterização Química do Sedimento 56

Índice de Figuras

Figura 1: Denominações usualmente empregadas para biorremediação 22
Figura 2 - Esquema de um Fertilizante de Liberação Lenta 24
Figura 3: Esquema *Biosparging* 26
Figura 4: Esquema do *Bioventing* 27
Figura 5: Esquema do *Bioslurping* 28
Figura 6: Esquema da Fitorremediação 29
Figura 7: Esquema Landfarming 30
Figura 8 - Esquema Biopilha 31
Figura 9 - Produtos de PCR visto após eletroforese em gel de agarose (A) e em gel com gradiente de desnaturantes (B) 39
Figura 10 - Coleta de material para análises de HTP e armazenamento em bandejas de alumínio estéreis. 40
Figura 11 - Coleta de amostras de sedimento em sacos plásticos estéreis para análises físico-químicas e em tubos Falcon para análises microbiológicas. ... 41
Figura 12 - Basacote 3M 43
Figura 13 - Basacote – 90% dos grânulos com diâmetro de 1,5 – 2,8mm. Peso de 1000 grãos = 9,58g 43
Figura 14 - Foto do Microcosmo utilizado 49
Figura 15 – NMP de microrganismos degradadores 52
Figura 16 - HTP inicial do Sedimento 57
Figura 17 - Contagem de Células Microbianas – Sedimento Inicial 58
Figura 18 - NMP de degradadores e anaeróbios do sedimento 59
Figura 19 - Degradação de HTPs nos tratamentos. 62
Figura 20 - Porcentagem de Degradação do Osmocote. 64
Figura 21 - Porcentagem de Degradação do Tratamento com Osmocote adicionado de óleo 65
Figura 22 - Degradação dos n-alcanos nos tratamentos 68
Figura 23 - Degradação dos n-alcanos nos tratamentos com a adição de óleo. 68

Figura 24 - Degradação de UCM com e sem a adição de óleo como co-substrato..... 70
Figura 25 – Perfil (1) do gel obtido com os produtos de PCR. 73
Figura 26 - Perfil (2) do gel obtido com os produtos de PCR 73
Figura 27 - Perfil (3) do gel obtido com os produtos de PCR. 74
Figura 28 - Dendrograma obtido para o gel de DGGE-16S com as amostras dos sistemas de tratamento. 75

Sumário

1 Introdução 1

2 Objetivo Geral 6

2.1 Objetivos Específicos 6

3. Revisão Bibliográfica 7

3.1 Petróleo 7

3.1.1 Efeitos do petróleo sobre atividades socioeconômicas 11

3.1.2 Efeitos do petróleo sobre ecossistemas marinhos. 12

3.2 Manguezais 15

3.3 Poluição por Óleo nos Manguezais 17

3.4 Legislação (anexo 1). 18

3.5 Alternativas de tratamento de solos contaminados 18

3.5.1 Métodos Físico-Químicos 19

3.5.2 Biorremediação 20

3.5.2.1 Atenuação Natural Monitorada 25

3.5.2.2 Biosparging 26

3.5.2.3 Bioventing 26

3.5.2.4 Bioslurping 27

3.5.2.5 Fitorremediação 28

3.5.2.6 Landfarming 29

3.5.2.7 Biorreatores 30

3.5.2.8 Biopilhas 31

3.6 Custos de Tratamento 32

3.7 Fatores ambientais importantes para a Biorremediação 33

3.7.1 Temperatura 33

3.7.2 pH 34
3.7.3 Nutrientes 34
3.7.4 Aeração 35
3.9 –Ecologia Microbiana Molecular 36
3.9.1 Extração de ácidos nucléicos a partir de amostras ambientais 37
3.9.2 RNA Ribossômico 16s (rRNA 16s) 37
3.9.3 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) 38
3.9.4 DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes) 38
4 Material e Métodos 40
4.1 Sedimento de Manguezal 40
4.2 Petróleo como contaminante 41
4.3 Produtos Comerciais 42
4.3.1 Osmocote 3M 42
4.3.2 Basacote 3M 43
4.4 Bioestímulo Convencional 44
4.4 Reagentes Soluções e Meios de Cultura. 44
4.5 Biorremediação do Sedimento de Manguezal contaminado com Hidrocarbonetos de Petróleo (Experimentos em Microcosmos) 49
4.6 Quantificação de Hidrocarbonetos 50
4.7 Avaliação da Diversidade Microbiana 51
4.7.1 Contagem de células microbianas (método convencional) 51
4.7.2 Ecologia Microbiana Molecular 53
4.7.2.1 Extração de DNA dos Sistemas de Tratamento 53
4.7.2.2 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) 53
4.7.2.2.1 PCR-16S 53
4.7.2.3 DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes) ... 54
5 Resultados e Discussão 56

5.1. Caracterização do Sedimento 56

5.1.1 Análise Química do Sedimento 56

5.1.2 Análise Microbiológica do sedimento– Método Convencional..... 57

5.2. Avaliação da Degradação do poluente nos diferentes tratamentos. ... 61

5.2.1 Degradação de HTPs Totais 61

5.3 Avaliação da Diversidade Microbiana – Abordagem Molecular DGGE (“Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”)..... 72

6 Conclusões..... 77

7 Perspectivas..... 80

8 Anexo 1 - Legislação..... 81

Legislação Protetiva dos Manguezais 81

Principais Convenções Internacionais sobre Poluição por Óleo no Mar..... 84

Regulamentação Brasileira..... 94

9 Referências Bibliográficas 110

1 Introdução

O grande crescimento populacional é um dos principais fatores responsáveis pelo fenômeno de impacto ambiental, em função da produção de quantidades cada vez maiores de resíduos, sejam eles de origem doméstica ou industrial. Esse crescimento tem gerado um aumento no consumo e, a simples necessidade de adequar um produto a sua maior e melhor comercialização pode acarretar em um impacto ambiental sem precedentes (Brito *et al.*, 2004). Por exemplo, a substituição de embalagens de vidro para bebidas por embalagens plásticas vêm causando grandes impactos ao meio ambiente. As embalagens plásticas são consideradas um sério problema ambiental devido ao seu tempo de biodegração no ambiente ser muito elevado e por não existir, no Brasil, uma legislação especifica para sua reciclagem e/ou disposição. Dessa forma, são lançadas inadequadamente em lixões ou cursos d'água o que acarreta graves problemas e transtornos para a população em geral. (Brito *et al.*, 2004)

A atividade industrial não tem ficado à margem desses problemas, causando extensa degradação do meio ambiente, através de emissões gasosas não controladas, disposição inadequada de rejeitos industriais que causam a contaminação de águas subterrâneas, e diversas outras formas (Brito *et al.*, 2004).

Essas preocupações ambientais, incipientes até a ocorrência da 2ª Guerra Mundial, demonstraram ser de vital importância na medida em que mais e mais acidentes ambientais passaram a ocorrer, estimulando a pesquisa de forma a reparar ou minimizar, nos processos produtivos, esses danos ambientais. Além disso, a pressão por parte dos governos e da opinião pública tem forçado essa postura ambientalmente correta das indústrias, estabelecendo leis que regulam o gerenciamento ambiental (Bayardino,2004, Martins *et al.*, 2003, Molina-barahona *et al.*, 2004;).

Nesse contexto, encontram-se as indústrias de petróleo que são potencialmente grandes causadoras de impactos ambientais que são inerentes ao seu processo produtivo. Tais impactos vêm do consumo de grandes

quantidades de água e energia, da produção de efluentes e resíduos sólidos de difícil tratamento e disposição, e da liberação de gases tóxicos na atmosfera. Por outro lado, é extensa e fundamental a importância do petróleo em nossa sociedade, tal como está atualmente organizada. O petróleo não é apenas uma das principais fontes de energia utilizadas, mas também seus derivados são matérias-primas para a manufatura de inúmeros bens de consumo e, deste modo, tem um papel cada dia mais presente e relevante na sociedade (Mariano, 2005).

Os impactos ambientais de um derramamento de óleo, ou de seus subprodutos, nos ecossistemas costeiros e oceânicos variam consideravelmente em função do tipo e composição do óleo (quanto mais solúvel for o composto, mais tóxico ele será), da quantidade derramada, da época do ano, de fatores metereológicos e oceanográficos, da localização geográfica, da persistência e biodisponibilidade dos hidrocarbonetos e do estado biológico dos organismos na hora da contaminação.

Não obstante, casos como o ocorrido na Baía de Guanabara em 2000, onde três milhões de litros de petróleo vazaram de um oleoduto, alertam para a necessidade de minimizar esses impactos da indústria petrolífera, bem como recuperar os ambientes já contaminados. A disposição inadequada de resíduos oleosos, por exemplo, vem causando a contaminação de solos, recursos hídricos superficiais e subterrâneos e, eventualmente, dependendo da volatilidade dos compostos orgânicos presentes nos resíduos, a contaminação do ar (Bayardino, 2004). Atualmente, esforços estão sendo feitos no desenvolvimento de novas alternativas de remediação desses meios contaminados por petróleo, principalmente quando se trata de solos. Isto se deve ao fato das tecnologias de remediação aplicadas ao tratamento de solos contaminados encontrarem na heterogeneidade desse material um grande desafio, principalmente comparado com a menor complexidade no tratamento de efluentes líquidos industriais.

A destinação adequada dos resíduos sólidos industriais, devido à grande diversidade dos mesmos, ainda é um grande problema decorrente, principalmente, das diferenças nas concentrações e composição dos contaminantes. Muitas vezes, diferenças sutis entre dois resíduos de origem

semelhante,como teor de umidade, por exemplo, pode inviabilizar o uso de uma mesma solução de tratamento (Mariano, 2005).

Na indústria do petróleo esse fato é ainda mais alarmante, pois as diferenças na origem do óleo cru e no seu processamento, já interferem na composição dos resíduos produzidos. Segundo Trindade (2002), de todas as etapas que compõem a cadeia produtiva do petróleo, desde a prospecção até o consumo final, a produção em terra, o refino e a distribuição através de oleodutos ou petroleiros são as que potencialmente podem vir a contaminar o solo.

A contaminação de solos por petróleo e seus derivados tem sido um dos principais problemas ambientais das últimas décadas, tendo em vista a complexidade desses compostos e a dificuldade de remediação dos mesmos (Franco *et al.*, 2004).

Diante disso, no tratamento de solos contaminados por compostos orgânicos como o petróleo, pode ser exigida a utilização de uma combinação de tecnologias biológicas, físicas e químicas para reduzir a contaminação a um nível seguro e aceitável (Khan *et al.* 2004)

As técnicas físico-químicas possuem limitações apresentando, na maioria das vezes, um alto custo e não removem completamente os contaminantes deixando uma parcela retida no solo (Shell, 1995). Já os métodos biológicos (biorremediação) vêm se tornando uma alternativa atrativa, uma vez que tendem a limpar do sistema esta parcela que fica retida no solo evitando, por exemplo, a contaminação do lençol freático. Os métodos biológicos vêm se mostrando como uma tecnologia alternativa, pois apresentam uma grande aceitação por parte da opinião pública e são considerados uma “forma natural” de tratamento.

Os processos biológicos corretamente monitorados, quando comparados aos processos físico-químicos, são mais seguros e com custo relativamente baixo. Além disso, o aumento das pesquisas nessa área está relacionado também ao fato de que o tratamento biológico é menos agressivo ao meio ambiente, já que, muitas vezes, concentra seus esforços em otimizar o processo naturalmente existente nos solos. (Martins *et al*., 2003; Brito *et al*., 2004; (Molina-Barahona *et al.* 2005); (D'Annibale *et al.* 2006))

Dentre as várias tecnologias de aplicação da Biorremediação *in situ,* a Bioestimulação é a forma mais imediata e simples de tratamento que envolve a adição de nutrientes e oxigênio necessários para acelerar o processo. Outras tecnologias vêm sendo desenvolvidas como a introdução de microrganismos indígenas, selecionados pelo potencial para degradar e/ou acelerar o processo (Bioaumento), ou a introdução de enzimas especificas, principalmente do grupo das dioxigenases, que são importantes na fase inicial de oxidação do anel benzênico (Wilkstrom *et al*, 1996; Hamzah & Al-Baharna, 1994)

Todos estes processos necessitam de um monitoramento eficaz para definir se a estratégia de tratamento implementada está se mostrando eficiente ou se está comprometendo de forma negativa o ecossistema local.

Sabe-se hoje em dia que apenas uma pequena fração dos microrganismos presente no meio ambiente (1 a 10%) podem ser cultivados por técnicas convencionais. Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, associadas ao conhecimento em bioinformática, tornou-se possível a caracterização de comunidades microbianas mistas em determinados ecossistemas, revelando os grupos atuantes, muitos destes até então desconhecidos (da Cunha *et al.* 2006; MacNaughton *et al.* 1999; von der Weid *et al.* 2007; Watanabe *et al.* 2001)

A utilização de técnicas moleculares permite, portanto, um conhecimento mais aprofundado dos grupos microbianos presentes, após a seleção natural imposta por condições extremas, como a presença de substâncias poluentes e de suas formas distintas de tratamento. Do ponto de vista técnico, estes métodos são viáveis porque são rápidos e sensíveis para identificar e monitorar a população microbiana presente no processo de biorremediação (da Cunha *et al.* 2006; MacNaughton *et al.* 1999; Watanabe *et al.* 2001) (Peixoto *et al.* 2002).

A análise de seqüências de RNA ribossômicas permite um conhecimento maior acerca da filogenia e evolução microbiana (Freitas, 2002, (Olsen *et al.* 1994)). O uso do gene *rrs*, que cofidica o rRNA 16S nas técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e DGGE (Eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes) permite uma avaliação da comunidade microbiana dominante de um ambiente. O *Fingerprinting* da comunidade microbiana gerado por estas técnicas serve para avaliar estrutura da comunidade

dominante de um ambiente natural após a interferência de fatores ambientais e/ou da presença de um poluente. (da Cunha *et al.* 2006; MacNaughton *et al.* 1999; von der Weid *et al.* 2007; Watanabe *et al.* 2001)

Os manguezais, também conhecidos como florestas de mangue são enquadrados como ecossistemas altamente susceptíveis à contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. Esses ecossistemas apresentam características importantes como: amenização do impacto do mar na terra; c de erosão; rRetenção de sedimentos terrestres; “filtro biológico” (sedimentos, nutrientes, poluentes); abrigo de fauna; exportação de matéria orgânica; extrativismo, agricultura, silvicultura entre outros. Por serem ecossistemas costeiros, os manguezais estão entre os principais locais para onde os derramamentos de óleo convergem funcionando como um verdadeiro depósito de óleo, uma vez que a circulação das marés dentro deste ecossistema acaba favorecendo a deposição deste material no sistema de raízes aéreas e no sedimento (Lewis 1983).

Devido às particularidades dos manguezais e sua importância, esses ecossistemas devem ser protegidos e recuperados a fim de garantir a qualidade de vida das águas. (Lewis 1983)

2 Objetivo Geral

Avaliação de diferentes formas de biorremediação (bioestímulo) em microcosmos de sedimento de manguezal contaminado com altas concentrações de hidrocarbonetos de petróleo.

2.1 Objetivos Específicos

- Verificar a aplicabilidade de dois produtos comerciais, fertilizantes de liberação lenta, OSMOCOTE 3M e BASACOTE 3M nas concentrações de 0,03 e 0,8%, como estratégia de remediação de sedimento de manguezal contaminado na degradação dos hidrocarbonetos.

- Avaliar, em microcosmo, qual o comportamento do sedimento com histórico de contaminação antiga com e sem uma contaminação recente.

- Monitorar o efeito dos diferentes tratamentos sobre a comunidade Microbiana utilizando Técnicas de Biologia molecular (PCR/DGGE).

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Petróleo

Um dos grandes problemas de poluição ambiental nos dias de hoje se refere àqueles causados por derramamentos de petróleo e os provenientes da lavagem dos reservatórios de petroleiros, da exploração crescente de petróleo em plataformas continentais e de acidentes com petroleiros de grande porte ou vazamentos em refinarias. Porém, vale ressaltar que o mundo de hoje em dia é altamente dependente do petróleo e é, portanto, inimaginável a vida sem ele (Morais, 2005).

Atualmente, os principais produtos obtidos do petróleo são os combustíveis, lubrificantes, graxas, óleos e matéria-prima para as indústrias químicas e petroquímicas, gerando uma linha quase infinita de produtos (Braile & Cavalcante, 1993).

O petróleo é formado por processos biogeoquímicos e, por isso, é uma mistura complexa de hidrocarbonetos cuja composição varia em função de sua localização geográfica e das condições físico-químicas e biológicas que o originaram. Cerca de 60% a 90% são hidrocarbonetos alifáticos, passíveis de biodegradação. Nessa classe, o fitano e o pristano são mais resistentes à degradação e podem ser usados como marcadores químicos durante o monitoramento de ambientes expostos a contaminação por petróleo. Além disso, o restante, bruto ou refinado, é recalcitrante, isto é, demora a desaparecer por meios naturais. O destino dessas substâncias recalcitrantes, após um derrame, dependerá da interação de vários fatores levando a diferentes processos de remoção (Crapez *et al.,* 2002).

Os processos de remoção de produtos derivados do petróleo do ambiente diferem de acordo com a composição e estrutura química destes. Os compostos altamente voláteis podem sofrer evaporação, os compostos

solúveis na água podem ser dispersos e penetrar no solo, e ainda pode ocorrer a oxidação química, a foto oxidação e a biodegradação. (Morais, 2005)

A biodegradação é a capacidade microbiana de degradar compostos orgânicos, como o petróleo e seus derivados (Martins, 2003). Diversas espécies de bactérias (denominadas hidrocarbonoclásticas) e fungos, os quais fazem parte da microbiota presente em solos, águas e sedimentos, têm habilidade para degradar os componentes de petróleo. Essa habilidade é evidenciada quando diferentes ambientes são contaminados por petróleo, após uma etapa de adaptação ou aclimatação dos microrganismos. Estes, por sua vez, passam a assimilar os componentes do óleo como fonte de carbono, iniciando o processo de degradação. Na grande maioria dos casos, uma alta concentração de bactérias hidrocarbonoclásticas pode servir como um indicador de ambiente impactado cronicamente por petróleo, tendo em vista que sucessivos derrames no mesmo ambiente aceleram o crescimento dessa biomassa (Crapez *et al.,* 2002).

De acordo com Khan e colaboradores (2004), as classes de compostos orgânicos mais suscetíveis a biodegradação são os hidrocarbonetos de petróleo (por exemplo, aqueles contidos na gasolina e no óleo diesel combustível), solventes não-clorados, algumas combinações aromáticas cloradas, e alguns compostos alifáticos clorados. Dentro da classe de hidrocarbonetos, a biodegradação dos alcanos ocorre na seguinte ordem: linear>ramificado>cíclico>aromático; indicando uma ordem preferencial de assimilação das fontes de carbono (Chaineau *et al.* 1999).

Essa preferência microbiana indica que os microrganismos degradam primeiramente contaminantes que são assimilados mais facilmente ou fornecem mais energia (MARTINS *et al.,* 2003). Embora quase todos os compostos de petróleo sejam produtos tipicamente biodegradáveis, os compostos com estrutura molecular mais complexa são mais dificilmente removidos pelo tratamento biológico. Além disso, geralmente, compostos de baixo peso molecular (nove ou menos átomos de carbono) alifáticos e monoaromáticos são mais facilmente biodegradados que os compostos orgânicos alifáticos de alto peso molecular ou poliaromáticos, com exceção dos compostos com caráter solvente, os quais podem ser tóxicos aos

microrganismos (USEPA, 2004). Na Tabela 1 é listada a ordem decrescente do potencial de biodegradabilidade de alguns constituintes comuns de petróleo.

Os componentes do petróleo de alto peso molecular, como os encontrados em óleos de aquecimento e lubrificantes, exigem períodos de tempo mais longos para serem degradados. Porém, a adição de um segundo substrato orgânico (co-substrato) pode alterar substancialmente a taxa de degradação destes compostos orgânicos mais pesados (recalcitrantes). (Ortiz *et al.* 2006)

Em alguns casos, pode ser observada também a degradação parcial desses contaminantes formando subprodutos, os quais podem apresentar um nível de toxicidade mais alto que o contaminante (MARTINS *et al.*, 2003). No estudo da degradação de bifenilas policloradas, por exemplo, foi observada a degradação do composto de partida, praticamente completa, num período de 80 dias. Porém, vários produtos intermediários mostraram ser altamente recalcitrantes, não sendo degradados nem por tratamentos em tempo superior a 120 dias (VAN DORT *apud* BRITO *et al.*, 2004). Testes de toxicidade das amostras de solo durante o processo de biorremediação, normalmente, auxiliam na verificação do impacto destes subprodutos nos microrganismos presentes no local contaminado.

Tabela 1: Estrutura Química e Biodegradabilidade

Biodegradabilidade	Exemplo de constituintes	Derivados nos quais os constituintes são normalmente encontrados
Mais Biodegradável	n-butano, n-pentano, n-octano	Gasolina
	Nonano	Óleo diesel
	Metilbutano, dimetilpentenos,	Gasolina
	Benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos	Gasolina
	Propilbenzenos	Óleo diesel, querosene
	Decanos	Óleo diesel
	Dodecanos	Querosene
	Tridecanos	Óleos combustíveis para aquecimento
	Tetradecanos	Óleos Lubrificantes
	Naftalenos	Óleo diesel
	Fluorantenos	Querosene
	Pirenos	Óleos combustíveis para aquecimento
Menos Biodegradáveis	Acenaftenos	Óleos Lubrificantes

Fonte: USEPA, 2004.

A hidrofobicidade dos compostos orgânicos também vem a ser um fator que pode interferir nas taxas de biodegradação dos mesmos. Os compostos orgânicos com elevada hidrofobicidade podem não ser biodegradados ou o serem em menores taxas, devido ao processo de adsorção, o qual acontece quando os contaminantes ficam presos ou sorvidos nas partículas do solo. Hidrocarbonetos combustíveis, por exemplo, são hidrofóbicos e ficam presos a matéria orgânica e aos minerais argilosos, além de repelirem a água (Khan *et al.* 2004). Portanto, a hidrofobicidade agrava a limitada disponibilidade desses compostos aos microrganismos degradadores, que são encontrados na fase aquosa (FRANCO *et al.*, 2004).

Como exemplo de compostos hidrofóbicos, temos os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), asfaltenos e muitos compostos ramificados (maior que 20 átomos de carbono). Estes hidrocarbonetos pesados são resistentes a biorremediação e, no caso dos HPAs, são considerados nas avaliações de risco a saúde humana, devido às possíveis atividades carcinogênicas e mutagênicas (Baheri,Meysami 2002)

A eficiência da biodegradação depende de fatores associados às características do contaminante, os quais podem afetar diretamente o metabolismo microbiano. Dentre estes, Martins *et al.* (2003) mencionam como os mais significativos: a biodisponibilidade dos contaminantes, o seu nível de toxicidade, a preferência microbiana e a degradação incompleta destes compostos.

A baixa biodisponibilidade de compostos orgânicos é principalmente atribuída a sua solubilidade limitada e a sua adsorção pela matéria orgânica da matriz do solo, podendo ser elevada por algumas propriedades microbianas como a produção de surfactantes naturais e a composição hidrofóbica de sua parede celular. Assim, mesmo quando microrganismos capazes de degradar os poluentes estão presentes no sistema e todas as condições ambientais estão adequadas, a inabilidade destes microrganismos em entrar em contato com os compostos poluentes pode vir a interferir negativamente nas taxas de degradação (TRINDADE, 2002).

As concentrações dos contaminantes também interferem no processo de biorremediação devido ao nível de toxicidade dos mesmos. Porém, a forte dependência da taxa de biodegradação em relação à concentração é, geralmente, observada nos hidrocarbonetos de maior solubilidade em água, isto é, de menor peso molecular e maior polaridade. Concentrações elevadas destes compostos atingem níveis de toxicidade que impossibilitam ou retardam a degradação pelos microrganismos (MARTINS *et al.,* 2003). Entretanto, de maneira geral, as altas concentrações de contaminantes podem reduzir as taxas de respiração, inibindo a biodegradação mais pela limitação de nutrientes do que pela toxicidade dos contaminantes (SCHROEDER *et al.,* 2002; SEABRA, 2005),

3.1.1 Efeitos do petróleo sobre atividades socioeconômicas

Os principais impactos socioeconômicos da contaminação por petróleo ou seus derivados são decorrentes da paralisação das atividades econômicas associadas ao mar ou aos ecossistemas contaminados, dos riscos intrínsecos à saúde publica, como as mortes causadas por explosões e incêndios, da

intoxicação causada pela ingestão de alimentos contaminados ou problemas dermatológicos e irritações nos olhos, causados pelo contato direto com o óleo.

As operações de limpeza das áreas costeiras poluídas e a deposição do material recuperado variam em custo de US$ 650 a US$ 6500 por tonelada, dependendo da disposição de mão-de-obra local (CETESB 2000). Uma limpeza completa nunca é alcançada na prática e, portanto, é primordial em uma operação de limpeza a decisão de quando se devem interromper as operações em função de suas despesas.

Com relação à deposição do material recuperado, os custos irão depender principalmente do modo como esse material será transportado, o tipo de região de deposição e o tratamento empregado.

De acordo com convenções e acordos internacionais que tratam da obrigatoriedade de compensar a vitima pelo prejuízo, muitos derramamentos devem requerer indenizações financeiras por danos causados em recursos naturais explorados ou não. Esses valores podem chegar a dezenas de milhões de dólares dependendo do volume vazado.

3.1.2 Efeitos do petróleo sobre ecossistemas marinhos.

As áreas sensíveis aos vazamentos de óleo abrangem não apenas as áreas destinadas à maricultura, a pesca, esportes náuticos e lazer, bem como os ecossistemas marinhos como manguezais, marismas, costões rochosos e praias. O conhecimento da localização é importante para orientar as atividades operacionais durante o combate ao óleo, de maneira a promover a proteção ambiental. (Snedaker, *et al*, 1985)

No que se refere aos sistemas costeiros, as respostas a um derramamento de óleo podem variar, em cada caso, dentro de limites relativamente amplos, devido ao numero de fatores que operam sobre ele.

Os ecossistemas costeiros são especialmente susceptíveis à contaminação por óleo, segundo GLUNDLACH e HAYES (1978) mangues e marismas são classificados como as áreas mais sensíveis ou vulneráveis aos efeitos potenciais do óleo. Tal vulnerabilidade é baseada na proximidade das fontes poluidoras, na dos bosques em relação ao corpo d'água principal, da

geomorfologia das áreas do nível das marés, na interação da costa com processos físicos relacionados com a deposição do óleo e na extensão do dano ambiental. (Snedaker, *et al*, 1985).

Os manguezais e marismas são locais onde o óleo, ao ser transportado por ondas e correntes para a área costeira, se acumula após um derramamento. O acesso à maioria desses ecossistemas dificulta a remoção do óleo. (Snedaker, *et al*, 1985).

De um modo geral, quando o filme de óleo atinge os manguezais, forma-se uma barreira mecânica, cobrindo as regiões entre marés, que impede a ventilação adequada do sistema radicular dificultando as trocas gasosas. (Snedaker, *et al*, 1985).

O efeito mais imediato causado pelo recobrimento mecânico das raízes é o elevado desfolhamento seguido de morte, principalmente, dos indivíduos mais jovens e, como conseqüência, a formação de clareiras. (Snedaker, *et al*, 1985).

Para SNEDAKER (1985), as repostas dos manguezais a derramamentos de óleo podem ser sintetizadas em três fases: sufocação mecânica (efeito agudo), toxicidade química crônica (efeito crônico) e recuperação.

Os manguezais e estuários são considerados os ambientes onde se esperam, em caso de acidentes, os impactos iniciais mais graves e com recuperação lenta. A elaboração de mapas de sensibilidade da costa insere-se como uma ferramenta indispensável aos planos de contingência, pois permitirá a visualização da área e a identificação dos diversos tipos de ambientes existentes e de suas respectivas sensibilidades à poluição por óleo. (Snedaker, *et al*, 1985)

Vários autores tentam definir uma escala relativa de vulnerabilidade dos ecossistemas costeiros aos derrames de petróleo. Entre os mais conhecidos índices de vulnerabilidade está o de GUNLACH e HAYES (1978), tabela 2, sendo utilizado para ecossistemas costeiros.

Tabela 2 - Vulnerabilidade dos ecossistemas costeiros a danos causados por derramamentos de óleo no mar. Fonte: Elaborado a partir de GUNDLACH e HAYES, 1978 e PEBG, 1999.

Índice de Vulnerabilidade	Ambiente	Comentários
1	Costão rochoso exposto	A reflexão das ondas mantém a maior parte do óleo afastado e favorece os mecanismos naturais de remoção e degradação.
2	Plataformas de abrasão (ação de ondas)	Pela ação de "lavagem" das ondas, a maior parte do óleo é removida por processos naturais em semanas
3	Praias com areia fina a media abrigada	O óleo fica restrito a uma camada superficial, facilitando a remoção mecânica, se necessária. No entanto, o óleo pode persistir por vários meses.
4	Praias com areia média a grossa exposta	O óleo pode penetrar e/ou se enterrar rapidamente, dificultando a limpeza. Sob condições de ondas moderadas a fortes, o óleo pode ser removido naturalmente, dentro de meses. Neste ambiente, a atividade biológica é geralmente baixa e o impacto é pequeno.
5	Planícies de maré expostas	Em terrenos compactados como estes, a maior parte do óleo não vai aderir ou penetrar.
6	Praias com areia mista (cascalho e areia)	O óleo pode penetrar e se enterrar rapidamente. Sob condições de moderada a baixa energia, o óleo pode persistir por anos
7	Praias de cascalho	O processo descrito acima é agravado pela granulometria mais grosseira. A limpeza deve se concentrar ao nível da maré alta. Um pavimento sólido asfáltico pode se formar em áreas com grande concentração de óleo
8	Costões rochosos abrigados	São áreas de reduzida ação de ondas. O óleo pode persistir por muitos anos. A limpeza não é recomendada, a menos que o acúmulo de óleo seja muito grande.
9	Planícies de maré abrigadas	São áreas de grande produtividade biológica e baixa energia de ondas. O óleo pode persistir por anos. A limpeza não é recomendada a menos que o acumulo de óleo seja muito grande.

