

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Tecnologia e Geociências
Escola de Engenharia
Departamento de Oceanografia
Programa de Pós-Graduação em Oceanografia



Biorremediação da toxicidade de sedimento
lamoso contaminado por petróleo e derivados
sobre o copépodo harpacticóide *Tisbe biminiensis*

Anny Gabrielle Araújo Graf Torreiro Melo

RECIFE
2010

Anny Gabrielle Araújo Graf Torreiro Melo

**Biorremediação da toxicidade de sedimento lamoso
contaminado por petróleo e derivados sobre o
copépodo harpacticóide *Tisbe biminiensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco (PPGO-UFPE), como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Oceanografia, Área de concentração: Oceanografia Biológica.

Orientadora: **Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos**

Co-Orientadora: **Profa. Dra. Cristiane M^a. V. Araújo Castro**

RECIFE
2009

M528t

Melo, Anny Gabrielle Araújo Graf Torreiro.

Biorremediação da Toxicidade de sedimento lamoso contaminado por petróleo e derivados sobre o copépodo harpacticóide *Tisbe biminiensis* / Anny Gabrielle Araújo Graf Torreiro Melo. – Recife: O Autor, 2010.

xii, 54 f.; il., gráfs., tabs.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, 2010.

Inclui Referências Bibliográficas.

1. Oceanografia. 2. *Pseudomonas*. 3. NPK. 4. OSMOCOTE. I. Título.

UFPE

551.46 CDD (22. ed.)

BCTG/2010-195

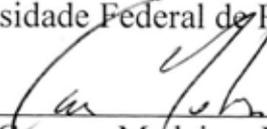
Biorremediação da toxicidade de sedimento lamoso contaminado por petróleo e derivados sobre o copépodo harpacticóide *Tisbe biminiensis*

Anny Gabrielle Araújo Graf Torreiro Melo

Folha de Aprovação – Banca Examinadora



Profª. Dra. Lília Pereira de Souza Santos (Orientadora) – Presidente
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

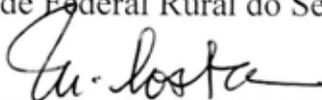


Profª. Dra. Carmen Medeiros Limongi – Titular Interno
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

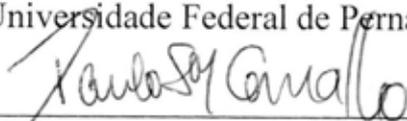


Profª. Dra. Eliete Zanardi Lamardo – Titular
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Profª. Dra. Alessandra Carla Oliveira Chagas Spinelli – Titular Externo
(Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFRSA)



Profª. Dra. Monica Ferreira da Costa – Suplente Interno
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)



Prof. Dr. Paulo Sérgio Martins de Carvalho – Suplente Externo
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

"A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio."

Martin Luther King

Dedico esta dissertação aos meus heróis, meu filho, João Gabriel e meu marido, Pedro, que me presenteiam todos os dias com o brilho de seus olhos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Lília P. de Souza-Santos, pela orientação, amizade e conselhos profissionais e pessoais nestes 4 anos de convívio e ensinamentos.

À minha co-orientadora Dra. Cristiane (Kika), a famosa Araújo-Castro, a quem devo minha paixão pela ecotoxicologia. Obrigada por me fazer sua “filha adotiva”, pela amizade, paciência e humildade nos ensinamentos.

À FINEP e PETROBRÁS pelo financiamento do projeto Processos de Biorremediação (RECUPETRO IV) da Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas- RECUPETRO e sub-rede Resíduos Líquidos do Nordeste – RELINE , na qual se insere este estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia da UFPE e a todos que fazem parte do DOCEAN, em especial a Myrna, por ser sempre tão prestativa e atenciosa.

À Capes, pela concessão da bolsa de mestrado e ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica que possibilitou que eu tivesse a ajuda de Bruno neste trabalho.

À Bruno, por ser meu braço direito neste trabalho e parte essencial nesta conquista. Agradeço também pelas palavras de apoio e incentivo constantes.

À Dra. Alessandra Carla Chagas Spinelli, idealizadora do projeto Universal em Suape, pelas horas compartilhadas de cansaço após as coletas, pela confiança e apoio, mesmo à distância.

À Msc. Débora Bayer, por ter superado as dificuldades ao longo do projeto me dando força em todos os momentos.

Aos professores Dr. Mario Kato e Dra. Sávia Gavazza, assim como todos do LSA que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À Dra. Karina Garcia, do Laboratório do Núcleo de Estudos Ambientais - LEPETRO/NEA/UFBA, pela amizade, paciência e por toda colaboração no presente trabalho. À Msc. Danúsia Lima, também da UFBA, por disponibilizar os resultados de alcanos utilizados em sua dissertação.

Ao professor Dr. Paulo Carvalho, pela amizade e por ser sempre tão solícito em tirar minhas dúvidas.

Às Empresas Aqualider e Netuno por ceder água do mar tratada, para manutenção dos cultivos.

À minha mãe Rosângela, meu padrasto Douglas e meu irmão Danilo, pelo amor e compreensão em todos os fins de semana nos quais estive ausente. Agradeço à todos que compreenderam os motivos da minha ausência: meus sogros D. Diva, S. Fred, meus

cunhados e cunhada assim como todos queridos da casa de tia Vera. Também às minhas tias e primos de Aracaju por 2 anos sem que eu pudesse visitá-los.

Ao meu filho, João Gabriel, bênção em minha vida, pelo amor e incrível compreensão.

Ao meu marido, meu parceiro, Pedro Melo, pelo imenso companheirismo e cumplicidade que deixa os problemas pequenos. Pelo apoio incessante neste trabalho, “pitacando”, formatando e revisando, mesmo quando o cansaço parecia nos vencer.

Aos amigos do LACE, Kika, Lela, Bia, Lílian Cristine, Deloar, Crisis, Ari, Nana e bendito entre as mulheres Bruno, pela amizade, momentos de trabalho e descontração, pelas sugestões e ajuda mútua.

Aos amigos Sabrina Ribeiro, Fernanda Possatto, Carol Costa, Scheylinh Tinoco, Thi Reis, Camillinha, Adilma Cocentino, Patrícia Façanha, Keyla Travassos, Débora Lucatelli, Catarina Araújo, Marina Leitão, Priscila Cordeiro e todos que passaram ou estão no meu caminho me ajudando a ser uma pessoa melhor.

Aos amigos do LABZOO, Valdylene Pessoa, Xiomara Garcia, Mauro Melo, Gabi com “i”, e especialmente às professoras Dras. Lúcia Gusmão, Tâmara Almeida e Sigrid Neumann, pelo carinho e momentos de descontração.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. HIPÓTESE	5
3. OBJETIVOS	6
3.1. <i>Geral</i>	6
3.2. <i>Objetivos Específicos</i>	6
4. METODOLOGIA.....	6
4.1. <i>Áreas de estudo</i>	6
4.1.1. <i>Estuário do rio São Paulo</i>	6
4.1.2. <i>Baía de Suape</i>	8
4.2. <i>Amostragem de sedimento</i>	9
4.3. <i>Montagem dos experimentos</i>	11
4.4. <i>Simulações de Biorremediação</i>	12
4.4.1. <i>Simulação utilizando fertilizantes (Bioestímulo)</i>	12
4.4.2. <i>Simulação utilizando biossurfactante</i>	13
4.5. <i>Cultivo dos copépodos</i>	15
4.6. <i>Cultivo de microalgas</i>	16
4.7. <i>Bioensaios</i>	16
4.8. <i>Análises geoquímicas</i>	17
4.8.1. <i>Sedimentos tratados com fertilizantes</i>	17
4.8.2. <i>Sedimentos tratados com biossurfactante</i>	17
4.9. <i>Análise Estatística</i>	18
5. RESULTADOS.....	18
5.1. <i>Testes com dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇)</i>	18
5.2. <i>Estuário do rio São Paulo</i>	19
5.2.1. <i>Caracterização da toxicidade inicial do sedimento</i>	19
5.2.2. <i>Toxicidade observada no processo de biorremediação utilizando fertilizantes (Bioestímulo)</i>	19
5.2.2.1. <i>Sobrevivência</i>	19
5.2.2.2. <i>Fecundidade</i>	20
5.2.2.3. <i>Percentual de copepoditos</i>	22

5.2.2.4.	<i>Avaliação de inorgânicos e carbono orgânico total (COT) no sedimento ..</i>	23
5.2.2.5.	<i>Análises de correlação</i>	25
5.3.	<i>Baía de Suape</i>	26
5.3.1.1.	<i>Toxicidade observada no processo de biorremediação utilizando Biosurfactante</i>	26
5.3.1.2.	<i>Sobrevivência</i>	26
5.3.1.3.	<i>Fecundidade</i>	28
5.3.1.4.	<i>Percentual de Copepoditos</i>	30
5.3.1.5.	<i>Análises de correlação com HPAs no sedimento</i>	32
6.	DISCUSSÃO	34
6.1.	<i>Estuário do rio São Paulo</i>	34
6.1.1.	<i>Caracterização da toxicidade do sedimento inicial</i>	34
6.1.2.	<i>Toxicidade observada no processo de biorremediação utilizando fertilizantes (Bioestímulo)</i>	35
6.1.3.	<i>Toxicidade observada nos sedimentos contaminados e no processo de biorremediação utilizando Biosurfactante</i>	39
7.	CONCLUSÕES	43
8.	REFERÊNCIAS	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Área de amostragem de sedimento, próximo à Estação de Produção Pedra Branca (Petrobras), no estuário do rio São Paulo, Baía de Todos os Santos – BA, Brasil (modificado de Araújo-Castro, 2008).....	8
Figura 2 – Área (demarcada com retângulo) da amostragem do sedimento na baía de Suape – PE, Brasil.	9
Figura 3 - Galpão de simulação de biorremediação do Laboratório de Geoquímica da Universidade Federal da Bahia. Fonte: Laboratório de Geoquímica da Universidade Federal da Bahia.	10
Figura 4 - Diferentes ângulos das provetas de vidro, revestidas com saco de algodão, utilizadas no sistema de simulação de biorremediação instalado no Galpão do Laboratório de Geoquímica da Universidade Federal da Bahia. Fonte: Laboratório de Geoquímica da Universidade Federal da Bahia.	11
Figura 5 - Desenho esquemático dos aquários utilizados nos tratamentos de biorremediação de sedimento em laboratório.....	12
Figura 6 - Médias (\pm desvio padrão) da sobrevivência, fecundidade total (náuplios + copepoditos) e percentual de copepoditos de <i>Tisbe biminiensis</i> no momento da caracterização da toxicidade inicial do sedimento homogeneizado do estuário do rio São Paulo. O símbolo * acima das barras indica diferenças significativas em relação ao Controle coletado em Maracaípe (ANOVA: Dunnet; $p < 0,05$).	19
Figura 7 - Médias (\pm desvio padrão) da sobrevivência, fecundidade total (náuplios + copepoditos) e percentual de copepoditos da espécie <i>Tisbe biminiensis</i> quando exposto aos tratamentos de biorremediação (estuário do rio São Paulo) e Controle ao longo do tempo. O símbolo * acima das barras indica diferenças significativas em relação ao Controle em cada tempo experimental (ANOVA: Dunnet ; Kruskal Wallis :Dunn; $p < 0,05$).....	21
Figura 8 - Sobrevivência média (\pm desvio padrão) da espécie <i>Tisbe biminiensis</i> quando exposta aos tratamentos de biorremediação nas três profundidades analisadas (baía de Suape) (onde: a) superfície, b) meio e c) fundo) e Controle ao longo do tempo. O símbolo * acima das barras indica diferenças significativas em relação ao Controle em cada tempo experimental (ANOVA: Dunnet ; Kruskal Wallis :Dunn; $p < 0,05$).	27
Figura 9 - Médias (\pm desvio padrão) da fecundidade total (náuplios + copepoditos) da espécie <i>Tisbe biminiensis</i> quando exposta aos tratamentos de biorremediação nas três profundidades analisadas (baía de Suape) (onde: a) superfície, b) meio e c) fundo) e Controle. O símbolo * acima das barras indica diferenças significativas em relação ao Controle em cada tempo experimental (ANOVA: Dunnet ; Kruskal Wallis :Dunn; $p < 0,05$).....	29
Figura 10 - Médias (\pm desvio padrão) do percentual de copepoditos (número de copepoditos/total de descendentes*100) da espécie <i>Tisbe biminiensis</i> quando exposta aos tratamentos de biorremediação nas três profundidades analisadas (baía de Suape) (onde: a) superfície, b) meio e c) fundo) e Controle. O símbolo * acima das barras indica diferenças significativas em relação ao Controle em cada tempo experimental (ANOVA: Dunnet; Kruskal Wallis: Dunn; $p < 0,05$).....	31

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Diferenças entre os tratamentos de biorremediação (estuário do rio São Paulo) e Controle em relação à sobrevivência, fecundidade e percentual de copepoditos ao longo do tempo. No caso de variâncias desiguais, foi realizada transformação dos dados para $\log_{10}^{(*)}$. Persistindo a desigualdade, foi utilizado Kruskal-Wallis. Testes *a posteriori*: Dunnet (ANOVA) e Dunn (Kruskal-Wallis), ambos $p < 0,05$; onde: ^aControle \neq Atenuação natural; ^bControle \neq NPK; ^cControle \neq OSMOCOTE; ^dAtenuação natural \neq OSMOCOTE; ^xDiferença não detectada. Valores em negrito representam diferenças significativas. 22
- Tabela 2 - Concentrações de amônia, fósforo, carbono orgânico total (COT), percentual de nitrogênio total e nitrato nos sedimentos do estuário do rio São Paulo no sedimento inicial homogeneizado e nos três tratamentos ao longo do período de biorremediação. Fonte: RECUPETRO, 2009. 25
- Tabela 3 - Resultados da análise de correlação de Pearson (r) dos parâmetros de toxicidade (sobrevivência, fecundidade e percentual de copepoditos) com os compostos inorgânicos (Amônia, Fósforo, Nitrogênio Total e Nitrato) e carbono orgânico total (COT) nos sedimentos do estuário do rio São Paulo ao longo do tempo. Valores em negrito representam correlações significativas, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ 26
- Tabela 4 - Diferenças em relação à sobrevivência entre os tratamentos de biorremediação nas três profundidades analisadas (baía de Suape) e Controle ao longo do tempo. No caso de variâncias desiguais, foi realizada transformação dos dados para $\log_{10}^{(*)}$. Persistindo a desigualdade, foi utilizado Kruskal-Wallis. Testes *a posteriori*: Dunnet (ANOVA) e Dunn (Kruskal-Wallis), ambos $p < 0,05$; onde: ^xDiferença não detectada. Valores em negrito representam diferenças significativas. 28
- Tabela 5 - Diferenças (ANOVA) em relação à fecundidade total entre os tratamentos de biorremediação nas três profundidades analisadas (baía de Suape) e Controle ao longo do tempo. No caso de variâncias desiguais, foi realizada transformação dos dados para $\log_{10}^{(*)}$. Teste *a posteriori*: Dunnet, $p < 0,05$; onde: ^aControle \neq Atenuação natural; ^bControle \neq Biossurfactante; ^xDiferença não detectada. Valores em negrito representam diferenças significativas. 30
- Tabela 6 - Diferenças em relação ao percentual de copepoditos entre os tratamentos de biorremediação nas três profundidades analisadas (baía de Suape) e Controle ao longo do tempo. No caso de variâncias desiguais, foi realizada transformação dos dados para $\log_{10}^{(*)}$. Persistindo a desigualdade, foi utilizado Kruskal-Wallis. Testes *a posteriori*: Dunnet (ANOVA) e Dunn (Kruskal-Wallis), ambos $p < 0,05$; onde: ^aControle \neq Atenuação natural; ^bControle \neq Bioestímulo; ^cControle \neq Branco; ^dBioestímulo \neq Branco; ^xDiferença não detectada. Valores de em negrito representam diferenças significativas. 32
- Tabela 7 - Resultados da análise de correlação de Pearson (r) entre os parâmetros de toxicidade (sobrevivência, fecundidade e percentual de copepoditos) e os HPAs nos sedimentos da baía de Suape ao longo do tempo. Valores de em negrito representam correlações significativas, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ 33

RESUMO

A eficiência de tratamentos de biorremediação utilizando fertilizantes e um biossurfactante na redução da toxicidade de sedimento contaminado por petróleo e um derivado, ao longo do tempo, foi avaliada no presente trabalho por meio de bioensaios com o copépodo *Tisbe biminiensis*. O sedimento utilizado foi coletado no estuário do rio São Paulo-BA, área com histórico de contaminação por derivados de petróleo e na baía de Suape-PE. Em laboratório, os sedimentos foram acondicionados em provetas de vidro acomodadas em aquários. Para cada tratamento foram utilizados 3 aquários sujeitos à renovação de 1/3 da água a cada 12 horas. O sedimento do estuário do rio São Paulo foi homogeneizado e recebeu os fertilizantes NPK e OMOCOTE, aplicados em 3 vezes de 1,5 g em cada proveta. O sedimento de Suape foi contaminado com óleo diesel (40 g. kg⁻¹) e recebeu biossurfactante ramnolípido (0,04 g. kg⁻¹), produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. Os sedimentos contaminados por petróleo e derivado sujeitos à biorremediação foram comparados ao sedimento controle, proveniente de uma área sem contaminação. As coletas das provetas de sedimento para a avaliação ecotoxicológica foram realizadas 6 vezes durante os 90 dias do experimento com fertilizantes e 5 vezes durante os 111 dias do experimento com biossurfactante. Durante os bioensaios, cinco réplicas contendo sedimento controle, coletada em uma área livre de contaminação, foram utilizadas para comparar o efeito tóxico. Os testes de toxicidade tiveram duração de 7 dias. Para cada réplica de sedimento foram utilizadas 10 fêmeas ovígeras, colocadas em recipientes-teste contendo 2g do sedimento em estudo e 20 ml de suspensão de diatomácea a uma concentração de 0,2µg Clorofila a. mL⁻¹. A adição de alimento era realizada a cada dois dias. Ao término de cada experimento as fêmeas eram coradas com Rosa de Bengala e fixadas em formol para contagem e análise dos efeitos letais e sub-letais (sobre a prole). O sedimento coletado no estuário do Rio São Paulo, testado inicialmente após homogeneização não apresentou toxicidade letal às fêmeas de *Tisbe biminiensis*, porém reduziu significativamente a fecundidade total dos organismos expostos. A introdução do fertilizante NPK interferiu na sobrevivência das fêmeas nas coletas realizadas com 1 e 8 dias após o início do experimento, contudo este sinal de letalidade desaparece no decorrer do período de biorremediação com os fertilizantes. A fecundidade dos organismos aumenta gradativamente tanto nos tratamentos em que houve adição de fertilizantes quanto no tratamento sujeito apenas à atenuação natural, não havendo diferenças significativas entre tais tratamentos. O tratamento com biossurfactante apresentou efeito tóxico sub-letal na fecundidade do copépodo na primeira avaliação após a adição deste composto, aos 21 dias de experimento, possivelmente pela disponibilização do óleo, pela presença de metabólitos gerados após a degradação ou ainda pela toxicidade do biossurfactante. Este tratamento não demonstrou superioridade quanto à eficiência em relação ao sedimento sujeito apenas à atenuação natural. Desta forma, a adição de fertilizantes, bem como o uso de biossurfactante, nas concentrações utilizadas, não acelerou a redução da toxicidade dos sedimentos contaminados do estuário do rio São Paulo e da baía de Suape, respectivamente. Nestas circunstâncias, a atenuação natural dos hidrocarbonetos liberados por derivados do petróleo no sedimento resultará em uma degradação sem maiores prejuízos à biota.

Palavras Chave: *Pseudomonas*, NPK, OSMOCOTE.

ABSTRACT

The efficiency of toxicity reduction in petroleum-contaminated sediments by bioremediation treatments using fertilizers and a biosurfactant was evaluated utilizing the copepod *Tisbe biminiensis* bioassays. The sediments used were collected in the estuary of São Paulo river (Bahia), an area with a history of contamination oil derivatives, and on Suape Bay (Pernambuco). In laboratory, sediments were placed in glass test tubes on aquarium, subjected to renewal of 1/3 of the water volume every 12 hours. The sediment of São Paulo river estuary was homogenized and received NPK and OSMOCOTE fertilizers, applied three times on each test tubes (1.5 g). The sediment of Suape was contaminated by diesel oil (40 g. kg⁻¹) and received the rhamnolipid biosurfactant (0.04 g. kg⁻¹), produced by the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. Three replicates aquariums were used for each treatment and also for controls without additives to accelerate the process of bioremediation (natural attenuation). The sediment test tubes were sampled for toxicology assessment 6 times during the 90 days in fertilizers experiment and 5 times during 111 days in biosurfactant experiment. During the bioassay with copepods five replicates of control sediment represented by an estuarine sediment of uncontaminated area were made to determine toxic effect. The toxicity bioassays lasted 7 days. For each sediment replicate were added ten ovigerous female in test containers prepared with 2g of sediment and 20 mL of diatom suspension (0.2 µg Chl-a mL⁻¹). The food addition was carried out every two days. At the end of experiments, the copepod females were stained with Rose Bengal and fixed in formaldehyde for counting and analysis of the lethal and sub-lethal effects. The São Paulo's estuarine sediments were tested initially after homogenization and did not present lethal effect on *T. biminiensis*, however decreased significantly the total fecundity of exposed organisms. The introduction of NPK fertilizer affected the females' survival in samples taken out at 1 and 8 days after beginning of the experiment, however this sign of lethality disappears throughout fertilizer bioremediation period. The fecundity of the organisms increased gradually both in treatments where there was addition fertilizer as in treatment subject to natural attenuation, no significant differences between such treatments. The biosurfactant treatment showed sub-lethal effects on fecundity in the first evaluation after the addition of this compound, at 21 experiment days, probably due to the availability of oil, because the presence of metabolites generated after degradation, or by the toxicity of biosurfactant. It was not observed after 111 days more efficiency of this treatment in relation to sediment subject only to natural attenuation. Thus, the addition of fertilizers or biosurfactant do not accelerated the reduction of the toxicity of sediments contaminated of the estuary of São Paulo estuary and Suape bay, respectively. In these circumstances, the natural attenuation of hydrocarbons released by petroleum in the sediment will result in degradation without major damage to biota.