10	Manguezais e Marismas	São os ecossistemas marinhos mais produtivos e sensíveis a qualquer tipo de impacto. O óleo pode persistir por anos. Estes ambientes são áreas de prioridade máxima de proteção.

A tabela acima qualifica os ecossistemas segundo o índice de vulnerabilidade. Os índices apresentados acima são importantes ferramentas para tomada de decisão durante os atendimentos a acidentes com derrames de óleo na zona costeira, pois dão subsídios para que se possa priorizar, por exemplo, a proteção dos ambientes mais sensíveis e vulneráveis. (Gunlach & Hayes, 1978)

3.2 Manguezais

Os manguezais, também conhecidos como florestas de mangue, são comunidades vegetais lenhosas que ocorrem ao longo dos litorais tropicais nas faixas tropicais e subtropicais do globo. No Brasil, esses ecossistemas complexos estão presentes ao longo da costa desde o estado do Amapá até Santa Catarina perfazendo um total de 25000 km^2 (Vergara-Filho 1993).

Esses sistemas desenvolvem-se nas reentrâncias da costa, em estuários e às margens de lagoas, onde a velocidade das correntes é reduzida, favorecendo o acúmulo de substâncias alóctones, geralmente trazidas pelos rios, e degradação de folhas ou outros substratos autóctones. Esta alta quantidade de matéria orgânica é muito importante nos processos de reciclagem de nutrientes influenciando a rica cadeia alimentar presente nesses ecossistemas. ((Lewis 1983).

A grande concentração e disponibilidade de alimento nos manguezais fazem com que esses funcionem como áreas de reprodução, abrigo e alimentação para muitas espécies. A vegetação local não é muito diversa, apresentando muitos representantes de poucas espécies. As principais árvores são: *Rhizophora mangle* (mangue vermelho*); Avicennia schaueriana* (mangue

siriuba); *Laguncularia racemosa* (mangue branco) e *Spartina alterniflora* (capim paraturá). Também são encontradas bromélias, orquídeas, liquens e uma alta quantidade de algas. Algumas plantas apresentam mecanismos fisiológicos especiais para eliminar o excesso de sais que são absorvidos da água salobra (Zysman, 1989).

Poucos são os organismos característicos desses ambientes, visto que a maior parte da fauna desses locais é composta por animais marinhos que passam apenas uma fase da sua vida nesses ambientes. Dentre os organismos característicos, podemos destacar alguns moluscos bivalves e alguns crustáceos como ostras e caranguejos (Araújo, 1999). Estes últimos representam 80% dos organismos macrobentônicos presentes nos manguezais e, além do interesse comercial, estes crustáceos desempenham papel importante na reciclagem de nutrientes e, devido a estratégia de cavar tocas para se abrigarem, são importantes na aeração do sedimento e estímulo da fauna microbiana dos manguezais (Vergara Filho, 1992).

Os manguezais são considerados áreas de grande importância para a população humana, pois possuem uma grande riqueza de recursos naturais sendo considerados como berçários dos mares. Porém, ao longo dos anos, esses ambientes vêm sofrendo diversas agressões que contribuem para sua degradação, seja na exploração desenfreada e não planejada dos seus recursos, seja nos aterros que vêm sofrendo ou, ainda, nos aportes de poluição de esgotos domésticos e industriais. (Vergara Filho, 1992).

Os manguezais são considerados áreas de preservação permanente (Lei Federal n° 4.771, 15/09/65) e reserva biológica, “em toda a sua extensão” (Resolução. CONAMA, n° 004, 18/09/85).

Nas grandes cidades, a maior parte dos resíduos poluentes das indústrias, refinarias de petróleo, postos de abastecimento e pela própria população (esgoto doméstico) é jogada nos rios e mares e, na maioria das vezes, não recebem tratamento adequado para minimizar os efeitos poluidores desses resíduos (Souza, 1998).

A poluição é uma alteração desfavorável ao meio ambiente podendo causar mudanças na composição química e física do ambiente e, além disso, alterar bruscamente a comunidade microbiana (Souza, 1998).

Considerando as características peculiares que o ecossistema de manguezal apresenta e a grande devastação que vem sofrendo ao longo de toda a costa do Brasil, é de fundamental importância a proteção das áreas remanescentes, não apenas como banco genético e acervo para fins de pesquisa, mas igualmente como alternativa para a recuperação de áreas semelhantes já degradadas pela ação humana.

3.3 Poluição por Óleo nos Manguezais

Os impactos causados pelo óleo dependem do tipo de óleo e da duração do derramamento, sendo de modo geral causados por efeitos físicos ou toxicológicos do óleo. O efeito pode ser agudo, imediato, ao atingir a casca, pneumatóforos, raízes escoras e sedimento. Ocorre o amarelamento das folhas, o desfolhamento, culminando com a morte das árvores. Se a quantidade de óleo for muito grande, as plantas morrem entre 48 e 72 horas. A flora e a fauna bentônica microscópica morrem de imediato. Alguns caranguejos fogem do local, mas vão morrer adiante (Lai, 1986).

Os efeitos crônicos, geralmente ocorrem após o primeiro mês, e estão relacionados aos efeitos toxicológicos do óleo. Pode-se listar a redução na reprodução das plantas e na sobrevivência das sementes, bem como a redução na produção de serrapilheira. Efeitos genéticos são também percebidos, com várias plantas apresentando má formação devido a mutações causadas pelos efeitos toxicológicos (Klekowski, 1994).

Efeitos secundários também podem ser presenciados. O óleo residual remanescente na superfície dos sedimentos dos manguezais atingidos pelo derramamento durante a Guerra do Golfo aumentou a temperatura do solo a ponto de afetar a germinação e crescimento das plantas da zona intermarés (Boer, 1993). A decomposição que segue a mortalidade em larga escala provoca significante erosão e mesmo subsidência da área onde a floresta estava localizada (Dodge *et al*, 1995).

A geomorfologia e hidrodinâmica nos manguezais também vão determinar o quanto o óleo vai persistir dentro destes. Áreas mais protegidas da ação das correntes e das ondas são mais seriamente afetadas do que as áreas externas, de franja. A densidade de caranguejos e conseqüentemente de buracos pode influenciar na penetração e persistência do óleo dentro do sedimento.

A degradação do óleo residual que contamina os manguezais ocorre lentamente uma vez que estes sedimentos são anaeróbicos logo abaixo dos primeiros centímetros de profundidade (Burns *et al*, 2000). As características peculiares destes ecossistemas fazem com que estes possam levar mais de 30 anos para se recuperar dos derramamentos de óleo mais severos (Burns *et al*, 2000)

3.4 Legislação (anexo 1).

Será apresentado nesse capítulo de maneira sucinta, a Legislação Brasileira Protetiva referente aos Manguezais e as principais convenções e acordos internacionais vigentes, bem como a regulamentação brasileira, pertinente à prevenção da poluição por óleo.

3.5 Alternativas de tratamento de solos contaminados

A contaminação de solos por petróleo e seus derivados tem sido um dos principais problemas ambientais das últimas décadas, tendo em vista a complexidade desses compostos e a dificuldade de remediação dos mesmos (Franco *et al.*, 2004).

Os métodos de tratamento mais utilizados na indústria de petróleo são normalmente divididos em três grandes categorias: métodos físicos, químicos e biológicos (Khan *et al.* 2004).

3.5.1 Métodos Físico-Químicos

Os tratamentos físicos envolvem a separação das fases do solo e contaminante. Já os tratamentos químicos se baseiam nas diferenças das propriedades químicas dos diversos componentes dos contaminantes e envolvem, geralmente, uma ou mais das seguintes reações químicas: neutralização, fotólise e/ou oxi-redução. Como exemplo de processos químicos, o processo conhecido como estabilização refere-se à redução do risco de alastrar a contaminação pela conversão do resíduo em um contaminante menos solúvel, imóvel ou em uma forma menos tóxica. Já processos como vitrificação e incineração são processos térmicos, cuja forma de ação dependerá da composição do contaminante (Mariano, 2005).

A Tabela 3 apresenta as principais operações e/ou processos físicos e químicos utilizados em todo mundo para tratamento de resíduos sólidos.

Tabela 3: Principais operações e/ou processos físicos e químicos utilizados para o tratamento de resíduos sólidos

Operação/Processo	Objetivo	Tipos de Resíduos
Encapsulamento	Estocagem	1, 2, 3, 4 e 5
Extração por Solvente	Separação	1, 2, 3, 4 e 5
Neutralização	Detoxificação	1, 2, 3 e 4
Oxidação (POAs)	Detoxificação	1, 2, 3 e 4
Vitrificação	Imobilização, Detoxificação	1, 2, 3, 4 e 5
Dessorção Térmica	Redução de volume, separação, detoxificação	1, 2, 3, 4 e 5
Incineração	Redução de volume, detoxificação	3, 5, 6, 7 e 8

Tipos de Resíduos: 1, químicos inorgânicos sem metais pesados; 2, químicos inorgânicos com metais pesados; 3, químicos orgânicos sem metais pesados; 4, químicos orgânicos com metais pesados; 5, radioativos; 6, biológico; 7, inflamáveis; 8, explosivos.
Fonte: Adaptada de CETESB *apud* MARIANO, 2005.

Dentre as técnicas citadas, a incineração é uma das alternativas mais empregadas para a destruição de resíduos sólidos de características orgânicas. É um método de tratamento que utiliza a decomposição térmica via oxidação, com o objetivo de tornar um resíduo menos volumoso, menos tóxico ou atóxico, ou ainda eliminá-lo, em alguns casos.

3.5.2 Biorremediação

O tratamento biológico, ao contrário dos processos físicos e químicos, é considerado um método seguro, eficiente e de menor custo a ser aplicado na remediação de solos contaminados por compostos orgânicos (Trindade, 2002; D'Annibale *et al.* 2006). Este tratamento é baseado na capacidade das da comunidade microbiana ou de plantas de imobilizar ou degradar esses compostos, denominado biodegradação, que quando aplicado como uma tecnologia de remediação ambiental é chamada de biorremediação (Martins *et al.,* 2003).

A biorremediação é uma tecnologia ecologicamente aceitável para a remediação de solos contaminados, a qual utiliza o estímulo da atividade microbiana para degradar compostos orgânicos, em especial hidrocarbonetos de petróleo, resultando na transformação em metabólitos ou mineralização dos contaminantes. (Molina-Barahona *et al.* 2005, Farhadian *et al.* 2007)

A biorremediação tem sido definida de muitas formas. A Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA) apresenta uma definição genérica sobre a prática da biorremediação: *"Biorremediação é o processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de microrganismos para degradar substâncias toxicamente perigosas transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas*." O Escritório de Estudos Geológicos do Departamento do Interior do Governo Americano (USGS), por sua vez, adota a definição do *American Heritage Dictionary of the American Language* que define biorremediação como:

"*O uso de agentes biológicos tais como bactérias e plantas, para remover ou neutralizar contaminantes, como poluentes do solo e da água"* (Chapelle *apud* Martins *et al.,* 2003).

A biorremediação é a ciência que busca, através do estudo, controle e aplicação da propriedade biodegradativa dos microrganismos, a remediação ambiental. Uma das maiores vantagens no estudo da biorremediação de ambientes contaminados por óleo cru é seu custo-benefício, quando comparado a algumas técnicas físico-químicas que são caras e precisam ser rigorosamente controladas para atingir bons resultados. No tratamento

biológico de solos contaminados por petróleo, os microrganismos, sendo as bactérias as mais estudadas, utilizam os hidrocarbonetos, principais constituintes do contaminante, como fonte de carbono e energia alternativa para formação de biomassa (Alexander,Loehr 1992; Jorgensen *et al.* 2000; Yu *et al.* 2005).

Esse conceito, de que os microrganismos podem utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia, é difundido há muito tempo. Em 1895, um estudo mostrou a degradação da parafina pelo fungo *Botrytis cinerea*. Desde então, o metabolismo de hidrocarbonetos tem sido extensivamente estudado. (Alexander,Loehr 1992; Wilson,Jones 1993)

Esse metabolismo envolve a transformação dos hidrocarbonetos em unidades menores e, posteriormente, a incorporação como material celular (biotransformação) ou conversão a gás carbônico (mineralização), resultando na redução da concentração de hidrocarbonetos de petróleo (Robles-Gonzalez *et al.* 2008).

As tecnologias de biorremediação de solos podem ser aplicadas *in situ*, isto é, no próprio local onde ocorreu a contaminação (impacto), não havendo necessidade da remoção dos solos contaminados (Farhadian *et al.* 2007). Este processo pode ocorrer de forma engenheirada ou intrínseca, tendo esta última reduzida interferência da ciência já que a biorremediação se vale dos microrganismos existentes no local para a biodegradação (Evans *et al.* 2004; von der Weid *et al.* 2007).

Como exemplo, a contaminação de solos por BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), normalmente associados a vazamentos de produtos derivados de petróleo, atinge rapidamente águas subterrâneas devido a grande mobilidade desses compostos. Com isso, o processo tradicional de remoção de BTEX envolve o bombeamento das águas subterrâneas contaminadas para tratamento com carvão ativado e remoção de gases. No entanto, a atenuação natural vem recebendo atenção crescente pelo seu menor custo de aplicação e por ser ambientalmente mais segura devido ao menor distúrbio da área contaminada, menor geração de resíduos e reduzida exposição humana ao meio contaminado (Abu,Dike 2007)

Há casos em que a biorremediação é possível, porém é necessária uma série muito maior de providências do que o simples auxílio ao meio ambiente natural. Nesses casos, é comum a aplicação de técnicas de engenharia como construções de dutos para oxigenação, recolhimento/tratamento de gases, modificações topográficas do local, adição de microrganismos exógenos, implantação de biorreatores, aplicação de nutrientes, entre outras. As técnicas que exigem grandes quantidades de recursos tecnológicos são conhecidas como biorremediação engenheirada, podendo também ser realizada *in situ*, o que inicialmente é sempre recomendável por questões econômicas e de menor agressão ao meio ambiente (Khan *et al.* 2004)

Existem casos cuja remoção do material contaminado de sua origem para um local adequado, com um tratamento posterior, é exigida para evitar riscos de alastramento da área contaminada, como contaminação de cursos de água ou lençóis freáticos. Neste caso as tecnologias aplicadas são denominadas *ex situ (Carberry,Wik 2001)*

A Figura 1 apresenta um resumo das principais denominações que a biorremediação pode assumir segundo a localização onde ela é praticada e as ações aplicadas.

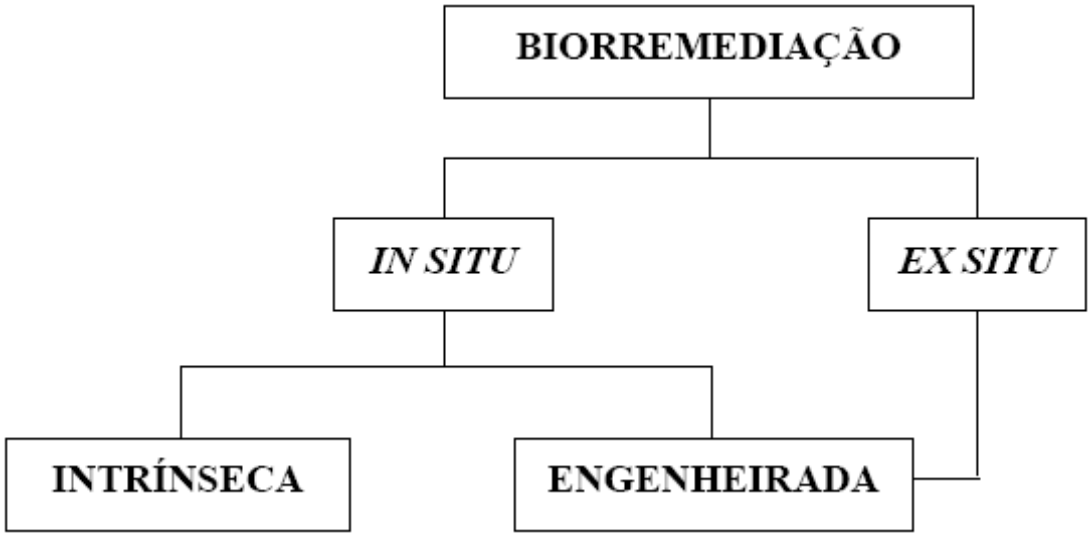


Figura 1: Denominações usualmente empregadas para biorremediação

Fonte: CETESB 2000

O sucesso da biorremediação quer seja *in situ* ou *ex situ,* está diretamente ligado a uma compreensão abrangente das condições locais e a

uma avaliação cuidadosa da aplicabilidade de uma determinada tecnologia. Na revisão realizada por Khan e colaboradores (2004), são apresentadas, de forma detalhada, as tecnologias químicas, biológicas e físicas atualmente disponíveis no tratamento de solos e águas subterrâneas contaminados por petróleo e produtos relacionados. Para cada alternativa de remediação, foram avaliados e discutidos o processo, aplicabilidade, vantagens, limitações e preocupações, parâmetros específicos do local e custos.

Dentre os vários tratamentos que compõem o processo de Biorremediação *in situ*, a Bioestimulação parece ser o mais usual. Este tratamento envolve basicamente a adição de nutrientes (N e P), necessários para estimular os microrganismos indígenas, acelerando o consumo da matéria orgânica presente (contaminante) (Margesin *et al.* 2000)

O nitrogênio é o nutriente mais comumente adicionado em processos de Biorremediação. Ele pode ser utilizado tanto para o crescimento celular ($NH4^+$ ou NO_3^-) quanto como aceptor final de elétrons (NO_3^-). Ele pode ser adicionado na forma de uréia ou cloreto de amônio, mas também pode ser utilizado como qualquer sal de amônio, como o nitrato de amônio por exemplo.

O fósforo pode ser empregado como fosfato de sódio, fosfato de potássio, sais orto fosfóricos e polifosfatos. Estas fontes são facilmente assimiladas pelo metabolismo microbiano, estimulando a biodegradação de hidrocarbonetos. O estímulo algumas vezes é imediato, mas pode requerer algum tempo para que o benefício seja evidente e raramente a adição de outros elementos além de P, N e O_2 pode estimular a biodegradação em ambienteis naturais impactados. (Coulon *et al.* 2007; Delille,Coulon 2007; Jimenez *et al.* 2007)

Atualmente, diversos estudos vêm avaliando a utilização de fertilizantes de liberação lenta, como uma forma de bioestímulo, para fornecer as concentrações de nutrientes necessárias ao processo de biorremediação. (Liang,Liu 2006; Wu *et al.* 2008; Xu *et al.* 2005; Xu *et al.* 2004). Esses produtos, são usualmente utilizados para diferentes cultivares agrícolas e fornecem nutrientes para as culturas durante todo o seu ciclo de crescimento. Apresentam ainda, diversas concentrações de nutrientes com diferentes espessuras de camada protetora, o que garante a liberação desses nutrientes

num período de 45 dias a 14 meses. Essas cápsulas são revestidas normalmente, por uma resina orgânica que é degradada com o esgotamento dos nutrientes.

Podemos observar na figura 2, o esquema de liberação dos nutrientes pelos fertilizantes de liberação lenta. A água penetra pela resina e dissolve os nutrientes, possibilitando sua liberação para o meio. Esta liberação ocorre por pressão osmótica, podendo variar de intensidade conforme as variações de umidade e temperatura.

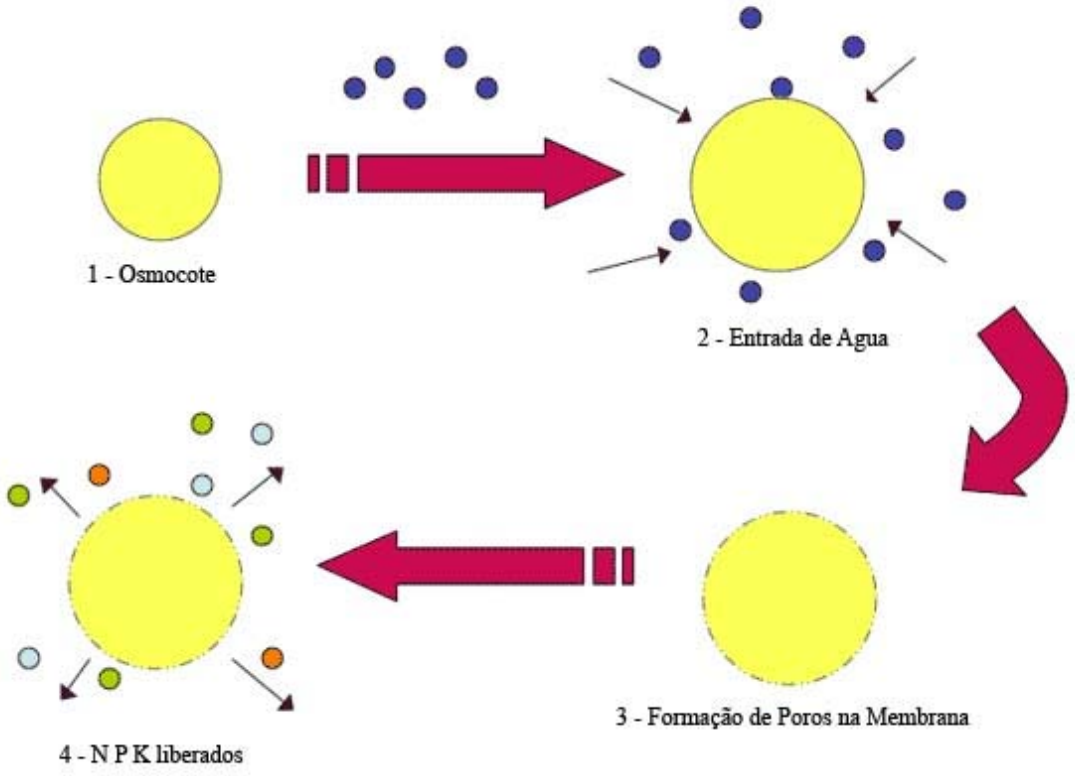


Figura 2 - Esquema de um Fertilizante de Liberação Lenta

A Biorremediação também pode utilizar, além da população microbiana indígena presente nos sítios para degradar os contaminantes, a adição de um inóculo microbiano aumentado em laboratório e que apresenta capacidade de degradar ou produzir substâncias que favoreçam a eficiência do processo. Este tipo de tratamento é denominado de bioaumento (Jacques *et al.* 2008)

O uso do Bioaumento como tecnologia de Biorremediação tem sido bastante reportado pela literatura (Jacques *et al.* 2008; Kasai *et al.* 2007; Yu *et al.* 2005). A introdução de microrganismos autóctones é conhecida como bioenriquecimento. A concentração do inóculo adicionado é um fator bastante importante para aumentar a taxa de biodegradação. A efetividade está diretamente relacionada à manutenção de uma concentração significativa durante todo o período de tratamento. Muitas vezes, essa concentração é conseguida através de adições periódicas, o que pode permitir uma distribuição mais uniforme dos microrganismos na área tratada. (Gilbert,Crowley 1998)

3.5.2.1 Atenuação Natural Monitorada

A Atenuação natural, também conhecida como remediação passiva, biorremediação *in situ*, remediação intrínseca, bioatenuação, e biorremediação intrínseca, é um método de tratamento *in situ* que usa processos naturais biológicos, químicos e físicos. O processo ocorre sem intervenção humana de forma a conter a expansão da contaminação, reduzindo a massa, a toxicidade, o volume ou concentração dos contaminantes. Esta redução pode ocorrer pela biodegradação do contaminante, sua diluição simples, dispersão, volatilização ou ainda pela adsorção, isto é, ligação desses compostos a partículas do solo para prevenir a migração do contaminante. (Khan *et al.* 2004).

Dentre as principais vantagens do processo de atenuação natural o custo-benefício é o de maior destaque, tendo em vista que está relacionado somente aos custos de avaliação local e monitoramento. A aplicação da atenuação natural como uma tecnologia de remediação não é indicada para um elevado grau de contaminação e de comprometimento do local contaminado, tendo em vista que por ser um processo mais lento, pode apresentar riscos à população.

3.5.2.2 Biosparging

O *biosparging,* figura 3, envolve a injeção de ar atmosférico sob pressão e nutrientes, transferindo os contaminantes da zona saturada para a zona insaturada (superfície) aumentando a taxa de degradação de contaminantes pelos microrganismos autóctones.

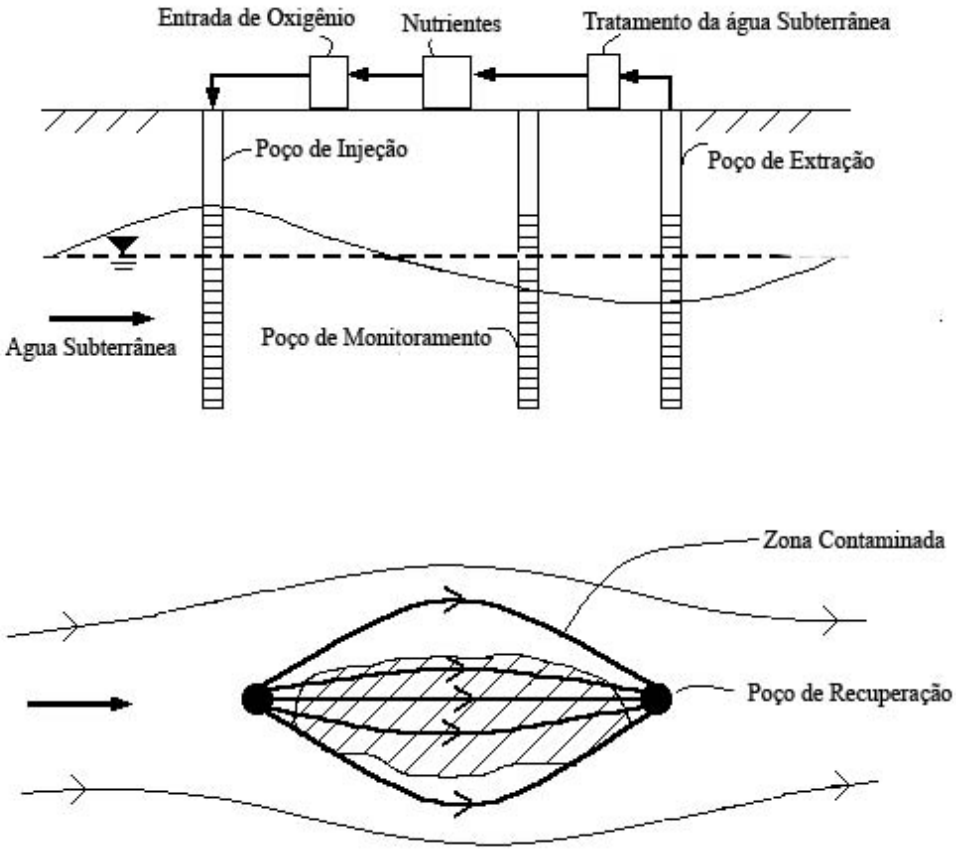


Figura 3: Esquema *Biosparging*

Fonte: adaptado de USEPA 2004

3.5.2.3 Bioventing

O processo de *bioventing, figura 4,* consiste na injeção de ar no solo contaminado para maximizar a biodegradação *in situ* e minimizar, ou eliminar, a volatilização dos contaminantes para a atmosfera. Diferentemente do *biosparging*, que envolve a insuflação de ar e o bombeando de nutrientes na zona saturada, o *bioventing* insufla ar na zona não saturada ou vadoza (Lee *et al.* 2006; Osterreicher-Cunha *et al.* 2004). O *bioventing*, quando comparado ao

biosparging, também favorece a degradação de contaminantes orgânicos menos voláteis e, como requer um volume menor de ar, permite o tratamento de solos menos permeáveis.

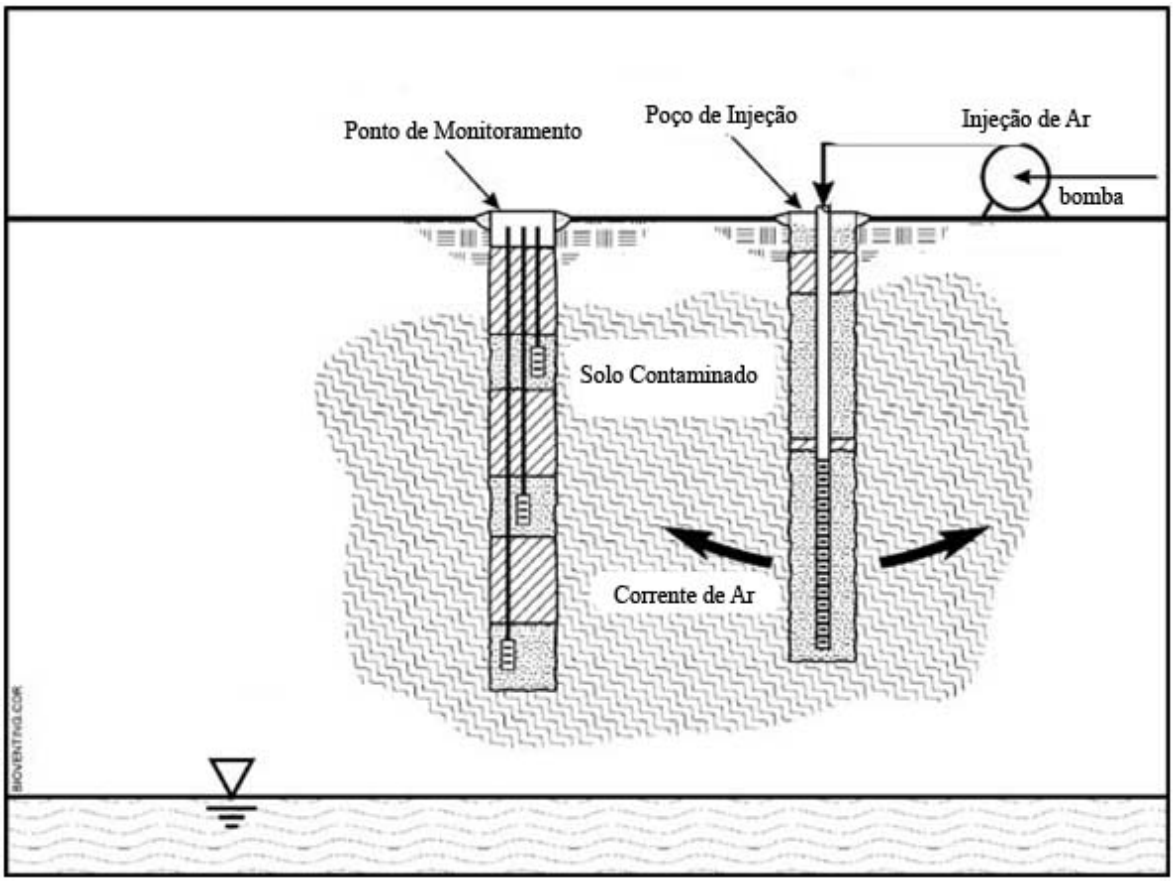


Figura 4: Esquema do *Bioventing*

Fonte: Adaptado de USEPA 2004

3.5.2.4 Bioslurping

O *Bioslurping, figura 5,* é uma tecnologia de remediação *in situ* que associa elementos de *bioventing* e bombeamento para recuperar contaminantes livres de águas e solos subterrâneos promovendo a biorremediação aeróbia de hidrocarbonetos. O sistema de *bioslurping* consiste na instalação de um tubo de sorção, conectado a uma bomba de vácuo que remove o produto livre (vapor) junto com um pouco da água subterrânea. Os líquidos (produto e solução de água subterrânea) são enviados a um separador óleo/água, e os vapores para um separador de líquido/vapor. Além disso, a extração de vapores pelo tubo promove a aeração da zona insaturada, aumentando o conteúdo de oxigênio e a taxa de degradação aeróbia.

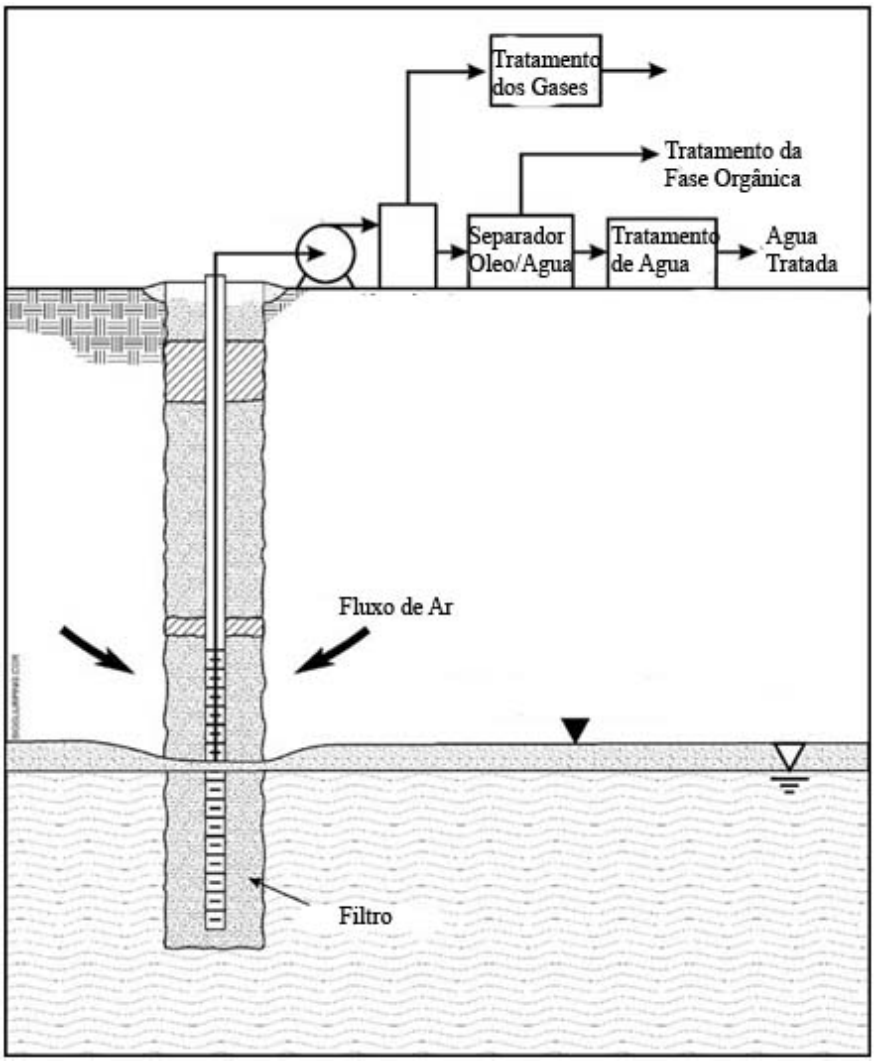


Figura 5: Esquema do *Bioslurping*

Fonte: USEPA 2004

3.5.2.5 Fitorremediação

A fitorremediação, figura 6, é um processo baseado na habilidade de plantas de absorver, acumular e/ou degradar compostos que estão presentes nos solos e em ambientes aquáticos. Há cinco processos básicos que podem ocorrer durante a fitorremediação: a rizofiltração, na qual a remediação de águas ocorre pelo transporte dos contaminantes pelas raízes das plantas; fitoextração que envolve a captação do contaminante do solo; fitotransformação que é aplicável para solos e água e envolve a degradação do contaminante pelo metabolismo da planta; fitoestimulação ou biorremediação auxiliada pela planta que envolve o estímulo da degradação microbiana pelos

microrganismos localizados na rizosfera; e fitoestabilização que utiliza plantas para reduzir a migração dos contaminantes no solo. (Khan *et al.* 2004) (Xia *et al.* 2003)

A fitorremediação vem ganhando força como uma técnica eficaz de biorremediação pelos resultados obtidos e pelo tratamento estético que esta técnica oferece. (Hutchinson *et al.* 2001; Keller *et al.* 2008; Sun *et al.* 2004)

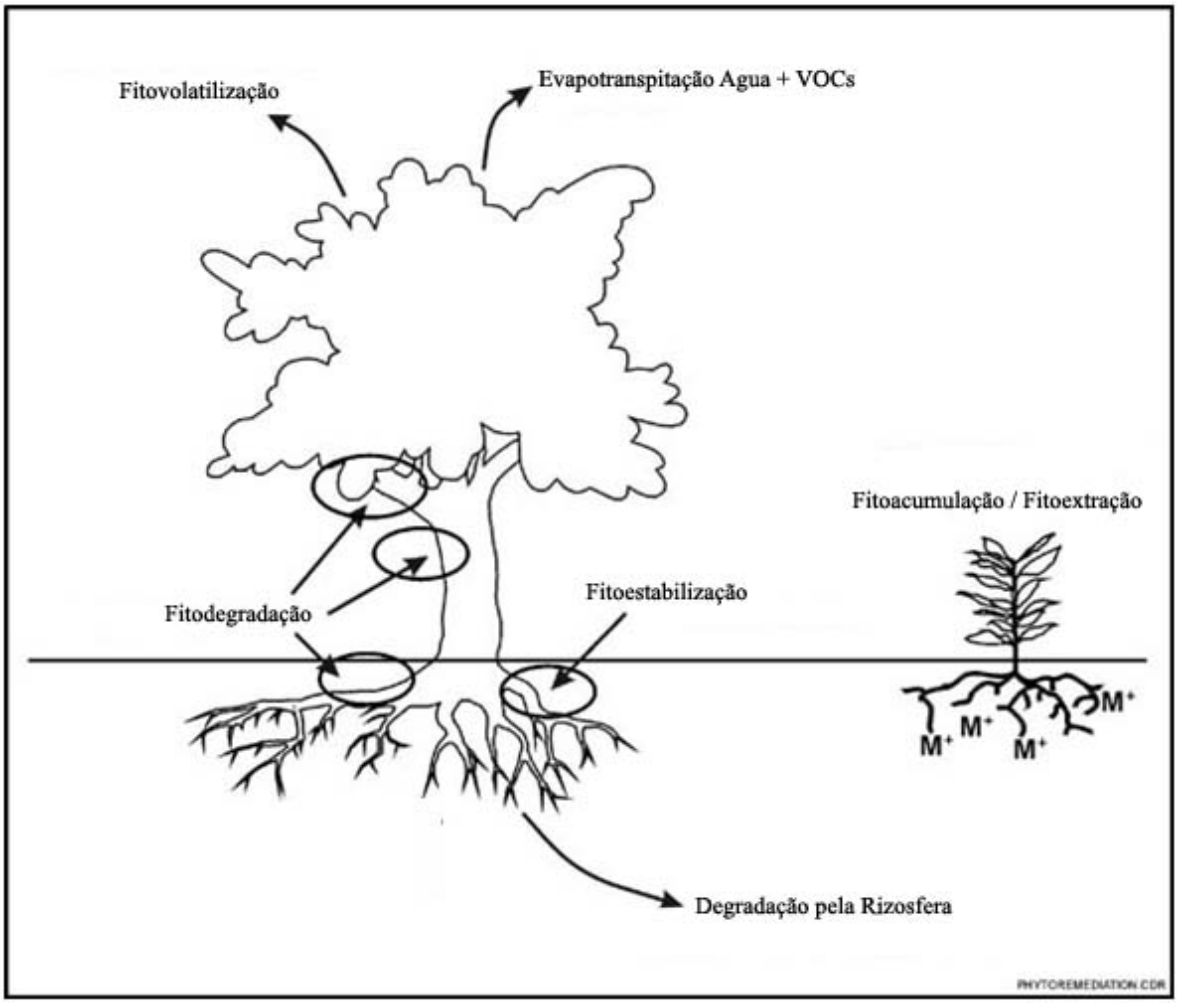


Figura 6: Esquema da Fitorremediação Fonte:Adaptado de USEPA 2004

3.5.2.6 Landfarming

O *Landfarming,* figura 7, é uma tecnologia de remediação *ex situ* que reduz a concentração de componentes de petróleo presentes em solos através de processos associados à biorremediação. Esta tecnologia envolve a distribuição do solo contaminado escavado em uma pequena camada na superfície do solo de um local em tratamento. O revolvimento periódico do solo aumenta o contato entre os microrganismos e os compostos orgânicos e

fornece o oxigênio necessário para a degradação biológica aeróbica. (Franco *et al.*, 2004).

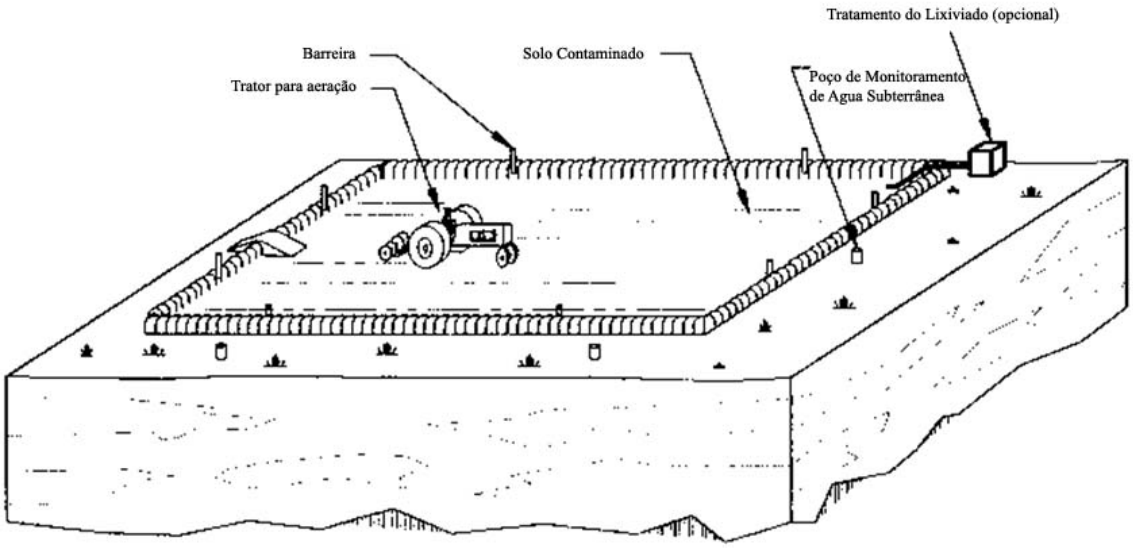


Figura 7: Esquema Landfarming

Fonte: Adaptado de USEPA 2004

3.5.2.7 Biorreatores

Os tipos de biorreatores mais comuns para o tratamento de solos contaminados são os reatores de lama ou “bioslurry”. Este tratamento biológico *ex situ* requer a remoção do solo contaminado que é misturado à uma fase aquosa que pode conter microrganismos, nutrientes e outros aditivos (Khan *et al.* 2004).

Dentre as tecnologias *ex situ*, a utilização de biorreatores vem apresentando vantagens tais como: monitoramento efetivo do processo, maior controle das variáveis (valor de pH, temperatura, umidade etc.) e melhor incorporação de aditivos. Além disso, os biorreatores são sistemas fechados que permitem o controle de emissões e possibilita, na maioria dos casos, a redução do tempo de processo (Dean-Ross 2005). Entretanto, A necessidade de remover o solo para o tratamento por tecnologias *ex situ*, encarece muito o processo

3.5.2.8 Biopilhas

O sistema de biopilhas ou biocélulas, figura 8 é uma tecnologia *ex situ* de biorremediação, que envolve o empilhamento de solos contaminados. O objetivo do processo é simular a atividade microbiana aeróbia acelerando a degradação do poluente pela aeração, adição de nutrientes e correção de umidade (Jorgensen *et al.* 2000; Khan *et al.* 2004; Mohn *et al.* 2001). A área de disposição das pilhas é freqüentemente coberta com uma manta impermeável para reduzir a lixiviação do poluente para o solo não contaminado. A aeração dessas pilhas pode ser realizada de duas formas: mecanicamente ou por um sistema subterrâneo de passagem de ar (dutos). Além disso, as biopilhas são cobertas para prevenir a perda por evaporação e volatilização e para manter a temperatura. (Khan *et al.* 2004; Mohn *et al.* 2001)

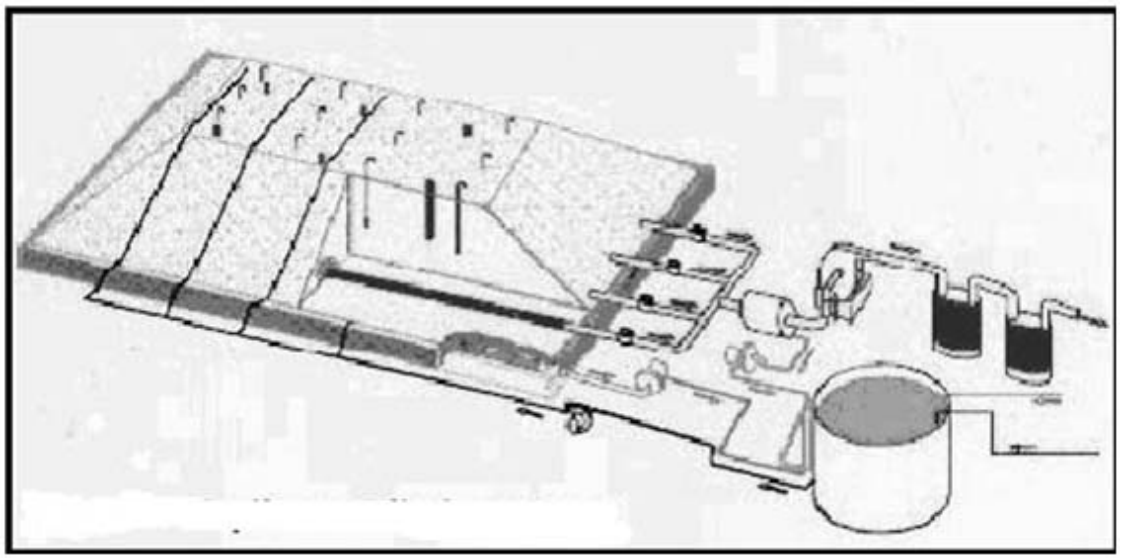


Figura 8 - Esquema Biopilha

Fonte: Adaptado de USEPA 2000.

3.6 Custos de Tratamento

A tabela 4 apresenta os custos aproximados das tecnologias de remediação de solos e águas subterrâneas contaminadas, segundo (Khan *et al.* 2004)

Tabela 4 - Custos das tecnologias de Remediação de solos e águas subterrâneas

Tecnologias de Tratamento	Custo Aproximado US$/t
Tratamento Térmico	25-225
Lavagem de Solos	120-200
Barreiras Reativas	120-200
Atenuação Natural	*custos de monitoramento
Incorporação de Nutrientes	50-130
Pump and Treat	195-365
Extração de Vapores (SVE)	20-50
Air Sparging	20-50
Bioventing	20-50
Biosparging	30-190
Bioslurping	50-150
Biorreatores	130-200
Landfarming	30-60
Biopilhas	170-338
Fitorremediação	15-25

Fonte: adaptado de (Khan *et al.* 2004)

É importante ressaltar que o custo final da tecnologia de remediação empregada varia de acordo com alguns parâmetros, entre eles: custo da implantação do projeto, características do contaminante, extensão da contaminação, características geológicas e hidrogeológicas, tempo de tratamento e a necessidade de pré ou pós-tratamentos. (Khan *et al.* 2004)

3.7 Fatores ambientais importantes para a Biorremediação

Além dos microrganismos com a habilidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo, o tipo do contaminante e diversos outros fatores ambientais influenciam este processo melhorando a degradação do contaminante. Os mais importantes são a temperatura, concentração de oxigênio (aeração eficiente), pH e nutrientes inorgânicos (Alexander,Loehr 1992; Molina-Barahona *et al.* 2005; Osterreicher-Cunha *et al.* 2004)

3.7.1 Temperatura

A temperatura atua tanto na natureza física e química dos hidrocarbonetos de petróleo, como pela alteração das populações microbianas. Nas temperaturas abaixo de 15ºC predominam microrganismos psicrófilos que são organismos extremófilos capazes de crescer e reproduzir em temperaturas frias abaixo de 15ºC. A membrana celular lipídica quimicamente resistente ao enrijecimento causado pelo resfriamento extremo, é responsável por manter o meio intracelular líquido e proteger o DNA até mesmo em temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água. Já os mesófilos são microrganismos que crescem melhor em temperaturas moderadas, tipicamente entre 25 e 40°C. Os termófilos, outro tipo de extremófilos, são microrganismos que crescem a temperaturas relativamente altas, acima de 45°C. Como uma condição prévia para a sua sobrevivência, os termófilos contêm enzimas que resistem a altas temperaturas (Chamkha *et al.* 2008; Wagner,Wiegel 2008).

Em geral, baixas temperaturas acarretam o aumento da viscosidade do óleo e a volatilização dos alcanos de cadeias curtas é reduzida, o que leva a um processo mais lento, devido à redução na atividade enzimática. (Neff *et al.* 2006; Page *et al.* 2002; Rice *et al.* 2003).Em alguns estudos, a variação na taxa de degradação do contaminante é observada durante um mesmo dia. Isto porque os microrganismos têm um ciclo diário de atividade biológica relacionado principalmente a flutuações diárias de temperatura (Fiuza,Vila 2005)

3.7.2 pH

Valores extremos de pH são inibitórios para a grande maioria dos processos microbianos de degradação (Boszczyk-Maleszak *et al.* 2006; Shin,Kim 2004). Além de estar diretamente relacionada ao metabolismo dos microrganismos, a alteração de pH pode influenciar a solubilidade dos contaminantes em água como também a intensidade da sorção destes no solo (Boszczyk-Maleszak *et al.* 2006)

Em alguns casos, o controle do pH durante o processo pode ser de extrema
importância para a eficiência do mesmo. Segundo Boopathy (2003), o valor de pH durante o processo de tratamento de um solo em reator de lama pode reduzir devido ao aumento da concentração de ácidos graxos durante a metabolização do contaminante, como foi verificado pelo autor, para óleo diesel. Uma forma de elevar os valores de pH seria adicionando óxido de cálcio (cal).

3.7.3 Nutrientes

Os nutrientes essenciais ao crescimento celular são o nitrogênio e o fósforo, os quais devem estar balanceados, propiciando uma boa relação com o carbono. Geralmente, em ambientes contaminados por hidrocarbonetos, o aumento da quantidade de carbono proveniente deste contaminante faz com que estes nutrientes necessários para o crescimento ótimo microbiano estejam presentes em quantidades inferiores. Assim, freqüentemente há necessidade de correção das concentrações de nitrogênio e fósforo utilizando fontes externas desses nutrientes como sais inorgânicos (amônio, nitratos e fosfatos) ou fertilizantes utilizados na agricultura, como uréia. (Coulon *et al.* 2007; Yu *et al.* 2005)

A influência da adição de nutrientes na biodegradação de um óleo cru em um solo agrícola foi estudada em microcosmos adicionados ou não de fertilizantes com duas concentrações distintas de nutrientes: alta (3000 µg N, 450 µg P e 1500 µg por quilo de solo seco) e baixa (850 µg N, 85 µg P e 240 µg K por quilo de solo seco). O autor observou que a adição de nutrientes no

solo propiciou uma maior remoção de hidrocarbonetos em ambas as condições, além de estimular os microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo. Porém, este estímulo teve um limite, pois nas concentrações mais altas de nutrientes, foi observado um efeito inibitório na microbiota. Ao final de 90 dias de experimento, para a alta concentração de nutrientes foi observada uma remoção de hidrocarbonetos lineares, ramificados e cíclicos de 91, 75 e 37%, respectivamente. Enquanto para as baixas concentrações de nutrientes foi observada uma remoção de hidrocarbonetos lineares, ramificados e cíclicos de 100, 85 e 57%
(Chaineau *et al.* 1999).

3.7.4 Aeração

A quantidade de oxigênio é outro fator importante na biorremediação de solos contaminados por resíduos de petróleo, pois geralmente este processo é aeróbio e os microrganismos heterotróficos utilizam o oxigênio como aceptor final de elétrons, mas também como substrato nas reações catalisadas pelas enzimas oxigenases. Conseqüentemente, uma baixa concentração de oxigênio afeta a mineralização dos hidrocarbonetos pelos microrganismos, tornando-se um fator limitante. Fatores como tipo de solo, teor de umidade, baixa permeabilidade e baixas temperaturas podem afetar a aeração do solo, reduzindo a troca de gás com o ar atmosférico, assim como reduzindo a difusão do oxigênio no solo.

A difusão é o principal processo de transporte do oxigênio no solo, que pode ser maior quando a aeração forçada é aplicada, aumentando a concentração de oxigênio no solo, bem como transferindo para o ar atmosférico o gás carbônico, produto do metabolismo microbiano. Porém, quando somente a difusão do ar atmosférico é responsável pelo transporte de oxigênio no solo ocorre a formação de gradientes verticais deste gás, resultante do consumo microbiano do mesmo durante o processo de biodegradação. Nos solos sem contaminação a difusão do ar atmosférico normalmente é suficiente para suprir as deficiências de oxigênio e reduzir o excesso tóxico de gás carbônico proveniente da metabolização do contaminante, o que não é observado para os solos contaminados com óleo.

(Lee *et al.* 2006; Osterreicher-Cunha *et al.* 2004).

É importante ressaltar que, devido às particularidades dos sedimentos de manguezal e por serem extremamente anóxicos, a estratégia de incorporação de oxigênio não é usual, uma vez que irá interferir em toda a dinâmica do sedimento e, provavelmente, resultará numa diminuição dos índices de degradação do poluente. Na realidade, principalmente para ecossistemas de manguezais, esses métodos são reportados mais como prejudiciais do que benéficos, como descrito no "GUIDELINES FOR THE BIOREMEDIATION OF MARINE SHORELINES AND FRESHWATER WETLANDS" (Zhu *et al,*. 2001), preparado pela agência de proteção ambiental dos Estados Unidos.

Atualmente, diversos estudos envolvendo a biodegração em anaerobiose estão sendo realizados e irão trazer novas perspectivas para a biorremediação em anaerobiose (Dou *et al.* 2008; Hu *et al.* 2007; Kasai *et al.* 2007).

3.9 –Ecologia Microbiana Molecular

Em função do grande avanço tecnológico, foi possível verificar que o conhecimento acerca da biodiversidade microbiana existente no planeta é praticamente insignificante. Esta falta de conhecimento se deve em grande parte ao fato de que os microrganismos precisam ser cultivados para serem caracterizados. Sabe-se hoje em dia que apenas uma pequena fração dos microrganismos presentes no meio ambiente (0,1 a 10%) podem ser cultivados por técnicas convencionais (Watanabe *et al.* 2001, Rosado, 1997)

Recentes avanços nas técnicas de biologia molecular, somados aos grandes desenvolvimentos que vem ocorrendo na área de bioinformática, produziram uma renovação na microbiologia ambiental, constituindo uma nova área que tem sido referida como Ecologia Microbiana Molecular (Rosado, 1997).

Neste contexto, a utilização de técnicas moleculares vem se tornando de extrema importância para o estudo da ecologia microbiana, pois essas técnicas nos permitem adquirir informações sobre os microrganismos cultiváveis e os não cultiváveis presentes nas amostras. (Rosado, 1997)

3.9.1 Extração de ácidos nucléicos a partir de amostras ambientais

Existem muitos protocolos descritos para extração direta e indireta de DNA de solo (amostras ambientais). A extração direta envolve lise celular direta na matriz seguida da extração do DNA, enquanto a extração indireta envolve a separação das células para posterior lise e extração do DNA. (Liang,Liu 2006; Schneegurt *et al.* 2003). Em ambos os métodos, é necessário uma etapa posterior de purificação dos ácidos nucléicos. (Rosado, 1997).

Uma grande parte desses protocolos foi testada em um número limitado de tipos de solo, principalmente com baixo conteúdo de matéria orgânica, não sendo aplicados a todos os tipos de amostras ambientais (Roh *et al.* 2006; Tsai,Olson 1991; Yeates *et al.* 1998; Zhang *et al.* 2005).

Atualmente, existem diversos kits comerciais para e extracao de DNA de amostras ambientais, como por exemplo o FAST DNA Spink Kit for Soil.

3.9.2 RNA Ribossômico 16s (rRNA 16s)

As seqüências de RNA ribossomais 16S tem sido preferencialmente escolhidas para determinação da estrutura filogenética de espécies bacterianas porque apresentam vantagens como:

- Encontram-se presentes em todos os organismos
- Parecem ser geneticamente estáveis
- Possuem tamanho razoável
- Derivam de um ancestral comum

Estas moléculas são constituídas de regiões altamente conservadas entre os organismos que compartilham aquela espécie de RNA, e regiões variáveis, sendo diferente esse grau de variação nessas regiões específicas. Portanto, a análise das seqüências dos RNAs ribossômicos, permite um maior conhecimento da filogenia e da evolução microbiana.(Peixoto *et al.* 2002; Watanabe *et al.* 2001).

3.9.3 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A reação em cadeia da polimerase foi inicialmente descrita por SAIKI e colaboradores (Saiki *et al.* 1988). Esta técnica permite amplificar "in vitro" segmentos específicos de DNA, gerando várias cópias desses fragmentos.

Para que a amplificação ocorra, é necessário utilizar um par de iniciadores (*primers)* que flanqueiam a região alvo. Geralmente envolvem de 30 a 45 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo constituído de 1) desnaturação do DNA ; 2) anelamento dos *primers* 3) extensão ou alongamento pela enzima *Taq* polimerase. A utilização desta enzima termoestável, obtida de *Thermus aquaticus*, se deve às altas temperaturas empregadas na desnaturação do DNA.(Saiki *et al.* 1988)

A eficiência e especificidade do método são influenciadas por uma série de fatores como: o iniciador utilizado, o regime de repetição dos ciclos, os reagentes e suas concentrações, a presença de aditivos, o grau de pureza das amostras entre outros. (Rosado, 1997)

3.9.4 DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes)

Esta metodologia é aplicada na determinação direta da diversidade genética de populações microbianas complexas. Ela se baseia na eletroforese dos produtos de PCR em géis de poliacrilamida contendo um gradiente crescente de agentes desnaturantes (uréia e formamida). Os fragmentos que possuem o mesmo tamanho e seqüências nucleotídicas diferentes podem ser separados pela diferença na mobilidade das moléculas após desnaturação química de seus domínios, *"Melting Domains".*

A mobilidade eletroforética do DNA é sensível à estrutura secundária da molécula que pode ser helicoidal, parcialmente desnaturada e fita simples. Portanto, a desnaturação parcial promove uma movimentação mais lenta no gel comparado à molécula em fita dupla ou simples. As moléculas que possuem seqüências nucleotídicas diferentes irão parar de migrar em posições distintas no gel, gerando perfis diferenciados. A figura 9 apresenta esquematicamente, a visualização dos produtos de PCR em gel de agarose e

separados através da eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE). (Rosado, 1997)

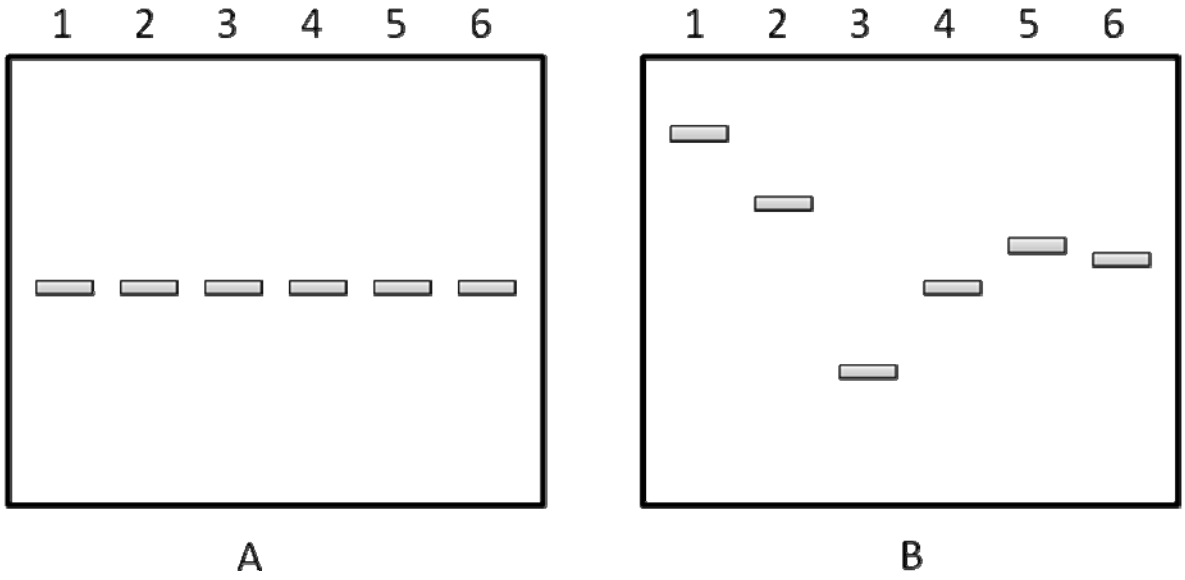


Figura 9 - Produtos de PCR visto após eletroforese em gel de agarose (A) e em gel com gradiente de desnaturantes (B)

Através dessa técnica, é possível detectar aproximadamente 50% das variações de seqüências em fragmentos de DNA com até 500 pares de bases (Myers *et al.* 1985; Myers *et al.* 1985). Quando se acrescenta à extremidade 5' de um ou de ambos iniciadores um "grampo"de GC contendo de 30 a 50 nucleotídeos, há um impedimento da dissociação das fitas de DNA aumentando para 100% a detecção das variações existentes. (Satoh,Takahashi 1996) (Myers *et al.* 1985; Myers *et al.* 1985; Satoh,Takahashi 1996)

Esta técnica pode ser usada para complementar o monitoramento nos estudos de impactos ambientais. Além de avaliar a diversidade genética de amostras ambientais, estudando o efeito da presença de um determinado poluente na estrutura da comunidade microbiana. Pode também ser aplicada no monitoramento de microrganismos inoculados *in situ*, avaliando a permanência ou eliminação nos processos de Bioaumento. (Iwamoto,Nasu 2001; Iwamoto *et al.*2000)

4 Material e Métodos

4.1 Sedimento de Manguezal

O sedimento de manguezal utilizado, proveniente de uma região do estado da Bahia, apresenta um histórico de contaminação por derrames acidentais de óleo.