Key words: *Pseudomonas*, NPK, OSMOCOTE.

1. INTRODUÇÃO

Na última década, o volume de óleo movimentado no Brasil cresceu significativamente. Em 2008, o país conseguiu produzir e exportar 132 milhões de barris de petróleo, cerca de 20 vezes o que foi exportado em 2000 (ANP, 2009a).

Atualmente, existem 14 refinarias instaladas no país utilizando óleo predominantemente oriundo dos campos de produção nacionais (ANP, 2009b). Além das refinarias, o setor conta ainda com um sistema de dutos de aproximadamente 25.000 km de extensão para transportar os derivados de petróleo pelos centros consumidores do país (PETROBRAS, 2008).

Grande parte dessa estrutura necessária à cadeia produtiva do petróleo e derivados, no Brasil, está localizada próxima aos ecossistemas costeiros. Com isso, embora seja crescente o nível de responsabilidade ambiental envolvido neste setor, a extensa costa brasileira (7.400 km) apresenta-se vulnerável aos acidentes envolvendo derramamento de petróleo de diferentes magnitudes (DA SILVA *et al.*, 1997; BURNS *et al.*, 2000).

Segundo Gundlach & Hayes (1978), os ambientes costeiros (manguezais, costões rochosos, recifes de coral, etc.) diferem significativamente quanto à sua sensibilidade a derrames de óleo, considerando tanto o tempo de residência do óleo quanto os impactos sobre a biota. Segundo estes autores, os manguezais por apresentarem baixo hidrodinamismo, são considerados os ecossistemas mais sensíveis a derrames acidentais de petroderivados, pois apresentam maior tempo de residência, quando comparados aos ambientes mais expostos à ação das ondas.

Uma vez na água, parte dos contaminantes orgânicos como hidrocarbonetos, tendem a depositar-se no sedimento, sendo o caráter hidrofóbico destes contaminantes um fator adicional para a persistência neste compartimento (BURNS *et al.*, 1994; LEVINGS *et al.*, 1994). Nos manguezais, estes compostos são acumulados e preservados no ambiente sedimentar devido às características peculiares deste ecossistema, como elevado conteúdo de carbono orgânico, diretamente relacionado à sorção (aderência) de contaminantes hidrofóbicos (BURNS *et al.*, 1994; SOUSA, 2002).

A contaminação do sedimento representa um potencial poluidor elevado e contínuo (CHAPMAN, 2007). Assim, os efeitos deletérios causados por este sedimento

são manifestados mesmo quando os níveis de poluentes na coluna d'água estão dentro dos níveis estabelecidos por critérios de qualidade da água ou ainda quando as fontes poluentes são cessadas (LARSSON, 1985; BURGESS & MCKINNEY, 1997).

Os hidrocarbonetos ligados ao sedimento são recalcitrantes e apresentam alta complexidade e toxicidade (THOMAS *et al.*; 1999; CARMAN *et al.*, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2000; HARWELL *et al.*, 2006;). Ao entrar em contato com os organismos, podem levar à letalidade ou manifestar efeitos crônicos (LOTUFO, 1998a; LOTUFO, 1998b; LANDRUM *et al.*, 2003; PALETTO *et al.*, 2008), ou disfunções metabólicas (desreguladores endócrinos), as quais interferem no desenvolvimento e reprodução dos indivíduos afetados (BEJARANO *et al.*, 2006). Os efeitos tóxicos podem atingir desde indivíduo até populações inteiras em diversos níveis da teia trófica, sendo a fauna bentônica um dos grupos mais afetados devido à relação de dependência com a matriz sedimentar (MENDOZA, 1998; CARMAN *et al.*, 2000; SOUSA, 2002; LANDRUM *et al.*, 2003;)

Diante das implicações relacionadas à poluição causada por petroderivados, diversos mecanismos direcionados ao tratamento de ecossistemas costeiros têm sido desenvolvidos. Estes devem visar à redução das concentrações e dos efeitos tóxicos sobre o ambiente sem que sejam gerados impactos adicionais decorrentes dos processos aplicados (BURNS, 2000; PRINCE *et al.*; 2003; CANTAGALLO *et al.*, 2007).

A aplicação de métodos físicos como o uso de estruturas absorventes, esteiras recolhedoras e *skimmers* são recomendados para limpeza de manguezais, todavia, deve-se ressaltar que alternativas equivocadas podem maximizar os danos ambientais de um derrame (CANTAGALLO *et al.*, 2007). Na tentativa de minimizar estes danos, estudos têm se aprofundado sobre o uso da remediação biológica ou biorremediação, uma vez que tem se destacado como o menos agressivo ao ecossistema.

O desenvolvimento de técnicas baseia-se principalmente na capacidade que a microbiota instalada nos sedimentos tem em degradar e mineralizar hidrocarbonetos petrolíferos (YU *et al.*, 2005). Entretanto, o crescimento destes microorganismos no ambiente natural pode ser limitado por diversos fatores tais como baixa solubilidade e disponibilidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em água e a limitação de alguns nutrientes, especialmente o nitrogênio (N). A adição de nutrientes que estimulam a degradação pela microbiota (bioestímulo) tem sido adotada como estratégia para superar estas deficiências (BARAHONA *et al.*, 2004; BENTO *et al.*, 2005). Quando os nutrientes não são um fator limitante, uma das estratégias de

biorremediação sugeridas é o bioaumento, que se dá através da adição de consórcios microbianos com atributos especiais para degradar os poluentes (BENTO *et al.*, 2005). Em contraproposta aos tratamentos mencionados, a biodegradação passiva, conhecida por “atenuação natural”, vem sendo bastante estudada. Esta por sua vez, conta apenas com a degradação realizada pela microbiota nativa, sem que sejam utilizadas técnicas ou produtos para acelerar a transformação dos contaminantes (YU *et al.*, 2005; OLGUÍN *et al.*, 2007).

Cantagallo *et al.* (2007) não recomendam o emprego de técnicas de biorremediação que se utilizam da adição de fertilizantes para áreas eutrofizadas, uma vez que os nutrientes frequentemente não são limitantes nestes ambientes. Entretanto, a utilização de fertilizantes pode ser um benefício na redução de hidrocarbonetos no sedimento de áreas que, embora estejam eutrofizadas, os nutrientes não se apresentam disponíveis ou estão em proporções deficientes (SMITH *et al.*, 1998; PORTO ROSA & TRIGUIS, 2007).

O uso de surfactantes, substâncias que atuam como dispersantes, tem sido amplamente explorado como alternativa para limpeza de ambientes costeiros, eles apresentam atividade tensoativa e auxiliam na dessorção de compostos hidrofóbicos. A disponibilização causada pelos surfactantes intensifica a biodegradação, o que resulta em um aumento da eficiência de remoção dos contaminantes (MULLIGAN, 2005; AL-ARAJI *et al.*, 2007).

A aplicação de surfactantes de origem sintética requer ponderações importantes visto que pode gerar efeitos mais tóxicos do que os causados pela presença de óleo (BRASIL, 2000; FULLER & BONNER *et al.*, 2001; CETESB, 2005). Em oposição, os biosurfactantes, produzidos por várias espécies de microorganismos, principalmente bactérias e fungos, são biodegradáveis e apresentam baixa toxicidade, aspectos que reforçam o seu uso como alternativa diante dos surfactantes de origem sintética (BENINCASA, 2007; BARROS *et al.*, 2008; RAHMAN & GAKPE, 2008).

Até poucas décadas, o acompanhamento da eficiência dos processos de biorremediação baseava-se, principalmente, em análises químicas da matriz remediada. Contudo, os processos biogeoquímicos que ocorrem durante degradação geram metabólitos que estas análises não são capazes de detectar (KOROL, 2003; BURATINI & ZAGATTO, 2006). Estes compostos secundários, por sua vez, podem apresentar toxicidade superior em relação aos compostos iniciais (DORN & SALANITRO, 2000; BENTO *et al.*, 2003; CHAGAS-SPINELLI, 2007). A toxicidade gerada em um

processo biorremediativo pode advir ainda dos compostos utilizados para acelerar a degradação dos contaminantes (p. ex. surfactantes e compostos nitrogenados) (FULLER & BONNER, 2001; CHAGAS-SPINELLI, 2007). O grau de toxicidade observado pode ser acentuado caso ocorram efeitos sinérgicos, antagônicos ou de potenciação entre os compostos (MOZETO & ZAGATTO, 2006). Estes fatores fazem parte de uma gama de argumentos que sugerem a incorporação da ecotoxicologia nas avaliações de processos biorremediativos. O uso de testes de toxicidade pode ajudar a definir e direcionar decisões adequadas em relação a padrões aceitáveis de limpeza em relação à remediação, uma vez que estes respondem pela avaliação de impactos na biota (BESTEN & BRINK *et al.*, 2005; MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2005; PLAZA *et al.*, 2005).

Os parâmetros utilizados na ecotoxicologia dividem-se de acordo com sua relevância biológica, podendo ser caracterizados como letais e sub-letais (LOTUFO, 1998b; LANDRUM *et al.*, 2003; ABESSA *et al.*, 2006). Estes últimos são causados por concentrações inferiores das capazes de causar letalidade direta e compreendem uma variedade de aspectos que podem afetar a reprodução das espécies e interferir no desenvolvimento saudável da prole. A avaliação de efeitos sub-letais pode basear-se na quantificação de descendentes produzidos, na análise dos padrões de desenvolvimento e comportamento dos indivíduos ou ainda em análises bioquímicas (enzimas e hormônios) e genéticas (CHAPMAN, 2002; DAHL *et al.*, 2006).

As espécies utilizadas nos testes precisam ter características que os tornem confiáveis e reprodutíveis (ZAGATTO, 2006; KWOK *et al.*, 2008). Devido à comprovada utilidade da ecotoxicologia no estabelecimento de critérios de qualidade de água e sedimento (CHAPMAN, 2007) novos métodos foram adaptados para diversas espécies (ASTM, 1994a; ASTM, 1994b; ASTM, 2004).

Os copépodos marinhos harpacticóides, são componentes representativos da fauna bentônica e têm sido freqüentemente expostos a testes letais e sub-letais com contaminantes (LOTUFO, 1997; BELLAS & THOR, 2007). A escolha destes organismos é justificada por apresentarem os pré requisitos necessários como sensibilidade aos contaminantes, o ciclo de vida curto, altas taxas de fecundidade, tamanho reduzido e o baixo custo envolvido nos testes (HUTCHISON *et al.*, 1999; HACK *et al.*, 2008). O hábito epibentônico destes copépodos possibilita testar poluentes tanto na fase aquosa quanto aqueles ligados ao sedimento, a exemplo das espécies, *Robertsonia propinqua* (HACK *et al.*, 2008) *Amphiascus tenuiremis* (HAGOPIAN-

SCHLEKAT *et al.*, 2001, BEJARANO & CHANDLER, 2004), *Nitocra spinipes* (DAHL *et al.*, 2006) e *Tigriopus fulvus* (BENGTSSON, 1978; COULL & CHANDLER, 1992; FARAPONOVA *et al.*, 2005). Estudos têm demonstrado que organismos desta ordem apresentam reduções significativas na densidade quando expostos à contaminação por óleo (BOUCHER, 1980; CARMAN *et al.*, 1996; CARMAN *et al.*, 1997).

Dentre os harpacticóides, o gênero *Tisbe* um grupo ecologicamente importante da meiofauna, tem se destacado na ecotoxicologia aquática. As espécies *Tisbe battagliai* (HUTCHINSON *et al.*, 1999; ISO 14669, 1999; POUNDS *et al.*, 2002; THOMAS *et al.*, 2003) *Tisbe holothuriae* (MILIOU *et al.*, 2000; TAYLOR *et al.*, 2007) e *Tisbe longicornis* (LARRAIN *et al.*, 1998; RUDOLPH *et al.*, 2009) são espécies teste utilizadas internacionalmente em ecotoxicologia marinha por apresentarem alta sensibilidade a tóxicos.

A espécie *Tisbe biminiensis* Volkmann-Rocco 1973 tem demonstrado resultados satisfatórios em estudos envolvendo avaliações de toxicidade de ambientes impactados (ARAÚJO, 2008; TORREIRO, 2008; OLIVEIRA 2009). A padronização da metodologia para a realização de teste de toxicidade de sedimento com esta espécie, cuja dinâmica populacional e aspectos de sua dieta em condições de laboratório são conhecidos (PINTO *et al.*, 2001; ARAÚJO-CASTRO & SOUZA-SANTOS, 2005), foi realizada por Araújo-Castro (2008). Neste trabalho, foi determinada a carta controle necessária à padronização do método, utilizando o dicromato de potássio como substância de referência.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade ao longo do tempo em sedimento de manguezal contaminado natural e artificialmente por petróleo e derivados e sujeito à biorremediação com fertilizantes e um biossurfactante em condições laboratoriais através de bioensaios com o copépodo bentônico *Tisbe biminiensis*.

2. HIPÓTESE

Os processos biorremediativos no sedimento utilizando os fertilizantes NPK e OSMOCOTE e um biossurfactante ramnolipídio promovem a redução da toxicidade provocada por petróleo e derivados ao longo do tempo.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar a eficiência da biorremediação na redução da toxicidade do sedimento de manguezal contaminado natural e artificialmente por petróleo e derivados utilizando fertilizantes e um biossurfactante em condições laboratoriais, ao longo do tempo, através de bioensaios com o copépodo bentônico *Tisbe biminiensis*.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar o efeito da contaminação do sedimento da baía de Todos os Santos e do sedimento de Suape, este último contaminado com óleo diesel, antes da aplicação dos métodos de biorremediação em relação à sobrevivência e reprodução do copépodo *Tisbe biminiensis*;
- Avaliar a toxicidade letal e sub-letal do sedimento contaminado durante a aplicação de processos de biorremediação utilizando os fertilizantes NPK e OSMOCOTE e um biossurfactante ramnolipídio, por meio de testes com o copépodo *Tisbe biminiensis* ao longo do tempo;
- Verificar a relação da toxicidade com os nutrientes no processo utilizando fertilizantes, e com os 16 HPAs principais no processo utilizando o biossurfactante.

4. METODOLOGIA

4.1. Áreas de estudo

4.1.1. Estuário do rio São Paulo

O estuário do rio São Paulo está localizado na porção nordeste da Baía de Todos os Santos (BTS), no Estado da Bahia (Fig.1). A BTS possui uma área de aproximadamente 1.000 km² e cerca de 180 km de extensão costeira. Apresenta ecossistemas característicos de regiões tropicais e subtropicais, como manguezais e os recifes de corais (CRA, 2001).

É uma região de grande importância econômica e histórica regional, sendo considerada uma das maiores e mais importantes baías navegáveis da costa tropical do Brasil (CRA, 2001). A região enfrentou grande expansão industrial, com a implantação das primeiras unidades de exploração, produção e refino de petróleo em território brasileiro, sendo inserida no cenário mundial deste setor (VEIGA *et al.*, 2008).

Além do desenvolvimento industrial, a expansão populacional desordenada na BTS resultou em um quadro de elevadas concentrações de contaminantes orgânicos e inorgânicos (CELINO & QUEIROZ, 2006; CELINO *et al.*, 2008). A ausência de um adequado planejamento e tratamento de efluentes acentuou esta situação, sendo as porções norte e nordeste da baía as mais afetadas pela contaminação (ORGE *et al.*, 2000).

A circulação oceânica na BTS eleva os níveis de reciclagem da água, entretanto, essa circulação não é capaz de neutralizar totalmente a toxicidade em algumas áreas da baía (WOLGEMUTH *et al.*, 1981; LIZÁRRAGA-PARTIDA & CÁRDENAS, 1996). Vários trabalhos têm demonstrado concentrações de hidrocarbonetos na BTS como perturbadoras da qualidade ambiental da área (PESO-AGUIAR *et al.*, 2000; VENTURINI & TOMMASI, 2004).

No estuário do rio São Paulo foi verificada a presença de exudações de óleo em uma extensa área do substrato de manguezal. Esta ocorrência se deve à proximidade da Estação de Produção da UN-BA (Petrobras), denominada Pedra Branca. Este passivo ambiental é o foco do projeto de biorremediação financiado pela RECUPETRO, que construiu um galpão de simulação em parceria com o Laboratório de Geoquímica da Universidade Federal da Bahia, com 78 m², nas proximidades do manguezal, onde os sedimentos são submetidos a processos biorremediativos.

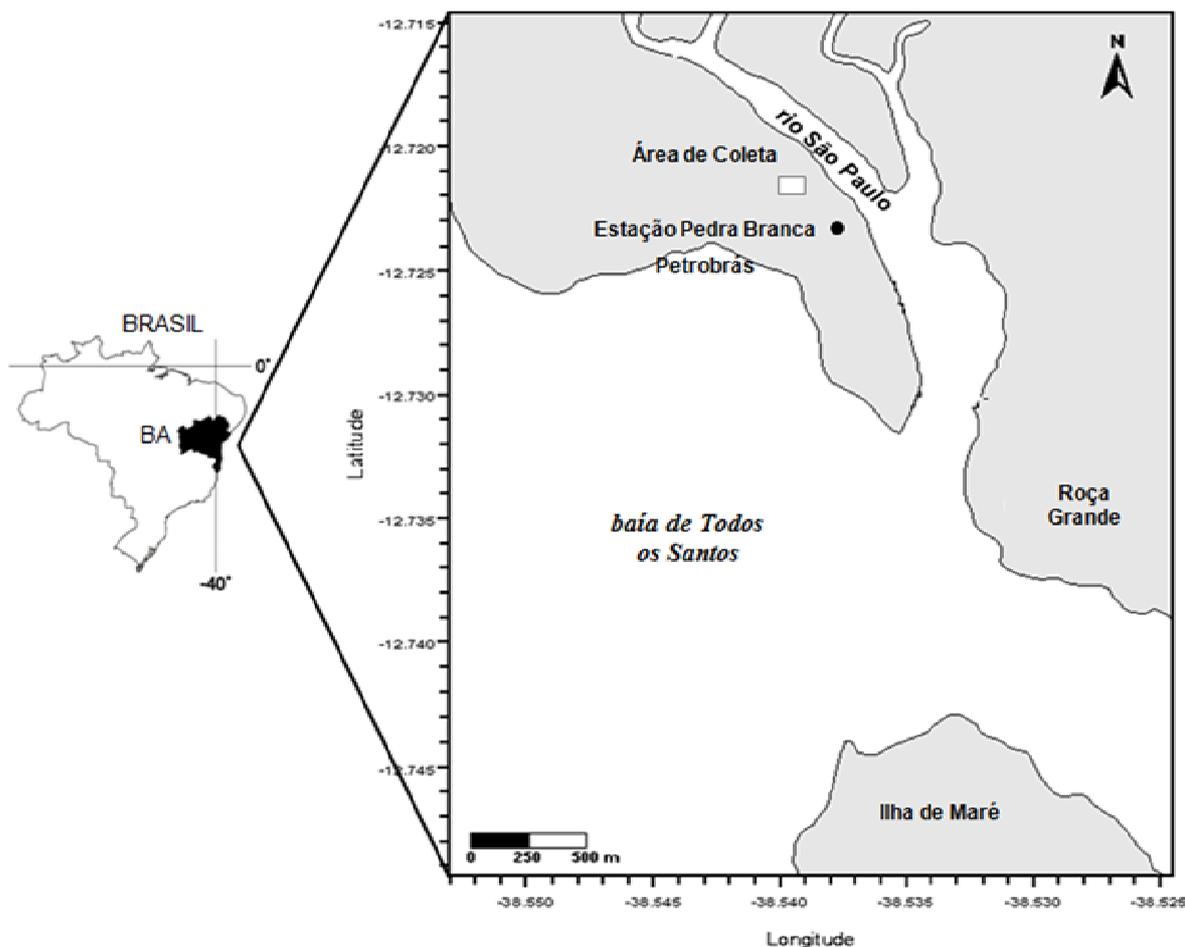


Figura 1 – Área de amostragem de sedimento, próximo à Estação de Produção Pedra Branca (Petrobras), no estuário do rio São Paulo, Baía de Todos os Santos – BA, Brasil (modificado de Araújo-Castro, 2008).

4.1.2. Baía de Suape

O Complexo Industrial e Portuário de Suape está localizado no município de Ipojuca, 40 km ao sul de Recife – PE (Fig. 2). Além de ser privilegiado pela posição geográfica, que o torna concentrador e distribuidor de cargas, este se tornou o mais completo pólo para a implantação de negócios industriais e portuários da Região Nordeste (SUAPE, 2009). Contudo, as atividades de exploração da área tornam o Complexo responsável por inúmeros impactos devido, principalmente, à dragagem, dinamitação dos recifes, aterros sobre a linha recifal, destruição do manguezal adjacente e tráfego de embarcações de grande porte (FERNANDES, 2000).