Para as análises de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP), amostras foram coletadas e imediatamente armazenadas em bandejas de alumínio estéreis (Figura 10). Amostras de sedimento para análises microbiológicas convencionais e moleculares foram coletadas com auxílio de uma espátula e acondicionadas em tubos do tipo “Falcon” estéreis, e as amostras direcionadas às análises físico-químicas foram armazenadas em sacos plásticos estéreis (figura 11).

Figura 10 - Coleta de material para análises de HTP e armazenamento em bandejas de alumínio estéreis.

Figura 11 - Coleta de amostras de sedimento em sacos plásticos estéreis para análises físico-químicas e em tubos Falcon estéreis para análises microbiológicas.

4.2 Petróleo como contaminante

O petróleo, ou óleo cru, empregado nos experimentos é conhecido como OAL (óleo árabe leve – *arabian light crude oil*) com grau API médio de 28,9 e foi cedido pelo CENPES/PETROBRAS para a utilização nos experimentos.

Como já mencionado, o sedimento utilizado tem um histórico de contaminação crônica e recorrente por hidrocarbonetos de petróleo apresentando uma fração altamente recalcitrante aderida à matriz do sedimento.

De forma a simular em laboratório uma nova contaminação, foi realizada a adição de óleo cru (1% m/v) ao sedimento. O objetivo dessa incorporação adicional de óleo foi avaliar o comportamento da comunidade microbiana dominante frente a um novo derramamento.

4.3 Produtos Comerciais

Foram utilizados dois fertilizantes comerciais de liberação lenta, OSMOCOTE 3M e BASACOTE 3M, como estratégia de bioestímulo que apresentam, em sua composição, fontes de Nitrogênio, Fósforo e micronutrientes.

Esses produtos são amplamente utilizados na agricultura para minimizar as aplicações de fertilizante, pois eles apresentam uma tecnologia de liberação lenta e gradual dos nutrientes no solo.

Existem na literatura, diversos estudos abordando o uso do OSMOCOTE 3M como estratégia de remediação de áreas impactadas por hidrocarbonetos de petróleo (Xu *et al.* 2004; Xu *et al.* 2005)

Ambos os produtos foram utilizados nas concentrações de 0,03 e 0,8%. A menor concentração, 0,03%, foi calculada para atingir a proporção de C:N:P de 100:10:1 no sedimento para o OSMOCOE 3M. Já a maior concentração, 0,8%, é referenciada na literatura como a concentração ideal de OSMOCOTE 3M para atingir um alto nível de biodegradação de hidrocarbonetos. (Xu *et al.* 2004; Xu *et al.* 2005)

As concentrações do OSMOCOTE 3M também foram utilizadas como referência para o BASACOTE 3M.

4.3.1 Osmocote 3M

O Osmocote utilizado nos experimentos foi o OSMOCOTE 3M 15-9-12 + Micros. O produto apresenta um médio tempo de liberação no ambiente de 3 meses e apresenta concentrações de 15, 9 e 12% de N P K, respectivamente. Apresenta ainda, as seguintes concentrações de micronutrientes. Mg: 1%, S: 2.3%, B: 0.02%, Cu: 0.05%, Fe: 1%, Mn: 0.06%, Mo: 0.02%, Zn: 0.05%.

4.3.2 Basacote 3M

O Basacote, figuras 12 e 13, utilizado nos experimentos foi o BASACOTE 3M 13-6-16 + Micros. Esse produto apresenta um tempo médio de liberação no ambiente de 3meses e apresenta concentrações de 13, 6 e 16% de N P K, respectivamente. Apresenta ainda, as seguintes concentrações de micronutrientes. Mg: 1,4%, S: 10%, B: 0.02%, Cu: 0.05%, Fe: 0,26%, Mn: 0.06%, Mo: 0.015%.

Figura 12 - Basacote 3M

Figura 13 - Basacote – 90% dos grânulos com diâmetro de 1,5 – 2,8mm.
Peso de 1000 grãos = 9,58g

4.4 Bioestímulo Convencional

De acordo com análises do sedimento foi determinado que o fósforo apresentou-se como um fator limitante, considerando-se a relação C:N:P (100:10:1). Dessa forma, para obedecer a relação C:N:P mencionada, o fósforo deveria ser o único nutriente a ser incorporado ao sedimento. Esse tratamento foi nomeado como Bioestímulo Convencional.

4.4 Reagentes Soluções e Meios de Cultura.

Tampão TBE 1X

Tris	89 mM
EDTA	2,5 mM
H_3BO_3	89 mM

Corante para Eletroforese de DNA

Glicerol	50%
EDTA, pH 7,5	20 mM
Azul de bromofenol	0,05%
Xilenocianol	0,05%

Soluções do DGGE:

Acrilamida/Bisacrilamida 40%

Acrilamida	38,93 g
Bisacrilamida	1,07 g

Tampão TAE 50x

Trisma Base (Sigma)	2 M
Ácido acético glacial	1 M
EDTA	50 mM

Tampão TAE 0,5X

Tris-acetato, pH 7,4 20 mM

Acetato de sódio 10 mM

EDTA 0,5 mM

Solução desnaturante a 0% para gel a 6% de acrilamida

Acrilamida/Bisacrilamida 40% 15 ml

Tampão TAE 50x 2 ml

Água bidestilada 83 ml

Solução desnaturante a 100% para gel a 6% de acrilamida

Acrilamida/Bisacrilamida 40% 15 ml

Tampão TAE 50x 2 ml

Formamida deionizada 40 ml

Uréia 42 g

Água bidestilada q. s. p 100 ml

Persulfato de amônio (APS) 10%

Persulfato de amônio 0.1 g

Água destilada 1 ml

Solução 40% (para volume final de 12 ml)

4,8 ml de solução do DGGE 100%

7,2 ml da solução do DGGE 0%

Solução 60% (para volume final de 12ml)

7,2 ml da solução do DGGE 100%

4,8 ml da solução do DGGE 0%

Em seguida, são adicionadas 50μl de APS 10% e 10μl de TEMED às soluções de 40 e 60% para a formação do gradiente.

MEIOS DE CULTURA

Meio King's B (*Pseudomonas* sp)

	Concentração (g/L)
Peptona	20
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	1,5
Hidrogeno Fosfato de Potássio	1,5
Agar	15
pH 7.2	

Meio TY (*Bacillus sp.)*

	Concentração (g/L)
Hidrolisado de Caseína	10
Extrato de Levedura	5
Cloreto de Sódio	5
pH 7.0	

Meio Amido caseína (Actinomicetos)

	Concentração (g/L)
Extrato de carne	30,0
Caseína hidrolisada	17,5
Amido	1,5
Agar	15,0
pH 7,4	

Extrato de malte (Fungos)

	Concentração (g/L)
Extrato de Levedura	4

Extrato de Malte	10
Glicose	4
Agar	15
pH 7.3	

Meio Agar Marinho (Heterotróficos totais)

	Concentração
Peptona	5,0g/L
Extrato de Levedura	1,0g/L
Citrato Férrico	0,1g/L
Cloreto de Sódio	19,45g/L
Cloreto de Magnésio	8,8g/L
Sulfato de Sódio	3,24g/L
Cloreto de Cálcio	1,8g/L
Cloreto de Potássio	0,55g/L
Bicarbonato de Sódio	0,16g/L
Brometo de Potássio	0,08g/L
Agar	15,0g/L
Cloreto de Estrôncio	34mg/L
Ácido Bórico	22mg/L
Silicato de Sódio	4mg/L
Fluoreto de Sódio	2,4mg/L

Nitrato de Amônia	1,6mg/L
Fosfato Dibásico de Sódio	8mg/L

pH 7.6

Meio TSA (Heterotróficos totais)

	Concentração (g/L)
Peptona de Caseína	17
Peptona de Soja	3
Glicose	2,5
Cloreto de Sódio	5,0
Hidrogeno Fosfato de Potássio	*2,5*

pH 7.0

Meio Bushnell-Haas + Óleo (Microrganismos degradadores de óleo)

	Concentração (g/L)
Sulfato de Magnésio	0,2
Cloreto de Cálcio	0,02
Monopotássio de Fosfato	1
Bifosfato de Potássio	1
Nitrato de Amônia	1
Cloreto Férrico	0,05
Óleo	1% (m/v)

pH 7.0

4.5 Biorremediação do Sedimento de Manguezal contaminado com Hidrocarbonetos de Petróleo (Experimentos em Microcosmos)

Os microcosmos foram construídos a partir de tubos de PVC com 75 mm de diâmetro e 75 mm de altura (Halmemies *et al.* 2003) contendo 300 g do sedimento de manguezal preenchendo cerca de 70% do volume do microcosmo (figura 14). Foram utilizadas 14 estratégias de bioestímulo para avaliar o efeito do uso de diferentes produtos na biorremediação do sedimento.

Figura 14 - Foto do Microcosmo utilizado

1. Sedimento. + Osmocote (0,03%)
2. Sedimento. + Osmocote (0,8%)
3. Sedimento. + Basacote (0,03%)
4. Sedimento. + Basacote (0,8%)
5. Sedimento. + Fósforo (H_3PO_4 2M) (Bioestímulo Convencional)
6. Sedimento. + Osmocote (0,03%) + Óleo
7. Sedimento. + Osmocote (0,8%) + Óleo
8. Sedimento. + Basacote (0,03%) + Óleo
9. Sedimento. + Basacote (0,8%) + Óleo
10. Sedimento. + Fósforo (H_3PO_4 2M) + Óleo
11. Sedimento. (Atenuação Natural)

12. Sedimento. + Óleo (Atenuação Natural)
13. Sedimento. Abiótico (azida de sódio 1%)
14. Sedimento. Abiótico + Óleo

O acompanhamento dos tratamentos foi realizado nos tempos 24h, 25, 50 e 75 dias. As analises de DGGE foram realizadas nos tempos de 24h e 75 dias.

Os experimentos foram realizados em triplicata totalizando 42 microcosmos para cada tempo. A contaminação foi realizada diretamente no microcosmo com uma concentração de 1% (V/P) de Óleo Árabe Leve (OAL). Esta contaminação visou simular um novo derrame de frações mais facilmente biodegradáveis.

Foi feita a adição de água destilada aos microcosmos para manter um filme de água sobre o sedimento.

Para um melhor entendimento na leitura da dissertação: Quando for referenciado SEDIMENTO, deve se entender: Sedimento de manguezal que já apresenta um histórico prévio de contaminação por hidrocarbonetos. Quando for referenciado SEDIMENTO + ÓLEO, deve se entender: Sedimento de manguezal com histórico prévio de contaminação por hidrocarbonetos adicionado de OAL (Óleo Árabe Leve), simulando uma nova contaminação.

4.6 Quantificação de Hidrocarbonetos

Foi realizada a avaliação da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) por cromatografia gasosa nos tempos inicial e final utilizando o método EPA 8015D. Este método tem como objetivo, indicar a quantidade de óleo presente no sedimento a fim de analisar os índices de biodegração nos diferentes tratamentos. Os ensaios de HTP foram realizados junto à empresa Analytical Solutions.

4.7 Avaliação da Diversidade Microbiana

4.7.1 Contagem de células microbianas (método convencional)

A determinação do número de células microbianas foi realizada numa etapa anterior pelo Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular.

As amostras de sedimento foram diluídas utilizando-se 5 g de sedimento em 95 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%). Após o preparo, a suspensão foi submetida à agitação a 120 rpm por 60 min.

A contagem e o isolamento de microrganismos aeróbios e/ou facultativos viáveis foi feita pelo método de plaqueamento em superfície com meios de cultura específicos para grupos taxonômicos de importância em biorremediação:

- *Pseudomonas*: Meio King's B;
- *Bacillus*: Meio TY;
- Actinomicetos: Meio Amido caseína;
- Fungos: Meio Extrato de malte**;**
- Heterotróficos totais: Meio Agar marinho e Meio TSA;
- Microrganismos degradadores de hidrocarbonetos: Meio Bushnell-Haas após enriquecimento das amostras com óleo como única fonte de carbono;

Para o plaqueamento, foram preparadas diluições da suspensão de células original em solução salina de 10^{-1} a 10^{-7}. A partir de cada diluição, foram transferidas alíquotas de 0,1 mL para placas de Petri, contendo meio de cultura. Para o meio TY, utilizamos também as mesmas suspensões originais antes e depois de processo de pasteurização (60ºC por 30 minutos). O inóculo foi espalhado na superfície do meio de cultura, com auxilio de uma alça de Drigalsky. Foram feitas triplicatas para cada diluição. Em seguida, as placas

foram incubadas a 28°C durante 48 horas e após este período, as colônias foram contadas e os resultados expressos em UFC (Unidade Formadora de Colônias) por mL de amostra.

A determinação do número de microrganismos heterotróficos totais e do número de microrganismos degradadores de óleo foi realizada pelo método do Número Mais Provável (NMP), utilizando-se os seguintes meios de cultura:

- Estimativa do Número Mais Provável de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos: Meio Bushnell-Haas em microplacas ;
- Estimativa do Número Mais Provável de microrganismos anaeróbios: Meio a base de Tioglicolato em frascos do tipo penicilina.

O procedimento para a contagem dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos consiste em preparar sucessivas diluições da suspensão de células original em solução de NaCl 0,85% (p/v) sendo a seguir inoculados 0,1 mL de cada diluição em 3 poços da microplaca contendo cada um aproximadamente 1,75 mL do meio mineral Bushnell-Hass. Em seguida, foram adicionados 25 μL do óleo utilizado para o teste. A leitura do resultado foi realizada observando-se as três últimas diluições que apresentaram, pelo menos, um poço com crescimento positivo, pela alteração visual no filme de óleo, procurando-se na tabela o NMP para a combinação de tubos positivos encontrados (Figura 15). Este valor foi corrigido pelo fator de diluição utilizado e expresso em NMP/ 100mL.

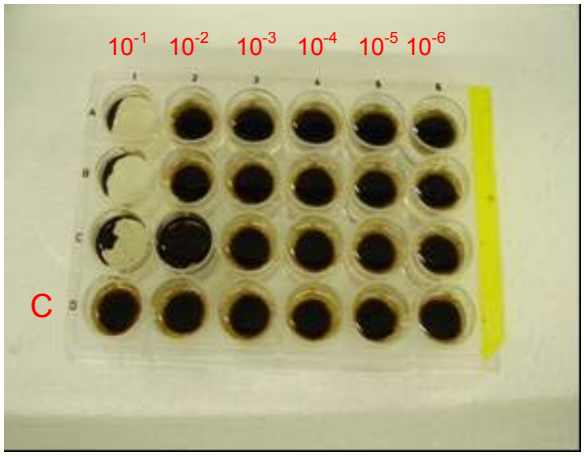


Figura 15 – NMP de microrganismos degradadores.

do sedimento.

4.7.2 Ecologia Microbiana Molecular

4.7.2.1 Extração de DNA dos Sistemas de Tratamento

A extração de DNA do sedimento foi realizada através do uso de um Kit de extração de solo (FastDNA® SPIN Kit for Soil) da BIO101 (Califórnia, EUA) que utiliza o método da extração direta. Amostras de 0,5 g de sedimento previamente homogeneizadas foram utilizadas para a extração de DNA nesse kit.

A qualidade e a pureza do DNA obtido foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 1% (m/v). Amostras de DNA (5 µL) foram misturadas com 5 µL de corante para eletroforese e aplicadas nos géis. Os géis foram submetidos a uma corrente elétrica de 90V em tampão TBE 0,5x pelo período de 1,5 horas e, em seguida, foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz U.V. em um sistema de captura de imagem (IMAGO, B & L Systems).

4.7.2.2 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Após a constatação da pureza das amostras por eletroforese, estas amostras foram submetidas a uma reação de amplificação do fragmento do gene *rrs* que codifica para o rRNA 16S.

4.7.2.2.1 PCR-16S

Para a amplificação do fragmento do gene que codifica para o rRNA 16S foram utilizados os seguintes iniciadores: U968f-GC (“grampo” + 5’ AAC GCG AAG AAC CTT AC 3’) e L1401r (5’ GCG TGT GTA CAA GAC CC 3’(Nubel *et al.* 1999). O iniciador U968f é homólogo a região 968-984 do gene rDNA de *Escherichia coli*, enquanto que o iniciador L1401 é homólogo a região 1385-1401 deste mesmo gene. Estes iniciadores amplificam a região da alça V6-V8 do RNA ribossomal, que é mais variada do que as outras regiões descritas na literatura (Watanabe *et al.* 2001).

As misturas foram feitas para um volume final de amostra de 50 μL e as concentrações de cada reagente estão apresentadas a seguir na Tabela 5

Tabela 5 - Concentrações dos reagentes utilizados na reação de PCR – 16S (U968-L1401)

Reagente	Concentração Final no tubo
Tampão	1x
$MgCl_2$	2,5 mM
dNTPs	0,2mM
Primer Forward	10 pmol/50μL
Primer Reverse	10 pmol/50μL
BSA	5μg/50μL
Formamida	1%
Taq	2,5 U/50μL

Em cada reação foi aplicado 1 μL de DNA.

O programa de PCR utilizado foi iniciado com um ciclo de desnaturação das fitas de DNA a 94°C por 4 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min e 72 °C por 2 min. O ciclo de extensão final foi de 10 min a 72 °C. (Peixoto *et al.* 2002)

4.7.2.3 DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes)

Os géis de DGGE foram preparados com solução de poliacrilamida (6%) em tampão Tris-acetato (pH 8,3). Foi estabelecido um gradiente de 40 a 70% de desnaturantes químicos (formamida e uréia). As amostras foram aplicadas em "Dcode™ Universal Mutation Detection System" e, em seguida, este gel foi submetido a uma corrida a 220 V por 6 h. Posteriormente estes géis foram corados com SYBR GREEN (Molecular Probes) diluído na razão de 1/10.000 em tampão TAE 1x, segundo especificação do fabricante, por aproximadamente 40 minutos. Em seguida, os géis foram observados sob luz U.V. e fotografados em um sistema de captura de imagem STORM (Pharmacia, Amersham) para a construção dos dendrogramas.

Com a imagem digitalizada dos géis, foi feita uma análise para gerar o perfil densitométrico das bandas, utilizando o Software Image Quant (v 5.2). As bandas foram consideradas para a construção da matriz, quando a altura do pico, referente a uma intensidade, não excedia 1% do somatório de todas as alturas identificadas, de acordo com o protocolo descrito por Iwamoto (Iwamoto *et al.* 2000). Com a matriz de presença e ausência de bandas obtida, foi feita a analise de grupo. Os cálculos de similaridade foram baseados no coeficiente de *Pearson*, que corresponde à medida de distância. O coeficiente de correlação de *Pearson* é altamente recomendado para a análise dos perfis gerados pela técnica de DGGE (Nubel *et al.* 1999). Foi utilizado o método de UPGA para o cálculo de agrupamento no dendrograma gerado para o gel, utilizando o *Software Statistica for Windows* v. 5.1, (Statsoft, USA).

5 Resultados e Discussão

5.1. Caracterização do Sedimento

Para a caracterização do sedimento, foram realizadas análises químicas junto ao laboratório LABFER (UFRRJ) e microbiológicas convencionais.

5.1.1 Análise Química do Sedimento

O sedimento utilizado nos experimentos apresentou um teor de água de 55,7 |+- 0,28%|. As análises de fertilidade e micronutrientes do sedimento estão mostradas na tabela 6, e a análise de HTP do sedimento inicial é mostrada na figura 16. Pode-se observar que o sedimento apresenta uma alta contaminação por hidrocarbonetos de petróleo principalmente da fração UCM (Mistura não resolvida Complexa), que inclui os HPAs (Hidrocarbonetos Poli Aromáticos), apresentando concentrações de 6352,02 ppm de um total de 6740,24 ppm.

Tabela 6 - Caracterização Química do Sedimento

Resultado de Análises Químicas – Rotina de FERTILIDADE DO SOLO																		
Na	***Ca***	***Mg***	***K***	***H+Al***	***Al***	***S***	***T***	***V***	***m***	***n***	***pH$_{água}$***	***Corg***	***P***	***K***	***Fe***	***Cu***	***Zn***	***Mn***
$Cmol_o$ / dm^3								*%*			*1:2,5*	*%*	*mg/L*		*mg/Kg*			
58,3	*44,3*	*23,7*	*3,69*	*1,7*	*0*	*130*	*131,7*	*99*	*0,0*	*44,3*	*6,1*	*6,6*	*72*	*1441*	*1155*	*42,0*	*69,3*	*39,9*

m - saturação por Al; n - saturação por Na; Extratores: KCl, Mehlich e Acetato de Cálcio; Cmolc / dm3 = meq / 100 ml de TFSA; mg/kg = ppm

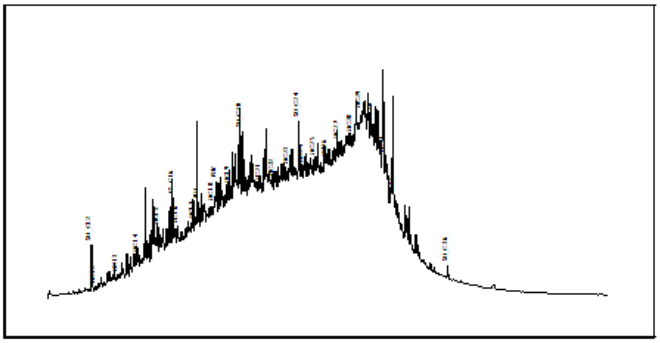
TPH Finger Print

Amostra:	05648CS001	**Tipo de Amostra:**	SD
Cliente:	UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - ESCOLA DE QUIMICA		
Referência:	2 TEMPO 2	**Quantidade (g):**	3,68
Nome do arquivo:	GC415953.D	**Fator de diluição:**	1
		Referência interna:	PE 4.9 - 105 Rev 06

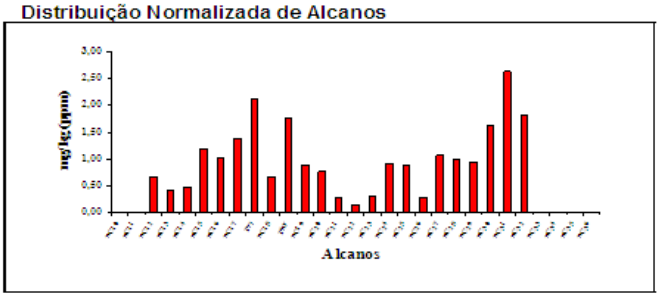
Compostos Alvo (mg/Kg, ppm)

n C10	N.D.
n C11	N.D.
n C12	0,66
n C13	0,41
n C14	0,47
n C15	1,19
n C16	1,03
n C17	1,38
Pri	2,13
n C18	0,68
Phy	1,78
n C19	0,89
n C20	0,77
n C21	0,28
n C22	0,15
n C23	0,32
n C24	0,91
n C25	0,87
n C26	0,28
n C27	1,07
n C28	1,01
n C29	0,93
n C30	1,63
n C31	2,63
n C32	1,83
n C33	N.D.
n C34	N.D.
n C35	N.D.
n C36	N.D.

Limite Quantificação	0,10
Limite Detecção	0,01
TOTAL	23,31



Distribuição Normalizada de Alcanos



Quantidades (mg/Kg, ppm)	
n -Alcanos:	19,41
HRP	388,21
UCM	6352,02
HTP	6740,24

Figura 16 - HTP inicial do Sedimento

5.1.2 Análise Microbiológica do sedimento– Método Convencional

Numa etapa anterior, foi realizada no laboratório de Ecologia Microbiana Molecular, a caracterização microbiológica do sedimento. Como já mencionado, foram utilizados diversos meios de cultura para diferentes grupos de microrganismos, bem como a utilização da técnica do Número Mais Provável (NMP) para a quantificação de microrganismos anaeróbios e microrganismos hidrocarbonoclásticos.

- TSA e Marine Agar → Heterotróficos totais encontrados nas amostras.
- King´s B → Meio semi-seletivo para o gênero *Pseudomonas*
- Amido-caseína → Meio semi-seletivo para Actinomicetos
- Extrato de malte → Meio seletivo para Fungos
- TY → Meio semi-seletivo para o gênero *Bacillus*
- TY pasteurizado → contagem de esporos bacterianos

.

A contagem das células bacterianas, nos diferentes meios, pode ser observada na figura 17.

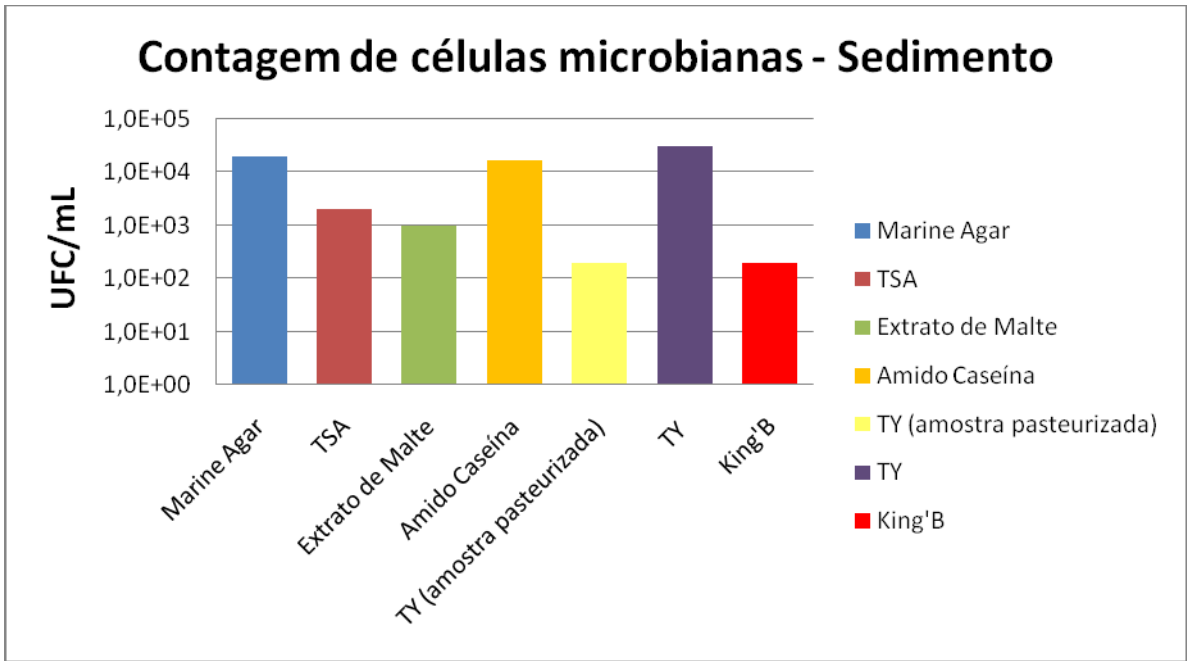


Figura 17 - Contagem de Células Microbianas – Sedimento Inicial

Também foi realizada a contagem de células bacterianas, através da metodologia de Número Mais Provável (NMP), para microrganismos degradadores e microrganismos anaeróbios como pode ser observado na figura 18.

A contagem de bactérias hidrocarbonoclásticos ficou na ordem de 2,3 x 10^3 NMP/100 mL.

Para os microrganismos anaeróbios, a contagem ficou na ordem de 2,2 x 10^6 NMP/g. Essa contagem elevada reflete a característica anaeróbica do sedimento de manguezal (baixa oxigenação).