As fontes de contaminação da área abrangem desde descarga de esgoto doméstico e de resíduos de indústrias, até as oriundas do material dragado e relativas à agricultura (CPRH, 2003; 2006). Estas atividades comprometem a qualidade de todos os compartimentos deste ambiente, como a qualidade do ar (FREITAS, 2009) e

principalmente das águas e sedimentos (CHAGAS-SPINELLI, 2007; ARAÚJO-CASTRO, 2008; MORAES, 2009).

Em adição ao risco ambiental, neste ambiente costeiro também está sendo instalada a Refinaria Abreu e Lima até 2011, que irá processar o óleo pesado do Brasil e da Venezuela, sendo responsável por 60% do óleo diesel produzido no país. Diante desse crescente risco ambiental em áreas de manguezal, um dos ecossistemas mais produtivos da Terra, sobretudo em aspectos econômicos e sócio-ambientais (RICKLEFS, 2003), os esforços no sentido de ampliar estudos acerca da contaminação e minimização dos danos ecológicos neste ambiente são bastante justificáveis.

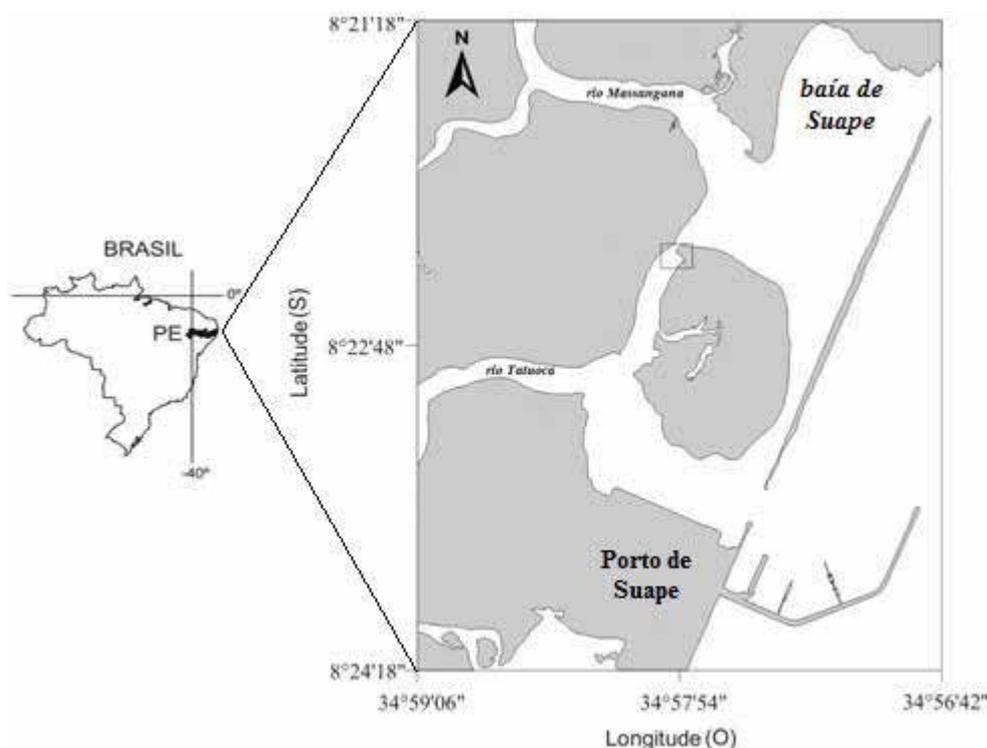


Figura 2 – Área (demarcada com retângulo) da amostragem do sedimento na baía de Suape – PE, Brasil.

4.2. Amostragem de sedimento

Os sedimentos utilizados no presente estudo foram coletados durante a baixa-mar, com auxílio de um testemunhador de aço inoxidável de 10 cm de diâmetro e capacidade para coletar testemunhos de até 30 cm de profundidade.

No estuário do rio São Paulo-BA, foi coletado o sedimento para biorremediação no qual foi utilizado o bioestímulo, que consistiu na adição de nutrientes para estimular o crescimento bacteriano e acelerar o processo de degradação do óleo. Após a coleta, realizada no médio-litoral em maré baixa, o sedimento foi homogeneizado a fim de

evitar erros analíticos, já que é observada a presença de manchas pontuais de óleo no sedimento desta área. Parte deste sedimento homogeneizado seguiu para as análises geoquímicas e de toxicidade descritos adiante para a avaliação do sedimento antes da introdução dos fertilizantes. O sedimento restante foi transportado para o galpão de simulação de biorremediação do Laboratório de Geoquímica da Universidade Federal da Bahia (Fig. 3).

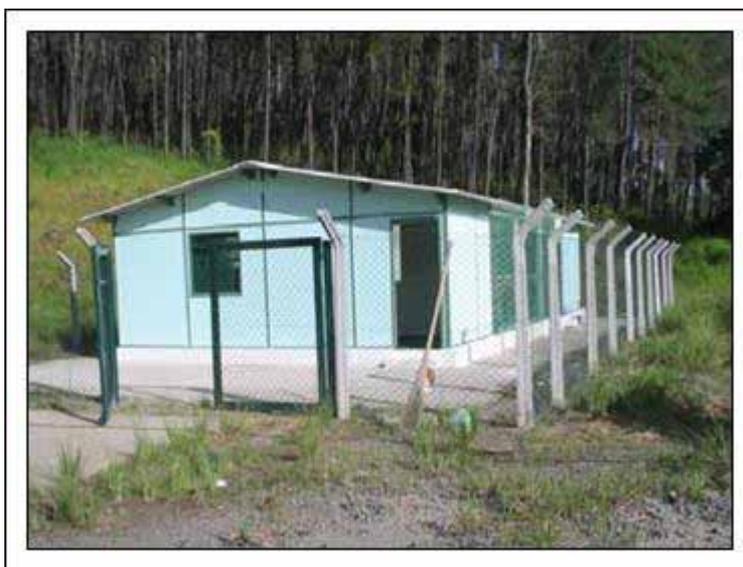


Figura 3 - Galpão de simulação de biorremediação do Laboratório de Geoquímica da Universidade Federal da Bahia. Fonte: Laboratório de Geoquímica da Universidade Federal da Bahia.

A adoção do biossurfactante (surfactante de origem biológica) teve como finalidade reduzir a tensão superficial entre o óleo e a água e auxiliar na dispersão e biodisponibilidade das frações do petroderivado. Para este tratamento foi utilizado o sedimento coletado na baía de Suape – PE, no médio-litoral em maré baixa. As amostras coletadas foram divididas em três frações com 10 cm de altura cada, denominadas ao longo do estudo de superfície, meio e fundo. Após a separação das frações, as mesmas foram depositadas em recipientes com capacidade de 15 L, um para cada fração do substrato. Cada fração foi homogeneizada para posterior medição de parâmetros físico-químicos. O sedimento foi levado para o Laboratório de Saneamento Ambiental no Departamento de Engenharia Civil da UFPE.

As amostras provenientes das simulações de biorremediação tiveram seus parâmetros de toxicidades comparados às amostras de sedimento controle. A coleta do sedimento controle foi realizada no estuário do rio Maracaípe, situado no município de Ipojuca, Pernambuco (S 08°32'21.8" W 35°00'14.5"). Este estuário localiza-se longe de centros urbanos e indústrias, sendo os níveis de contaminação avaliados até o presente

incapazes de causar efeitos biológicos prejudiciais à espécie dos organismos testados no presente estudo (ARAÚJO-CASTRO *et al.*, 2009). O sedimento foi coletado durante a baixa-mar, com auxílio de uma espátula, previamente descontaminada e lavada com água local, retirando os 2 primeiros centímetros. As amostras de sedimento controle foram submetidas aos bioensaios simultaneamente às demais, sendo coletado mensalmente para a Bahia e bimensalmente para Suape.

4.3. Montagem dos experimentos

Em laboratório o sedimento coletado foi acondicionado em colunas de vidro vazadas no topo e na base, com 30 cm de altura e 5 ou 6 cm de diâmetro (estuário do rio São Paulo-BA e baía de Suape-PE, respectivamente), previamente revestidas com sacos de algodão na cor branca ou preta (estuário do rio São Paulo-BA e baía de Suape-PE, respectivamente) (Fig. 4). A mudança de cor branca para preta foi para reduzir os processos aeróbicos. Os sacos foram fixados nas colunas com auxílio de elásticos posicionados logo abaixo da abertura superior das mesmas (Fig. 4). As colunas foram acomodadas em aquários de vidro com 30 cm x 30 cm x 35 cm (largura x comprimento x profundidade) através de suportes de madeira (Fig. 4 e Fig. 5). Para o sedimento de Suape-PE, onde a amostra foi fracionada, foi realizada uma marcação nas colunas em intervalos de 10 cm, garantindo que cada fração fosse depositada na posição correspondente às três profundidades coletadas.



Figura 4 - Diferentes ângulos das provetas de vidro, revestidas com saco de algodão, utilizadas no sistema de simulação de biorremediação instalado no Galpão do Laboratório de Geoquímica da Universidade Federal da Bahia. Fonte: Laboratório de Geoquímica da Universidade Federal da Bahia.

Cada aquário possuía um sistema de circulação para renovar 1/3 do volume total da água a cada 12 horas. Para o experimento da Bahia foi utilizada a água do mar do

próprio manguezal e para o experimento de Pernambuco foi utilizada água do mar captada pela Aqualider em Muro Alto (Ipojuca-PE) e pela Netuno em Barra de Sirinhaém (Sirinhaém-PE). Para manter a água dos aquários oxigenada, em ambos experimentos, foram utilizados compressores de ar.

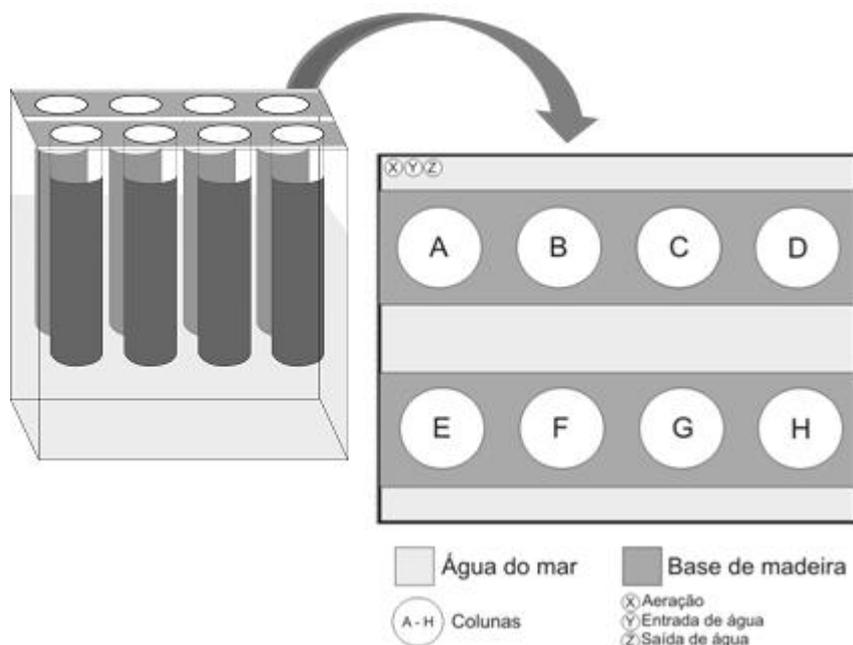


Figura 5 - Desenho esquemático dos aquários utilizados nos tratamentos de biorremediação de sedimento em laboratório.

4.4. Simulações de Biorremediação

4.4.1. Simulação utilizando fertilizantes (Bioestímulo)

Os sedimentos contidos nas colunas foram submetidos a dois tratamentos de bioestímulo, utilizando dois fertilizantes amplamente aplicados na agricultura, e um tratamento de atenuação natural, processo no qual não há a otimização das condições nem a adição de compostos para acelerar a degradação do óleo. Para cada tratamento foram realizadas três réplicas, totalizando nove aquários, com oito colunas cada, estas coletadas ao longo do tempo.

Os tratamentos estão descritos a seguir:

- a) NPK – Sedimento com adição do fertilizante NPK;
- b) OSMOCOTE – Sedimento com adição do fertilizante OSMOCOTE, que apresenta basicamente o mesmo papel do NPK, contudo é um fertilizante de liberação lenta, visando redução do desperdício e do efeito tóxico nas raízes das plantas por excesso de adubação;

c) Atenuação Natural (AN) – Sedimento sujeito apenas a simulação de maré e oxigenação.

A adição dos fertilizantes foi realizada três vezes na fase inicial do experimento, em intervalos de dez dias entre elas. Cada aplicação consistiu em 1,5 g do fertilizante utilizado no tratamento, baseado em Porto-Rosa & Triguis (2006).

O fertilizante agrícola NPK utilizado, da marca Produquímica, contém sulfato de amônia ((NH₄)₂SO₄), fosfato de amônia ((NH₄)₃HPO₄) e cloreto de potássio (KCl) em proporções de N:P:K equivalentes (1:1:1). O fertilizante OSMOCOTE, da mesma marca, possui nitrogênio (N), pentóxido de fósforo (P₂O₅) e óxido de potássio (K₂O) também em proporções equivalentes.

Os sedimentos de cada coluna foram retirados um dia após adicionados os fertilizantes e após 8, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de biorremediação. Após serem coletados das colunas, os sedimentos foram acondicionados em recipientes de vidro, sendo mantidos refrigerados por bolsas de gelo em caixa térmica para preservar a integridade da amostra. Os recipientes de vidro foram lavados, previamente, com ácido clorídrico e na seqüência com água destilada,

Em seguida, os recipientes foram transportados para Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia (LACE) na UFPE em um período inferior a 24h para a realização dos testes de toxicidade. Outra parte das amostras foi encaminhada para o Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO) na UFBA para análises geoquímicas.

4.4.2. *Simulação utilizando biossurfactante*

Para esse experimento de biorremediação utilizando biossurfactante, foram utilizados 7 aquários, cada um contendo 8 colunas, e cada coluna contendo aproximadamente 1 kg de sedimento. Os tratamentos de biorremediação denominados Biossurfactante e Atenuação Natural foram realizados com 3 réplicas cada, sendo o 7º aquário destinado ao tratamento branco (sem contaminação). Este aquário foi utilizado apenas nas análises de toxicidade para avaliar a existência de alterações deste parâmetro no sedimento após a incubação no sistema de simulação.

Segundo ARAÚJO-CASTRO (2008), o sedimento coletado na baía de Suape não apresenta contaminação por hidrocarbonetos relevante em relação a outras áreas consideradas poluídas. Por este motivo, foi realizada a contaminação do sedimento com óleo diesel antes da aplicação dos tratamentos de biorremediação. Essa contaminação

consistiu na adição de 40 g de óleo diesel na superfície de cada coluna. Essa concentração foi baseada nos estudos de Barahona *et al.* (2004) e em Chagas-Spinelli (2007). O óleo diesel utilizado foi o diesel B3, que apresenta em sua composição (3%) de biodiesel. O mesmo foi obtido em um posto autorizado PETROBRAS (Posto BR).

Os tratamentos estão descritos a seguir:

- a) Biossurfactante (BS) – Sedimento contaminado com óleo diesel, com adição do biossurfactante raminolipídeo;
- b) Atenuação Natural (AN) – Sedimento contaminado com óleo diesel sem tratamento;
- c) Branco – Sedimento da área, sem contaminação com óleo diesel.

A adição do biossurfactante raminolipídeo foi realizada uma semana após a contaminação com o óleo diesel. Em cada coluna foram adicionados 35 mL da solução do biossurfactante a uma concentração de 1,04 g/L, resultando em 0,04 g de biossurfactante por coluna, ou 0,04 g. kg⁻¹ de sedimento.

Para a produção do biossurfactante raminolipídeo, foi utilizada *Pseudomonas aeruginosas* D1A2, isolada de poços de petróleo de Canto do Amaro/RN, e depositadas na Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE. O meio fermentado, contendo os raminolipídeos, foi produzido com o objetivo de ser utilizado na remediação de sedimento impactado por petroderivados como agente de aceleração da biodegradação. A produção do biossurfactante ocorreu no Laboratório de Saneamento Ambiental do Departamento de Engenharia Civil da UFPE, estando a metodologia descrita em Silva *et al.* (2009).

Uma semana após a contaminação do sedimento e antes de iniciar o tratamento com o biossurfactante, foi retirada uma coluna de cada aquário para avaliar o efeito do derramamento do óleo diesel, denominado tempo 0 (T0). As demais coletas do sedimento se deram após 21, 45, 62 e 111 dias de biorremediação. Em cada coleta foi retirada uma coluna de cada aquário, sendo retiradas 5 das 8 colunas contidas em cada aquário durante o período de biorremediação apresentado neste trabalho.

Após serem coletados das colunas, os sedimentos foram acondicionados em recipientes de vidro lavados com ácido clorídrico, seguido de água destilada, sendo mantidos refrigerados em caixa térmica para preservar a integridade da amostra. Em seguida os recipientes foram levados para o Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia (LACE) na UFPE para os testes de toxicidade e outra parte encaminhada para o

Laboratório de Meio Ambiente do Centro de Tecnologias do Gás (CTGás/SENAI/RN) para análises geoquímicas dos HPAs.

4.5. Cultivo dos copépodos

Os copépodos da espécie *Tisbe biminiensis*, utilizados nos bioensaios, foram cultivados no Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia (LACE) no Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco.

O cultivo da espécie foi mantido em caixas de polietileno contendo 5 L de água do mar filtrada (33 ± 2 UPS), sob temperatura de 27 ± 2 °C e fotoperíodo controlado (12/12h claro/escuro). A água dos cultivos foi trocada semanalmente, sendo o conteúdo passado por malha de $63\mu\text{m}$ de abertura. As caixas de cultivo também foram trocadas semanalmente. A alimentação consistiu na adição das diatomáceas *Thalassiosira fluviatilis* ou *Chaetoceros calcitrans* e ração para peixes.

As fêmeas utilizadas nos bioensaios apresentaram 12 dias de vida para que fosse minimizado o efeito da mortalidade natural durante o período de cada teste, bem como a interpretação errônea dos resultados, uma vez que ocorre uma redução da produção de descendentes por indivíduos mais velhos (PINTO *et al.*, 2001). Para obter as fêmeas com idade determinada, foi utilizada a metodologia proposta por Araújo-Castro *et al.* (2009). Desta forma, o conteúdo total do cultivo foi vertido em uma malha de $250\mu\text{m}$ de abertura 13 dias antes do início dos experimentos, com o objetivo de reter as fêmeas ovígeras. Os organismos retidos na malha foram transferidos para outra caixa contendo 5 L de água do mar filtrada e alimento, na qual foram mantidos por 24 h para eclosão do ovos. Após este período, o volume foi vertido na mesma malha, sendo a fração de adultos retida transferida para outra caixa. A fração menor que $250\mu\text{m}$ foi acomodada em uma caixa contendo 5 L de água do mar filtrada, renovada 2 vezes por semana, juntamente à adição de alimento. Após 12 dias, este grupo foi novamente passado pela malha de $250\mu\text{m}$, sendo os organismos retidos transferidos para um recipiente com aproximadamente 1 L de água do mar filtrada. Para a utilização nos experimentos, as fêmeas ovígeras foram coletadas uma a uma com auxílio de pipeta Pasteur.

4.6. Cultivo de microalgas

Para a alimentação dos organismos foram cultivadas as microalgas *Thalassiosira fluviatilis* e *Chaetoceros calcitrans* no laboratório em meio de cultivo F/2 (GUILLARD, 1975).

O meio foi preparado utilizando-se água do mar filtrada (33 ± 2 UPS), nutrientes, 1 mL de silicato e 2 mL da solução tampão de TRIS (25% de pH = 7,8). Após o preparo, o meio foi esterilizado em autoclave a 120 °C em 1 atm de pressão por 15 minutos, sendo adicionadas posteriormente vitaminas esterilizadas por filtração em membranas estéreis de 0,2 µm.

Os cultivos de microalgas foram mantidos em erlenmeyers a uma temperatura controlada (26 ± 1 °C), iluminados por lâmpadas fluorescentes com fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro), sendo agitados manualmente todos os dias.

4.7. Bioensaios

Em laboratório, apenas os sedimentos provenientes do estuário do rio São Paulo foram peneirados em malha de 63 µm para remoção de possíveis predadores assim como de outras espécies de copépodos para posterior utilização nos bioensaios. O sedimento proveniente da baía de Suape não foi peneirado devido ao reduzido volume de sedimento disponível para os bioensaios.

O bioensaio com o copépodo *T. biminiensis*, seguiu a metodologia de Araújo-Castro *et al.* (2009), sendo realizado no Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia (LACE) do Departamento de Oceanografia da UFPE. Foi utilizada a mesma metodologia para os bioensaios nos dois sistemas de simulação. Cada recipiente-teste de 67 mL recebeu 2 g de sedimento a ser testado e 20 mL de suspensão de diatomácea (*Thalassiosira fluviatilis* ou *Chaetoceros calcitrans*) em água do mar na mesma salinidade do cultivo (33 ± 2 UPS) e concentração de 0,2 µg Clorofila-*a*. mL⁻¹. Em seguida, os recipientes foram mantidos sob temperatura de 26 ± 1 °C e fotoperíodo controlado (12/12h claro/escuro).