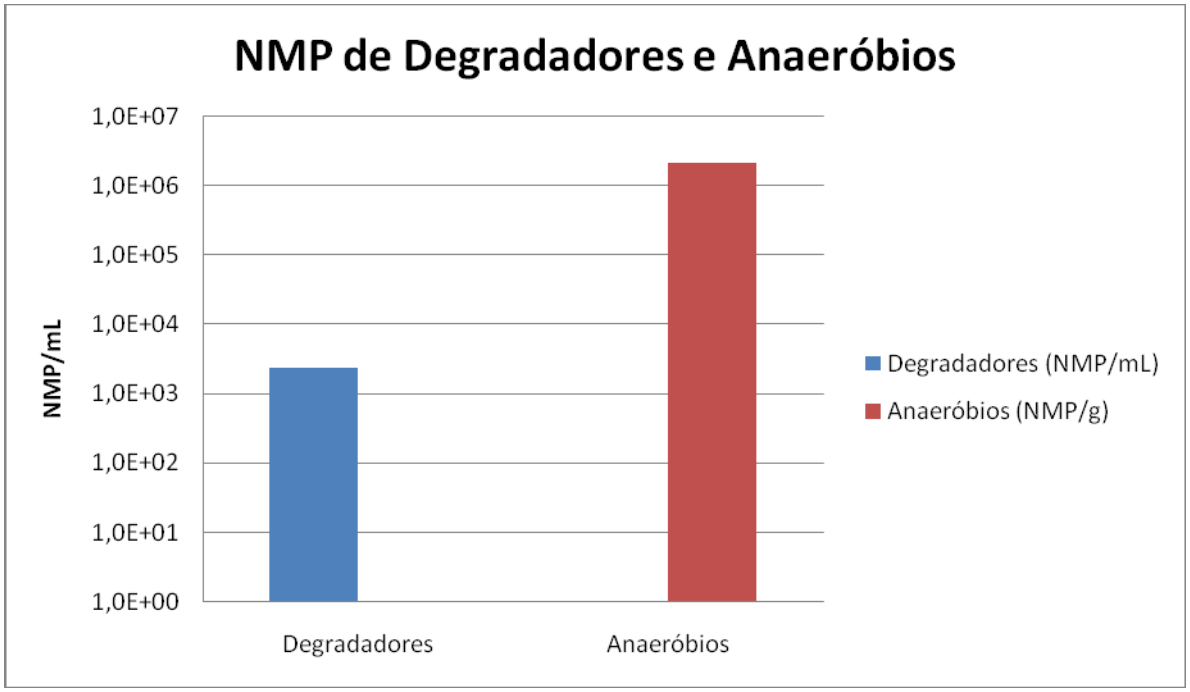


Figura 18 - NMP de degradadores e anaeróbios do sedimento

No sedimento de manguezal foi encontrada uma população bastante heterogênea. Os resultados de contagem por microbiologia convencional (plaqueamento) são similares aos resultados já obtidos no Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular para outros sedimentos (dados ainda não publicados).

É importante lembrar que a contagem de microrganismos por plaqueamento subestima o número total de bactérias no sedimento, uma vez que as técnicas dependentes de cultivo apresentam grandes limitações derivadas da impossibilidade atual de cultivar a maioria dos microrganismos (Rosado *et al* 1997). Atualmente, a utilização dessa técnica para mostrar diferenças na resposta da comunidade frente a diferentes tratamentos tem sido criticada, uma vez que essa técnica geralmente subestima o numero de bactérias em cerca de duas ordens de grandeza podendo, muitas vezes, levar a erros de avaliação. Dentro deste contexto, é importante a utilização de diferentes estratégias de monitoramento.

Estudos realizados por Ramsay e colaboradores (2000) avaliaram, por metodologia convencional (NMP), o comportamento da comunidade microbiana no tratamento de um sedimento de manguezal contaminado por hidrocarbonetos de petróleo. Foram testadas diferentes metodologias de remediação, uma baseada na adição do surfactante Corexit 9527 e a outra baseada na adição de OSMOCOTE com aeração forçada do sedimento. As contagens de heterotróficos, degradadores de alcanos e degradadores de aromáticos do sedimento de manguezal foram da ordem de 10^5-10^6 e 10^4-10^3 células/g respectivamente e se mantiveram nessa faixa durante todo o experimento para ambos os tratamentos, não sendo observadas variações expressivas. Como mencionado acima, foi utilizado pelos autores um sistema de bioestímulo + aeração e com isso, foi observado um aumento da ordem de 10^1 10^2 celulas/ grama nas comunidades de heterotróficos e degradadores de alcanos e aromáticos durante o experimento. Esses dados mostram que a aeração e a incorporação de nutrientes estimularam a comunidade microbiana.

Outra abordagem utilizada na avaliação da toxicidade do poluente foi baseada na mortalidade das árvores do ecossistema analisado. Os autores observaram que o surfactante Corexit 9527 reduziu a mortalidade das árvores enquanto, para a estratégia de biorremediação, essa redução não foi observada. A variável aeração forçada parece ter alterado as propriedades naturais do sedimento (anóxico) e pode ter interferido na sobrevivência das árvores. Essa abordagem de avaliação da mortalidade das árvores é extremamente interessante, uma vez que já é sabido que a vulnerabilidade dos manguezais a derramamentos de petróleo é diretamente relacionada à manutenção da estrutura da vegetação. Quando as plantas morrem, há uma perda estrutural e de proteção à erosão. Atualmente, as estratégias de recuperação de manguezais são baseadas na preservação das plantas e da estrutura do ecossistema. Outra estratégia muito utilizada é a baseada nos mapas de sensibilidade da costa que mapeiam áreas sensíveis e que são priorizadas para proteção, quando acontecem acidentes ambientais.

5.2. Avaliação da Degradação do poluente nos diferentes tratamentos.

Devido às particularidades dos manguezais, eles são considerados os ambientes onde se espera, em caso de acidentes, os impactos iniciais mais graves e com recuperação mais lenta. Dessa forma, é extremamente importante que metodologias sejam desenvolvidas para a recuperação dessas áreas.

Foram avaliados nessa etapa, diferentes tratamentos do sedimento contaminado com hidrocarbonetos em microcosmos. Dentre estes tratamentos, foi avaliada a introdução de dois fertilizantes comerciais de liberação lenta, OSMOCOTE e BASACOTE, como estratégia de bioestímulo. Esses produtos foram utilizados com objetivo de garantir fontes de nutrientes para os microrganismos e minimizar a manipulação do sedimento, uma vez que uma única aplicação do sedimento seria realizada.

Existem na literatura diversos estudos avaliando a eficácia do OSMOCOTE na remediação de áreas contaminadas. Entretanto, para o BASACOTE ainda não existem dados publicados.

5.2.1 Degradação de HTPs Totais

Os índices de biodegradação de HTPs (Hidrocarbonetos Totais de Petróleo) obtidos para os diferentes tratamentos avaliados podem ser observados na Figura 19.

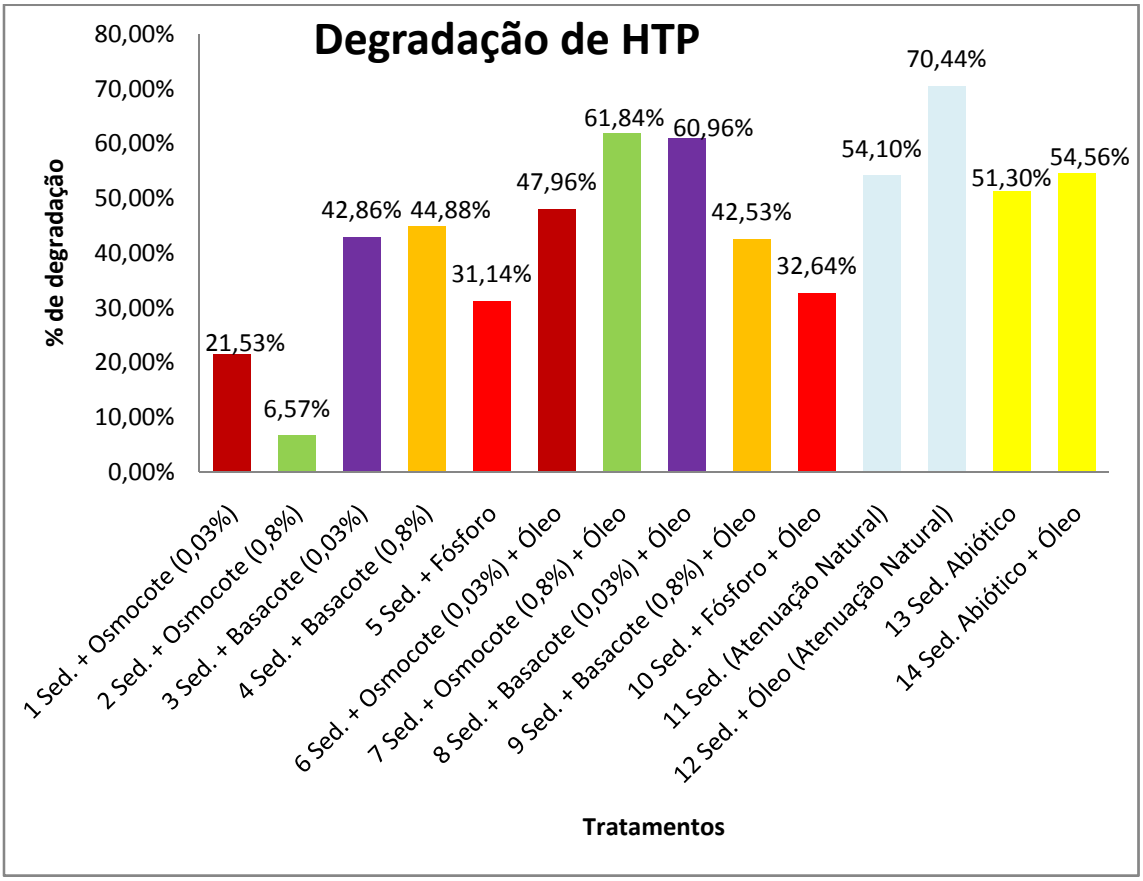


Figura 19 - Degradação de HTPs para os diferentes tratamentos avaliados.

Os índices de degradação obtidos para os controles abióticos (tratados com 1% de azida de sódio) foram 55,60 e 51,17% com e sem a adição de óleo, respectivamente. Esses resultados sugerem que a azida de sódio nessa concentração não foi capaz de inativar os microrganismos presentes para que pudessem ser excluídas as porcentagens de biodegradação. O comportamento do controle abiótico é similar à atenuação natural que apresentou 54% de degradação. É importante ressaltar que outros modos de degradação do poluente também são importantes, como a volatilização/fotodegradação e que, possivelmente ocorreram nesse experimento.

Analisando os dados de degradação obtidos, pode-se observar que o tratamento que apresentou a maior eficiência na remoção dos hidrocarbonetos de petróleo foi a Atenuação Natural. Esse tratamento atingiu 71,19 e 54% de degradação, com e sem a adição de uma fonte extra de óleo (nova contaminação) respectivamente.

Outra questão que merece ser levantada é o fato de que as duas variáveis alteradas nesse experimento, adição de óleo e nutrientes, são variáveis que já estão presentes no sedimento. Ou seja, já fazem parte da dinâmica do sedimento. O sedimento de manguezal apresenta uma alta concentração de nutrientes e possui um histórico de contaminação por hidrocarbonetos. Essa contaminação prévia por hidrocarbonetos foi responsável por selecionar linhagens de bactérias capazes de sobreviver e/ou degradar o poluente. Assim, a manipulação dessas 2 variáveis (nutrientes e óleo) parece não alterar a resposta da comunidade microbiana de uma maneira muito intensa.

Os índices de biodegradação obtidos com o produto OSMOCOTE mostram que alterações nas concentrações de nutrientes apresentam um impacto grande na dinâmica populacional. O uso de fertilizantes de liberação lenta promove uma liberação contínua de nutrientes e um excesso de nutrientes, acima do requerimento metabólico, está inibindo a degradação desse poluente.

Foram obtidas porcentagens de degradação de 6,49 e 21,33% para concentrações do produto de 0,8 e 0,03% respectivamente (Figura 20). Pode-se observar que, na menor concentração (0,03%) do produto obteve índices mais satisfatórios de degradação. Dessa forma, o aumento da liberação de nutrientes pelo OSMOCOTE na maior concentração levou a um desequilíbrio na relação C:N:P, o que pode ter inibido a comunidade microbiana e conseqüentemente, a degradação do poluente.

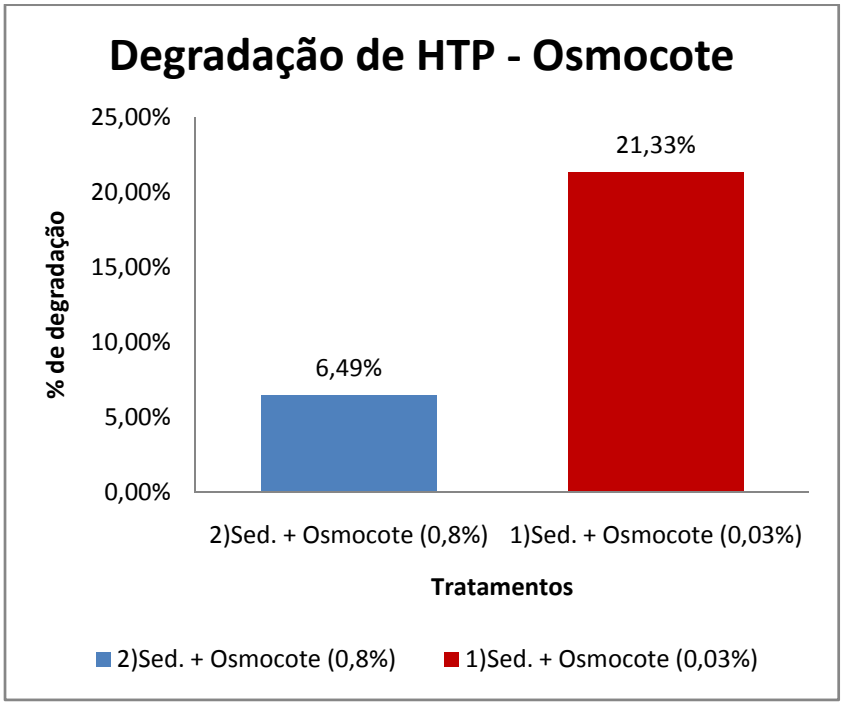


Figura 20 - Porcentagem de Degradação do Osmocote.

Quando simulamos uma nova contaminação, introduzindo uma fonte adicional de carbono (óleo), observamos o efeito inverso. Há um aumento na porcentagem de degradação do poluente na maior concentração do produto OSMOCOTE. Isso pode ser explicado pelo fato de que, a introdução dessa nova fonte de carbono pode ter equilibrado a relação C:N:P e, nesse caso, estimulado a degradação do poluente (figura 21). Também pode ser observado um aumento na degradação do poluente para a concentração 0,03% do fertilizante. Esse fato pode ser explicado pela presença de frações mais facilmente biodegradáveis no óleo que estimularam a degradação de outros compostos por co-metabolismo. A degradação dos n-alcanos, relacionado ao co-metabolismo das frações recalcitrantes, será abordada mais adiante.

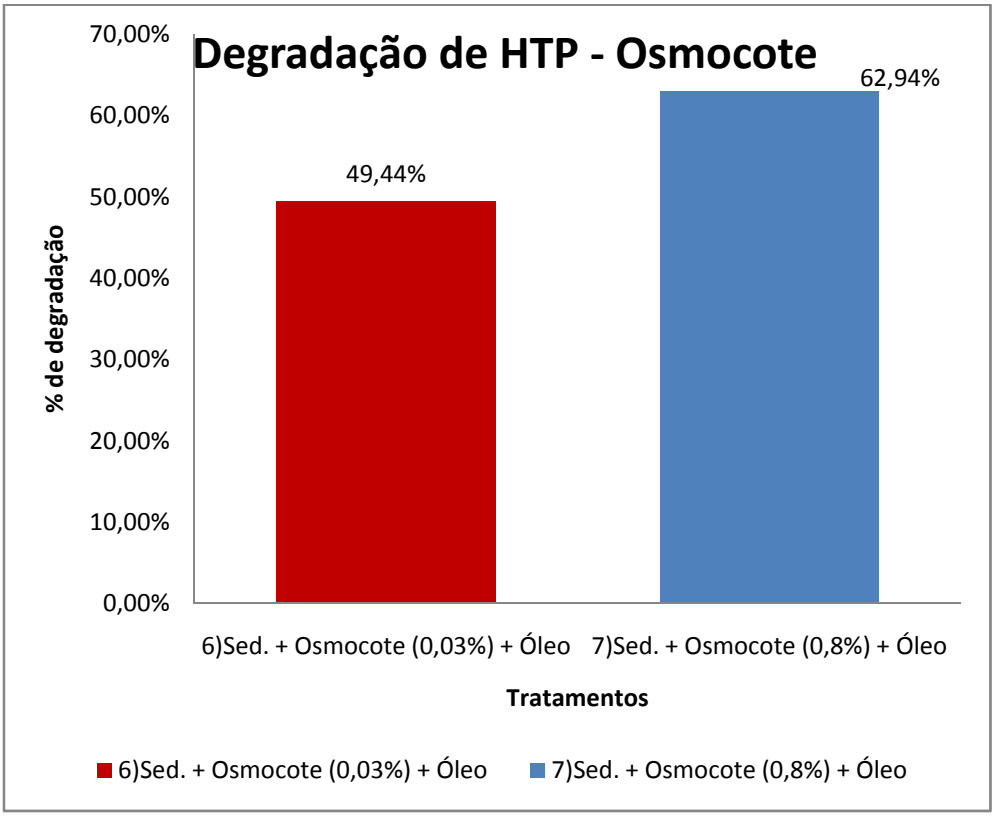


Figura 21 - Porcentagem de Degradação do Tratamento com Osmocote adicionado de óleo

Xu e colaboradores (2003) testaram diferentes concentrações de Osmocote para a remediação de um sedimento de praia contaminado com óleo árabe leve em microcosmos. O uso de fertilizantes de liberação lenta promove uma contínua liberação de nutrientes mantendo uma concentração, teoricamente, suficiente para a atividade microbiana. Dentro dessa idéia, os autores avaliaram diferentes concentrações do produto OSMOCOTE (18: 4,8: 8,3% - N-P-K) com concentrações variando entre 0,2 e 4% para otimizar a degradação do poluente. Os sistemas conduzidos em microcosmos foram monitorados diariamente para manter a umidade e as condições aeróbicas do sedimento, através da adição de água e mistura do sedimento. A concentração ideal de OSMOCOTE para o sedimento de praia utilizado pelos autores foi de 0,8%. Essa concentração foi suficiente para garantir uma degradação eficiente do poluente e é uma concentração razoavelmente pequena, o que minimiza os custos de aplicação. Na concentração de 1,5%, foi evidenciada uma diminuição no número de bactérias que, de acordo com os autores, é explicado pelo excesso de nutrientes liberados no sedimento e que inibiu a comunidade

microbiana. Para concentrações maiores que 1,5%, foi observado que um excesso de nutrientes, acima do requerimento metabólico, inibiu a degradação do poluente. Além disso, altas concentrações do produto apresentam maior custo além de representar um potencial problema de eutrofização dos ambientes aquáticos.

Num trabalho recente, Chaîneau e colaboradores (2005) estudaram o efeito da concentração de nutrientes sobre a comunidade microbiana do solo na biodegradação de óleo durante 150 dias. Os autores observaram a estimulação máxima da comunidade bacteriana na maior concentração de nutrientes adicionada. Entretanto, a biodegradação não acompanhou esse aumento. Ou seja, mesmo com uma grande estimulação da comunidade, os índices de degradação do poluente não acompanharam a dinâmica microbiana. A maior taxa de biodegradação alcançada foi de 62% em condições ótimas. Os autores evidenciaram que, inicialmente, os compostos lineares e ramificados foram preferencialmente degradados. No solo bioestimulado, a mineralização das frações de n-alcanos e de ramificados foi quase total enquanto no tratamento onde não houve bioestímulo, essas frações foram degradadas parcialmente mesmo com uma degradação de 47%. A inibição da biodegradação pelo excesso de nutrientes foi bastante evidenciada nesse trabalho. Eles evidenciaram também, que a adição de nutrientes foi mais importante para a assimilação dos carbonos lineares e ramificados do que para os aromáticos e cíclicos. Os autores concluíram que o bioestímulo adequado à comunidade microbiana apresenta um efeito bastante positivo, principalmente na degradação de n-alcanos e ramificados, enquanto um excesso desses nutrientes apresenta um efeito negativo. Esse efeito negativo foi somente evidenciado nos índices de degradação dos hidrocarbonetos e não no estimulo à comunidade. Ou seja, a comunidade bacteriana foi estimulada nas altas concentrações de nutrientes, mas não foi capaz de degradar mais compostos de petróleo.

O produto BASACOTE, apesar de apresentar uma concentração de nutrientes e um tempo de liberação no meio ambiente similar ao OSMOCOTE (3 meses), apresentou um comportamento diferente.

Nos tratamentos onde não houve a incorporação de óleo, os tratamentos atingiram porcentagens de degradação muito parecidas, 42,53 e 44,65 % para as concentrações de 0,03 e 0,8%, respectivamente. Nos tratamentos onde o óleo foi incorporado, as porcentagens de degradação atingidas foram de 61,68 e 43% respectivamente. Todos esses resultados, exceto o do tratamento de BASACOTE 0,03% + óleo (61,68% de degradação) são bastante parecidos e não mostram diferença de degradação entre as diferentes concentrações utilizadas. Esses dados parecem sugerir que, a menor concentração do BASACOTE (0,03%) aliada à incorporação de óleo ao sedimento parece estimular a comunidade bacteriana na degradação das frações dos n-alcanos (86,64%) que será abordada num tópico posterior.

Os resultados obtidos com o Bioestímulo Convencional com a incorporação de fósforo, elemento limitante no sistema, foram 30,87 e 34,79% para os tratamentos sem e com a adição de óleo, respectivamente. Esses dados sugerem que o fósforo não é tão importante, ou não limitante à atividade microbiana nesse sedimento, para que sejam alcançados altos índices de biodegradação.

Degradacao dos n-alcanos

Analisando os resultados de degradação para as frações dos n-alcanos com e sem a adição de óleo, (Figuras 22 e 23 respectivamente) pode ser observado que grande parte dos n-alcanos adicionados aos sistemas foi perdida por volatilização ou degradação. O melhor comportamento obtido também foi para a Atenuação Natural com valores de 94 e 54%, com e sem a adição de óleo respectivamente.

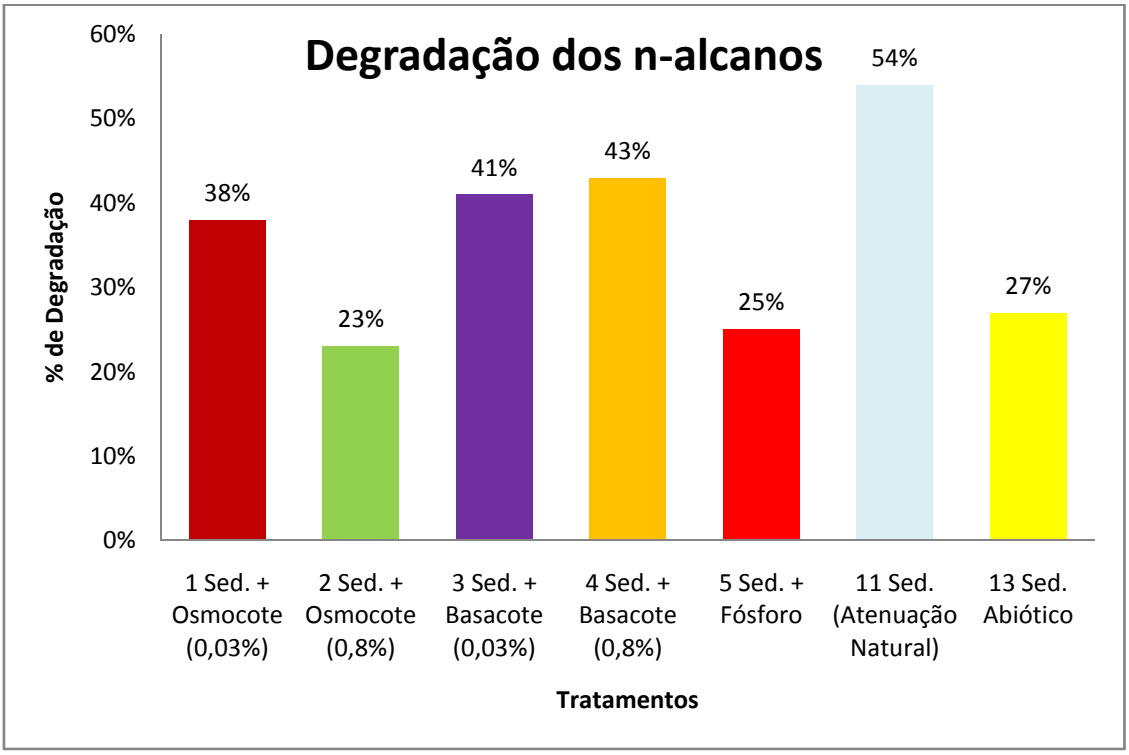


Figura 22 - Degradação dos n-alcanos nos diferentes tratamentos avaliados

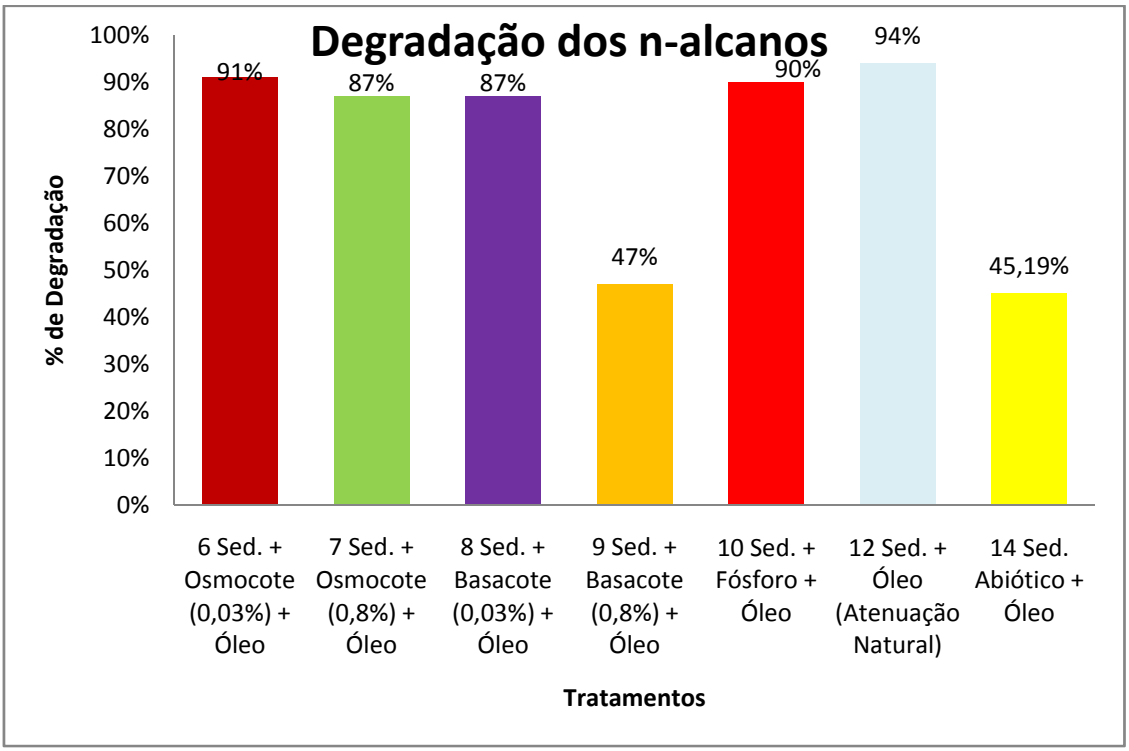


Figura 23 - Degradação dos n-alcanos nos diferentes tratamentos avaliados com a adição de óleo.

Uma das hipóteses levantadas nesse trabalho era a de que uma nova contaminação poderia estimular a degradação das frações mais recalcitrantes, os UCM (mistura complexa não resolvida), uma vez que a comunidade bacteriana já está adaptada. Pode-se observar na Figura 24 que para quase todos os tratamentos, a adição do óleo estimulou a degradação das frações mais recalcitrantes. Para os tratamentos BASACOTE 0,8%, Bioestímulo Convencional (Fósforo) e Abiótico, observa-se índices similares de degradação com e sem a adição de óleo. Para esses tratamentos, pode-se inferir que a simulação de uma nova contaminação, pela presença se frações mais facilmente biodegradáveis, não foi capaz de estimular a degradação das frações mais recalcitrantes. É importante lembrar que para o BASACOTE 0,8% não foi evidenciada diferença na degradação dos HTPs entre os tratamentos com e sem a adição de óleo. Foram atingidos percentuais de 43% e 44,65% de degradação nas concentrações de 0,8% com e sem a adição de óleo respectivamente. Esse fato parece mostrar que, para a concentração de 0,8% de BASACOTE, a concentração de nutrientes não foi suficiente para estimular a maior degradação dos poluentes.

Entretanto, o Fósforo (Bioestímulo Convencional) como já mencionado, parece não ser importante para o aumento da degradação desses poluentes no sedimento, uma vez que foram obtidos índices de degradação de 32,64 e 31,14 % com e sem a adição de óleo (Figura 24).

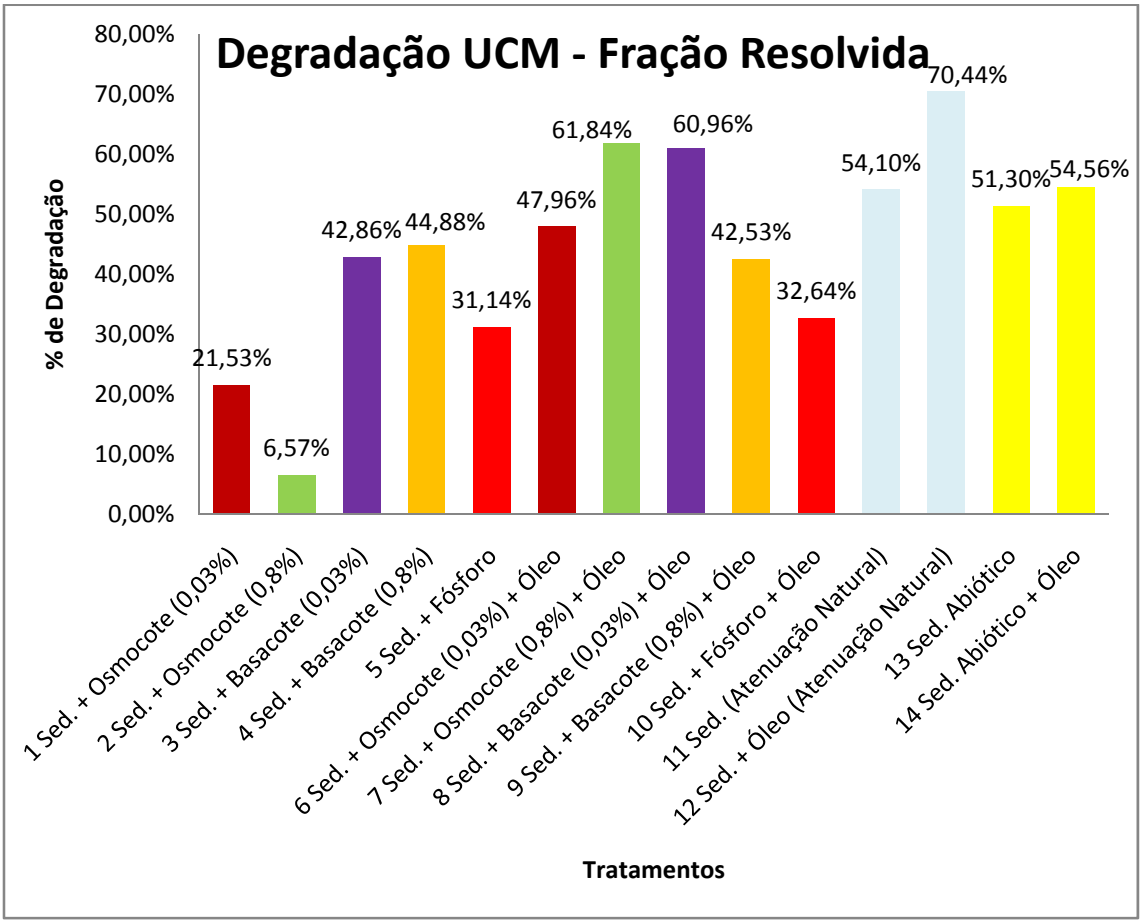


Figura 24 - Degradação de UCM com e sem a adição de óleo como co-substrato.

Como pode-se observar na figura 24, o tratamento que atingiu o maior valor de degradação das frações recalcitrantes com a simulação de uma nova contaminação foi a atenuação natural, que atingiu 70,44%. Entretanto, o maior ganho de degradação das frações recalcitrantes foi atingido pelo tratamento OSMOCOTE 0,8% que, com a nova contaminação, aumentou os índices de degradação de 6,57 para 61,84%. Fato similar também foi observado na concentração de 0,03% de OSMOCOTE que aumentou as taxas de degradação de 21,53 para 47,96%. Esse resultado sugere que o OSMOCOTE foi capaz de estimular a degradação das frações mais recalcitrantes frete uma nova contaminação.

A presença de um substrato mais biodegradável, no caso as frações mais leves da nova contaminação, pode alterar a cinética de degradação dos compostos orgânicos no solo, levando a uma degradação indireta do poluente original. Ortiz e colaboradores (2006) estudaram o efeito da adição de uma fonte mais biodegradável (tolueno gasoso) na degradação de HTPs. Neste

trabalho, os autores avaliaram o efeito da passagem de um fluxo contínuo de tolueno gasoso através de colunas para o tratamento de dois tipos de solo. Os autores utilizaram um solo com histórico de contaminação recente por HTPs (52,4 g/Kg) e um solo com contaminação antiga por HTPs (50,4 g/Kg). Para o solo com contaminação antiga, também foi feita uma adição de surfactante para aumentar a biodisponibilidade dos contaminantes. Já é sabido que a biodegradação de compostos orgânicos no solo é inversamente proporcional ao tempo de contaminação, ou seja, quanto maior o tempo de contaminação, menores são as taxas de biodegradação. Esse comportamento é explicado pela diminuição da biodisponibilidade dos compostos no solo/sedimento, e pelo fato de que as frações mais leves já foram degradadas. Em todos os tratamentos, houve uma degradação de 99% do co-substrato adicionado (tolueno gasoso). Para o solo contaminado recentemente, o tratamento com tolueno levou a um aumento de 28% na degradação do poluente em 62 dias. Já para o solo com contaminação antiga, o tolueno não foi capaz de aumentar a degradação. Entretanto, quando o solo com contaminação antiga foi pré-tratado com surfactante, houve um aumento de 29% na taxa de degradação. A adição de surfactante ao solo com contaminação antiga aumentou a biodisponibilidade do poluente. Nesse trabalho, a adição de tolueno gasoso como co-substrato se mostrou bastante satisfatória para a biodegradação e mineralização dos hidrocarbonetos. O maior efeito da degradação de HTPs com a adição do tolueno como co-substrato foi observado para o solo com contaminação recente e para o solo com contaminação antiga tratado com surfactante, o que tornou os hidrocarbonetos mais biodisponíveis ao ataque microbiano.

Num trabalho mais recente, Zhan e colaboradores (2007) avaliaram a degradação de MTBE (éter metil-terciário butílico) na presença de etanol como co-substrato em Reator Sequencial em Batelada (RSB). O MTBE é um composto oxigenado, derivado do metanol, que é atualmente adicionado à gasolina para elevar a octanagem e diminuir a formação de monóxido de carbono durante a queima. O principal problema do MTBE é que ele é considerado cancerígeno e é muito solúvel em água (50 g/L em temperatura

5.3 Avaliação da Diversidade Microbiana – Abordagem Molecular DGGE (“Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”)

O conhecimento acerca da biodegradação de compostos poluentes no meio ambiente tem sido bastante estudado através de métodos convencionais de cultivo em laboratório, isolando microrganismos degradadores, com potencial para atuação nos processos de remediação. A aplicação recente das técnicas moleculares tem indicado uma maior diversidade destes microrganismos presentes em áreas impactadas, muitos deles diferentes dos isolados em condições laboratoriais. Portanto, as técnicas de ecologia microbiana molecular servem para detectar espécies dominantes que os métodos convencionais não conseguiriam. A maior razão para a incapacidade de detecção pelos métodos de cultivo convencionais se deve a diferença nas condições fisiológicas impostas pelo ambiente natural e pelo cultivo em laboratório, onde o aporte de nutrientes é consideravelmente diferente (Watanabe *et al,* 2001).

O perfil dos géis obtido com os produtos de PCR para cada amostra avaliada esta apresentado nas Figuras 25, 26 e 27.

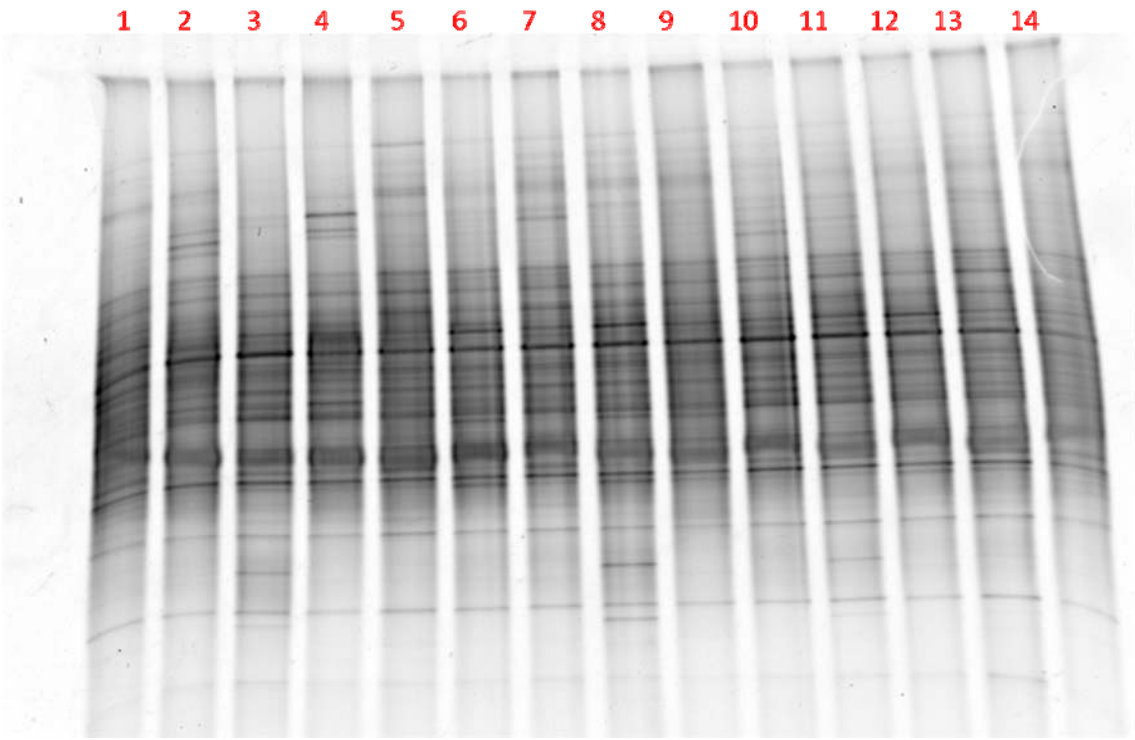


Figura 25 – Perfil (1) do gel de DGGE (gradiente de 40 a 70%) obtido com os produtos de PCR para os iniciadores U968-GC e L1401.

1)Padrão 2)Sed.+Osmocote 0,03% 25d 3)Sed.+Osmocote 0,03% 75d 4)Sed.+Osmocote 0,8% 25d. 5)Sed.+Osmocote 0,8% 75d 6)Sed.+Osmocote 0,03%+Óleo 25d 7) Sed.+Osmocote 0,03%+Óleo 75d 8)Sed.+Osmocote 0,8%+Óleo 25d 9)Sed.+Osmocote 0,8%+Óleo 75d 10)Atenuação Natural 25d 11)Atenuação Natural 75d 12)Atenuação Natural+Óleo 25d 13)Atenuação Natural+Óleo 75d 14) Padrão.

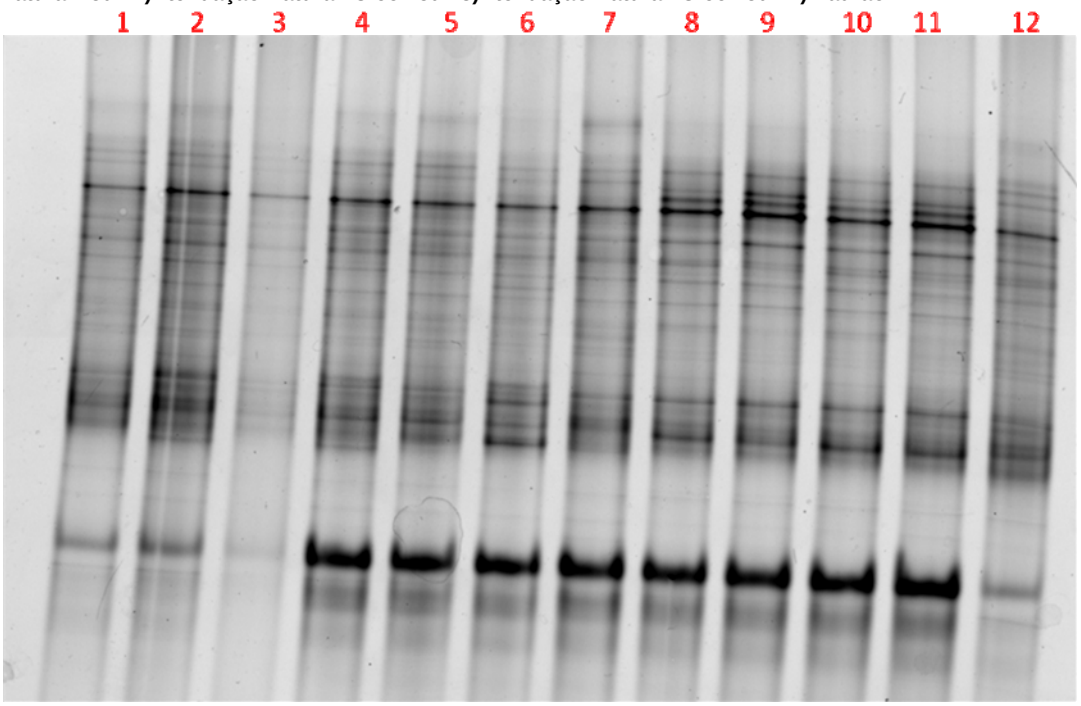


Figura 26 - Perfil (2) do gel de DGGE (gradiente de 40 a 70%) obtido com os produtos de PCR para os iniciadores U968-GC e L1401.

1)Padrão 2)Sed,+Basacote 0,03% +Óleo 25d 3)Sed,+Basacote 0,03% + Óleo 75d 4)Sed,+Basacote 0,8% +Óleo 25d 5) Sed,+Basacote 0,8% + Óleo 75d 6)Sed.+Fósforo +Óleo 25d 7) Sed,+Fósforo +Óleo 75d 8)"Abiótico" 25d 9)"Abiótico" 75d 10)"Abiótico"+Óleo 25d 11)"Abiótico"+Óleo 75d 12)Padrão.

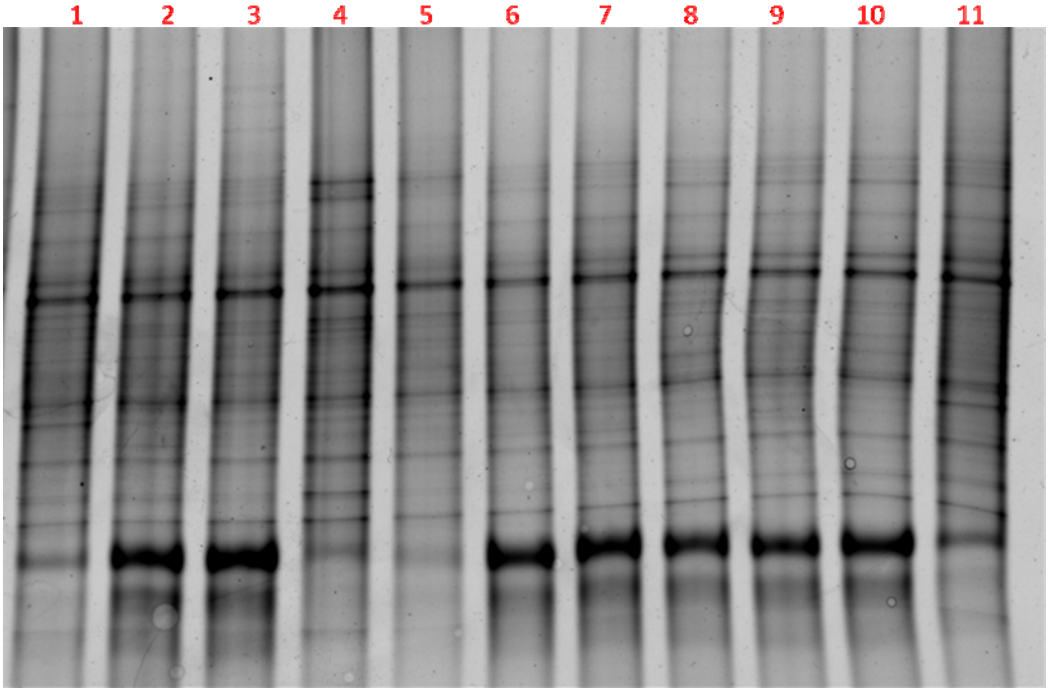


Figura 27 - Perfil (3) do gel obtido com os produtos de PCR.

1)Padrão 2)Sed.+Fósforo 75d 3)Sed.+Fósforo 25d 4)Sed.+Basacote 0,8% 75d 5)Sed.+Basacote 0,8% 25d 6)Sed.+Basacote 0,03% 75d 7)Sed.+Basacote 0,03% 75d 8)Sed. Controle,t=0 1
9)Sed. Controle 2, t=0 10)Sed.Controle 3, t=0 11) Padrão

A técnica de DGGE permite obter informações sobre a estrutura da comunidade bacteriana dominante em solos/ sedimentos e outras matrizes.. Foi construído o dendrograma a partir da matriz gerada pelo sistema de análise de imagem, considerando o método do UPGA (Unweighted pair-group average) para a formação dos grupos e o coeficiente de correlação de *Pearson* como medida de distância entre os objetos (amostras).

De acordo com o dendrograma obtido (Figura 28) observa-se que as variáveis alteradas nesse trabalho, nutrientes e óleo, que são variáveis intrínsecas ao sedimento (alta concentração de nutrientes, e sedimento contaminado) parecem não apresentar qualquer efeito sobre a estrutura dominante da comunidade bacteriana, que se manteve similar em todos os tratamentos, exceto para os tratamentos onde foi incorporada a azida de sódio como biocida. Nesses tratamentos "abióticos", observamos uma ligeira alteração na comunidade que pode ser observada na figura 28. Como já

comentado, a azida de sódio na concentração de 1%, não apresentou efeito biocida sobre a comunidade.

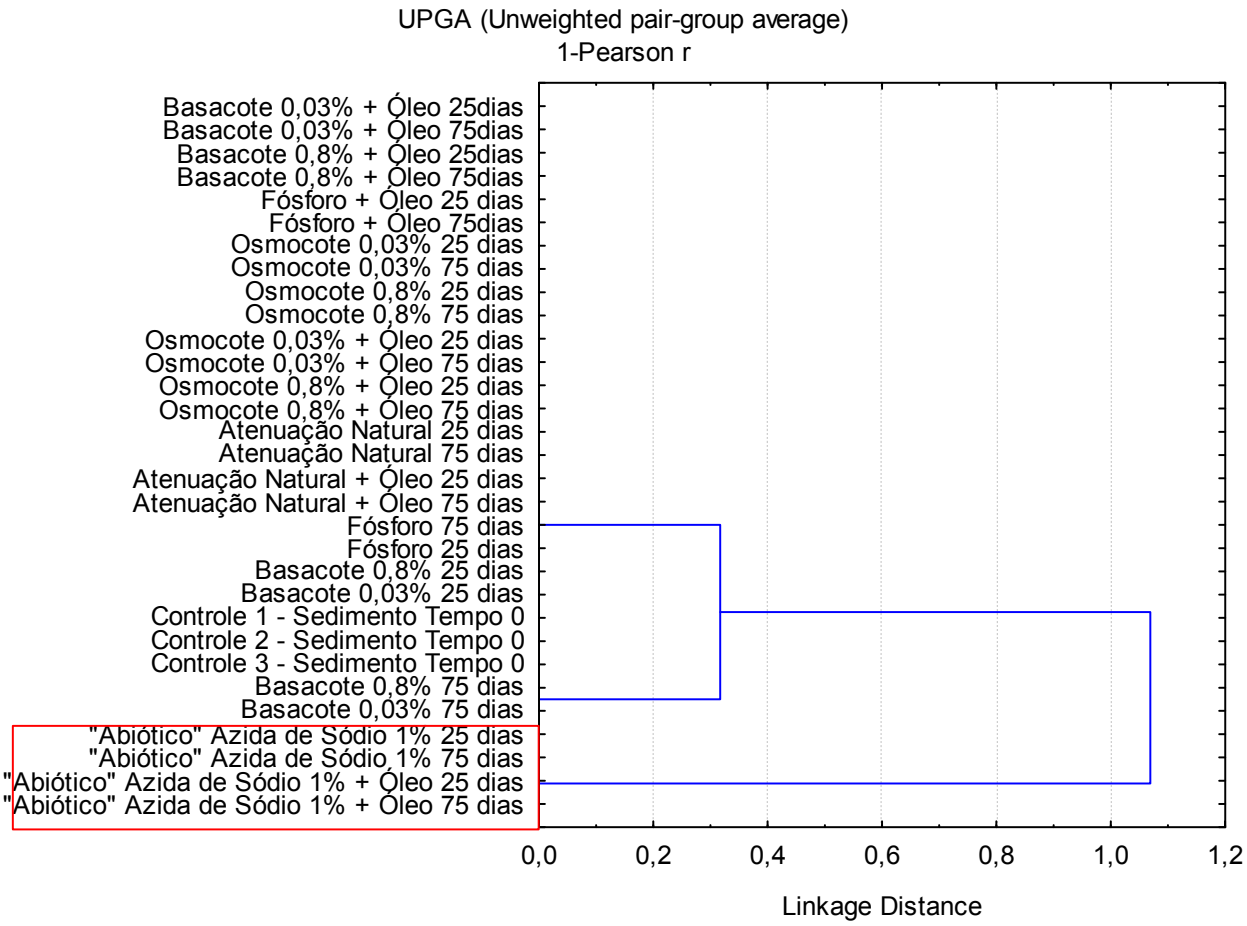


Figura 28 - Dendrograma obtido para o gel de DGGE (gradiente de 40 a 70%) obtido com os produtos de PCR para os iniciadores U968-GC e L1401.

O perfil de bandas gerado pelo PCR-DGGE com iniciadores que hibridizam com regiões do gene *rrs* (codifica o 16s rRNA) reflete a composição das populações microbianas dominantes na comunidade, incluindo os microrganismos não-cultiváveis (Frassani & Gelsomino, 1999). Entretanto, os resultados gerados por esta técnica devem ser analisados com cautela, pois a técnica está sujeita a vários erros nas diversas etapas moleculares (extração DNA, amplificação via PCR, DGGE) (Muyzer,& Smalla, 1998).

Os resultados obtidos nesta etapa mostram que as variáveis alteradas nesse trabalho, nutrientes e óleo, que são variáveis intrínsecas ao sedimento (alta concentração de nutrientes, e sedimento contaminado) parecem não

apresentar qualquer efeito sobre a estrutura dominante da comunidade bacteriana.

6 Conclusões

- Para o Sedimento de manguezal em questão, a Atenuação Natural parece ser a melhor estratégia de remediação. Esse tipo de tratamento envolve basicamente o monitoramento da área de estudo, o que minimiza os custos de operação.

- Uma nova contaminação por hidrocarbonetos estimulou a degradação das frações mais recalcitrantes (UCMs) devido a presença de frações mais biodegradáveis.

- Os índices de biodegradação obtidos com a manipulação da variável nutrientes mostram que alterações nas concentrações apresentam um impacto grande na dinâmica da comunidade bacteriana dominante. O uso de fertilizantes de liberação lenta promove uma liberação contínua de nutrientes e um excesso de nutrientes, acima do requerimento metabólico inibe a degradação do poluente.

- O Fósforo (Bioestímulo Convencional) não é importante para o aumento da degradação dos HTPs para o balanço energético avaliado, 100:10:1 (CNP) nesse sedimento avaliado.

- O tratamento que atingiu o maior valor de degradação das frações recalcitrantes com a simulação de uma nova contaminação foi a atenuação natural, que atingiu 70,44%.

- O maior ganho de degradação das frações recalcitrantes foi atingido pelo tratamento OSMOCOTE 0,8% que, frente a uma nova contaminação, aumentou os índices de degradação de 6,57 para 61,84%. Fato similar também foi observado na concentração de 0,03% de OSMOCOTE que aumentou as

taxas de degradação de 21,53 para 47,96%. Esse resultado sugere que o OSMOCOTE foi capaz de estimular a degradação das frações mais recalcitrantes quando foi adicionado mais efetivamente que o BASACOTE.

- As variáveis alteradas nesse experimento, adição de óleo e nutrientes, são variáveis que já estão presentes no sedimento e que já fazem parte da dinâmica do sedimento. O sedimento de manguezal apresenta uma alta concentração de nutrientes e possui um histórico de contaminação por hidrocarbonetos. Essa contaminação prévia por hidrocarbonetos foi responsável por selecionar linhagens de bactérias capazes de sobreviver e/ou degradar o poluente. Assim, a manipulação dessas variáveis (nutrientes e óleo) parece não alterar a resposta da comunidade microbiana de uma maneira muito intensa.

- Os resultados obtidos pela técnica de DGGE para os tratamentos do sedimento em questão mostram que as variáveis alteradas nesse trabalho, nutrientes e óleo, parecem não apresentar qualquer efeito sobre a estrutura dominante da comunidade bacteriana.

7 Perspectivas

A fim de dar continuidade à linha de pesquisa na qual se insere este estudo, são sugeridas algumas perspectivas para a otimização dos tratamentos de remediação de sedimento de manguezal contaminado.

- Avaliar a concentração de nutrientes, nos diversos tratamentos, para tentar responder as dúvidas referentes ao balanço C:N:P ideal para processos de remediação.

- Otimização das concentrações de uso do OSMOCOTE para biorremediação de HTPs que não cause uma inibição na população microbiana.

- Avaliar pela técnica PCR/DGGE potenciais grupos microbianos envolvidos nos processos de biorremediação do sedimento, bem como sua dinâmica, verificando se esses grupos específicos se alteram frente aos diferentes tratamentos. Ex. *Pseudomonas sp,* Fungos, Actinomicetos, Proteobacterias, etc.

- Realizar estudos integrados com plantas, avaliando a fitorremediação e a manutenção da estrutura do ecossistema de manguezal pelas plantas.

- Avaliar se o comportamento de outro solo, ex mata atlântica, frente à um estimulo por fertilizantes de liberação lenta na biorremediação de HTPs é similar ao comportamento do sedimento de manguezal.

- Desenvolvimento de um produto de liberação lenta, como fonte de N e P, para a remediação de solos e sedimentos contaminados por HTP.

8 Anexo 1 - Legislação

Fonte: Legislação Brasileira(disponível em www.planalto.gov.br)

Legislação Protetiva dos Manguezais

Constituição Federal brasileira, art.225, § 4º, considera a Zona Costeira como "patrimônio nacional", devendo ser utilizada observando a preservação do meio ambiente;

Lei 7661, de 16 de maio de l988, Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro (PNGC) definiu em seu **art.2º, parágrafo único**, a Zona Costeira como " o espaço geográfico de interação do ar, do mar e da terra, incluindo seus recursos renováveis ou não, abrangendo uma faixa marítima e outra terrestre, que serão definidas pelo Plano ", e em seu art.3º,I, dá prioridade a conservação e proteção, em caso de zoneamento, entre outros, aos manguezais, prevendo, inclusive, sanções como interdição, embargos e demolição (**arts.6º**), além das penalidades do **art.14 da Lei 6.938/81** (**Política Nacional do Meio Ambiente)**

Resolução nº 01 de 21.11.90 da Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (CIRM) e pelo CONAMA-Conselho Nacional do Meio Ambiente aprovou a Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro que define a Zona Costeira como " a área de abrangência dos efeitos naturais resultantes das interações terra-mar-ar, leva em conta a paisagem físico-ambiental, em função dos acidentes topográficos situados ao longo do litoral, como ilhas, estuários e baias, comporta em sua integridade os processos e interações características das unidades ecossistêmicas litorâneas e inclui as atividades sócio-econômicas que aí se estabelecem.

Lei de Parcelamento do Solo (Lei 6766/79), não permite o parcelamento do solo em áreas de preservação ecológica , entre outras **(art. 3º,** parágrafo único, V), incluindo nestas os manguezais;

Lei 4.771 de 15.09.65 (Código Florestal), art.2º, f considera também floresta de preservação permanente, as que servem de estabilizadoras de mangues;

Lei 6938 de 31 de agosto de 1981 (Política Nacional do Meio Ambiente), com a finalidade de preservar, melhorar e recuperar a qualidade ambiental para propiciar a vida, assegurando assim o desenvolvimento sócioeconômico (**art.2**), com o atendimento dos seguintes princípios, entre outros: planejamento e fiscalização do uso dos recursos ambientais (**inc. III);** proteção dos ecossistemas, com preservação de áreas representativas (**IV**); controle e zoneamento das atividades potencial ou efetivamente poluidoras (**V**); recuperação de áreas degradadas (**VIII**); e proteção de áreas ameaçadas de degradação;

Nesta lei estão importantes conceitos como, por exemplo, recursos ambientais que são: a atmosfera, as águas interiores, superficiais e subterrâneas, os estuários, o mar territorial, o solo, o subsolo, os elementos da biosfera, a fauna e a flora (**art.3 ,V**). Instituiu ainda em seu **art.14** as sanções administrativas de multa, perda ou restrição de incentivos e benefícios fiscais,perda ou suspensão de participação em linhas de financiamento em estabelecimentos oficiais de crédito, e suspensão de atividade ; e prevê ainda em seu art.15, alterado pela

Lei 7.804 de 18.07.89, pena de reclusão e multa ao poluidor que expuser a perigo a incolumidade humana, animal ou vegetal, ou venha a agravar esta situação;

Lei 7.347/85 (**da Ação Civil Pública**) permite ao Ministério Público, à União, aos Estados, aos Municípios, Autarquias, empresas públicas, fundações, sociedades de economia mista e associações civis com mais de um ano ajuizar ação civil pública de responsabilidade por danos ao meio ambiente, conforme seu **art.5º,** impondo : condenação em dinheiro ou cumprimento de obrigação de fazer ou não fazer (**art.3º);** multa e pena de prisão-reclusão aos agressores **(art.10º**); ação popular constitucional para o fim de anular ato lesivo ao patrimônio público (**art.5º, LXXIII,Constituição Federal**); - mandado

de segurança coletivo às entidades associativas, aos partidos políticos e aos sindicatos para defender interesses transindividuais **(art.5º, LXX da CF**) e; mandado de injunção em faltando norma regulamentadora a agasalhar um direito reconhecido **(art.5º, LXXI, C.F),** todas elas podendo ser aplicadas em havendo potencial dano aos manguezais.

Lei 9.605/98 (dos Crimes Ambientais)

Proteção legal nas constituições dos estados brasileiros

- **Bahia, art.215, I,** inclui os manguezais nas áreas de preservação permanente;
- **Ceará, art.267, V**, proíbe a indústria, comércio, hospitais e residências de despejarem nos mangues resíduos químicos e orgânicos não tratados;
- **Maranhão, art.241, IV, " a",** inclui os manguezais nas áreas de preservação permanente;
- **Paraíba, 227, IX**, determina a designação dos mangues como áreas de preservação permanente;
- **Piauí, art.237, § 7º, I** , também inclui os manguezais nas áreas de preservação permanente;
- **Rio de Janeiro, art.265, I,** também considera os manguezais de preservação permanente.
- **São Paulo, art.196**, considera o Complexo Estuário Lagunar entre Iguape e Cananéia como espaços territoriais especialmente protegidos, podendo ser utilizado apenas com autorização, mas sempre observando a preservação do meio ambiente, bem como em seu **art.197, I** considera expressamente os manguezais áreas de proteção permanente.

No restante dos Estados marítimos os manguezais existentes em suas áreas estão de certa forma protegidos, porque em suas Constituições há dispositivos legais que protegem regiões que tem flora e fauna rica ou de importância, estando por conseguinte incluídos aí os mangues, de forma que os manguezais brasileiros estão bem definidos e incluídos na Zona Costeira do

Brasil, e conseqüentemente protegidos por lei, quer expressamente ou indiretamente.