Passadas 24 horas da distribuição do sedimento, 10 fêmeas ovígeras do copépodo *T. biminiensis* foram adicionadas em cada recipiente com auxílio de uma pipeta Pasteur. Cada bioensaio teve uma duração de 7 dias, com adição de alimento a cada 2 dias. Foram medidos pH, O.D e salinidade do sobrenadante no início e no final do experimento. Ao fim do teste o conteúdo total dos recipientes foi corado com Rosa de Bengala e fixado com formol a 4%. O efeito letal foi avaliado a partir da

quantificação das fêmeas coradas (sobreviventes). Os efeitos sub-letais foram avaliados através da contagem da prole produzida (fecundidade) e da percentagem de copepoditos (número de indivíduos no estágio de copepodito x 100/total de descendentes). O percentual de copepoditos foi analisado a fim de relacionar o desenvolvimento dos organismos com a exposição ao sedimento testado.

Testes de referência usando o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) foram realizados paralelamente a cada teste com sedimento. O objetivo destes testes foi avaliar a susceptibilidade do lote de copépodos utilizados, comparando os resultados à carta controle descrita em Araújo-Castro *et al.* (2009).

4.8. Análises geoquímicas

4.8.1. Sedimentos tratados com fertilizantes

As amostras de sedimento provenientes da simulação com fertilizantes foram submetidas às análises químicas no Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO) da Universidade Federal da Bahia.

As seguintes análises foram realizadas: amônia e nitrato (Método de Kjeldahl por via úmida - EMBRAPA, 1999); fósforo assimilável (EMBRAPA, 1999); carbono orgânico total (COT) (WALKEY-BLACK, 1947) e nitrogênio total (Método de Kjeldahl - EMBRAPA, 1997). Os dados destas análises foram cedidos por RECUPETRO (2009), para correlacioná-los aos padrões de variação da toxicidade.

4.8.2. Sedimentos tratados com biossurfactante

Bayer (2010) realizou análises de identificação e quantificação dos 16 hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) listados como poluentes prioritários pela EPA nos sedimentos sujeitos ao tratamento com biossurfactante (Baía de Suape). Parte destes dados foi utilizada no presente trabalho com o objetivo de relacionar a toxicidade à presença dos hidrocarbonetos pesquisados.

A determinação e quantificação dos 16 HPAs foi realizada no Laboratório de Meio Ambiente do Centro de Tecnologias do Gás (CTGás - SENAI/RN), seguindo o método USEPA 8270 (USEPA, 2004). A amostra de sedimento foi estocada em 4°C até a execução das análises. Uma alíquota de 10 g foi extraída usando extractor *Soxhlet* e diclorometano como um solvente. O extrato purificado foi obtido posteriormente usando uma coluna cromatográfica de sílica-alumina de 40 cm e diclorometano e n-

hexano como solventes. Os 16 HPAs prioritários foram identificados e quantificados através de cromatografia gasosa por espectrometria de massa (GC-MS).

4.9. Análise Estatística

Os resultados obtidos com o teste de referência foram analisados através do *software* de análise ABBOTT, utilizando o método *Trimmed Spearman-Kärber* (HAMILTON *et al.*, 1977) para obtenção da concentração letal média após 96 horas de exposição (CL50-96H).

Para a análise estatística dos dados de sobrevivência, fecundidade total e percentual de copepoditos na fecundidade total foi utilizado o *software* Bioestat versão 5.0. Após a verificação da normalidade e da homogeneidade de variância dos dados, foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) de um fator para cada tempo experimental, sendo o nível de significância igual a 0,05. O Teste *a posteriori* de Dunnett foi utilizado para detectar diferenças significativas em relação ao controle. Quando não foi observada a normalidade ou heterogeneidade de variâncias, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste *a posteriori* de Dunn quando em presença de diferenças significativas.

As análises de correlação de Pearson foram realizadas a fim de verificar a existência de padrões de associação da toxicidade com os compostos inorgânicos e carbono orgânico total (estuário do rio São Paulo-BA) e com os 16 HPAs pesquisados (baía de Suape-PE) ao longo de ambos experimentos de biorremediação. Quando significativas, as correlações foram classificadas de acordo com o coeficiente de correlação, sendo fortes, quando $0,7 < r \text{ de Pearson} < 1,0$, moderadas, quando $0,3 < r \text{ de Pearson} < 0,7$ ou fracas, quando $(0 < r \text{ de Pearson} < 0,3)$.

5. RESULTADOS

5.1. Testes com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$)

Os resultados de CL50-96H obtidos nos testes com o dicromato de potássio variaram entre 8.29 e 10.01 mg.L⁻¹, estando os mesmos dentro da faixa de variação de 9.45 (± 1.68) descrita por Araújo-Castro *et al.*, 2009. Desta forma, a sensibilidade dos organismos utilizados esteve dentro do padrão aceitável em todos os bioensaios com sedimento.

5.2. Estuário do rio São Paulo

5.2.1. Caracterização da toxicidade inicial do sedimento

Na avaliação da toxicidade inicial do sedimento homogeneizado do estuário do rio São Paulo não foi observado efeito tóxico letal nas fêmeas de *T. biminiensis* (ANOVA um fator: $F= 2,824$; $p= 0,1421$) cuja média de sobrevivência foi de 74,5%, comparado ao Controle de 88% (Fig. 6). Porém, a exposição a estes sedimentos promoveu um decréscimo significativo na fecundidade total *T. biminiensis* em relação ao Controle (Kruskal-Wallis: $H= 5,000$; $p= 0,0253$), tendo média de 60,4 indivíduos produzidos (Fig. 6). Contudo, o percentual de indivíduos que chegou até o estágio de copepodito nos grupos expostos ao sedimento do estuário do rio São Paulo foi significativamente superior ao Controle (ANOVA um fator: $F= 38,9232$; $p<0,001$) (Fig. 6).

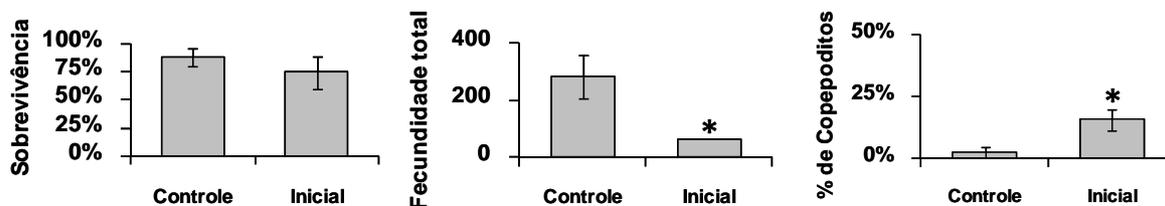


Figura 6 - Médias (\pm desvio padrão) da sobrevivência, fecundidade total (náuplios + copepoditos) e percentual de copepoditos de *Tisbe biminiensis* no momento da caracterização da toxicidade inicial do sedimento homogeneizado do estuário do rio São Paulo. O símbolo * acima das barras indica diferenças significativas em relação ao Controle coletado em Maracáipe (ANOVA: Dunnet; $p<0,05$).

5.2.2. Toxicidade observada no processo de biorremediação utilizando fertilizantes (Bioestímulo)

5.2.2.1. Sobrevivência

As fêmeas expostas aos sedimentos que receberam o fertilizante NPK exibiram diferenças significativas na sobrevivência no primeiro dia após o início da biorremediação (Tab.1). O valor médio da sobrevivência para este tratamento foi de 19%, sendo este resultado 68% inferior ao Controle (Fig. 7). Este efeito significativo persistiu aos 8 dias de simulação, entretanto a redução foi menos acentuada, sendo observado um valor médio de 68% de sobrevivência no tratamento NPK (Fig. 7; Tab.1).

Os tratamentos Atenuação Natural, NPK e OSMOCOTE apresentaram diferenças significativas em relação ao Controle aos 15 dias de biorremediação (Fig. 7; Tab.1). Este resultado pode ser considerado um artefato estatístico, uma vez que estas

diferenças podem ter sido identificadas devido à sobrevivência do Controle exibir uma média elevada de 98% e um desvio padrão de apenas 4%.

A sobrevivência obtida aos 30 dias não demonstrou diferenças significativas em relação ao Controle, tendo todos os tratamentos de biorremediação valores médios superiores a 85% (Fig. 7; Tab.1).

Aos 45 dias após o início da simulação de biorremediação, embora tenham sido observadas diferenças significativas entre os tratamentos, estas não foram identificadas pelo teste *a posteriori* de Dunn; Kruskal Wallis (Tab.1). Semelhante ao ocorrido após 15 dias, levanta-se a possibilidade das diferenças terem sido identificadas devido à sobrevivência do Controle exibir uma média elevada, neste caso de 100% e ausência de desvios (Fig. 7).

Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos biorremediativos e o Controle aos 60 dias e, ao final do período de biorremediação, aos 90 dias (Fig. 7; Tab.1). Em ambos os períodos, as diferenças entre os tratamentos e o Controle variaram de 5 a 10%, com valor mínimo de 86% para o tratamento NPK e máximo de 96% para o Controle.

5.2.2.2. *Fecundidade*

Os dados de fecundidade total das fêmeas de *Tisbe biminiensis*, alcançados a partir da contagem de indivíduos produzidos, estão na figura 7. Durante todo o período de biorremediação, exceto aos 45 dias, a fecundidade apresentou as médias dos tratamentos Atenuação Natural, NPK e OSMOCOTE significativamente inferiores ao Controle (Fig. 7; Tab.1). Pôde-se observar que o efeito sub-letal notado ao longo do experimento demonstrou um padrão de resposta do primeiro ao 15º dia, no qual o tratamento NPK apresentou médias aparentemente inferiores aos demais tratamentos neste período. Nota-se também uma tendência de aumento na fecundidade total ao longo do experimento até o dia 60, o que indica uma redução de toxicidade sub-letal nos 3 tratamentos.

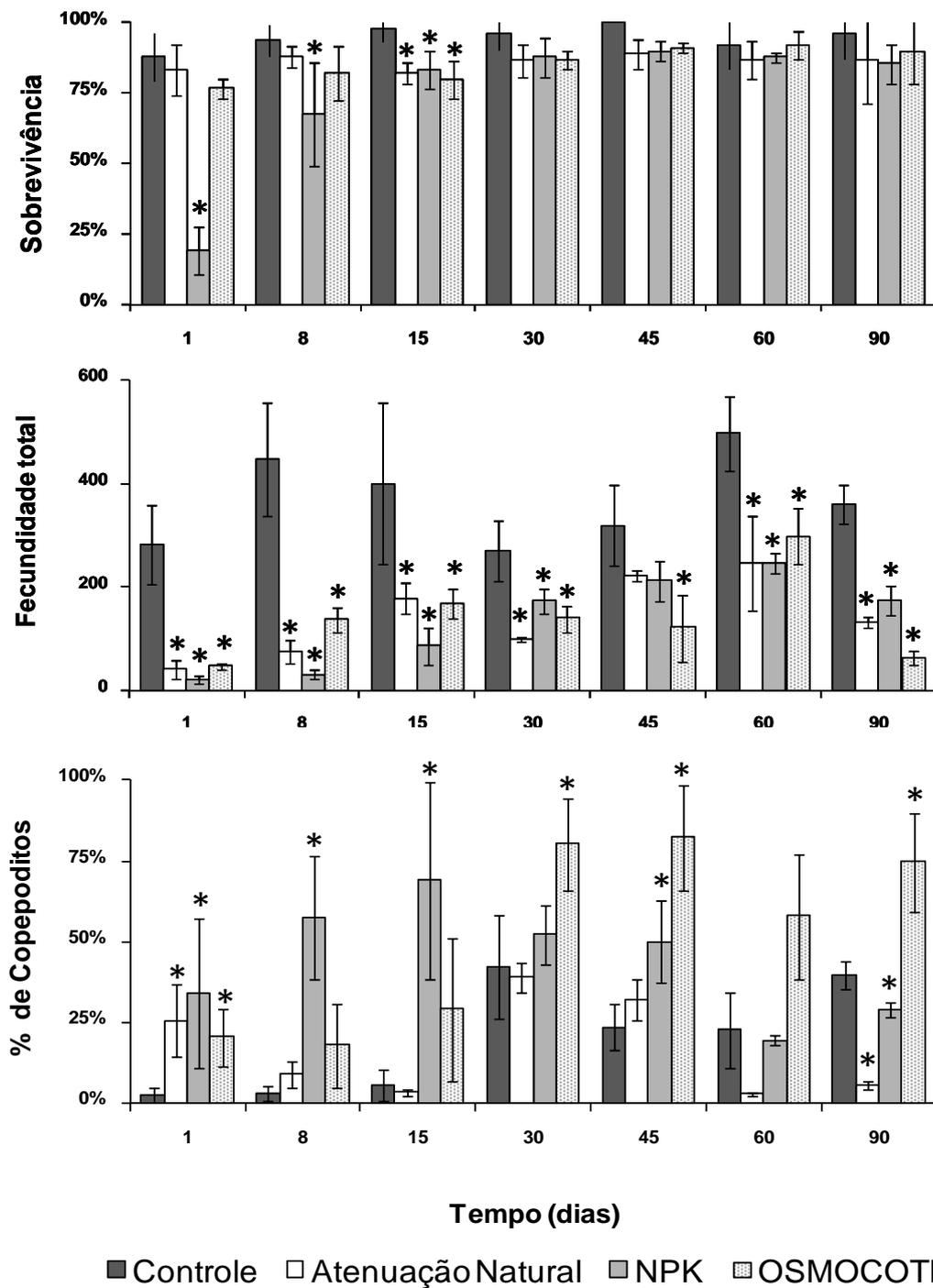


Figura 7 - Médias (\pm desvio padrão) da sobrevivência, fecundidade total (náuplios + copepoditos) e percentual de copepoditos da espécie *Tisbe biminiensis* quando exposto aos tratamentos de biorremediação (estuário do rio São Paulo) e Controle ao longo do tempo. O símbolo * acima das barras indica diferenças significativas em relação ao Controle em cada tempo experimental (ANOVA: Dunnet ; Kruskal Wallis :Dunn; $p < 0,05$).

Tabela 1 - Diferenças entre os tratamentos de biorremediação (estuário do rio São Paulo) e Controle em relação à sobrevivência, fecundidade e percentual de copepoditos ao longo do tempo. No caso de variâncias desiguais, foi realizada transformação dos dados para $\log_{10}^{(*)}$. Persistindo a desigualdade, foi utilizado Kruskal-Wallis. Testes *a posteriori*: Dunnet (ANOVA) e Dunn (Kruskal-Wallis), ambos $p < 0,05$; onde: ^aControle \neq Atenuação natural; ^bControle \neq NPK; ^cControle \neq OSMOCOTE; ^dAtenuação natural \neq OSMOCOTE; ^xDiferença não detectada. Valores em negrito representam diferenças significativas.

Parâmetro	Tempo (dias)	F (ANOVA)	p	Kruskal-Wallis (p)
Sobrevivência	1	56,3776	< 0,0001^b	-
	8	4,1987	0,0362^b	-
	15	8,9208	0,0039^{a,b,c}	-
	30	2,9574	0,0839	-
	45	-	-	0,0198^x
	60	0,6455	0,6059	-
	90	1,4943	0,2748	-
Fecundidade	1	49,7827 ^(*)	< 0,0001^{a,b,c}	-
	8	59,8928 ^(*)	< 0,0001^{a,b,c}	-
	15	10,6783 ^(*)	0,0022^{a,b,c}	-
	30	24,831 ^(*)	0,0002^{a,b,c}	-
	45	7,1836	0,0077^c	-
	60	13,718	0,001^{a,b,c}	-
	90	79,3592	< 0,0001^{a,b,c}	-
% Copepodito	1	10,4446 ^(*)	0,0024^{a,b,c}	-
	8	6,9988 ^(*)	0,0084^b	-
	15	6,6596 ^(*)	0,0097^b	-
	30	7,0366	0,0082^c	-
	45	20,5586	0,0003^{b,c}	-
	60	-	-	0,0143^d
90	150,1887 ^(*)	< 0,0001^{a,b,c}	-	

5.2.2.3. Percentual de copepoditos

O percentual de copepoditos foi significativamente diferente para todos os tratamentos em relação ao Controle no bioensaio realizado com os sedimentos 1 dia após o início da simulação de biorremediação (Fig. 7; Tab.1). Todos os tratamentos, neste bioensaio, apresentaram percentuais superiores a 20% enquanto no Controle a porcentagem média foi inferior a 3%.

Apenas os sedimentos que tiveram adição de NPK apresentaram o percentual de copepoditos significativamente diferente em relação ao Controle aos 8 e 15 dias de biorremediação (Fig. 7; Tab.1). Os valores médios de 57% aos 8 dias e 69% aos 15 dias para este tratamento foram significativamente elevados quando comparados ao Controle, com média inferior a 5% em ambos períodos.

Aos 30 dias de biorremediação, apenas o tratamento OSMOCOTE apresentou percentuais significativamente diferentes do Controle (Fig. 7; Tab.1), sendo observada média de 81% neste tratamento e apenas 42% no Controle.

O percentual de copepoditos observado nos tratamentos NPK e OSMOCOTE foi significativamente superior ao Controle aos 45 dias de biorremediação (Fig. 7; Tab.1).

Não houve diferenças significativas no percentual de copepoditos entre os tratamentos biorremediativos e o Controle aos 60 dias de experimento (Fig. 7; Tab.1). Entretanto, foi observada superioridade significativa entre os valores dos tratamentos OSMOCOTE e Atenuação Natural, sendo a diferença entre os mesmos de aproximadamente 55%.

Ao término dos 90 dias de biorremediação, o percentual de copepoditos foi significativamente inferior nos tratamentos NPK e Atenuação Natural em relação ao Controle. Já no tratamento OSMOCOTE o percentual de copepoditos foi significativamente superior em relação ao Controle, tendo valores médios de 75% (Fig. 7; Tab.1).

Observa-se uma grande variação neste parâmetro mesmo nos controles, já que de 1 a 15 dias o percentual foi bem menor que após 30 dias de experimento.

5.2.2.4. Avaliação de inorgânicos e carbono orgânico total (COT) no sedimento

As análises de amônia, fósforo, percentual de nitrogênio total, nitrato e carbono orgânico total foram realizados no sedimento inicial homogeneizado e nos sedimentos sujeitos aos tratamentos do primeiro ao 60º dia de biorremediação. Os resultados destas análises estão expostos na tabela 2.

A amostragem efetuada no estuário do rio São Paulo antes da adição dos fertilizantes revelou uma concentração média de amônia de $2,36 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{kg}^{-1}$. No momento seguinte à adição do fertilizante NPK, o valor médio para este tratamento elevou-se para $323,5 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{kg}^{-1}$. A partir dos 8 dias de biorremediação foi observada uma tendência à redução das concentrações de amônia, esta persistiu até o término do período de estudo para o tratamento com NPK, quando a concentração foi de apenas $8,8 \text{ mg N-NH}_4^+ \cdot \text{kg}^{-1}$.

No tratamento utilizando o fertilizante de liberação lenta, o OSMOCOTE, foi observada grande oscilação nas concentrações de amônia ao longo do tempo, sendo o valor mínimo observado aos 8 dias e máximo aos 30 dias após o início do tratamento. Neste intervalo de tempo, o tratamento OSMOCOTE apresentou valores de amônia inferiores em relação ao tratamento NPK. O tratamento Atenuação Natural exibiu pouca variação nas concentrações de amônia, entretanto, em todas as coletas apresentou valores superiores em relação ao momento da avaliação inicial.

O valor médio observado para o fósforo na primeira avaliação após a adição do fertilizante NPK foi aproximadamente seis vezes superior ao resultado obtido no sedimento inicial homogeneizado. Estes valores foram reduzindo gradativamente ao longo do período de experimento, sendo o valor máximo de $171,4 \text{ mg. kg}^{-1}$ de fósforo no primeiro dia chegando à $146,3 \text{ mg. kg}^{-1}$ após 60 dias do início de biorremediação. Os sedimentos que receberam OSMOCOTE apresentaram valores crescentes de fósforo, uma vez que a liberação do pentóxido de fósforo (P_2O_5) é gradativa. O composto teve aparente acúmulo ao longo do tempo. Os sedimentos sujeitos apenas à atenuação natural mantiveram as concentrações de fósforo estáveis, variando em apenas 1 mg. kg^{-1} para mais ou para menos durante todo o período da simulação de biorremediação.

De forma geral, o carbono orgânico total apresentou variação mínima, o valor médio para todos os tratamentos foi $4,7\% (\pm 0,1)$ em todas as coletas analisadas.

O percentual de nitrogênio total foi elevado de $0,09$ para $0,14\%$ logo após a adição do fertilizante NPK. Os valores reduziram gradativamente ao longo do tempo, chegando a $0,08\%$ após 60 dias. Na primeira coleta após a adição de OSMOCOTE, os sedimentos apresentaram concentração de nitrogênio total superior em apenas $0,003\%$ do observado antes da adição do fertilizante. Neste tratamento, os valores oscilaram entre $0,08$ e $0,10\%$ ao longo do tempo. O sedimento proveniente do tratamento Atenuação Natural apresentou comportamento semelhante ao OSMOCOTE em relação ao nitrogênio total, sem oscilações acentuadas e mesma faixa de variação percentual.