Estas são, em suma, as sanções administrativas e a legislação principal penal existentes que podem ser aplicadas em caso de degradação dos manguezais,

É importante lembrar ainda que o art.225 de nossa Carta Magna garante a todos o direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, impondo ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo.

Pelo fato de estarem dentro das Zonas Costeiras, somado as suas características especiais em termos biológicos,o ecossistema manguezal está protegido legalmente contra a degradação, observando que em muitos Estados marítimos brasileiros, incluindo nestes o do Rio de Janeiro, é expressamente considerado área de proteção permanente em suas Constituições; mas, apesar de toda essa legislação os manguezais vem sofrendo grandes pressões e impactos ambientais.

Principais Convenções Internacionais sobre Poluição por Óleo no Mar

As discussões internacionais para nortear as medidas preventivas e corretivas sobre a poluição por óleo no mar não são muito antigas.

A OILPOL 54 é primeira convenção internacional reconhecida, visando prevenir a contaminação por óleo transportado pelos navios, realizada pelo governo britânico em 1954, por iniciativa do Conselho Econômico e Social das Nações Unidas. Nesta época, os assuntos marítimos tinham como fórum principal a Organização Consultiva Marítima Intergovernamental (IMCO - *Inter-governmental Maritime Consultative Organization*), criada em 1948, especializada na segurança da navegação. A segunda convenção mais importante a seguir foi a SOLAS 1960 - *International Convention for the Safety of Life at Sea,* discutida anteriormente em 1914 e 1948, mas que passou a vigorar apenas em 1965, abordando entre outros temas importantes, a segurança da navegação, o transporte de cargas a granel, o transporte de substâncias perigosas e os navios nucleares.

Da IMCO, surgiu a Organização Marítima Internacional (OMI) ou IMO - *International Maritime Organization*, acumulando mais de cinqüenta anos de experiência no assunto, promovendo 47 convenções internacionais, protocolos e emendas sobre Segurança da Vida Humana no Mar Proteção do Meio Marinho, Transporte de Carga, Facilitação do Transporte Marítimo entre as quais se destacam a CLC 69, MARPOL 73/78 e a OPRC 90.

CLC - *A Civil Liability Convention* (CLC) ou Convenção sobre a Responsabilidade Civil em Danos Causados por Poluição por Óleo, realizada em Bruxelas em 1969. Tem como objetivo principal estabelecer o limite de responsabilidade civil por danos a terceiros causados por derramamentos de óleo no mar, excluindo-se os derivados claros como gasolina, óleo diesel e querosene, criando assim um sistema de seguro compulsório, que se aplica aos navios petroleiros dos países signatários a esta Convenção. Esta Convenção está ratificada por 79 países entre eles o Brasil, excluindo-se os Estados Unidos. Decreto Federal No 79.437 de 28/03/71 e Decreto Federal No 83.540 de 04/06/79.

FUNDO 1971 (IOPC Fund), OU CONVENÇÃO DE BRUXELAS 1971

O Comitê de Aspectos Legais da IMO estabeleceu nesta Convenção a criação do Fundo Internacional de Compensação por Danos pela Poluição por Óleo (*IOPC Fund*), que entrou em vigor em 1978. O propósito deste fundo é prover indenizações cujos valores excedam o limite de responsabilidade do armador, estabelecido pela *CLC 69*. Os recursos são provenientes de uma taxa sobre a quantidade de petróleo importado por ano, via marítima e, conta com o patrocínio de empresas e pessoas jurídicas que utilizam óleo cru e outros óleos pesados. As indenizações têm como teto o valor de US$ 81,8 milhões. Esta Convenção foi ratificada por 56 países, os quais também são signatários da CLC 69. Embora o governo brasileiro tenha assinado a CLC 69, ainda não ratificou a sua participação neste Fundo.

CONVENÇÃO DE LONDRES 1972

Esta Convenção refere-se à Prevenção da Poluição Marítima por Alijamento de Resíduos e Outras Matérias e fixa normas para controlar e regular, em nível mundial, o despejo de dejetos e outras substâncias de qualquer espécie por navios e plataformas. As partes desta Convenção interromperam a autorização para despejo no mar de substâncias radioativas em 1982 e, para a incineração de despejos químicos, em 1991, até que novas pesquisas "lancem luz sobre o problema".

MARPOL 73/78

Convenção Internacional para a Prevenção da Poluição Causada por Navios, alterada posteriormente pelo Protocolo de 1978 e por uma série de emendas a partir de 1984, visando introduzir regras específicas para estender a prevenção da poluição do mar às cargas perigosas ou equivalentes às dos hidrocarbonetos. As regras da MARPOL passam por um processo dinâmico de aperfeiçoamento em função das inovações tecnológicas, científicas e políticas.

A MARPOL 73/78 contempla atualmente cinco anexos e um a discussão:

- Anexo I - Regras para prevenção da poluição por óleo, a primeira a entrar em vigor

- Anexo II - Regras para o controle da poluição por substâncias nocivas líquidas transportadas a granel;

- Anexo III- Regras para prevenção da poluição ocasionada por substâncias nocivas, transportadas por mar em embalagens (fardos, containers, tanques portáteis ou vagões tanques ferroviários e rodoviários);

- Anexo IV- Regras para a prevenção da poluição por esgotos provenientes de navios;

- Anexo V - Regras para prevenção da poluição por lixo provenientes dos navios;

- Anexo VI - ainda em discussão - Regras para prevenção da poluição por emissões gasosas provenientes dos navios.

De acordo com a MARPOL, entende-se por substâncias nocivas: *"qualquer substância que, se despejada no mar, é capaz de gerar riscos para a saúde humana, danificar os recursos biológicos e a vida marinha, prejudicar as atividades recreativas ou interferir com outras utilizações legítimas do mar e inclui toda substância sujeita a controle pela presente convenção."*

As principais medidas acordadas referem-se à (ao):

- necessidade de realizar vistorias iniciais, periódicas e intermediárias nos navios;
- proibição da descarga de óleo ou misturas oleosas no mar, a menos que o petroleiro esteja a mais de 50 milhas náuticas da terra mais próxima, navegando em sua rota; que o regime de descarga do conteúdo não exceda 60 L por milha náutica. A descarga poderá ser feita desde que o navio possua sistemas de monitoramento e controle de descarga de óleo e separador de água/óleo em operação;
- proibição da descarga de óleo ou misturas oleosas no mar para os demais navios, com arqueação maior ou igual a 400 ton, proveniente dos tanques de combustíveis e dos porões de compartimentos de máquinas, a menos que estejam a mais de 12 milhas náuticas da terra mais próxima, navegando em sua rota; que o conteúdo seja menor ou igual a 100 ppm e que possua em operação, sistema de monitoramento e controle de descarga de óleo, equipamento e sistema de filtragem de óleo entre suas instalações;
- comprometimento dos governos dos países signatários em assegurar a instalação de equipamentos e meios de recebimento da descarga de resíduos de óleo e misturas oleosas como sobras de petroleiros e de outros navios, nos terminais de carregamento de petróleo e derivados, nos portos de reparo entre outros tipos de portos;
- necessidade de dotar os petroleiros novos, isto é, cujo contrato de construção tenha sido assinado após 31/12/75, de tonelada maior ou

igual a 70 mil, de tanques de lastro segregado ou seja, tanques diferenciados, completamente separados dos sistemas de óleo de carga e combustível, destinado ao transporte de lastro ou outras cargas que não sejam óleo, misturas oleosas e substâncias nocivas;

- obrigatoriedade de possuir o livro de registro de óleo, seja como parte ou não do diário náutico, no qual serão feitas anotações relativas à todas as movimentações de óleo, lastro e misturas oleosas, inclusive as entregas efetuadas às instalações de recebimento. Este livro é válido para os petroleiros de arqueação bruta maior ou igual a 150 ton e nos cargueiros de arqueação maior ou igual a 400 ton;
- procedimentos para descarga de substâncias nocivas líquidas;
- procedimentos para embalagem, marcação, etiquetagem, documentação necessária, e estivagem de substâncias prejudiciais transportadas por mar na forma de embalagens;

O governo brasileiro aprovou com restrições os textos desta Convenção pelo Decreto Legislativo No 2508/98 de 04/03/1998.

Navios de Casco Duplo

Um outro assunto de grande interesse relativo à MARPOL é a regulamentação sobre navios de casco duplo. A IMO - Organização Marítima Internacional, durante a 46ª MEPC - Comitê de Proteção ao Meio Ambiente Marinho, realizada em abril 2001, determinou que os navios entregues a partir de 06/07/1996, deveriam ser do tipo casco duplo. De acordo com as novas regras, o limite de vida útil dos petroleiros foi reduzido de 30 para 25 anos devendo ser intensificadas as vistorias nas embarcações, visando preservar navios com boas condições de manutenção.

CONVENÇÃO DE PARIS DE 1974 - Fontes terrestres

Convenção para Prevenção da Poluição Marítima por Fontes Situadas em Terra. Começou a vigorar em maio de 1978 sendo o principal instrumento internacional a respeito da prevenção da poluição por portos e terminais entre outras fontes terrestres.

SOLAS 1974

Convenção Internacional para a Salvaguarda da Vida Humana no Mar (International Convention for the Safety of Life at Sea). Foi adotada em 1/11/1974, protocolos de 1978 e Emendas de 1994, 1995 e 1997. Estabelece regras e diretrizes para inspeções e vistorias de navios, equipamentos salva-vidas, instalações de rádio, casco, máquinas, construção, compartimentagem e estabilidade, instalações elétricas, manutenção das condições, busca e salvamento, sistema de gestão da segurança e, ainda, a emissão e aceitação de certificados. A SOLAS foi a primeira convenção realizada da história, ocorrida em 1914, em função do acidente ocorrido com o navio Titanic, porém só entrou em vigor em 25/05/1980.

LLMC 75 Transporte marítimo de material nuclear

Convenção Relativa à Responsabilidade Civil no Caso de Transporte Marítimo de Material Nuclear, em vigor desde 15/7/75, não ratificada pelo governo brasileiro.

CONVENÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS SOBRE OS DIREITOS DO MAR

É qualificada como "a constituição dos oceanos". Realizada em 1982, em Montego Bay, Jamaica, entrou em vigor em 1994. Tem como objetivos principais estabelecer normas para as zonas oceânicas internacionais, limites territoriais marítimos, direitos de navegação, jurisdição econômica, direitos de exploração de recursos, gerenciamento e proteção ao ambiente marinho. Desde que esta Convenção passou a viger, estas disposições adquiram a eficácia de tratados internacionais. O governo brasileiro é signatário pelo Decreto Federal No 99.165 de 12/03/90.

Compreende 17 partes (sendo a primeira um texto introdutório) e 9 anexos, abordando disposições sobre as áreas marítimas como Mar Territorial, Zona Contígua e Zona Econômica Exclusiva entre outras; sobre questões específicas referentes a determinados espaços marítimos utilizados para navegação internacional, ao regime das ilhas, a mares fechados ou semi-fechados; sobre o direito de acesso ao mar; sobre a proteção e preservação do

meio marinho e investigação científica, entre outros tópicos. Os anexos apresentam temas que necessitaram de maior aprofundamento e pormenorização, como regras sobre a solução de controvérsias, tais como conciliação, estatuto do Tribunal Internacional do Direito do Mar, arbitragem e participação de organizações internacionais.

No âmbito deste documento destacam-se alguns artigos isoladamente e Parte do Capítulo XII (194 a 201), por abordarem diretamente a proteção e preservação do meio marinho:

- Art. 24: sobre os deveres do Estado Costeiro: "o Estado Costeiro dará a devida publicidade a qualquer perigo que tenha conhecimento e que ameace a navegação no seu mar territorial";
- Art. 25: sobre os direitos de proteção do Estado Costeiro: "o Estado Costeiro pode tomar, no seu mar territorial, as medidas necessárias para impedir toda a passagem que não seja inocente";
- Art. 28: aborda sobre jurisdição civil em relação aos navios estrangeiros: "o Estado Costeiro não pode tomar contra este navio, medidas executórias ou medida cautelares em matéria civil, a não ser que essas medidas sejam tomadas por força de obrigações assumidas pelo navio ou de responsabilidade em que o mesmo haja incorrido durante a navegação ou devido à esta quando da sua passagem pelas águas do Estado Costeiro.
- Art. 194: dispõe sobre medidas para prevenir, reduzir e controlar a poluição do mar;
- Art. 197: aborda a cooperação no plano mundial ou regional, diretamente ou por intermédio de organizações internacionais competentes, para a proteção e preservação do ambiente marinho;
- Art. 199: ressalta a importância dos estados costeiros elaborarem e promoverem planos de emergência para enfrentar incidentes de poluição no meio marinho.
- Art. 200: estimula os estados a participar ativamente dos programas regionais e mundiais, com vista a adquirir os conhecimentos necessários

para avaliação da natureza e grau de poluição, efeitos da exposição a mesma, seu trajeto, riscos e soluções aplicáveis;

- Art. 201: estimula o estabelecimento de critérios científicos apropriados para a formulação e elaboração de regras, bem como práticas e procedimentos recomendados para prevenir, reduzir e controlar a poluição do meio marinho.*Decreto Federal No 99.165 de 12/03/90*

CONVENÇÃO DE BASILÉIA 1989

Convenção da Basiléia sobre o Controle dos Movimentos Transfronteiriços dos Resíduos Perigosos e sua eliminação, adotada em 22/03/1989. Passou a vigorar em 05/05/92. Entre os seus principais objetivos estão o de reduzir os movimentos transfronteiriços de resíduos perigosos e de outros resíduos submetidos a esta Convenção, a um mínimo compatível com seu manejo ambientalmente adequado; tratar e eliminar estes resíduos o mais próximo possível de sua fonte de geração; prevenir o tráfico ilícito destes resíduos; proibir seu transporte até os países carentes de capacidades jurídicas, administrativas e técnicas para seu manejo e eliminação ambientalmente adequada.

SALVAGE 1989

Convenção Internacional sobre Salvamento. Foi adotada em 28/04/89 e passou a vigorar em 14/07/96. Visa incentivar, mesmo monetariamente, operações de salvamento de navios ou outros tipos de embarcação e prevenir a poluição marinha por tais operações.

OPRC 1990

A Convenção Internacional sobre Preparo, Responsabilidade e Cooperação em Casos de Poluição por Óleo (Oil Pollution Preparedness, Response and Co-Operation) foi estabelecida pela IMO em 30/11/90, em função do acidente ocorrido com o petroleiro Exxon Valdez no Alasca, em 1989 e do inacreditável derramamento de óleo provocado por forças militares durante a Guerra do Golfo Pérsico. Passou a vigorar em 1995. Visa facilitar a cooperação internacional e a assistência mútua no preparo para o atendimento

aos casos de vazamentos de óleo e incentivar os países a desenvolver e manter adequada capacitação para lidar, de maneira eficaz, com as emergências decorrentes deste tipo de poluição. Estende seu alcance às instalações portuárias que operam com hidrocarbonetos e derivados além dos navios e plataformas. Entre os principais aspectos estabelecidos destaca-se que:

- os estados devem exigir planos de emergência individuais das instalações que manuseiam hidrocarbonetos e derivados
- cada país deverá estabelecer um sistema nacional de resposta aos acidentes (plano nacional de contingência) a partir dos planos de emergência individuais e um sistema internacional, contemplando a cooperação de dois ou três países, se necessário;
- os navios devem ser providos de manual de instruções para os procedimentos de emergência (não se aplica aos navios de guerra, de auxílio naval ou operado por um governo com fins que não sejam comerciais);
- a notificação dos acidentes deve ser feita rapidamente aos países envolvidos;
- os países poderão solicitar a cooperação internacional quando os acidentes ocorrerem, devendo também promover a cooperação nas áreas de pesquisas relacionadas com a prevenção da poluição por óleo;
- a IMO deverá prover informação, educação, treinamento e serviços de consultoria internacional durante os acidentes.

No Brasil, esta convenção foi promulgada pelo *Decreto Legislativo No 43 de 01/06/98.*

Resolução A. 868 (20) IMO - Água de lastro

Diretrizes para o controle e gerenciamento da água de lastro dos navios para minimizar a transferência de organismos aquáticos nocivos e agentes patogênicos. Título original: *Guidelines for the control and management of ship´s ballast water to minimize the transfer of harmful aquatic organism and patogens*. A Organização Marítima Internacional (IMO) e a Organização

Mundial de Saúde (OMS) reconheceram oficialmente que a descarga da água de lastro e de sedimentos transportados por navios pode permitir a entrada de organismos aquáticos nocivos e agentes patogênicos (bactérias, algas, larvas de invertebrados, etc) nos diversos portos internacionais, ameaçando o equilíbrio ecológico da vida marinha existente e podendo causar doenças epidêmicas. Estas diretrizes visam minimizar o risco desta contaminação

Ainda não foi elaborada legislação nacional pertinente. No Brasil, o Programa Globallast é coordenado pelo Ministério do Meio Ambiente e auxiliado por um Assistente Técnico, contratado pela IMO, do qual também participam a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, universidades, entre outros.

A PARTICIPAÇÃO DO BRASIL NO PROGRAMA GLOBAL DE GESTÃO DE ÁGUA DE LASTRO

A Organização Marítima Internacional (IMO), com recursos oriundos do Fundo para o Meio Ambiente Mundial (GEF) através do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (UNDP), uniu-se aos Estados Membros e a indústria do transporte marítimo com o propósito de apoiar países em desenvolvimento no trato do problema de água de lastro, dando início, assim, ao Programa Global de Gerenciamento de Água de Lastro - GloBallast. O projeto, denominado originalmente "Remoção de Barreiras para a Implementação Efetiva do Controle da Água de Lastro e Medidas de Gerenciamento em Países em Desenvolvimento", visa reduzir a transferência de espécies marinhas não nativas indesejáveis que têm como vetor a água de lastro dos navios. Tem como propósito ajudar os países em desenvolvimento a implementar as medidas de caráter voluntário previstas na Resolução A.868 (20) - IMO "Diretrizes para o Controle e Gerenciamento da Água de Lastro dos Navios para Minimizar a Transferência de Organismos Aquáticos Nocivos e Agentes Patogênicos"; publicação essa já traduzida e distribuída pela DPC à Comunidade Marítima e Capitanias. Além disso, o GloBallast tenciona preparar os países antecipadamente para a implementação de instrumento legal de âmbito internacional, atualmente em desenvolvimento pelos Estados Membros da IMO, que regulamentará o gerenciamento da água de lastro. Para que isso

seja alcançado, será provido aos seis países participantes, durante os três anos de duração do Programa (maio de 2000 até maio de 2003), assistência técnica, capacitação e reforço institucional, tendo como objetivo uma efetiva gestão da água de lastro. Os estudos de caso a serem desenvolvidos nesses países servirão, numa primeira etapa, como demonstração de dificuldades e experiências de sucesso de gestão do problema. Pretende-se que esses seis locais de demonstração representem as principais regiões em desenvolvimento do mundo: Saldanha/África do Sul, Bombaim - Índia, Sepetiba - Brasil, Ilha Kharg - Irã, Dalian - China e Odessa - Ucrânia.

No Brasil, o GloBallast é coordenado pelo Ministério do Meio Ambiente e auxiliado por um Assistente Técnico, contratado pela IMO. Uma Força-Tarefa Nacional foi estabelecida, em novembro de 2000, formada por uma equipe multidisciplinar de especialistas de várias universidades do Estado do Rio de Janeiro e representantes dos setores envolvidos como Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Companhia Docas do Rio de Janeiro, FEEMA, IBAMA, e PETROBRAS. O GloBallast conta, ainda, com o apoio técnico e institucional do Instituto de Estudos do Mar Almirante Paulo Moreira.

Regulamentação Brasileira

Em qualquer país, o instrumento necessário para abordar as causas e as conseqüências deletérias ao meio ambiente é a legislação. Através destas, são estabelecidos os padrões, as ações e as medidas de combate, de resposta e prevenção à poluição por óleo, bem como as penalidades pelo não cumprimento.

A legislação nacional sobre poluição por óleo no mar por navios data do século XIX; é o Decreto Federal No 3.334 de 05/07/1899 -Art. 176 que:

> **"Proíbe o lançamento ao mar ou rio, de bordo de navios ou de quaisquer embarcações, lixo, cinza, varreduras do porão, etc, para o que as capitanias, de acordo com a repartição sanitária ou com a câmara municipal, designarão em ilhas situadas a sotavento dos ventos reinantes nos portos, local adequado para o vazadouro. Os infractores pagarão a multa de 50$ a 100$000."**

Em 1967 foi aprovada a Lei Federal 5.357 que vigorou por trinta e três anos até ser substituída pela Lei Federal 9.966/00. A Lei 5.357/67 estabelecia penalidades para embarcações e terminais marítimos ou fluviais de qualquer natureza, estrangeiros ou nacionais, que lançassem detritos ou óleo nas águas brasileiras. A multa era de 2% do maior salário mínimo vigente no território nacional, por tonelada de arqueação ou fração às embarcações e multa de 200 vezes o maior salário mínimo vigente no território nacional, para os terminais marítimos ou fluviais. Nos casos de reincidência, a multa deveria ser aplicada em dobro. A fiscalização estava a cargo da Diretoria de Portos e Costas do Ministério da Marinha. A receita proveniente da sua aplicação deveria ser vinculada ao Fundo Naval. Esta lei aplicava-se apenas aos navios e terminais, não abrangendo demais fontes de poluição e também não estabelecia quaisquer obrigações, normas ou procedimentos, limitando-se às penalidades a serem impostas aqueles que lançassem detritos ou óleo em águas brasileiras.

LEGISLAÇÃO FEDERAL

A seguir serão apresentadas, resumidamente, uma abordagem geral sobre a legislação brasileira relacionada direta e indiretamente com a poluição marinha.

Decreto Federal No 79.437 de 28/03/71

Promulga a Convenção Internacional sobre a Responsabilidade Civil de Danos Causados por Poluição por Óleo (CLC 69).

Decreto Federal No 83.540 de 04/06/79

Regulamenta a aplicação da Convenção Internacional sobre a Responsabilidade Civil de Danos Causados por Poluição por Óleo (CLC 69) e dá outras providências:

- Art. 2º: "o proprietário de um navio que transporte óleo a granel como carga é civilmente responsável pelos danos causados por poluição por óleo no território nacional, incluindo o mar territorial";
- Art. 6º: "os órgãos estaduais de controle do meio ambiente que tenham jurisdição na área onde ocorrer o incidente executarão, em articulação com o IBAMA, as medidas preventivas e corretivas necessárias à redução dos danos causados por poluição por óleo, bem como supervisionarão as medidas adotadas pelo proprietário do navio, concernente à essa redução dos danos".
- Art. 8º §1º - Qualquer incidente deverá ser comunicado imediatamente à Capitania dos Portos da área a qual deverá participar o fato aos órgãos de meio ambiente, federais e estaduais, com urgência.

Portaria do Ministério dos Transportes N.º 124, de 20/08/80 Prevenção da poluição de origem terrestre

Exige que as indústrias potencialmente poluidoras e as construções ou estruturas que armazenem substâncias também potencialmente poluidoras, se instalem a uma distância mínima de 200 metros dos corpos d'água. E ainda, que todo depósito construído acima do nível do solo, que receba líquidos potencialmente poluentes, seja protegido de forma a evitar que eventuais vazamentos atinjam os corpos d'água. Para tanto deverão ser construídos tanques, amuradas, silos subterrâneos ou outros dispositivos de contenção que se mostrem necessários.

Lei Federal No 6.938 de 31/08/81 - Política Nacional de Meio Ambiente

Dispõe sobre a Política Nacional de Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação de aplicação. Objetiva a preservação, melhoria e recuperação da qualidade ambiental, propícia à vida, visando assegurar no país condições ao desenvolvimento sócio-econômico, aos interesses da segurança nacional e a proteção da dignidade da vida humana e, para tanto, constitui o Sistema Nacional do Meio Ambiente (SISNAMA).

- Art. 14: Estabelece a responsabilidade civil objetiva por danos por poluição, e as penalidades para os agentes poluidores, obrigando-os a indenizar ou reparar os danos causados ao meio ambiente e a terceiros afetados, independentemente da existência de culpa. Podem também os Ministérios Públicos da União e dos Estados proporem ações de responsabilidade civil e criminal por danos causados ao meio ambiente.

Lei Federal No 7.203 de 03/07/84 Assistência de Embarcações em Perigo no Mar

Dispõe sobre Assistência e Salvamento de Embarcações, Coisa ou Bem em Perigo no Mar. - Art. 3º: Estabelece que quando a embarcação, coisa ou bem, estiver em perigo e representar risco de dano a terceiros ou ao meio ambiente, o armador ou proprietário, conforme o caso, será responsável pelas providências necessárias para anular ou minimizar este risco.

Lei Federal No 7.347 de 24/07/85 Ação Civil Pública por Danos Causados ao Meio Ambiente

Institui a Ação Civil Pública de Responsabilidade por Danos Causados ao Meio Ambiente, ao Consumidor, a Bens e Direitos de Valor Artístico, Estético, Histórico e Paisagístico. Estas ações objetivam responsabilizar e obrigar o poluidor a reparar o dano gerado. Disciplina as Ações Civis Públicas que podem ser propostas pelo Ministério Público, pela União, Estados e Municípios ou por autarquias, empresas públicas, fundações, sociedades de economia mista ou associações de defesa ao meio ambiente.

Lei Federal No 7.542 de 26/09/86 Sobre Bens Afundados

Dispõe sobre a Pesquisa, Exploração, Remoção e Demolição de Bens Afundados, Submersos, Encalhados e Perdidos em Águas sob Jurisdição Nacional. Estabelece que a autoridade naval, a seu exclusivo critério, poderá determinar ao responsável a remoção ou a demolição no todo ou em parte

quando os bens afundados, submersos, encalhados ou perdidos constituírem perigo, obstáculo à navegação ou ameaça de danos a terceiros ou ao meio ambiente.

Lei Federal No 7.661 de 16/05/88 Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro

Institui o Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro o qual foi aprovado, posteriormente, pela Resolução No1, de 21/11/90, do Ministério da Marinha. De acordo com este Plano, os estados da federação deverão criar por vias legais um Sistema de Gerenciamento Costeiro, normatizar o uso da sua zona costeira e definir sua área de atuação marítima.

Decreto Federal No 99.165 de 12/03/90Convenção sobre o Direito do Mar

Promulga a Convenção das Nações Unidas sobre o Direito do Mar celebrada em Montego Bay, Jamaica em 10/11/82.

Resolução CONAMA N.º 06, de 17/10/90 – Dispersantes

Dispõe sobre a produção, importação, comercialização e uso de dispersantes químicos empregados nas ações de combate aos derrames de petróleo e seus derivados, determinando que só poderão ser aplicados após prévia avaliação e registro junto ao IBAMA a quem atribuiu também o estabelecimento de procedimentos e exigências complementares. O IBAMA baixou a Portaria Normativa N.º 64, de 19/06/92 que trata do registro provisório desses dispersantes. Esta Resolução foi substituída pela *Resolução CONAMA 269/00.*

Lei No 8.617 de 04/01/93 Mar territorial brasileiro

Dispõe sobre o mar territorial, zona contígua, zona econômica exclusiva e plataforma continental brasileiros e dá outras providências. Apresenta definições e algumas orientações sobre formas de utilização destas áreas.

Lei Federal 8.630/93 Lei dos Portos

Dispõe sobre o regime jurídico da exploração dos portos organizados e das instalações portuárias e dá outras providências.

Decreto Federal No 1290 de 21/10/94 Linhas de Base Reta na Costa Brasileira

Estabelece os pontos apropriados para o traçado das Linhas de Base Retas ao longo da costa brasileira, formadas pelos segmentos que unem os pontos de coordenadas geográficas. Estes dados são de importância para delimitar o divisor das águas sob jurisdição nacional, ou seja, água interiores e águas marítimas mencionadas na Lei 9.966/00.

Portaria No 046 de 28/08/96 do Ministério da Marinha Código Segurança Marítima

Portaria da Diretoria e Portos e Costas (DPC). Aprova as diretrizes para implementação do Código Internacional de Gerenciamento para a Operação Segura de Navios e para a Prevenção da Poluição - Código ISM (International Safety Maritime), visando orientar as companhias de navegação e operadoras de navios na preparação de sistemas de gerenciamento de segurança, na sua implantação e manutenção.

Lei Federal No 9.478 de 06/08/97 Cria Agência Nacional de Petróleo

Cria a Agência Nacional de Petróleo (ANP) sendo uma das suas atribuições a de fazer cumprir as boas práticas de conservação e uso racional do petróleo, dos derivados, do gás natural e de preservação do meio ambiente. A portaria ANP 170 de 26/11/1998, art. 13 - estatui que a empresa ou concessionária autorizada comunique imediatamente à Agência, a ocorrência de qualquer evento decorrente de suas atividades que possa acarretar riscos à saúde pública, à segurança de terceiros e ao meio ambiente, indicando as

causas de sua origem, bem como as medidas tomadas para sanar ou reduzir o seu impacto. A empresa ou concessionária poluidora poderá ser autuada pela Agência "por não ter observado os requisitos de proteção ambiental e de segurança do tráfego" e até ser interditada. O não cumprimento no disposto nesta Portaria implicará em aplicação das penalidades previstas na Lei N.º 9.847, de 26 de outubro de 1999 e legislação complementar.

Lei Federal No 9.537 de 11/12/97 Lei de Segurança do Tráfego Aquaviário (LESTA)

Dispõe sobre a segurança do tráfego aquaviário em águas jurisdicionais brasileiras e dá outras providências. Abrange embarcações brasileiras, exceto as de guerra, os tripulantes, os profissionais não-tripulantes, e os passageiros nelas embarcados, ainda que fora das águas sob jurisdição nacional, como também as embarcações estrangeiras e aeronaves na superfície das águas sob jurisdição nacional. Aborda a atuação da praticagem, a obrigatoriedade de comunicação de acidentes e a apuração dos fatos tanto para navios como para plataformas. Seguem alguns artigos de destaque:

Art. 5º: A embarcação estrangeira, submetida à inspeção naval, que apresente irregularidade na documentação ou condições operacionais precárias, representando ameaça de danos ao meio ambiente, à tripulação, a terceiros ou à segurança do tráfego aquaviário, pode ser ordenada a: I - não entrar no porto; II - não sair do porto; III - sair das águas jurisdicionais; IV - arribar em porto nacional.