O nitrato, assim como o fósforo e a amônia, teve a concentração fortemente elevada após a adição do NPK. A concentração observada nos sedimentos inicialmente homogeneizados apresentou média de $2,01 \text{ mg (N-NO}_3\text{). kg}^{-1}$ e no momento após a adição do fertilizante alcançou média de $265,5 \text{ mg (N-NO}_3\text{). kg}^{-1}$, entretanto, aos 60 dias a concentração observada foi de apenas $9,73 \text{ mg (N-NO}_3\text{). kg}^{-1}$.

Os valores de nitrato obtidos no tratamento OSMOCOTE foram inferiores em relação aos observados no NPK. No momento após a adição, a concentração foi cerca de 10 vezes maior, se mantendo relativamente estável ao longo do tempo, exceto aos 30 dias, quando houve novo aumento. Vale ressaltar que neste período, também foi observada concentração elevada de amônia para o tratamento OSMOCOTE, o que sugere uma maior liberação dos compostos que são fontes de amônia e nitrato neste fertilizante.

No sedimento que não recebeu nenhum tipo de fertilizante, a concentração de nitrato foi substancialmente inferior em relação aos demais. A concentração de nitrato

em Atenuação Natural superou a média verificada no sedimento inicial homogeneizado em no máximo 6,5 mg (N-NO₃). kg⁻¹ após 30 dias do início da simulação de biorremediação.

Tabela 2 - Concentrações de amônia, fósforo, carbono orgânico total (COT), percentual de nitrogênio total e nitrato nos sedimentos do estuário do rio São Paulo no sedimento inicial homogeneizado e nos três tratamentos ao longo do período de biorremediação. Fonte: RECUPETRO, 2009.

Tratamento	Tempo (dias)	Amônia (mg N-NH ₄ ⁺ Kg ⁻¹)	Fósforo (mg Kg ⁻¹)	C.O. (%)	Nitrogênio Total (%)	Nitrato (mg N-NO ₃ ⁻ Kg ⁻¹)
NPK	0 (Inicial)	2,36	29,0	4,698	0,095	2,01
	1	323,51	171,4	4,481	0,140	265,548
	8	285,28	161,8	4,673	0,119	243,981
	15	236,76	157,1	4,620	0,126	211,001
	30	91,20	160,2	4,598	0,100	104,193
	45	8,80	154,4	5,249	0,081	9,000
	60	8,80	146,3	4,820	0,080	9,732
OSMOCOTE	0 (Inicial)	2,36	29,0	4,698	0,095	2,006
	1	20,57	34,0	4,602	0,098	20,563
	8	13,14	36,3	4,482	0,085	15,761
	15	31,67	45,7	4,758	0,096	31,872
	30	58,12	69,3	4,780	0,104	62,401
	45	24,00	85,3	4,991	0,088	27,000
	60	24,70	100,6	5,157	0,080	27,337
Atenuação Natural	0 (Inicial)	2,36	29,0	4,698	0,095	2,006
	1	3,38	31,6	4,065	0,102	3,659
	8	3,38	32,0	4,555	0,088	3,241
	15	6,33	32,0	4,296	0,093	5,914
	30	3,98	32,7	4,333	0,087	8,496
	45	5,00	30,7	5,185	0,084	7,000
	60	5,76	32,1	4,707	0,080	7,615

5.2.2.5. Análises de correlação

As análises de correlação de Pearson detectaram a presença de forte correlação significativa negativa entre a sobrevivência com nitrogênio total (%) e moderada da sobrevivência com a amônia e o nitrato nos sedimentos sujeitos à biorremediação com fertilizantes (Tab. 3).

Assim como a sobrevivência, a fecundidade também esteve correlacionada significativa e negativamente com o nitrogênio total, sendo esta correlação de grau moderado. A fecundidade também apresentou correlação significativa com o carbono orgânico total, sendo esta positiva e de grau moderado (Tab. 3).

Em relação ao percentual de copepoditos, foram detectadas correlações positivas significativas de grau moderado com o fósforo e o nitrato contido nos sedimentos sujeitos à biorremediação com fertilizantes (Tab. 3).

Tabela 3 - Resultados da análise de correlação de Pearson (r) dos parâmetros de toxicidade (sobrevivência, fecundidade e percentual de copepoditos) com os compostos inorgânicos (Amônia, Fósforo, Nitrogênio Total e Nitrato) e carbono orgânico total (COT) nos sedimentos do estuário do rio São Paulo ao longo do tempo. Valores em negrito representam correlações significativas, sendo *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Parâmetros	Sobrevivência	Fecundidade	% Copepodito
Amônia	-0.683**	-0.396	0.400
Fósforo	-0.285	0.086	0.558**
Nitrogênio Total (%)	-0.759***	-0.656**	0.288
Nitrato	-0.641**	-0.372	0.442*
COT (%)	0.290	0.570**	0.381

5.3. Baía de Suape

5.3.1.1. Toxicidade observada no processo de biorremediação utilizando Biossurfactante

5.3.1.2. Sobrevivência

As amostras analisadas no presente trabalho contemplam os tempos 0, 21, 45, 62 e 111 dias de simulação de biorremediação com o sedimento coletado na baía de Suape. Os dados obtidos em relação à sobrevivência mostram a inexistência de efeito letal entre os tratamentos durante o período de biorremediação para o sedimento da camada superficial (Fig. 8; Tab. 4).

Embora a sobrevivência tenha apresentado diferenças significativas nos sedimentos de meio e fundo aos 45 dias de biorremediação, o teste *a posteriori* não identificou estas diferenças (Fig. 8; Tab. 4). De forma geral, não houve efeito letal aos 45 dias de tratamento, uma vez que todos os valores estiveram acima do Controle.

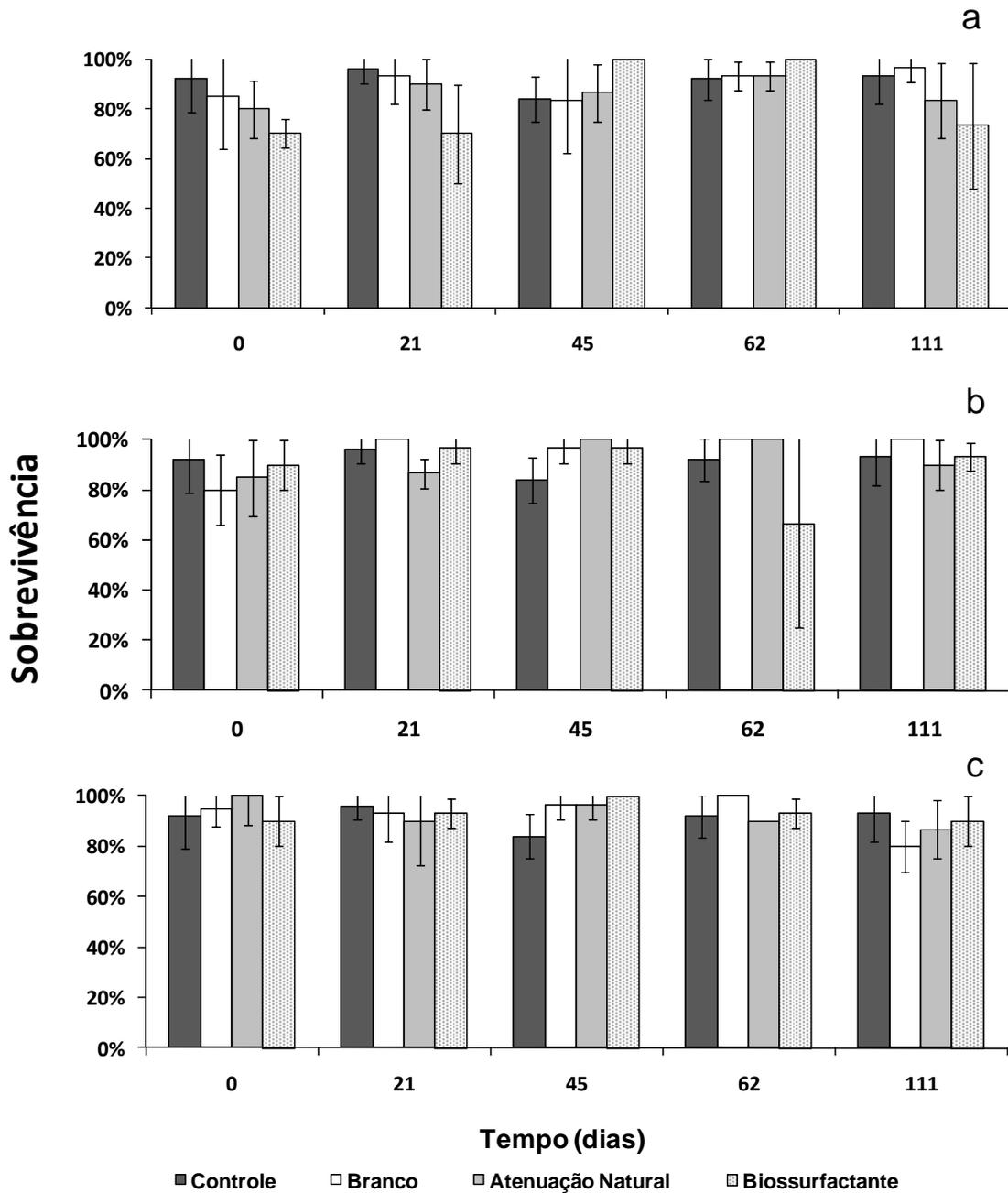


Figura 8 - Sobrevivência média (\pm desvio padrão) da espécie *Tisbe biminiensis* quando exposta aos tratamentos de biorremediação nas três profundidades analisadas (baía de Suape) (onde: a) superfície, b) meio e c) fundo) e Controle ao longo do tempo. O símbolo * acima das barras indica diferenças significativas em relação ao Controle em cada tempo experimental (ANOVA: Dunnet ; Kruskal Wallis :Dunn; $p < 0,05$).

Tabela 4 - Diferenças em relação à sobrevivência entre os tratamentos de biorremediação nas três profundidades analisadas (baía de Suape) e Controle ao longo do tempo. No caso de variâncias desiguais, foi realizada transformação dos dados para $\log_{10}^{(*)}$. Persistindo a desigualdade, foi utilizado Kruskal-Wallis. Testes *a posteriori*: Dunnet (ANOVA) e Dunn (Kruskal-Wallis), ambos $p < 0,05$; onde: ^xDiferença não detectada. Valores em negrito representam diferenças significativas.

Profundidade	Tempo (dias)	F (ANOVA)	p	Kruskal-Wallis (p)
Superfície	0	1,895	0,194	-
	21	3,329	0,065	-
	45	1,336	0,317	-
	62	1,045	0,415	-
	111	1,16	0,373	-
Meio	0	0,6229	0,6189	-
	21	-	-	0,0816
	45	-	-	0,0341^x
	62	-	-	0,1329
	111	-	-	0,3465
Fundo	0	0,0615	0,9785	-
	21	0,2155	0,8833	-
	45	-	-	0,0341^x
	62	-	-	0,1743
	111	0,4326	0,7368	-

5.3.1.3. Fecundidade

As médias de fecundidade total estão expostas na figura 9. Os sedimentos nos quais foi adicionado óleo diesel apresentaram redução significativa da fecundidade na camada superficial na primeira coleta antes da adição do biossurfactante (Tab. 5).

Ainda na camada de superfície, observou-se redução significativa da fecundidade aos 21 dias, após a adição do biossurfactante (Tab. 5). Neste intervalo de tempo, o tratamento com o biossurfactante apresentou uma produção média de 6 descendentes, enquanto os demais tratamentos exibiram valores cerca de 20 a 60 vezes mais elevados (Fig. 9).

Ainda aos 21 dias e na camada de superfície, o tratamento Atenuação Natural deixou de ser inferior ao Controle, passando a ser significativamente superior aos 45 dias de biorremediação, tanto nos sedimentos de superfície quanto nos de fundo, sendo as médias deste tratamento aproximadamente o dobro das médias obtidas no Controle (Fig. 9).

Ao fim dos 111 dias, a fecundidade foi significativamente diferente nos sedimentos superficiais, entretanto o teste *a posteriori* não apontou as diferenças dos tratamentos em relação ao Controle (Tab. 5). Neste mesmo intervalo de tempo, o tratamento com biossurfactante na camada intermediária apresentou fecundidade significativamente superior ao Controle.

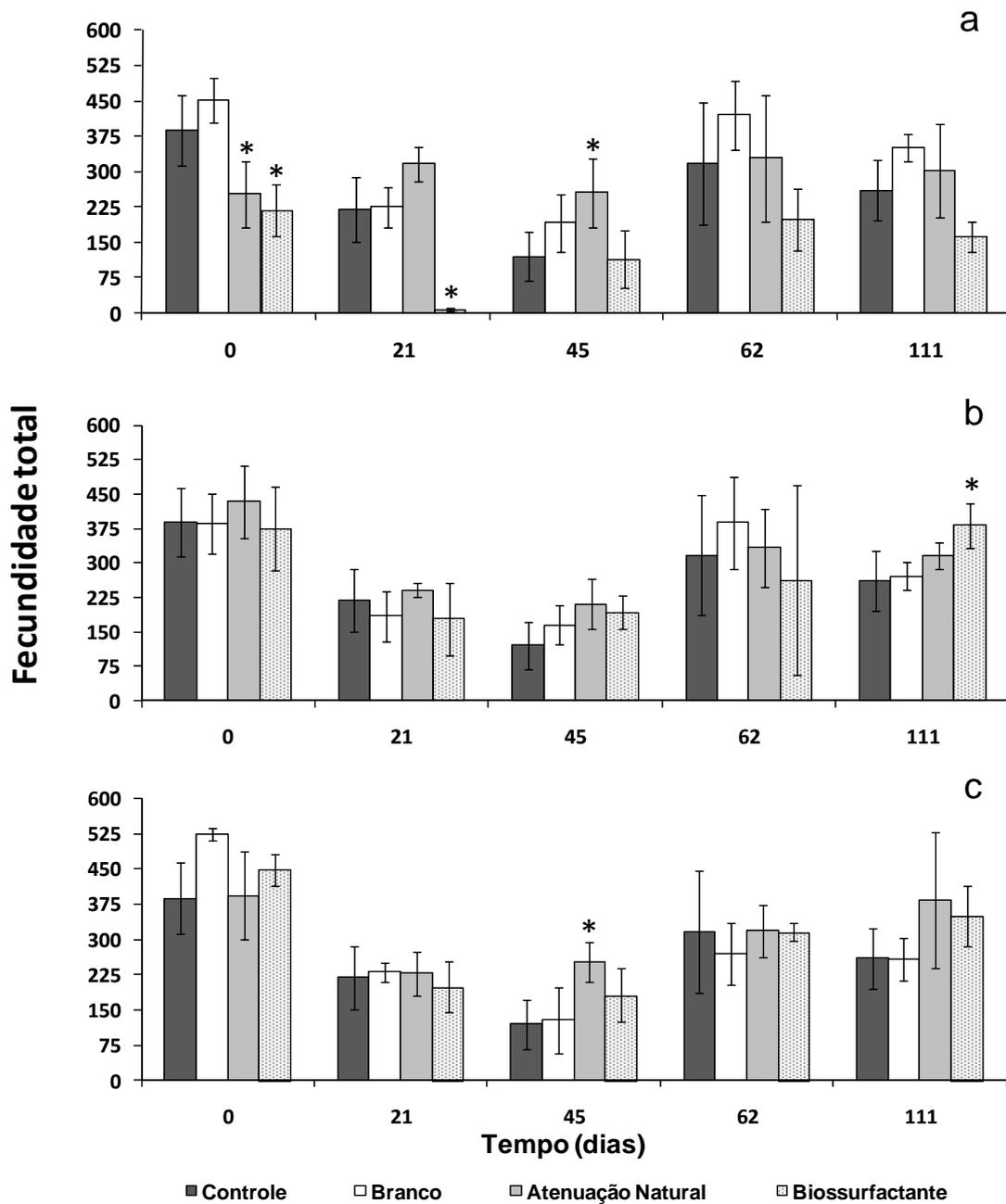


Figura 9 - Médias (\pm desvio padrão) da fecundidade total (náuplios + copepodites) da espécie *Tisbe biminiensis* quando exposta aos tratamentos de biorremediação nas três profundidades analisadas (baía de Suape) (onde: a) superfície, b) meio e c) fundo) e Controle. O símbolo * acima das barras indica diferenças significativas em relação ao Controle em cada tempo experimental (ANOVA: Dunnet ; Kruskal Wallis :Dunn; $p < 0,05$).

Tabela 5 - Diferenças (ANOVA) em relação à fecundidade total entre os tratamentos de biorremediação nas três profundidades analisadas (baía de Suape) e Controle ao longo do tempo. No caso de variâncias desiguais, foi realizada transformação dos dados para $\log_{10}^{(*)}$. Teste *a posteriori*: Dunnet, $p < 0,05$; onde: ^aControle \neq Atenuação natural; ^bControle \neq Biossurfactante; ^xDiferença não detectada. Valores em negrito representam diferenças significativas.

Profundidade	Tempo (dias)	F (ANOVA)	p
Superfície	0	8,4473	0,0047^{a,b}
	21	107,1061 ^(*)	<0,0001^b
	45	3,979	0,0416^a
	62	2,029	0,174
	111	5,4677	0,0175^x
Meio	0	0,2089	0,8878
	21	0,7428	0,5527
	45	2,6354	0,1069
	62	0,4254	0,7416
	111	6,3834	0,0111^b
Fundo	0	2,7865	0,0953
	21	0,2107	0,8866
	45	4,0584	0,0395^a
	62	0,2193	0,8808
	111	2,6289	0,1074

5.3.1.4. Percentual de Copepoditos

O percentual dos indivíduos que alcançou o estágio de copepodito é mostrado na figura 10. Os sedimentos da camada superficial das colunas demonstraram valores de percentual de copepoditos significativamente superiores em relação ao Controle no momento seguinte à adição do óleo diesel (Tab. 6). Nas camadas do meio e do fundo todos os tratamentos apresentaram valores significativamente mais elevados que o Controle, inclusive o sedimento do tratamento Branco, que não recebeu óleo (Tab. 6).

Aos 21 dias de biorremediação, apesar de serem observadas diferenças significativas quanto ao percentual de copepoditos nos sedimentos de superfície, estas diferenças não puderam ser identificadas pelo teste *a posteriori* (Tab. 6). As demais profundidades não apresentaram diferenças significativas em relação aos tratamentos aos 21 dias (Tab. 6). De forma geral, os valores observados neste parâmetro nos sedimentos de meio e fundo dos tratamentos que receberam óleo diesel foram visivelmente inferiores em relação aos observados em superfície.

O percentual de copepoditos foi significativamente superior no tratamento Biossurfactante após 45 dias no sedimento de superfície (Tab. 6). O sedimento da camada do meio apresentou diferenças significativas, porém estas diferenças não foram identificadas. Ainda assim, este resultado não é representativo, considerando que os tratamentos variaram entre a ausência de copepoditos e médias inferiores à 1%. O

sedimento retirado do fundo das colunas neste período não causou efeito significativo em relação ao percentual de desenvolvimento dos indivíduos (Tab. 6).

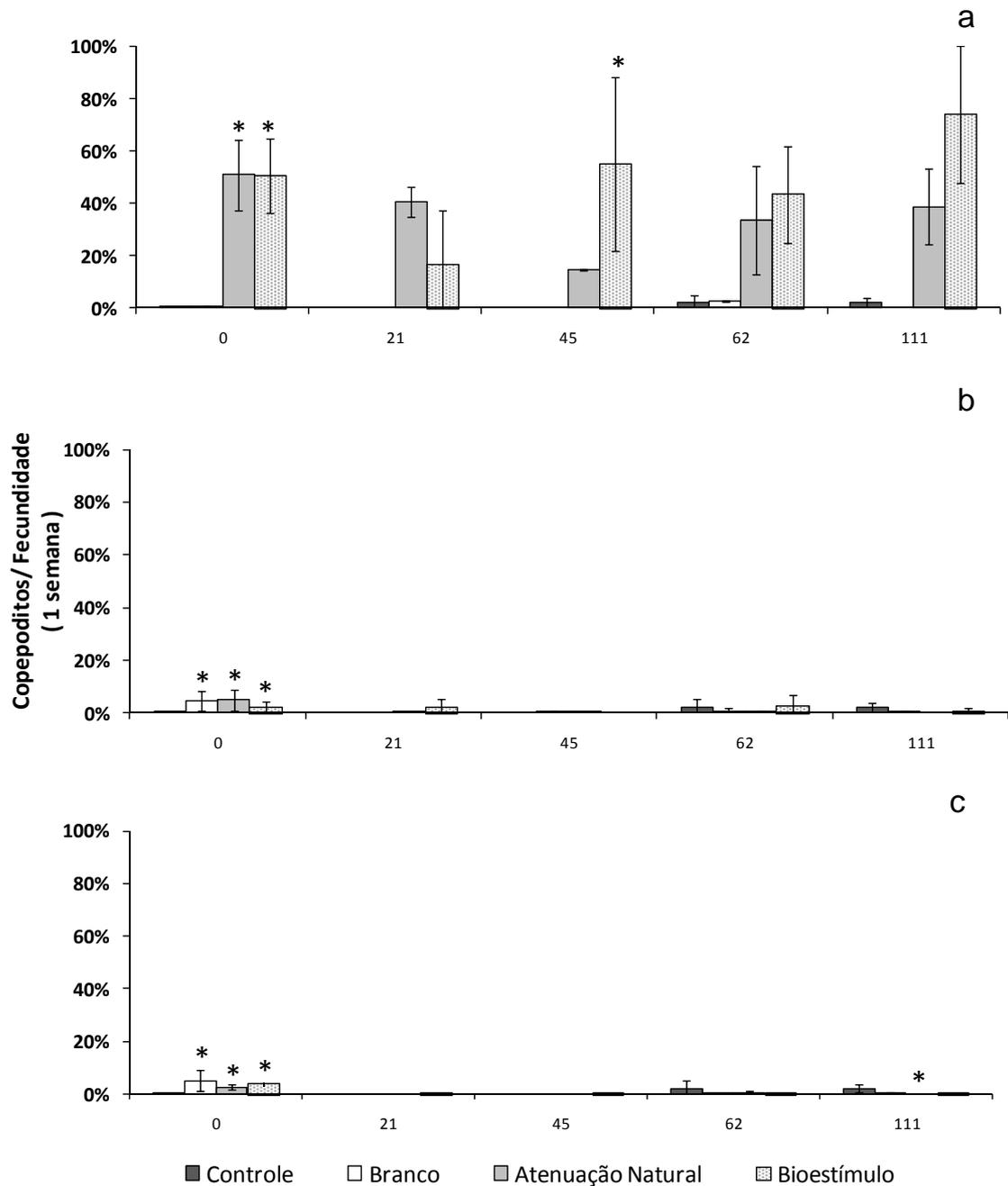


Figura 10 - Médias (\pm desvio padrão) do percentual de copepoditos (número de copepoditos/total de descendentes*100) da espécie *Tisbe biminiensis* quando exposta aos tratamentos de biorremediação nas três profundidades analisadas (baía de Suape) (onde: a) superfície, b) meio e c) fundo) e Controle. O símbolo * acima das barras indica diferenças significativas em relação ao Controle em cada tempo experimental (ANOVA: Dunnet; Kruskal Wallis: Dunn; $p < 0,05$).

Tabela 6 - Diferenças em relação ao percentual de copepoditos entre os tratamentos de biorremediação nas três profundidades analisadas (baía de Suape) e Controle ao longo do tempo. No caso de variâncias desiguais, foi realizada transformação dos dados para $\log_{10}(\cdot)$. Persistindo a desigualdade, foi utilizado Kruskal-Wallis. Testes *a posteriori*: Dunnet (ANOVA) e Dunn (Kruskal-Wallis), ambos $p < 0,05$; onde: ^aControle \neq Atenuação natural; ^bControle \neq Bioestímulo; ^cControle \neq Branco; ^dBioestímulo \neq Branco; ^xDiferença não detectada. Valores de em negrito representam diferenças significativas.

Profundidade	Tempo (dias)	F (ANOVA)	p	Kruskal-Wallis (p)
Superfície	0	39,5338	<0,0001^{a,b}	-
	21	-	-	0,0499^x
	45	-	-	0,0150^b
	62	-	-	0,0151^d
	111	-	-	0,0077^d
Meio	0	27,3076 ^(*)	0,0001^{a,b,c}	-
	21	-	-	0,7828
	45	-	-	0,0499^x
	62	0,4493	0,726	-
	111	-	-	0,0428^x
Fundo	0	77,8244 ^(*)	<0,0001^{a,b,c}	-
	21	-	-	0,8653
	45	-	-	0,8653
	62	1,4964 ^(*)	0,2743	-
	111	-	-	0,0206^a

Não foram encontradas diferenças significativas no percentual de copepoditos dos tratamentos Branco, Atenuação Natural e Biossurfactante em relação ao Controle nas três profundidades de sedimento aos 62 dias de biorremediação (Tab. 6). Todavia, neste período o percentual de copepoditos no tratamento Biossurfactante foi significativamente superior ao observado no tratamento Branco na camada de superfície (Tab. 6).

Após 111 dias de biorremediação, os sedimentos da camada de superfície não causaram efeito no percentual do copepoditos em relação ao Controle, sendo novamente observados valores significativamente superiores no tratamento Biossurfactante em relação ao Branco (Tab. 6). Foi verificada a existência de diferenças significativas nos sedimentos da camada do meio neste período, entretanto não foi possível identificar estas diferenças entre os tratamentos pelo teste de Dunn (Tab. 6). Os sedimentos do fundo exibiram, aos 111 dias, diferenças significativas entre os tratamentos, tendo o tratamento Atenuação Natural diferido do Controle para menos.

5.3.1.5. Análises de correlação com HPAs no sedimento

Foram observadas correlações significativamente negativas da sobrevivência das fêmeas com os hidrocarbonetos Fluoreno, Fluoranteno, Pireno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(g,h,i)perileno presentes nos sedimentos, sendo todas em grau moderado (Tab. 7).

Em relação à fecundidade, as análises detectaram correlações significativas negativas de grau moderado com os hidrocarbonetos Acenafteno, Fenantreno, Antraceno, Benzo(a)antraceno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno, Benzo(g,h,i)perileno e com o total dos HPAs (Tab. 7), indicando relação destes hidrocarbonetos com os efeitos observados neste parâmetro.

O percentual de copepoditos apresentou correlações positivas significativas com todos os hidrocarbonetos pesquisados, exceto o Acenaftileno (Tab. 7). As correlações deste parâmetro de toxicidade foram de grau forte com os compostos Fenantreno, Antraceno, Benzo(a)antraceno, Indeno(1,2,3-cd)pireno e com o total destes HPAs e foram de grau moderado com o Naftaleno, Acenafteno, Fluoreno, Fluoranteno, Pireno, Criseno, Benzo(b)fluoranteno, o Benzo(k)fluoranteno, o Benzo(a)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno e o Benzo(g,h,i)perileno (Tab. 7).

Tabela 7 - Resultados da análise de correlação de Pearson (r) entre os parâmetros de toxicidade (sobrevivência, fecundidade e percentual de copepoditos) e os HPAs nos sedimentos da baía de Suape ao longo do tempo. Valores de em negrito representam correlações significativas, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Parâmetros	Sobrevivência	Fecundidade	% Copepodito
Naftaleno	-0.153	-0.332	0.669***
Acenaftileno	-0.087	-0.166	0.296
Acenafteno	-0.035	-0.363*	0.590**
Fluoreno	-0.392*	-0.341	0.559**
Fenantreno	-0.254	-0.423*	0.741***
Antraceno	-0.213	-0.371*	0.763***
Fluoranteno	-0.445*	-0.164	0.483**
Pireno	-0.398*	-0.339	0.678***
Benzo(a)antraceno	-0.170	-0.380*	0.775***
Criseno	-0.298	-0.214	0.609***
Benzo(b)fluoranteno	-0.041	-0.343	0.632***
Benzo(k)fluoranteno	-0.533**	-0.350	0.665***
Benzo(a)pireno	0.097	-0.171	0.494**
Indeno(1,2,3-cd)pireno	-0.255	-0.375*	0.768***
Dibenzo(a,h)antraceno	-0.305	-0.435*	0.682***
Benzo(g,h,i)perileno	-0.380*	-0.421*	0.668***
Total	-0.253	-0.400*	0.709***

6. DISCUSSÃO

6.1. Estuário do rio São Paulo

6.1.1. Caracterização da toxicidade do sedimento inicial

A ausência de efeito letal nos sedimentos do estuário do rio São Paulo testados inicialmente após homogeneização pode ser justificada pela composição de hidrocarbonetos alifáticos nestes sedimentos, reportada por Lima (2010). Segundo este autor, estes sedimentos apresentaram baixos valores de abundância relativa de n-alcenos de alto peso molecular e ausência n-alcenos de baixo peso molecular, resultados que indicam um processo de biodegradação do óleo no substrato do estuário. Este processo de atenuação natural nos sedimentos da área pode estar promovendo a redução da toxicidade dos mesmos. Também com base na análise dos hidrocarbonetos alifáticos, Veiga *et al.* (2008) confirmam os indícios acerca do grau avançado de degradação na região.

Embora não tenham causado efeitos letais, as baixas concentrações de n-alcenos de alto peso molecular podem ter sido responsáveis pela redução da fecundidade observada no presente estudo. Esta suposição baseia-se no fato de que as respostas sub-letais são manifestadas em concentrações muito inferiores às capazes de causar letalidade e, por isso, frequentemente são mais sensíveis, conforme observado por alguns autores (LOTUFO, 1997; LOTUFO, 1998; BARATA *et al.*, 2002; BELLAS & THOR, 2007). Bejarano & Chandler (2004), expondo o copépodo bentônico *Amphiascus tenuiremis* a sedimentos de áreas adjacentes a atividades impactantes, demonstrou que os parâmetros reprodutivos foram bem sensíveis, tendo ocorrido uma diminuição significativa na produção de indivíduos nos bioensaios. Em acordo com estes estudos, o decréscimo acentuado observado na fecundidade no momento da caracterização demonstra a sensibilidade deste parâmetro, ecologicamente relevante, na avaliação da contaminação dos sedimentos estuarinos.

Os sedimentos do estuário do rio São Paulo detêm um grande aporte de matéria orgânica advinda de fontes como vegetais superiores (manguezal), derrames acidentais de óleo ou mesmo devido ao do lançamento de esgotos domésticos e industriais, que acentuam o grau de eutrofização da área (CELINO *et al.*, 2008). Estas condições produzem um ambiente com grande disponibilidade de alimento, o que favorece os copépodos harpacticóides. Os organismos desta ordem são capazes de utilizar uma grande variedade de recursos alimentares, de diatomáceas e detritos a bactérias e fungos (HICKS & COULL, 1983), sendo os indivíduos do gênero *Tisbe* considerados

indicadores de enriquecimento orgânico (COULL & CHANDLER, 1992). Essas características permitem inferir que tais condições possam ter favorecido o desenvolvimento dos náuplios e, possivelmente, justificam o aumento observado no percentual de copepoditos nos sedimentos desta área.

6.1.2. Toxicidade observada no processo de biorremediação utilizando fertilizantes (Bioestímulo)

Lima (2010), com base na degradação dos n-alcanos ao longo do experimento de biorremediação com os sedimentos do estuário do rio São Paulo, sugere que o tratamento com NPK foi o mais eficiente. Contudo, este tratamento foi o que apresentou maior grau de toxicidade no presente estudo.

Segundo Boyd (1998), a tolerância dos organismos aquáticos à amônia varia de espécie para espécie, com os níveis de estresse e com os fatores ambientais. O autor afirma que níveis elevados de amônia na água inibem a excreção desta substância e, conseqüentemente, elevam as concentrações de amônia no tecido dos organismos. Em decorrência deste evento, ocorre elevação do pH nestes organismos, ocasionando diversas reações enzimáticas desencadeadoras de efeitos tóxicos. Araújo (2005) observou letalidade em 50% dos indivíduos de *T. biminiensis* quando expostos a uma faixa de concentração variando de 34 mg. L⁻¹ a 49,48 mg. L⁻¹ de N-NH₄⁺ em solução aquosa por 96 horas. No presente estudo as concentrações de N-NH₄⁺ no sedimento nas coletas que apresentaram efeitos letais, foram de 323,51 e 285,28 mg. kg⁻¹ de N-NH₄⁺ para o 1º e 8º dia de experimento, respectivamente. Apesar das restrições na comparação de uma matriz aquosa a uma sedimentar, é razoável a observação das concentrações obtidas no presente estudo em relação aos efeitos observados na espécie, indicando que os efeitos observados podem estar relacionados às elevadas concentrações de amônia total ionizada (N-NH₄⁺) observadas neste período.

Altas concentrações de nitrogênio provocam desequilíbrio ambiental e parecem estar associadas a dois dos principais problemas em ambientes costeiros, uma vez que: a) podem prejudicar as funções fisiológicas que comprometem o desenvolvimento saudável e reprodução das espécies, como excreção e controle do pH sanguíneo (BOYD, 1998; CAMARGO & ALONSO, 2006) e; b) podem estimular a proliferação e manutenção de produtores primários, resultando na eutrofização dos ecossistemas marinhos costeiros e estuarinos, podendo provocar inclusive bloom de espécies de algas tóxicas (CAMARGO & ALONSO, 2006). No presente estudo, a toxicidade letal

observada no 1º e 8º dia após a introdução do fertilizante NPK pode ter sido um efeito direto do nitrogênio, assim como citado no problema (a), uma vez que o nitrogênio inorgânico pode ser altamente tóxico quando em contato com os organismos. Contudo, a possibilidade de um efeito indireto, a partir do consumo de algas tóxicas, como em (b), é reduzida, uma vez que a toxicidade letal começou a ser observada 24 horas após a adição dos fertilizantes, tempo inferior ao necessário para ocorrer um bloom destas espécies. Como as formas mais comuns do nitrogênio inorgânico (forma reativa) encontradas em ecossistemas aquáticos são a amônia ionizada (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), a letalidade pode ser justificada pelas elevadas concentrações de amônia total ionizada (N-NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) observadas neste período. A confirmação da relação inversa da sobrevivência com o percentual de nitrogênio total, amônia e nitrato contido nestes sedimentos, através das correlações de Pearson, permitiram a avaliação do impacto dos tratamentos com fertilizantes sobre este parâmetro de toxicidade no copépodo utilizado.

Segundo a ISO 14669 (1999), nos testes de toxicidade aguda com copépodos, uma queda na sobrevivência de no máximo 20% no controle é considerada normal. Nos resultados do presente estudo, embora o tratamento com NPK tenha demonstrado sobrevivência significativamente inferior ao controle no 15º dia, este resultado não é interpretado como efeito tóxico letal, uma vez que o percentual observado foi superior a 80%. O mesmo pode ser inferido para os tratamentos Atenuação Natural e OSMOCOTE neste período, nos quais também não foram observados efeitos tóxicos letais.

A adição do fertilizante OSMOCOTE, apesar deste ter constituição similar ao fertilizante NPK, não resultou em efeito letal às fêmeas de *Tisbe biminiensis*. Nos primeiros 15 dias, a fecundidade total neste tratamento foi maior do que aquela observada no tratamento NPK, este resultado pode ser devido à liberação mais lenta dos nutrientes, evitando uma alta concentração de compostos nitrogenados.

Similarmente ao presente estudo, Yu *et al.* (2005) estudando a biodegradação dos HPAs fenantreno, fluoranteno e pireno em sedimento de mangue observaram toxicidade mais elevada no tratamento bioestímulo (adição de nutrientes) quando comparado aos tratamentos atenuação natural e bioaumento (adição de consórcio bacteriano). Chagas-Spinelli (2007) comparou diferentes tratamentos para a remediação de solo contaminado com diesel, sendo eles: 1) bioestímulo, utilizando como fonte de N o Nitrato de Amônia (NH_4NO_3) e como fonte de P o Fosfato de Potássio di-básico

(K₂HPO₄); 2) uma combinação de bioestímulo com bioaumento e 3) landfarming (utilizando apenas aeração). Ao fim de 129 dias de biorremediação, o autor observou valores significativamente reduzidos de sobrevivência e fecundidade de *T. biminiensis* nos dois tratamentos com nutrientes. O autor sugere que tenham sido gerados metabólitos tóxicos decorrentes da degradação dos hidrocarbonetos, uma vez que a toxicidade não acompanhou a redução destes contaminantes. A produção destes compostos também é sugerida por Bento *et al.* (2003). Em ambos os trabalhos (YU *et al.*, 2005; CHAGAS-SPINELLI, 2007), não foi observada remoção significativa do somatório dos HPAs pesquisados nos tratamentos com nutrientes.

No decorrer do processo de biorremediação, foi possível notar que a toxicidade letal causada pelos nutrientes desaparece, tornando o tratamento de atenuação natural indiferente ao tratamento com os NPK aos 15 dias de experimento. Porto-Rosa & Triguis (2006) observaram comportamento semelhante da toxicidade ao avaliar sedimentos contaminados com óleo bruto durante a biorremediação com NPK nas mesmas concentrações do presente trabalho. Os autores observaram efeito tóxico do tratamento com NPK sobre a bactéria *Vibrio fischeri* (anteriormente *Photobacterium phosphoreum*) no 2º dia de biorremediação (1ª coleta), quando a CE₅₀-15' foi inferior ao controle. Na coleta seguinte, aos 11 dias após a adição do NPK, este efeito não esteve presente, permanecendo assim até o fim do experimento. Embora o organismo-teste utilizado no presente trabalho seja diferente do utilizado em Porto-Rosa & Triguis (2006), os efeitos tóxicos observados podem ser relacionados. Macken *et al.* (2008) realizaram este tipo de relação comparando o *Vibrio fischeri* ao copépodo *Tisbe battagliai* e à microalga *Tetraselmis suecica* quando expostos a contaminantes orgânicos e observaram maior sensibilidade do copépodo em relação aos demais organismos.

Assim como os efeitos letais, os efeitos deletérios observados na fecundidade no presente estudo, também podem estar relacionados aos compostos nitrogenados, como indicado nas análises de correlação de Pearson para o nitrogênio total. Valores reduzidos de fecundidade no tratamento atenuação natural também podem indicar que as concentrações de contaminantes permaneceram no limiar, sendo capazes de causar estes efeitos sub-letais durante todo o período de biorremediação.

Embora tenha sido notado um gradativo aumento nos valores de fecundidade ao longo do tempo em todos os tratamentos, não houve diferenças substanciais em relação a este parâmetro que justifiquem a adição dos fertilizantes. Este aumento também é um

indicativo que a microbiota autóctone do manguezal do estuário do Rio São Paulo é capaz de degradar os hidrocarbonetos presentes em seus sedimentos.

Como a capacidade de assimilação de nutrientes por parte do meio ambiente é finita, são acumulados altos níveis de compostos inorgânicos nitrogenados (p. ex. amônia e nitrato) no ambiente aquático, derivados de *inputs* antropogênicos. Estas concentrações elevadas, podem gerar efeitos letais e sub-letais aos organismos como observado no presente estudo.

Ainda que tenha sido observado o desaparecimento dos efeitos letais ao longo do tempo experimental, maiores conseqüências são esperadas em uma população natural sujeita a *inputs* contínuos destes compostos. Estes efeitos podem gerar uma redução da diversidade de espécies e a longo prazo, um comprometimento de toda a dinâmica populacional de uma comunidade biótica, como observado por Murolo (2005). Santos *et al.* (2009) observou as conseqüências destes impactos em uma comunidade meiofaunal após a aplicação de NPK simulando eutrofização associada à agricultura. Neste trabalho foi observada uma modificação da estrutura da comunidade, com redução da densidade de todos os grupos da meiofauna.

Nilsson *et al.* (1991) realizaram experimentos para verificar o comportamento da biomassa da meiofauna em sedimentos enriquecidos com nitrogênio e fósforo, utilizando como fonte de N o Nitrato de Sódio (NaNO_3) e como fonte de P o Fosfato de Potássio di-básico (K_2HPO_4). Os autores observaram que a biomassa de copépodos e oligoquetos foi estimulada pelo enriquecimento de nutrientes e atribuem o resultado a um provável aumento na disponibilização de recursos alimentares adequados. No presente estudo, as concentrações de nitrato e fósforo estiveram diretamente correlacionadas ao percentual de copepoditos. Desta forma, é possível inferir que tenha ocorrido um efeito na disponibilização de recursos que possa justificar os percentuais de copepoditos elevados nas coletas do 1º, 8º e 15º dia de biorremediação.

O comportamento observado no tratamento OSMOCOTE em relação ao percentual de copepoditos a partir do 30º dia pode estar relacionado a uma maior liberação de nutrientes por este fertilizante. As concentrações de amônia e nitrato podem justificar esta liberação, uma vez que os valores foram aproximadamente o dobro das exibidas no 15º dia de biorremediação.

6.1.3. Toxicidade observada nos sedimentos contaminados e no processo de biorremediação utilizando Biosurfactante

Araújo-Castro (2008) verificou na maior parte do tempo nos anos de 2005 e 2006 ausência de efeitos letais e a presença de efeitos sub-letais ao avaliar a toxicidade dos sedimentos do Complexo Industrial Portuário de Suape utilizando o *T. biminiensis*. Estes resultados são confirmados no presente estudo, pois não foi verificada toxicidade letal no tratamento Branco, sedimentos da mesma área que não receberam óleo diesel.