Art. 6º: A autoridade marítima poderá delegar aos municípios a fiscalização do tráfego de embarcações que ponham em risco a integridade física de qualquer pessoa nas áreas adjacentes às praias, quer sejam marítimas, fluviais ou lacustres.

Art. 8º: Compete ao Comandante: I cumprir e fazer cumprir a bordo, a legislação, as normas e os regulamentos, bem como os atos e as resoluções internacionais ratificados pelo Brasil e; II - cumprir e fazer cumprir a bordo, os procedimentos estabelecidos para a salvaguarda da vida humana, para a

preservação do meio ambiente e para a segurança da navegação, da própria embarcação e da carga;

Art. 33: Os acidentes e fatos da navegação, definidos em lei específica, aí incluídos os ocorridos nas plataformas, serão apurados por meio de inquérito administrativo instaurado pela autoridade marítima, para posterior julgamento no Tribunal Marítimo.

Parágrafo único. Nos casos de que trata este artigo, é vedada a aplicação das sanções previstas nesta Lei antes da decisão final do Tribunal Marítimo, sempre que uma infração for constatada no curso de inquérito administrativo para apurar fato ou acidente da navegação, com exceção da hipótese de poluição das águas.

Decreto Lei 2.596 de 18/05/98

Regulamenta a LESTA

Lei Federal No 9.605 de 12/02/1998 Lei de Crimes Ambientais

Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente e dá outras providências. Esta lei trouxe uma série de inovações entre elas a responsabilização de pessoas jurídicas e físicas, autoras e co-autoras da infração e o fato de que a punição poderá ser extinta com a apresentação de laudo que comprove a recuperação do dano ambiental. No entanto, para constatação do dano à fauna pelos vazamentos de óleo, por exemplo, é necessário comprovar que houve mortandade, fato este que nem sempre é fácil de ser evidenciado principalmente quando se trata da microfauna marinha. Como o texto dessa lei é muito extenso, foram extraídos apenas os itens pertinentes à questão da poluição por óleo:

- Cap. I. Disposições Gerais: Parágrafo único- A responsabilidade das pessoas jurídicas não exclui a das pessoas físicas, autoras, co-autoras ou partícipes do mesmo fato;

- Cap. II. da Aplicação da Pena- Art. 6º: Para imposição e gradação da penalidade, a autoridade competente observará a gravidade do fato, tendo em vista os motivos da infração e suas conseqüências para a saúde pública e para o meio ambiente;
- Cap. II. da Aplicação da Pena- Art.7º a 13: As penas restritivas de direitos a que se refere são:

  Prestação de serviços à comunidade; Interdição temporária de direitos; Suspensão parcial ou total de atividades; Prestação Pecuniária, isto é, pagamento em dinheiro à vítima ou à entidade pública ou privada com fim social, na importância fixada pelo Juiz. O valor pago será deduzido do montante de eventual reparação civil a que for condenado o infrator; Recolhimento domiciliar.

  Art. 14: São circunstâncias que atenuam a pena:

  II- arrependimento do infrator, manifestado pela espontânea reparação do dano ou limitação significativa da degradação ambiental causada;

  III- comunicação prévia pelo agente, do perigo iminente de degradação ambiental;

  IV- colaboração com os agentes encarregados da vigilância e do controle ambiental;

  Art. 10: A perícia de constatação do dano ambiental, sempre que possível, fixará o montante do prejuízo causado para efeitos de prestação de fiança e cálculo de multa;

  Art. 15: São circunstâncias que agravam a pena:

  I- reincidência nos crimes de natureza ambiental;

  II- ter o agente cometido infração afetando ou expondo a perigo, de maneira grave, a saúde pública e o meio ambiente, concorrendo para danos à propriedade alheia; atingindo áreas de unidades de conservação ou áreas sujeitas a regime especial de uso; em período de defeso à fauna; em domingos ou feriados ou à noite;

  Art. 23: A prestação de serviços à comunidade pela pessoa jurídica consistirá em custeio de programas e de projetos ambientais, execução de obras de recuperação de áreas degradadas, manutenção de espaços públicos e contribuições às entidades ambientais ou culturais públicas.

Cap. V dos Crimes Contra o Meio Ambiente;

Seção III- da Poluição e de Outros Crimes Ambientais:

Art. 54: Causar poluição de qualquer natureza em níveis tais que:

resultem ou possam resultar em danos à saúde humana ou que provoquem a mortandade de animais ou a destruição significativa da flora (pena de reclusão de 1 a 4 anos e multa se o crime for culposo e detenção de 6 meses a 1 ano e multa se o crime causar poluição hídrica),

torne necessária a interrupção do abastecimento público de água de uma comunidade, dificulte ou impeça o uso público das praias,

ocorra por lançamento de resíduos sólidos, líquidos ou gasosos ou detritos, óleos ou substâncias oleosas, em desacordo com as exigências estabelecidas em leis ou regulamentos.

Decreto Legislativo No 2.508 de 04/03/98 MARPOL

Este decreto estabelece regras para a prevenção da poluição causada por óleo, por substâncias líquidas nocivas transportadas a granel, em fardos, containers, tanques portáteis ou vagões, tanques rodoviários e ferroviários e também por esgotos e lixo provenientes de navios. As normas estabelecidas dirigem-se aos navios, portos e terminais. Aprova, com reservas, os textos da Convenção Internacional para Prevenção da Poluição Causada Por Navios/Protocolo de 1978. As reservas referem-se ao Art. 10 - Solução de Controvérsias e aos Anexos III, IV e V os quais, por serem opcionais nos termos desta Convenção, terão caráter não mandatário para o país. Para que seja possível a sua aplicação legal esta Convenção precisa ser promulgada pelo Governo Federal.

Decreto Legislativo No 43 de 01/06/98 OPRC

Ratifica a Convenção Internacional sobre Preparo, Responsabilidade e Cooperação em Casos de Poluição por Óleo (OPRC 90) estabelecida pela IMO em 30/11/90. Destacam-se os artigos:

Art. 6º: Cada parte deve estabelecer um sistema nacional para responder pronta e efetivamente aos incidentes de poluição por óleo. Este sistema incluirá, como um mínimo:

a) a designação de:

I. A(s) autoridade(s) nacional (is) competente(s) responsável (eis) pelo preparo e resposta em caso de poluição por óleo;

II. O ponto ou pontos de contato operacionais, de âmbito nacional, responsável pelo recebimento e pela transmissão de relatórios sobre poluição por petróleo, como referido no artigo 4º;

III. Uma autoridade credenciada para agir em nome do Estado para solicitar assistência ou tomar a decisão de prestar a assistência solicitada;

IV. Um plano nacional de contingência, para preparo e resposta que inclua a relação organizacional entre os diversos órgãos envolvidos, tanto públicos quanto privados e, que leve em consideração as diretrizes elaboradas pela Organização Marítima Internacional.

Lei Estadual No 10.019 de 03/07/98 Plano Estadual de Gerenciamento Costeiro

Institui o Plano Estadual de Gerenciamento Costeiro, com base no Programa Estadual de mesmo nome, criado em 1988 pela Secretaria de Estado do Meio Ambiente de São Paulo (SMA), para implantar processos participativos de administração e racionalização do uso dos recursos naturais terrestres e marinhos, renováveis ou não.

Portaria Interministerial 367 de 18/12/98 IMO

Institui uma comissão especial brasileira para coordenar os assuntos relativos à Organização Marítima Internacional ou *International Maritime Organizatio*n (IMO)

Decreto Lei 3.179/99 Sanções às atividades lesivas ao meio ambiente

Dispõe sobre especificações das sanções aplicáveis às condutas e atividades lesivas ao meio ambiente e dá outras providências.

Lei Federal No 9.966 de 28/04/2000 "Lei do óleo e de substâncias nocivas"

Estabelece os princípios básicos a serem obedecidos na movimentação de óleo e outras substâncias nocivas ou perigosas em portos organizados, instalações portuárias, plataformas e navios em águas sob jurisdição nacional. Aplica-se às embarcações e plataformas nacionais ou estrangeiras, portos, instalações portuárias e dutos. É composto de sete capítulos, sendo que o primeiro aborda definições e classificações. Os demais são sucintamente apresentados a seguir:

Capítulo II: dos Sistemas de Prevenção, Controle e Combate da Poluição - diz que os estabelecimentos mencionados acima devem dispor obrigatoriamente de instalações ou meios adequados para o recebimento e tratamento dos diversos tipos de resíduos e para o combate da poluição.

Art. 6º: deverão elaborar manual de procedimento interno para o gerenciamento de risco de poluição bem como para gestão dos diversos resíduos gerados ou provenientes das atividades de movimentação e armazenamento de óleo e substâncias nocivas ou perigosas a ser aprovado pelo órgão ambiental competente;

Art. 7º e 8º: mencionam que aqueles estabelecimentos deverão dispor de planos de emergência individuais para o combate à poluição por óleo e substâncias nocivas ou perigosas, os quais serão submetidos à aprovação do órgão ambiental competente e que depois serão consolidados pelo mesmo órgão ambiental competente, na forma de planos de contingência locais ou regionais em articulação com os órgãos de defesa civil.

Parágrafo único: o órgão federal de meio ambiente, em consonância com o disposto na OPRC 90, consolidará os planos de contingência locais e regionais na forma do Plano Nacional de Contingência, em articulação com os órgãos de defesa civil.

Art. 9º: fala da realização de auditorias ambientais bienais, independentes, com o objetivo de avaliar os sistemas de gestão e controle ambiental em suas unidades.

Cap. III: Do Transporte de Óleo e Substâncias Nocivas ou Perigosas

Art. 10 e 11: falam da obrigatoriedade dos navios e plataformas portarem a bordo o Livro de Registro, no qual deverão ser feitas anotações relativas à todas as movimentações de óleo, lastro e misturas oleosas, inclusive as entregas efetuadas às instalações de recebimento e tratamento de resíduos. Este livro poderá ser requisitado pela autoridade marítima, pelo órgão ambiental competente e pelo órgão regulador da indústria de petróleo.

Cap. IV: Da Descarga de Óleo, Substâncias Nocivas ou Perigosas e Lixo

Art. 15, 16 e 17: Proíbem a descarga de substâncias nocivas ou perigosas em águas sob jurisdição nacional, incluindo água de lastro, resíduos de lavagem de tanques ou outras misturas que contenham tais substâncias exceto se atendidas algumas condições como os casos permitidos pela MARPOL 73/78, e se o navio se encontrar fora dos limites de áreas ecologicamente sensíveis;

Art. 21: no caso dessa descarga ter sido autorizada, o responsável continua sendo obrigado a reparar os danos causados ao meio ambiente e a indenizar as atividades econômicas e ao patrimônio público e privado pelos prejuízos gerados;

Art. 23: a entidade exploradora de porto organizado ou de instalação portuária, o proprietário ou operador da plataforma ou de navio e o concessionário ou empresa autorizada a exercer atividade pertinente à indústria de petróleo, responsáveis pela descarga de material poluente em águas nacionais "são obrigados a ressarcir os órgãos competentes pelas despesas por ele efetuadas para o controle ou minimização da poluição causada, independente de prévia autorização e de pagamento de multa.

Cap. V: Das Infrações e das Sanções

As infrações serão punidas como multa, multa diária, multa e retenção do navio até que a situação seja regularizada, multa e suspensão imediata das atividades da empresa transportadora em situação irregular.

- § 1º: Respondem pelas infrações: proprietário do navio, armador ou operador de navio, concessionário ou empresa autorizada a exercer atividades pertinentes à indústria do petróleo, o comandante ou tripulante do navio e pessoa física ou jurídica que represente o porto organizado, a instalação portuária, a plataforma e suas instalações de apoio, estaleiros, marinas clubes náuticos ou instalações similares;

§ 2º: O valor da multa será no mínimo de R$ 7.000,00 (sete mil reais) e o máximo de R$ 50.000.000,00 (cinqüenta milhões de reais);

§ 3º: "a aplicação das penas previstas neste artigo não isenta o agente de outras sanções administrativas e penais previstas na Lei 9.605/98 e em outras normas específicas que tratem da matéria, nem da responsabilidade civil pelas perdas e danos causados ao meio ambiente e ao patrimônio público e privado.

Cap. VI: Disposições Finais e Complementares

Art. 27: menciona quem são os responsáveis pelo cumprimento desta lei e quais as suas atribuições;

Art. 28: o órgão federal de meio ambiente, ouvida a autoridade marítima, definirá a localização e os limites das áreas ecologicamente sensíveis, que deverão constar das cartas náuticas nacionais;

Art. 32: os valores arrecadados com a aplicação das multas previstas nesta Lei serão destinados aos órgãos que as aplicarem no âmbito de suas competências.

Decreto Federal No 4.136 de 20/02/2002 Sanções às infrações previstas na Lei 9.966/00

Dispõe sobre a especificação das sanções aplicáveis às infrações às regras de prevenção, controle e fiscalização da poluição causada por lançamento do óleo e outras substâncias nocivas e perigosas em águas sob jurisdição nacional prevista na Lei 9.966/00. Considera infração como a inobservância a qualquer determinação constante desta lei federal. As sanções variam de advertência e multa simples à suspensão parcial, total das atividades e restritiva de direitos. Ilustra quem são as pessoas físicas ou jurídicas que

respondem pela infração, quem são as autoridades competentes para lavrar os autos de infração e dá outras providências a esse respeito.

Resolução CONAMA No 237 de 19/12/1997 Licenciamento Ambiental

Apresenta orientações aos órgãos ambientais pertencentes ao SISNAMA - Sistema Nacional de Meio Ambiente sobre os procedimentos relativos ao licenciamento de empreendimentos e atividades lesivas ao meio ambiente, considerando a Resolução CONAMA 011/94 e a Lei Federal 6.938/81. Estão inseridas neste contexto, entre outras, atividades de perfuração de poços e produção de petróleo e gás natural, fabricação e reparo de embarcações e estruturas flutuantes, produção de substâncias e fabricação de produtos químicos, fabricação de produtos derivados do processamento de petróleo, transporte de cargas perigosas, transporte por dutos, marinas e portos, terminais de petróleo e derivados e de produtos químicos, depósitos de produtos perigosos.

Resolução CONAMA No 269 de 14/09/00 Dispersantes Químicos

Apresenta orientações sobre procedimentos e critérios para utilização de produtos químicos dispersantes no combate aos derramamentos de óleo no mar. Tanto esta resolução como seu respectivo anexo devem ser consultados e obedecidos pois, o não cumprimento do disposto neste documento sujeitará os infratores às penalidades previstas na legislação vigente. Os dispersantes precisam ser homologados pelo IBAMA, de acordo com sua eficiência e baixa toxicidade, e sua aplicação está condicionada a uma série de quesitos ambientais.

Resolução CONAMA No 293 de 12/12/2001 Plano de Emergência Individual

Com base na Lei Federal 9.966/00, apresenta orientações sobre o conteúdo mínimo que um Plano de Emergência Individual para incidentes de

poluição por óleo originados em portos organizados, instalações portuárias ou terminais, dutos, plataformas bem como suas respectivas instalações de apoio devem ter. Estes Planos devem ser apresentados ao órgão ambiental competente.

Decreto Federal 4.871 de 06/11/2003 Planos de Áreas para combate à poluição por óleo

Dispõe sobre a instituição dos Planos de Áreas (PA) para o combate à poluição por óleo em águas sob jurisdição nacional. Seu propósito é integrar e consolidar os Planos de Emergência Individual (PEIs) (Resolução CONAMA 293/01) das instalações que manuseiam óleo, situadas em uma mesma área, onde haja concentração de portos organizados, instalações portuárias ou plataformas e suas respectivas instalações de apoio. Visam aperfeiçoar, facilitar e ampliar a capacidade de resposta aos incidentes de poluição por óleo, como também orientar as ações necessárias, quando a fonte for desconhecida (manchas órfãs). Sob coordenação do órgão ambiental competente, os responsáveis pelas instalações elaborarão os PAs, a partir dos PEIs, em articulação com instituições públicas e privadas. Os PAs, mencionados nos Artigos 7 e 8 da Lei Federal 9.966/2000, constituem mais um avanço no controle da poluição ambiental.

9 Referências Bibliográficas

Abu, G. O., Dike, P. O. A study of natural attenuation processes involved in a microcosm model of a crude oil-impacted wetland sediment in the Niger Delta. Bioresour Technol.2007

Alexander, M., Loehr, R. C. Bioremediation Review. Science **258**(5084): 874.1992

Azizian, M. F., Istok, J. D., Semprini, L. Evaluation of the in-situ aerobic cometabolism of chlorinated ethenes by toluene-utilizing microorganisms using push-pull tests. J Contam Hydrol **90**(1-2): 105-24.2007

Baheri, H., Meysami, P. Feasibility of fungi bioaugmentation in composting a flare pit soil. J Hazard Mater **89**(2-3): 279-86.2002

Boszczyk-Maleszak, H., Zabost, A., Wolicka, D., Kacieszczenko, J. Effectiveness of biodegradation of petroleum products by mixed bacterial populations in liquid medium at different pH values. Pol J Microbiol **55**(1): 69-73.2006

Carberry, J. B., Wik, J. Comparison of ex situ and in situ bioremediation of unsaturated soils contaminated by petroleum. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng **36**(8): 1491-503.2001

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 **227**(2-3): 237-47.1999

Chaineau, C.H., Rougeux, G., Yéprémian, C., Oudot, J. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil associated microbial populations in the soil. Soil Biology & Biochemistry **37** : 1490-1497, 2005.

Chamkha, M., Mnif, S., Sayadi, S. Isolation of a thermophilic and halophilic tyrosol-degrading Geobacillus from a Tunisian high-temperature oil field. FEMS Microbiol Lett **283**(1): 23-9.2008

Coulon, F., McKew, B. A., Osborn, A. M., McGenity, T. J., Timmis, K. N. Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. Environ Microbiol **9**(1): 177-86.2007

D'Annibale, A., Rosetto, F., Leonardi, V., Federici, F., Petruccioli, M. Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. Appl Environ Microbiol **72**(1): 28-36.2006

da Cunha, C. D., Rosado, A. S., Sebastian, G. V., Seldin, L., von der Weid, I. Oil biodegradation by Bacillus strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. Appl Microbiol Biotechnol **73**(4): 949-59.2006

Dalton, H., Stirling, D. I. Co-metabolism. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **297**(1088): 481-96.1982

Dean-Ross, D. Biodegradation of selected PAH from sediment in bioslurry reactors. Bull Environ Contam Toxicol **74**(1): 32-9.2005

Delille, D., Coulon, F. Comparative Mesocosm Study of Biostimulation Efficiency in Two Different Oil-Amended Sub-Antarctic Soils. Microb Ecol.2007

Dou, J., Liu, X., Hu, Z., Deng, D. Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction. J Hazard Mater **151**(2-3): 720-9.2008

Evans, F. F., Seldin, L., Sebastian, G. V., Kjelleberg, S., Holmstrom, C., Rosado, A. S. Influence of petroleum contamination and biostimulation treatment on the diversity of Pseudomonas spp. in soil microcosms as evaluated by 16S rRNA based-PCR and DGGE. Lett Appl Microbiol **38**(2): 93-8.2004

Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., Larroche, C. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. Bioresour Technol.2007

Fiuza, A. M., Vila, M. C. An insight into soil bioremediation through respirometry. Environ Int **31**(2): 179-83.2005

Frassani, R., Gelsomino, S. A right atrial approach in redo postinfarction ventricular septal defect. Cardiovasc Surg **7**(6): 656-8.1999

Gilbert, E. S., Crowley, D. E. Repeated application of carvone-induced bacteria to enhance biodegradation of polychlorinated biphenyls in soil. Appl Microbiol Biotechnol **50**(4): 489-94.1998

Halmemies, S., Grondahl, S., Arffman, M., Nenonen, K., Tuhkanen, T. Vacuum extraction based response equipment for recovery of fresh fuel spills from soil. J Hazard Mater **97**(1-3): 127-43.2003

Hu, Z. F., Dou, J. F., Liu, X., Zheng, X. L., Deng, D. Anaerobic biodegradation of benzene series compounds by mixed cultures based on optional electronic acceptors. J Environ Sci (China) **19**(9): 1049-54.2007

Hutchinson, S. L., Banks, M. K., Schwab, A. P. Phytoremediation of aged petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. J Environ Qual **30**(2): 395-403.2001

Iwamoto, T., Nasu, M. Current bioremediation practice and perspective. J Biosci Bioeng **92**(1): 1-8.2001

Iwamoto, T., Tani, K., Nakamura, K., Suzuki, Y., Kitagawa, M., Eguchi, M., Nasu, M. Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. FEMS Microbiol Ecol **32**(2): 129-141.2000

Jacques, R. J., Okeke, B. C., Bento, F. M., Teixeira, A. S., Peralba, M. C., Camargo, F. A. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. Bioresour Technol **99**(7): 2637-43.2008

Jimenez, N., Vinas, M., Bayona, J. M., Albaiges, J., Solanas, A. M. The Prestige oil spill: bacterial community dynamics during a field biostimulation assay. Appl Microbiol Biotechnol **77**(4): 935-45.2007

Jitnuyanont, P., Sayavedra-Soto, L. A., Semprini, L. Bioaugmentation of butane-utilizing microorganisms to promote cometabolism of 1,1,1-trichloroethane in groundwater microcosms. Biodegradation **12**(1): 11-22.2001

Jorgensen, K. S., Puustinen, J., Suortti, A. M. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. Environ Pollut **107**(2): 245-54.2000

Kasai, Y., Kodama, Y., Takahata, Y., Hoaki, T., Watanabe, K. Degradative capacities and bioaugmentation potential of an anaerobic benzene-degrading bacterium strain DN11. Environ Sci Technol **41**(17): 6222-7.2007

Keller, J., Banks, M. K., Schwab, A. P. Effect of soil depth on phytoremediation efficiency for petroleum contaminants. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng **43**(1): 1-9.2008

Khan, F. I., Husain, T., Hejazi, R. An overview and analysis of site remediation technologies. J Environ Manage **71**(2): 95-122.2004

Lee, T. H., Byun, I. G., Kim, Y. O., Hwang, I. S., Park, T. J. Monitoring biodegradation of diesel fuel in bioventing processes using in situ respiration rate. Water Sci Technol **53**(4-5): 263-72.2006

Lewis, R. R. I. (1983). Impact of oil spills on mangrove forests. Tasks for Vegetation Science Vol. 8 (Biology and Ecology of Mangroves). Teas, H. J. The Hague, Dr. W.Junk Publishers. **8:** 171-183.

Liang, R., Liu, M. Preparation and properties of a double-coated slow-release and water-retention urea fertilizer. J Agric Food Chem **54**(4): 1392-8.2006

MacNaughton, S. J., Stephen, J. R., Venosa, A. D., Davis, G. A., Chang, Y. J., White, D. C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Appl Environ Microbiol **65**(8): 3566-74.1999

Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. Chemosphere **40**(4): 339-46.2000

Mohn, W. W., Radziminski, C. Z., Fortin, M. C., Reimer, K. J. On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles. Appl Microbiol Biotechnol **57**(1-2): 242-7.2001

Molina-Barahona, L., Vega-Loyo, L., Guerrero, M., Ramirez, S., Romero, I., Vega-Jarquin, C., Albores, A. Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after a bioremediation process. Environ Toxicol **20**(1): 100-9.2005

Muyzer, G., Smalla, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Van Leeuwenhoek **73**(1): 127-41.1998

Myers, R. M., Fischer, S. G., Lerman, L. S., Maniatis, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. Nucleic Acids Res **13**(9): 3131-45.1985

Myers, R. M., Fischer, S. G., Maniatis, T., Lerman, L. S. Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis. Nucleic Acids Res **13**(9): 3111-29.1985

Neff, J. M., Bence, A. E., Parker, K. R., Page, D. S., Brown, J. S., Boehm, P. D. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons from buried shoreline oil residues thirteen years after the Exxon Valdez oil spill: a multispecies assessment. Environ Toxicol Chem **25**(4): 947-61.2006

Nubel, U., Garcia-Pichel, F., Kuhl, M., Muyzer, G. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. Appl Environ Microbiol **65**(2): 422-30.1999

Olsen, G. J., Woese, C. R., Overbeek, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. J Bacteriol **176**(1): 1-6.1994

Onwurah, I. N. Modelling cometabolism of petroleum hydrocarbon pollutants in soil by Azotobacter vinelandii in the obligate presence of Pseudomonas sp. Bull Environ Contam Toxicol **73**(4): 690-7.2004

Ortiz, I., Auria, R., Sigoillot, J. C., Revah, S. Enhancing phenanthrene biomineralization in a polluted soil using gaseous toluene as a cosubstrate. Environ Sci Technol **37**(4): 805-10.2003

Ortiz, I., Velasco, A., Revah, S. Effect of toluene as gaseous cosubstrate in bioremediation of hydrocarbon-polluted soil. J Hazard Mater **131**(1-3): 112-7.2006

Osterreicher-Cunha, P., Vargas Edo, A., Jr., Guimaraes, J. R., de Campos, T. M., Nunes, C. M., Costa, A., Antunes Fdos, S., da Silva, M. I., Mano, D. M. Evaluation of bioventing on a gasoline-ethanol contaminated undisturbed residual soil. J Hazard Mater **110**(1-3): 63-76.2004

Page, D. S., Boehm, P. D., Stubblefield, W. A., Parker, K. R., Gilfillan, E. S., Neff, J. M., Maki, A. W. Hydrocarbon composition and toxicity of sediments following the Exxon Valdez oil spill in Prince William Sound, Alaska, USA. Environ Toxicol Chem **21**(7): 1438-50.2002

Peixoto, R. S., da Costa Coutinho, H. L., Rumjanek, N. G., Macrae, A., Rosado, A. S. Use of rpoB and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. Lett Appl Microbiol **35**(4): 316-20.2002

Rice, S. D., Carls, M. G., Heintz, R. A., Short, J. W. Comment on "Hydrocarbon composition and toxicity of sediments following the Exxon Valdez oil spill in Prince William Sound, Alaska, USA". Environ Toxicol Chem **22**(11): 2539-40; author reply 2540-2.2003

Robles-Gonzalez, I. V., Fava, F., Poggi-Varaldo, H. M. A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. Microb Cell Fact **7**(1): 5.2008

Roh, C., Villatte, F., Kim, B. G., Schmid, R. D. Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludge samples. Appl Biochem Biotechnol **134**(2): 97-112.2006

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**(4839): 487-91.1988

Satoh, C., Takahashi, N. [Denaturing gradient gel electrophoresis of DNA fragments attached with a GC-clamp]. Tanpakushitsu Kakusan Koso **41**(5): 556-60.1996

Schneegurt, M. A., Dore, S. Y., Kulpa, C. F., Jr. Direct extraction of DNA from soils for studies in microbial ecology. Curr Issues Mol Biol **5**(1): 1-8.2003

Shin, K. H., Kim, K. W. A biosurfactant-enhanced soil flushing for the removal of phenanthrene and diesel in sand. Environ Geochem Health **26**(1): 5-11.2004

Sun, W. H., Lo, J. B., Robert, F. M., Ray, C., Tang, C. S. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons in tropical coastal soils. I. Selection of promising woody plants. Environ Sci Pollut Res Int **11**(4): 260-6.2004

Tsai, Y. L., Olson, B. H. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. Appl Environ Microbiol **57**(4): 1070-4.1991

von der Weid, I., Marques, J. M., Cunha, C. D., Lippi, R. K., Dos Santos, S. C., Rosado, A. S., Lins, U., Seldin, L. Identification and biodegradation potential of a novel strain of Dietzia cinnamea isolated from a petroleum-contaminated tropical soil. Syst Appl Microbiol **30**(4): 331-9.2007

Wagner, I. D., Wiegel, J. Diversity of thermophilic anaerobes. Ann N Y Acad Sci **1125**: 1-43.2008

Watanabe, K., Kodama, Y., Harayama, S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. J Microbiol Methods **44**(3): 253-62.2001

Wilson, S. C., Jones, K. C. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. Environ Pollut **81**(3): 229-49.1993

Wu, L., Liu, M., Rui, L. Preparation and properties of a double-coated slow-release NPK compound fertilizer with superabsorbent and water-retention. Bioresour Technol **99**(3): 547-54.2008

Xia, H., Wu, L., Tao, Q. [A review on phytoremediation of organic contaminants]. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao **14**(3): 457-60.2003

Xu, R., Obbard, J. P., Tay, E.C.T. Optimization of a slow release fertilizer dosage for bioremediation of oil-contaminated beach sediment in a tropical environment. World Journal o Microbiology & Biotechnology **19:** 719-725, 2003.

Xu, R., Lau, A. N., Lim, Y. G., Obbard, J. P. Bioremediation of oil-contaminated sediments on an inter-tidal shoreline using a slow-release fertilizer and chitosan. Mar Pollut Bull **51**(8-12): 1062-70.2005

Xu, R., Lau, N. L., Ng, K. L., Obbard, J. P. Application of a slow-release fertilizer for oil bioremediation in beach sediment. J Environ Qual **33**(4): 1210-6.2004

Xu, R., Yong, L. C., Lim, Y. G., Obbard, J. P. Use of slow-release fertilizer and biopolymers for stimulating hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments. Mar Pollut Bull **51**(8-12): 1101-10.2005

Yeates, C., Gillings, M. R., Davison, A. D., Altavilla, N., Veal, D. A. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. Biol Proced Online **1**: 40-47.1998

Yu, K. S., Wong, A. H., Yau, K. W., Wong, Y. S., Tam, N. F. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic

aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. Mar Pollut Bull **51**(8-12): 1071-7.2005

Zhan, L. L., Chen, J. M., Fang, F. Biodegradation of methyl t-butyl ether by aerobic granules under a cosubstrate condition. Appl Microbiol Biotechnol **78**(3): 543-50.2008

Zhang, Y., Li, D., Wang, H., Xiao, Q. [Extraction method of soil microbial DNA for molecular ecology study]. Ying Yong Sheng Tai Xue Bao **16**(5): 956-60.2005