O óleo diesel é considerado altamente tóxico por ser enriquecido com HPAs, compostos que detém maior grau de toxicidade dentre os hidrocarbonetos do petróleo (KENNISH, 1992). Lotufo (1997) observou mortalidade de 50% dos copépodos *Schizopera knabeni* em 4 dias de exposição ao diesel em sedimento a uma concentração de 0,194 g. kg⁻¹. Os efeitos na fecundidade foram observados em uma concentração menor (0,064 mg. kg⁻¹), demonstrando a alta toxicidade deste produto a este organismo. Embora a concentração de diesel utilizada no presente estudo tenha sido maior (40 g. kg⁻¹), não foi observada toxicidade letal nas fêmeas expostas ao sedimento contaminado. Esta ausência de efeito letal pode estar relacionada às diferenças quanto à sensibilidade dos organismos ou à composição do óleo diesel utilizado no experimento, tendo o mesmo 3% de biodiesel (B3). Alguns estudos têm demonstrado, que embora existente, a toxicidade deste biocombustível é reduzida (PEREIRA *et al.*, 2007). Lapinskienè *et al.* (2006) avaliaram a toxicidade do biodiesel em relação ao diesel comum através da atividade respiratória de microrganismos no solo. Os autores observaram que a atividade respiratória dos microrganismos cresceu quando a concentração de biodiesel aumentou e só começou a decrescer quando foi atingida a concentração no solo de 1,3 g. kg⁻¹. Já no solo contaminado com diesel de petróleo, estas atividades começaram a reduzir numa concentração de apenas 0,3 g. kg⁻¹, decrescendo até ficar abaixo da atividade observada no solo não contaminado (controle), o que indica maior toxicidade deste combustível. Em acordo com os trabalhos citados, o presente estudo sugere que o diesel de petróleo adicionado de biodiesel apresente toxicidade reduzida, uma vez que foi verificada a ausência de efeito letal no *T. biminiensis*. Essa redução de toxicidade do diesel B3 em comparação ao diesel comum também foi observada em experimentos com a espécie *T. biminiensis* (Torreiro-Melo, dados não publicados).

O intenso efeito sub-letal sobre a fecundidade das fêmeas de *Tisbe biminiensis* observado nos sedimentos de superfície logo, após a adição do óleo, pode ser explicado

pelas altas concentrações do total de HPAs nestes sedimentos. Segundo Long (1992), os efeitos toxicológicos significativos em organismos bentônicos começam a ser observados em concentrações do total de HPAs no sedimento $> 1 \text{ mg. kg}^{-1}$. No experimento realizado neste estudo, as concentrações do total de HPAs nos sedimentos que produziram este efeito foram as maiores ao longo do tempo de biorremediação, sendo 100 mg. kg^{-1} (Biossurfactante) e $91,69 \text{ mg. kg}^{-1}$ (Atenuação Natural), segundo Bayer (2010).

A redução da fecundidade observada após a introdução do biossurfactante pode estar ligada à toxicidade do mesmo. Embora seja de origem biológica, o ramnolipídio é um surfactante aniônico, assim como o surfactante sintético dodecil sulfato de sódio (DSS), cuja composição apresenta compostos de carga negativa. No caso do ramnolipídio, o grupo carboxilato é responsável pelo caráter aniônico (NGUYEN *et al.*, 2008). Cserháti *et al.* (2002), discutem a ambiguidade do papel dos surfactantes aniônicos no ambiente, sugerindo que eles podem promover a decomposição e/ou remoção de outros poluentes orgânicos e inorgânicos do meio ambiente, mas por outro lado, podem causar poluição ambiental, com efeitos tóxicos sobre a vida organismos. Embora a toxicidade do ramnolipídio para organismos aquáticos não seja bem documentada, os surfactantes aniônicos em geral apresentam várias evidências de seu potencial tóxico. Whiting *et al.* (1996) obtiveram valores de CL_{50-48h} para o DSS para diversos crustáceos estuarinos. Os dados indicaram que a sensibilidade entre os organismos apresenta uma ampla faixa de variação, sendo de $9,8 \text{ mg. L}^{-1}$ para larvas do caranguejo azul (*Callinectes sapidus*), 34 mg. L^{-1} para larvas do camarão (*Palaemonetes pugio*) e 48 mg. L^{-1} para misidáceo (*Mysidopsis bahia*). Melo & Nipper (2007) observaram que a tolerância do anfípoda *Tiburonella viscana* a este surfactante aniônico foi ainda menor em relação aos crustáceos citados anteriormente, obtendo CL_{50-48h} $3,41 \text{ mg. L}^{-1}$. Em um estudo piloto, Araújo *et al.* (2007) observou que o *Tisbe biminiensis* apresentou maior tolerância ao DSS que o *Tiburonella viscana*, similar a larva de *Callinectes sapidus* e superior ao *Palaemonetes pugio* e ao *Mysidopsis bahia*, obtendo uma faixa de CL_{50-48h} entre $4,3$ e $13,1 \text{ mg. L}^{-1}$. Considerando que a sensibilidade varia entre os organismos, Lewis (1991) indica que os surfactantes sintéticos causam toxicidade sub-letal aos organismos aquáticos em concentrações muito baixas, que variam de $0,002$ a 40 mg. L^{-1} .

Venezia *et al.* (1980) em um estudo expondo o copépodo *Tisbe bulbisetosa* ao surfactante dodecil benzeno sulfonato (DBS) em uma salinidade de 36, encontraram

CL₅₀-48h de 5,12 mg. L⁻¹. Neste trabalho, os autores sugerem que as propriedades solventes dos surfactantes possam remover os lipídios da epicutícula, camada essencial à permeabilidade cuticular em alguns crustáceos como em *Tisbe* spp. Com esta membrana comprometida, o gasto energético para a manutenção da regulação osmótica representa um gasto da energia metabólica que tornaria o organismo menos tolerante a fatores adversos, como a exemplo da presença de poluentes.

Embora não haja literatura para comparar a toxicidade do biossurfactante ramnolipídio em copépodos ou mesmo em crustáceos, Millioli *et al.* (2007) possibilita a observação do efeito tóxico gerado por este composto quando utilizado em um processo de biorremediação. Neste trabalho, foi avaliada a fitotoxicidade deste biossurfactante em solo contaminado com óleo cru utilizando a *Lactuca sativa* (alface), sendo observado um aumento do efeito inibitório da germinação à medida que a concentração do biossurfactante foi elevada. A concentração de ramnolipídio que exibiu maior eficiência de biodegradação (4 a 6 g. kg⁻¹), produziu uma inibição da germinação de 40 a 45% em relação ao controle (sem o composto) ao final de 5 dias. Embora a concentração de ramnolipídio no presente trabalho (0,04 g. kg⁻¹) tenha sido 100 vezes menor do que no trabalho citado anteriormente, esta pode ter sido responsável pelo efeito sub-letal em *T. biminiensis* no 21º dia, primeira coleta após a adição do biossurfactante. Este efeito pode estar relacionado à possível pontualidade da presença do biossurfactante, uma vez que ele foi adicionado na superfície e pode ter permanecido em maior parte nesta área, não percolando ao longo de todo o volume de sedimento.

A toxicidade observada 21 dias após a introdução do biossurfactante também pode ter sido gerada pela disponibilização do óleo promovida por este composto (MULLIGAN, 2005), embora a biodegradabilidade neste tratamento não tenha sido acelerada (BAYER, 2010). A possibilidade dos efeitos tóxicos observados estarem relacionados a presença de metabólitos gerados neste processo é reduzida, uma vez que a degradação no tratamento com biossurfactante não foi acentuada em relação ao tratamento Atenuação Natural (BAYER, 2010). Embora o efeito sub-letal no tratamento com biossurfactante desapareça ao longo do tempo, os valores de fecundidade obtidos neste tratamento foram inferiores ao tratamento Atenuação Natural em todos os tempos experimentais. Tais resultados podem indicar um efeito prolongado do biossurfactante, embora não tenha sido significativo nas análises.

As correlações significativas negativas de alguns HPAs com a sobrevivência e a fecundidade observadas no presente estudo indicam que estes compostos estão ligados

aos efeitos observados nestes parâmetros, contudo, as correlações com a sobrevivência não apresentam uma significância relevante, uma vez que não foi observado efeito tóxico letal nas fêmeas expostas ao sedimento contaminado com óleo diesel.

Assim como no experimento de biorremediação com fertilizantes, os valores acentuados de copepoditos no sedimento contaminado com diesel também podem estar relacionados ao aumento da disponibilidade de recursos alimentares. Carman *et al.* (1997) sugerem que o diesel possa causar um incremento na densidade de bactérias que são abundantes em sedimentos contaminados, que por sua vez, podem ser utilizadas como alimento para alguns copépodos. No citado trabalho, foi observado um aumento na pastagem (*grazing*) do copépodo harpacticóide *Cletocamptus deitersi* quando exposto aos HPAs do óleo diesel numa concentração de 55 mg. kg⁻¹. Este resultado indica que algumas espécies podem apresentar certa tolerância a alguns contaminantes orgânicos.

Outra possibilidade que pode justificar a ocorrência da correlação direta entre o efeito observado no percentual de copepoditos e quase todos os hidrocarbonetos presentes no sedimento envolve o conceito de um fenômeno denominado hormese. Este é um fenômeno de dose-resposta, que caracteriza-se por uma resposta compensatória a certos compostos potencialmente tóxicos, entre eles os HPAs, resultando em uma perturbação da homeostase dos organismos. O mecanismo pode ser de estímulo (p. ex. crescimento e reprodução) se as doses forem baixas, ou de inibição, caso a exposição seja a doses elevadas destes compostos (STEBBING, 1982; CALABRESE & BALDWIN, 1997). Entretanto, não existe certeza sobre a dosagem ou intervalo de doses que represente o limiar da toxicidade expresso na hormese (CALABRESE & BALDWIN, 1997). Bejarano *et al.* (2006) observaram um incremento no desenvolvimento (náuplio-copepodito e copepodito-adulto) do copépodo *Amphiascus tenuiremis* quando expostos a concentração de 10% da fração acomodada de uma solução óleo cru/água do mar, enquanto que em concentrações de 50 e 100%, foi observado um atraso no desenvolvimento destes copépodos. Neste mesmo trabalho o autor sugere que esta resposta compensatória (ou seja, o reforço da taxa de crescimento) pode ser o resultado de indução do citocromo P450 levando a um aumento da excreção do hormônio 20-hidroxiecdisona, responsável pela muda em crustáceos, e desta forma ter acelerado o ciclo de muda, ou seja, a taxa de desenvolvimento (MOTHERSHEAD & HALE, 1992; SNYDER, 1998). Snyder (1998) discorre sobre a amplitude de efeitos que os compostos potencialmente tóxicos podem causar e sugere que a interação destes

compostos com os hormônios, como o 20-hidroxiecdisona, indicam a probabilidade de agentes desreguladores do sistema endócrino, outro tema que vem sendo amplamente discutido. Contudo, não é possível afirmar a ocorrência destes fenômenos no presente estudo, uma vez que análises genéticas e bioquímicas seriam necessárias.

7. CONCLUSÕES

- Os sedimentos homogeneizados da baía de Todos os Santos bem como os sedimentos de Suape, contaminado com óleo diesel, antes da aplicação dos métodos de biorremediação, não apresentaram toxicidade letal ao copépodo *Tisbe biminiensis*. Contudo, nestes sedimentos foram observados efeitos sub-letais na fecundidade e incremento no percentual de copepoditos.
- Na biorremediação com bioestímulo, o sedimento com NPK causou efeito tóxico letal que, embora desapareça ao longo do tempo, pode gerar danos à biota. A fecundidade foi afetada negativamente do início ao fim deste processo biorremediativo. Tais efeitos estão relacionados às concentrações dos compostos nitrogenados, incrementadas pelos fertilizantes. Este efeito faz com que o uso dos mesmos seja avaliado com mais cautela sob o ponto de vista biológico. O percentual de copepoditos parece ter sido beneficiado pelo enriquecimento de nutrientes no sedimento, uma vez que apresentaram valores elevados nos sedimentos que receberam fertilizantes.
- Na primeira coleta após a adição do biossurfactante, embora não tenha causado efeito letal, houve uma redução acentuada da fecundidade. Desta forma, o biossurfactante pode ter sido responsável pelo efeito sub-letal observado, mesmo em uma concentração muito baixa, uma vez que apresenta propriedades nocivas a alguns crustáceos. O incremento no percentual de copepoditos, notado nos sedimentos contaminados com óleo pode ser resultante de um mecanismo dose-resposta, provocado possivelmente pela presença dos hidrocarbonetos em baixas concentrações.
- Diferente da hipótese, a adição de fertilizantes e do biossurfactante, nas concentrações testadas, não acelerou a redução da toxicidade dos sedimentos contaminados do estuário do rio São Paulo e da baía de Suape, respectivamente. Nestas circunstâncias, a atenuação natural dos hidrocarbonetos liberados por

derivados de petróleo no sedimento demonstra ser a melhor medida biorremediativa, uma vez que resulta em uma degradação sem maiores prejuízos à biota.

8. REFERÊNCIAS

- ABESSA, D.M.S.; PINNA, F.V.; ROMANO, P.; SERIANI, R.; SILVEIRA, L.M.; MAGINI, C. 2006. Water Quality at the estuary of the Itanhaém river, SP, Brazil. In: Proceedings of Environmental and Health World Congress, Santos, SP, Brasil. p. 42-5.
- ADAMS, R.H.; DOMÍNGUEZ, V.; GARCÍA, L. 1999. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra*, 17: 159-174.
- AL-ARAJI, L.; RAHMAN, R.N.Z.R.A.; BASRI, M.; SALLEH, A.B. 2007. Microbial Surfactant: Minireview. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 15 (3): 99-105.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO – ANPa. 2009. Dados estatísticos sobre o número de barris de petróleo importados e exportados pelo Brasil. Acessível em http://www.anp.gov.br/doc/dados_estatisticos/Importacoes_e_Exportacoes. Acesso em 16/3/2009.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO – ANPb. 2009. Dados estatísticos sobre o número de barris de petróleo refinados no Brasil. Acessível em http://www.anp.gov.br/doc/dados_estatisticos/Processamento_de_Petroleo. Acesso em 16/3/2009.
- ARAÚJO, C.F.C. 2009. Testes de toxicidade de água do mar utilizando larvas do copépodo *Tisbe biminiensis* e morfometria das larvas do ouriço do mar *Lytechinus variegatus*. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- ARAÚJO, R.J.V. 2005. Tolerância do Copepoda *Tisbe biminiensis* à amônia em testes agudos. Monografia (Especialização em Oceanografia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 24p.
- ARAÚJO, R.J.V.; ARAÚJO-CASTRO, C.M.V.; SOUZA-SANTOS, L.P. 2007. The Tolerance of Harpacticoid Copepod *Tisbe biminiensis* to potassium dichromate, sodium dodecyl sulfate - SDS and ammonium chloride. In: Proceedings of XIII International Meiofauna Conference, Recife, PE, Brasil.
- ARAÚJO-CASTRO, C.M.V. 2008. Padronização e aplicação do copépodo marinho bentônico *Tisbe biminiensis* como organismo-teste em avaliações toxicológicas de sedimentos estuarinos. Tese (Doutorado em Oceanografia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 104p.
- ARAÚJO-CASTRO, C.M.V.; SOUZA-SANTOS, L.P. 2005. Are the diatoms *Navicula* sp. and *Thalassiosira fluviatilis* suitable to be fed to the benthic harpacticoid copepod *Tisbe biminiensis*? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 327: 58-69.

ARAÚJO-CASTRO, C.M.V; SOUZA-SANTOS, L.P; TORREIRO, A.G.A.G.; GARCIA, K.S. 2009. Sensitivity of the marine benthic copepod *Tisbe biminiensis* (copepoda, harpacticoida) to potassium dichromate and sediment particle size. *Brazilian Journal of Oceanography*, 57 (1): 33-41.

ASTM. 1994a. Standard Guide for Conducting 10-day Static Sediment Toxicity Tests with Marine and Estuarine Amphipods. Method E 1367-92. In: Annual Book of ASTM – Standards, Water and Environmental Technology, Volume 11.04. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.

ASTM. 1994b. Standard Guide for Conducting Renewal Microplate-Based Life-Cycle Toxicity Tests with a Marine Meiobenthic Copepod. Method E 2317 – 04. In: Annual Book of ASTM – Standards, Volume 11.04. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.

ASTM. 2004. Standard Guide for Conducting 10-day Static Sediment Toxicity Tests with Marine and Estuarine Amphipods. Method E 1367-92. In: Annual Book of ASTM — Standards, Water and Environmental Technology, Volume 11.04. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA.

BARAHONA, L.M.; VÁZQUEZ, R.R.; VELASCO, H.; JARQUIN, C.V.; PEREZ, O.Z.; CANTÚ, A.M.; ALBORES, A. 2004. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Applied Soil Ecology*, 27: 165-175.

BARATA, C.; BAIRD, D.J.; MEDINA, M.; ALBALAT, A.; SOARES, A.M.V.M. 2002. Determining the ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms: stage-specific short tests with *Tisbe battagliai*. *Marine Ecology Progress Series*, 230: 183-194.

BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. 2008. Studies of emulsifying properties and stability of the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cassava wastewater. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28 (4): 979-985.

BAYER, D.M. 2010. Biorremediação de sedimentos estuarinos contaminados por óleo diesel com o uso de biosurfactante. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BEJARANO, A.C.; CHANDLER, T. 2004. Toxicity assessment of sediments associated with various land-uses in coastal South Carolina, USA, using a meiobenthic copepod bioassay. *Marine Pollution Bulletin*, 49: 23-32.

BEJARANO, A.C.; CHANDLER, G.T.; HE, L.; COULL, B.C. 2006. Individual to population effects of South Louisiana crude oil water hydrocarbon accommodated fraction (WAFs) on a marine meiobenthic copepod. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 332: 49-59.

BELLAS, J.; THOR, P. 2007. Effects of selected PAHs on reproduction and survival of the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology*, 16: 465-474.

BENGTSSON, B.E. 1978. Use of a Harpacticoid Copepod in Toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*, 9: 238-241.

- BENINCASA, M. 2007. Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. *Current Microbiology*, 54: 445-449.
- BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.; FRANKENBERGER-JÚNIOR, W.T. 2003. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34.
- BENTO, B.; CAMARGO, F.; OKEKE, B.; Y FRANKENBERGER, W. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96: 1049-1055.
- BESTEN, P.J.; BRINK, P.J. 2005. Bioassay responses and effects on benthos after pilot remediations in the delta of the Rivers Rhine and Meuse. *Environmental Pollution*, 136: 197-208.
- BOUCHER, G. 1980. Impact of Amoco Cadiz oil spill on intertidal and sublittoral meiofauna. *Marine Pollution Bulletin*, 11: 95-101.
- BOYD, C. E. 1998. Gerenciamento da qualidade da água e aeração no cultivo do camarão marinho. Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC. Tradução e Impressão AQUATEC – Larvicultura de camarão marinho e MCR – Aquacultura Ltda, 157p.
- BURATINI, S.V.; ZAGATTO, P. A. 2006. Biodegradação. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações*. 1ª Ed. São Paulo, SP, Brasil. Editora Rima. p.89-116.
- BRASIL, Lei nº 9.966 de 28 de Abril de 2000. Disponível em: www.ibama.gov.br/. Acessado em 27/09/2008.
- BURGESS, R.M.; MCKINNEY, R.A. 1997. Effects of Sediment Homogenization on Interstitial Water PCB Geochemistry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 33, 125-129.
- BURNS, K.A.; GARRITY, S.; JORISSEN, D.; MACPHERSON, J.; STOELTING, M.; TIERNEY, J.; YELLE- SIMMONS, L. 1994. The Galeta Oil Spill II. Unexpected persistence of oil trapped in mangrove sediments. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 38: 349-364.
- BURNS, K.A.; CODI, S.; DUKE, N. C. 2000. Gladstone, Australia Field Studies: Weathering and Degradation of Hydrocarbons in Oiled Mangrove and Salt Marsh Sediments With and Without the Application of an Experimental Bioremediation Protocol. *Marine Pollution Bulletin*, 41: 392-402.
- CALABRESE, E.J.; BALDWIN, L.A. 1997. The dose determines the stimulation (and poison): development of a chemical hormesis database. *International Journal of Toxicology*, 16 (6): 545-559.
- CAMARGO, J.A.; ALONSO, A. 2006. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*, 32: 831-849.
- CANTAGALLO, C.; MILANELLI, J.C.; DIAS-BRITO, D. 2007. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 2 (1): 1-12.
- CARMAN, K.R.; MEANS, J.C.; POMARICO, S.M. 1996. Response of sedimentary bacteria in a Louisiana salt marsh to contamination by diesel fuel. *Aquatic Microbial Ecology*, 10: 231-241.

CARMAN, K.R.; FLEEGER, J.W.; POMARICO, S.M. 1997. Response of a benthic food web to hydrocarbon contamination. *Limnology and Oceanography*, 42 (3): 561-571.

CARMAN, K.R.; FLEEGER, J.W.; POMARICO, S.M. 2000. Does historical exposure to hydrocarbon contamination alter the response of benthic communities to diesel contamination? *Marine Environmental Research*, 49: 255-278.

CELINO, J.J.; QUEIROZ, A.F. 2006. Fonte e grau da contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de baixa massa molecular em sedimentos da Baía de Todos os Santos. *Revista Escola de Minas*, 59 (3): 265-270.

CELINO, J.J.; VEIGA, I.G.; TRIGÜIS, J.A.; QUEIROZ, A.F.S. 2008. Fonte e distribuição de hidrocarbonetos do petróleo nos sedimentos da Baía de Todos os Santos, Bahia. *Brazilian Journal of Aquatic Sciences and Technology*, 12 (1): 31-38.

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - CETESB. 2005. Vazamentos de petróleo. Disponível em www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/. Acessado em 27/09/2008.

CHAGAS-SPINELLI, A.C.O. 2007. Níveis de metais pesados e hidrocarbonetos em sedimentos do Complexo Industrial Portuário de SUAPE – PE – Brasil. Tese (Doutorado em Geociências). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 184p.

CHAPMAN, P.M. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, 44: 7-15.

CHAPMAN, P.M. 2007. Determining when contamination is pollution – Weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment International*, 33: 492-501.

COULL, B.C.; CHANDLER, G.T. 1992. Pollution and meiofauna: Field, laboratory, and mesocosm studies. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 30: 191-271.

CPRH (Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos). 2003. Levantamento das fontes poluidoras na bacia do Rio Ipojuca – Pernambuco. Pernambuco, Recife, Maio de 2003. 53p.

CPRH (Agência Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos). 2006. Disponível em http://www.cprh.pe.gov.br/central_servicos/centro_documentacao_informacao_ambiental/central_downloads/qualidade_oceano.pdf. Acessado em 21/08/2009.

CRA (Centro de Recursos Ambientais). 2001. Avaliação da Qualidade das Águas Costeiras superficiais. Relatório Técnico, Bahia.

CSERHÁTI, T.; FORGÁCS, E.; GYULA, O. 2002. Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environment International*, 28: 337-348.

DA SILVA, E.M.; PESO-AGUIAR, M.C.; NAVARRO, M.F.T., CHASTINET, C.B.A. 1997. Impact of petroleum pollution on aquatic coastal ecosystems in Brazil. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 16 (1): 102-118.

- DAHL, U.; GOROKHOVA, E.; BREITHOLTZ, M. 2006. Application of growth-related sublethal endpoints in ecotoxicological assessments using a harpacticoid copepod. *Aquatic Toxicology*, 77 (4): 433-438.
- DORN, P.H.; SALANITRO, J. 2000. Temporal ecology assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere*, 40: 419-426.
- DORN, P.H.; VIPON, T.; SALANITRO, J.; WISNIEWSKY, H. 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils using earthworms, microtox and plants. *Chemosphere*, 37: 845-860.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). 1997. Manual de Métodos de Análise de Solo. 2ª ed Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos (CNPS). 211p.
- EMBRAPA (Empresa brasileira de pesquisa agropecuária). 1999. Manual de Análises Químicas de Solos Plantas e Fertilizantes. 1ª Ed. Brasília: Embrapa informática agropecuária; Fábio César da Silva (org.). 370p.
- FARAPONOVA, O.; DE PASCALE, D.; ONORATI, F.; FINOIA, M.G. 2005. *Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoida) as a target species in biological assays. *Meiofauna Marina*, 14: 91-95.
- FERNANDES, M.L.B. 2000. Avaliação de dois ambientes recifais do litoral de Pernambuco, através das suas macro e mega faunas incrustantes e sedentárias. Tese (Doutorado em Oceanografia). Universidade de São Paulo, São Paulo. 165p.
- FREITAS, F.M.R. 2009. Uso de *Cladonia verticillaris* (Raddi) Fr. (LÍQUEN) como biomonitor da qualidade do ar no complexo industrial portuário de Suape – PE. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- FULLER, C.; BONNER, J.S. 2001. Comparative toxicity of oil, dispersant, and dispersed oil to Texas marine species. In: Proceedings from the 2001 International Oil Spill Conference. Tampa, FL. p. 1243-1248.
- GUILLARD, R.R.L. 1975. Culture of Phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith, W.L.; Chanley, M.H. (Eds). *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Plenum Press. N. Y., pp.26-60.
- GUNDLACH, E.R.; HAYES, M.O. 1978. Vulnerability of coastal environments to oil spill impacts. *Journal of Marine Technology Society*, 12 (4): 18-27.
- HACK, L.A.; TREMBLAY, L.A.; WRATTEN, S.D.; FORRESTER, G.; KEESING, V. 2008. Toxicity of estuarine sediments using a full life-cycle bioassay with the marine copepod *Robertsonia propinqua*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70 (3): 469-474.
- HAGOPIAN-SCHLEKAT, T.; CHANDLER, G.T.; SHAW, T.J. 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Marine Environmental Research*, 51: 247-264.
- HAMILTON, M.A.; RUSO, R.C.; THURSTIN, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science Technology Chemistry*, 1 (7): 714-719.

- HARWELL, M.A.; GENTILE, J.H. 2006. Ecological Significance of Residual Exposures and Effects from the Exxon Valdez Oil Spill. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2 (3): 204-246.
- HERBES, S.E.; SCHWALL, L.R. 1978. Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleumcontaminated sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 35: 306-316.
- HICKS, G.R.F., COULL, B.C. 1983. The ecology of marine meiobenthic harpacticoid copepods. *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, 21: 67-175.
- HUTCHINSON, T.H.; POUND, N.A.; HAMPEL, M.; WILLIAMS, T.D. 1999. Life-cycle studies with marine copepods (*Tisbe battagliai*) exposed to 20-hydroxyecdysone and diethylstilbestrol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18: 2914-2920.
- ISO 14669. 1999. Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). Geneva, Switzerland. First edition. 1999-04-01.
- KENNISH, M.J. 1992. Polynuclear aromatic hydrocarbons. In *Ecology of estuaries: Anthropogenic effects*. CRC Press. pp.133-181.
- KOROL, S.E. 2003. Mecanismos que alteran La biodegradación de contaminantes orgánicos. In: Herkovits, J. (ed.). *Toxicología y Química Ambiental: Contribuciones para un Desarrollo Sustentable*. SETAC-LA, Buenos Aires. pp. 247-249.
- KWOK, K.W., LEUNG, K. M.; BAO, V.W.; LEE, J.S. 2008. Copper toxicity in the marine copepod *Tigropus japonicus*: Low variability and high reproducibility of repeated acute and life-cycle tests. *Marine Pollution Bulletin*, 57: 632-636.
- LANDRUM, P.F.; LOTUFO, G.R.; GOSSIAUX, D.C.; GEDEON, M.L.; LEE, J.H. 2003. Bioaccumulation and critical body residue of PAHs in the amphipod, *Diporeia* spp.: additional evidence to support toxicity additivity for PAH mixtures. *Chemosphere*, 51: 481-489.
- LAPINSKIENĖ, A.; MARTINKUS, P.; RĖBŽDAITĖ, V. 2006. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. *Environmental Pollution*, 142 (3): 432-437.
- LARRAIN, A.; SOTO, E.; SILVA, J.; BAY-SCHIMITH, E. 1998. Sensitivity of the meiofaunal copepod *Tisbe longicornis* to $K_2Cr_2O_7$ under varying temperature regimes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 61: 391-396.
- LARSSON, P. 1985. Contaminated sediments of lakes and oceans act as sources of chlorinated hydrocarbons for release to water and atmosphere. *Nature*, 317: 347-349.
- LEVINGS, S.; GARRITY, S.; BURNS, K.A. 1994. The Galeta Oil Spill III. Chronic reoiling and long term toxicity of hydrocarbon residues in the mangrove fringe community. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 38: 365-395.
- LEWIS, M.A. 1991. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Water Research*, 25: 101-114.

- LIMA, D.F. 2010. Biorremediação em sedimentos impactados por petróleo na baía de Todos os Santos, Bahia: Avaliação da degradação de hidrocarbonetos saturados. Dissertação (Mestrado em Geologia). Universidade Federal da Bahia, Salvador. 223f.
- LIZÁRRAGA-PARTIDA, M.L.; CÁRDENAS, G.V. 1996. Influence of water circulation on marine and faecal bacteria in a mussel-growing area. *Marine Pollution Bulletin*, 32 (2): 196-201.
- LONG, E.R.; MACDONALD, D.D.; SMITH, S.L.; CALDER, F.D. 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management*, 19 (1): 81-97.
- LONG, E.R. 1992. Ranges in chemical concentrations in sediments associated with adverse biological effects. *Marine Pollution Bulletin*, 24 (1): 38-45.
- LOTUFO, G.R. 1997. Toxicity of sediment-associated PAHs to an Estuarine Copepod: effects on survival, feeding, reproduction and behavior. *Marine Environmental Research*, 44 (2): 149-166.
- LOTUFO, G.R. 1998a. Bioaccumulation of sediment-associated fluoranthene in benthic copepods: uptake elimination and biotransformation. *Aquatic Toxicology*, 44: 1-15.
- LOTUFO, G.R. 1998b. Lethal and sublethal toxicity of sediment-associated fluoranthene to benthic copepods: Application of the critical-body-residue approach. *Aquatic Toxicology*, 44: 17-30.
- MACKEN, A.; GILTRAP, M.; FOLEY, B.; McGOVERN, E.; McHUGH, B.; DAVOREN, M. 2008. A model compound study: the ecotoxicological evaluation of five organic contaminants employing a battery of marine bioassay. *Environmental Pollution*, 153: 627-637.
- MELO, S.L.R.; NIPPER, M. 2007. Sediment toxicity tests using the burrowing amphipod *Tiburonella viscana* (Amphipoda: Platyschnopidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66: 412-420.
- MENDOZA, R.E. 1998. Hydrocarbon leaching, microbial population, and plant growth in soil amended with petroleum. *Bioremediation Journal*, 1 (3): 223-231.
- MILIOU, H.; VERRIOPOULOS, G.; MAROULS, D.; BOULOUKUS, D.; MORAITOU-APOSTOLOPOULOU, M. 2000. Influence of life-history adaptations on the fidelity of laboratory bioassays for the impact of heavy metals (Co^{2+} and Cr^{6+}) on tolerance and population dynamics of *Tisbe holoturiae*. *Marine Pollution Bulletin*, 40: 352-359.
- MILLIOLI, V.S.; SÉRVULO, E.F.C.; SOBRAL, L.G.S. 2007. Biorremediação de solo contaminado com óleo cru: Avaliação da adição de Rannolipídio quanto à toxicidade e a eficiência de biodegradação. 4º PDPETRO, Campinas, São Paulo. pp. 21-24.
- MOLINA-BARAHONA, L.; VEGA-LOYO, L.; GUERRERO, M.; RAMÍREZ, S.; ROMERO, I.; VEGA-JARQUÍN, C.; ALBORES, A. 2005. Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after a bioremediation process. *Environmental Toxicology*, 20 (1): 100-109.
- MORAES, A. S. 2009. Geoestatística aplicada à geoquímica ambiental no estudo da qualidade dos sedimentos do Rio Tatuoca, Complexo Industrial Portuário de Suape. Dissertação (Mestrado em Geociências). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

- MOTHERSHEAD II, R.F.; HALE; R.C. 1992. Influence of ecdysis on the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in field exposed blue crabs. *Marine Environmental Research*, 33: 145-156.
- MOZETO, A.A.; ZAGATTO, P. A. 2006. Introdução de Agentes Químicos no Ambiente. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações*. 1ª Ed. São Paulo, SP, Brasil. Editora Rima. p.15-38.
- MULLIGAN, C.N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133: 183-198.
- MUROLO, P.P.A. 2005. Utilização da meiofauna bentônica no monitoramento do cultivo do camarão *Litopenaeus vannamei*. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- NASCIMENTO, I.A.; SMITH, D.H.; PEREIRA, S.A.; ARAUJO, M.M.S.; SILVA, M.A.; MARIANI, A. M. 2000. Integration of varying responses of different organisms to water and sediment quality at sites impacted and not impacted by the petroleum industry. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 3: 449-458.
- NGUYEN, T.T.; YOUSSEF, N.H.; MCINERNEY, M.J.; SABATINI, D.A. 2008. Rhamnolipid biosurfactant mixtures for environmental remediation. *Water Research*, 42: 1735-1743.
- NILSSON, P.; JÖNSSON, B.; SWANBERG, I.L.; SUNDBÄCK, K. 1991. Response of a marine shallow-water sediment system to an increased load of inorganic nutrients. *Marine Ecology Progress Series*, 71: 275-290.
- OLGUÍN, E.J.; HERNÁNDEZ, M.E.; SÁNCHEZ-GALVÁN, G. 2007. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista Interacional Contaminación Ambiental*, 23 (3): 139-154.
- OLIVEIRA, D. D. 2008. Toxicidade dos sedimentos do Parque dos Manguezais, Recife – Pernambuco – Brasil. Monografia (Graduação em Ciências Ambientais). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 25f.
- ORGE, M.D.R.; PORSCHE, I.J; COSTA, M.C.; LIMA, J.S.; SOARES, S.E.D.; JUSTIN, R. 2000. Assessment of oil refinery waste on *Rhizophora mangle* L. seedling growth in mangroves of Todos os Santos Bay, Bahia, Brazil. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 3 (4): 471-477.
- PALETTO, V.M.; COMMENDATORE, M.G.; ESTEVES, J.L. 2008. Hydrocarbon levels in sediments and bivalve mollusks from Bahía Nueva (Patagonia, Argentina): An assessment of probable origin and bioaccumulation factors. *Marine Pollution Bulletin*, 56 (12): 2100-2105.
- PEREIRA, S.A.; VÉRAS, T.F.; NASCIMENTO, I.A.; LEITE, M.B.N.; CRUZ, A.C.; BARROS, D.A.; SANTOS, J.M.; ARAÚJO, V.Q. 2007. Avaliação da toxicidade de biodiesel e óleos vegetais sobre o crescimento da microalga marinha *Tetraselmis chuii*. In: II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, Brasília.

PESO-AGUIAR, M.C.; SMITH, D.H.; ASSIS, R.C.F.; SANTA-ISABEL, L.M.; PEIXINHO, S.; GOUVEIA, E.P.; ALMEIDA, T.C.A.; ANDRADE, W.S.; CARQUEIJA, C.R.G.; KELMO, F.; CARROZZO, G.; RODRIGUES, C.V.; CARVALHO, G.C.; JESUS, A.C.S. 2000. Effects of petroleum and its derivatives in benthic communities at Baía de Todos os Santos/Todos os Santos Bay, Brazil. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 3: 459-470.

PETROBRAS. 2008. Apresenta resumo dos principais indicadores da estrutura da empresa. Acessível em <http://www2.petrobras.com.br>. Acesso em 17/07/2009.

PINTO, C.S.C.; SOUZA-SANTOS, L.P.; SANTOS, P.J.P. 2001. Development and population dynamics of *Tisbe biminiensis* (Copepoda : Harpacticoida) reared on different diets. *Aquaculture*, 198(3-4): 253-267.

PLAZA, G.; NALECZ-JAWECKI, G.; UFIG, K.; BRIGMON, R.L. 2005. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere*, 59: 289-296.

PORTO ROSA, A.; TRIGUIS, J.A. 2006. Processo de biorremediação usando o fertilizante NPK, em eventuais derrames de óleo – experimentos laboratoriais. *Revista Brasileira de Geociências*, 36(2): 232-242.

PORTO ROSA, A.; TRIGUIS, J.A. 2007. Biorremediation Process in Brazil Shoreline. *Environmental Science and Pollution Research International*, 14: 70-73.

POUNDS, N.A.; HUTCHINSON, T.H.; WILLIAMS, T.D.; WHITING, P.; DINAN, L. 2002. Assessment of putative endocrine disrupters in an in vivo crustacean assay and an in vitro insect assay. *Marine Environmental Research*, 54(3-5): 709-713.

PRINCE, R.C.; BARE, R.E.; GARRETT, R.M.; GROSSMAN, M.J.; HAITH, C.E.; KEIM, L.G. 2003. Bioremediation of stranded oil on an arctic shoreline. *Spill Science & Technology Bulletin*, 8: 303-312.

RAHMAN, P.K.S.M.; GAKPE, E. 2008. Production, Characterisation and Biosurfactant – Review. *Biotechnology*. 7 (2): 360-370.

READMAN, J.W.; FILLMANN, G.; TOLOSA, I.; BARTOCCI, J.; VILLENEUVE, J.P.; CATINNI, C.; MEE, L.D. 2002. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 44 (1): 48-62.

RECUPETRO (Rede Cooperativa em Recuperação de Áreas Contaminadas por Atividades Petrolíferas). 2009. Processos de Biorremediação (NO). Relatório Final de Atividades – Relatório Interno. Salvador-BA.190p.

RICKLEFS, R.E. 2003. *A Economia da Natureza*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 498p.

RUDOLPH, A.E.; MEDINA, P.; URRUTIA, C.; AHUMADA, R. 2009. Ecotoxicological sediment evaluations in marine aquaculture areas of Chile. *Environmental Monitoring and Assessment*, 155: 419-429.

SANTOS, P.J.P.; BOTTER-CARVALHO, M.L.; NASCIMENTO JÚNIOR, A.B.; MARINHO, R.G.C.; CARVALHO, P.V.V.C.; VALENÇA, A.P.M.C. 2009. Response of estuarine meiofauna association to

effects of fertilizer enrichment used in the sugar cane monoculture, Pernambuco, Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, 57: 43-55.

SILVA, D.M.C.; ARAÚJO, J.M.; PESSÔA, S.G.S.; SOUTO-MAIOR, A.M.; SPINELLI, A.C.O.C. 2009. Avaliação da eficiência de produção de ramnolipídeos a partir de diferentes fontes de nitrogênio por *Pseudomonas aeruginosas* isoladas de poço de petróleo. In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Natal-RN.

SMITH, V.H.; GRAHAM, D.W.; CLELAND, D.D. 1998. Application of resource-ratio theory to hydrocarbon biodegradation. *Environmental Science & Technology*, 32: 3386-3395.

SNYDER, M.J. 1998. Identification of a new cytochrome P450 family, CYP45, from the lobster, *Homarus americanus*, and expression following hormone and xenobiotic exposures. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 358 (2): 271-276.

SOUSA, E.C.P.M. 2002. Toxicologia Marinha: Histórico. In: NASCIMENTO, I.A.; SOUSA, E.C.P.M.; NIPPER, M. Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil. São Paulo: Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda. p. 9-14.

STEBBING, A.R.D. 1982. Hormesis: the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of the Total Environment*, 22: 213-234.

SUAPE. 2009. Disponível em http://www.suape.pe.gov.br/complexo_suape.asp. Acessado em 27/12/2009.

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

TAVARES, T.M. 1996. Relatório do subprojeto Química Ambiental do Programa de Monitoramento dos Ecossistemas ao Norte da Baía de Todos os Santos. PETROBRAS/UFBA.

TAYLOR, R.L.; CALDWELL, G.S.; DUNSTAN, H.J.; BENTLEY, M.G. 2007. Shortterm impacts of polyunsaturated aldehyde-producing diatoms on the harpacticoid copepod *Tisbe holothuriae*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 341: 60-69.

THOMAS, K.V.; BENSTEAD, R.E.; THAIN, J.E.; WALDOCK, M.J. 1999. Toxicity Characterization of Organic Contaminants in Industrialized UK Estuaries and Coastal Waters. *Marine Pollution Bulletin*, 38 (10): 925- 932.

THOMAS, K.V.; BARNARD, N.; COLLINS, K.; EGGLETON, J. 2003. Toxicity characterization of sediment porewaters collected from UK estuaries using a *Tisbe battagliai* bioassay. *Chemosphere*, 53: 1105-1111.

TORREIRO, A.G.A.G. 2008. Comparação do copépodo bentônico *Tisbe biminiensis* e da pós-larva do camarão *Litopenaeus vannamei* como organismo-teste em bioensaios de toxicidade com sedimentos do estuário do Rio São Paulo, Baía de Todos os Santos –Bahia – Brasil. Monografia (Graduação em Ciências ambientais), Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 25p.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). 1996. Method 8015B. Nonhalogenated Organics Using (GC/FID).

VEIGA, I.G.; TRIGUIS, J.A.; CELINO, J.J.; OLIVEIRA, O.M.C. 2008. Hidrocarbonetos saturados em sedimentos de manguezais na área norte da Baía de Todos os Santos. In: QUEIROZ, A.F.; CELINO, J.J. Avaliação de ambientes na Baía de Todos os Santos – aspectos geoquímicos, geofísicos e biológicos. Bahia: Editora da Universidade Federal da Bahia. p. 149-172.

VENEZIA, L.D.; FOSSATO, V.U.; SCARFI, S. 1980. Combined effects of dodecyl benzene sulfonate and low salinities on *Tisbe bulbisetosa* (Copepoda: Harpacticoida). Progress in Water Technology, 12 (1): 109-117.

VENTURINI, N.; TOMMASI, L.R. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons and changes in the trophic structure of polychaete assemblages in sediments of Todos os Santos Bay, Northeastern, Brazil. Marine Pollution Bulletin, 48 (1-2): 97-107.

VOLKMANN-ROCCO, B. 1973. *Tisbe biminiensis* (Copepoda, Harpacticoida) a new species of the gracilis-group. Archivio di Oceanografia e Limnologia, 18: 71-90.

VOLKMAN, J.K.; HOLDSWORTH, D.G.; NEILL, G.P.; BAVOR Jr., H.J. 1992. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. The Science of the Total Environment, 112: 203-219.

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

WHITING, V.K.; CRIPE, G.M.; LEPO, J.E. 1996. Effects of the anionic surfactant, sodium dodecyl sulfate, on newly-hatched blue crabs, *Callinectes sapidus*, and other routinely tested estuarine crustaceans. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 31: 293-295.

WOLGEMUTH, K.M.; BURNETT, W.; CAND MOURA, P.L. 1981. Oceanography and suspended material in Todos os Santos Bay. Revista Brasileira de Geociências, 11(3): 172-178.

YU, K.S.H.; WONG, A.H.Y.; YAU, K.W.Y.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. Marine Pollution Bulletin, 51: 1071-1077.

YUN, T.; YUAN-RONG, L.; TIAN-LING, Z.; LI-ZHE, C.; XIAO-XING, C.; CHONG-LING, Y. 2008. Contamination and potential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments of Xiamen, China. Marine Pollution Bulletin, 56: 1184-1191.

ZAGATTO, P. A. 2006. Validação de testes de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações. 1ª Ed. São Paulo, SP, Brasil. Editora Rima. p.251-266.