

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA BACTERIANA PRESENTE NA REGIÃO DA RESTINGA DE JURUBATIBA APÓS SIMULAÇÃO DE DERRAME DE PETRÓLEO.

(um espaço)

(um espaço)

J. L. BUENO^{1,2}, E. S. SOUZA¹ e B. R., BECKER¹

(um espaço)

¹ Universidade Estadual do Norte Fluminense, Laboratório de Engenharia e Exploração de Petróleo - Setor de Geoquímica

² Universidade Federal do Rio de Janeiro

E-mail para contato: bueno.jdl@gmail.com

(um espaço)

RESUMO – Tivemos como objetivo avaliar a potencialidade da biorremediação em derrames simulados de petróleo com solos da região da Restinga de Jurubatiba. Para isto foram instaladas colunas de experimentação com solo de praia (P1), solo úmido (P2) e um solo seco ao lado do oleoduto OCAB (P3). Foram utilizados Osmocote® (Osm) e NPK, sendo este último aplicado somente ao P3. Alíquotas de solo foram retiradas e realizou-se contagem das unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados mostraram que o crescimento dos microrganismos esteve intimamente ligado à degradação de hidrocarbonetos do petróleo. No P1 o uso de fertilizantes aumentou em 8 vezes a microbiota e levou à uma degradação total dos n-alcanos. No P2, a presença de Osm. aumentou a degradação em 70% comparativamente ao controle, degradando totalmente os n-alcanos. Para o P3 a aplicação do NPK levou a uma presença 2 vezes maior de bactérias comparado à aplicação do Osm. elevando em 48% degradação dos n-alcanos com relação ao controle.

(um espaço)

1. INTRODUÇÃO

Com a alta demanda da produção e comercialização do petróleo e de seus derivados, os acidentes envolvendo derrames de óleo se tornaram mais frequentes, criando-se com isso uma maior preocupação mundial em relação aos riscos ambientais decorrentes de tais acontecimentos (Ling, 2003). O escoamento de petróleo e derivados entre as fontes de produção, refinarias e centros de consumo são realizados, dentre outras formas, por tubulações subterrâneas. Foram relatados diversos acidentes devido à problemas relacionados a estes dutos pois os mesmos estão sujeitos a erosão, deslizamentos de terra, corrosão, queda de rochas, atos de vandalismo, ação de terceiros, os quais podem ocasionar vazamentos e, em função da alta pressão com que os produtos são bombeados e da periculosidade das substâncias transportadas, os danos ambientais e sócio-econômicos raramente são pequenos (CETESB, 2012). O oleoduto Cabiúnas – Barra do Furado (OCAB) é parte integrante da malha de escoamento de petróleo da Bacia de Campos. Ele adentra o continente na praia da Barra do Furado em Quissamã e segue até o Terminal Cabiúnas (TECAB), em Macaé, perfazendo 68km de trecho terrestre. Durante este percurso, o OCAB perpassa cerca de 30 km pela Restinga de Jurubatiba, o que representa praticamente metade de seu comprimento total, indicando com isso, que são grandes

bakeras chances de um vazamento acidental de petróleo ocorrer nesta área ambientalmente sensível.

Os vazamentos de petróleo causam grande impacto ecológico e também graves problemas à saúde humana, pois os mesmos apresentam propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas, podendo ser incorporado às gorduras, causar distúrbios metabólicos ou interromper a quimiorrecepção (Crapez 2002; Tonini, 2010).

Após o petróleo atingir um determinado ambiente é necessária uma ação imediata por parte dos responsáveis para controlar e remover a máxima quantidade do contaminante. A etapa seguinte é a de limpeza do local atingido pela contaminação. Diversas técnicas já foram testadas e adotadas para este fim, e, consistem de um modo geral, na remoção física, química ou biológica dos hidrocarbonetos.

A biorremediação é a mais vantajosa dentre estas técnicas testadas, visto que é mais viável economicamente e ainda apresenta menor risco de contaminação secundária (Atlas, 1995, Brito, 2009; Juwarkar et al, 2010; Yang et al, 2009).

A biorremediação, segundo Cookson (1995) e Baker & Herson (1995), é a aplicação dos princípios de processos biológicos no tratamento de ambientes contaminados, na qual se faz uso de micro-organismos, para se realizar a limpeza de ambientes contaminados com xenobióticos recalcitrantes (Díaz, 2004; Roth, 2008).

Para que a biorremediação através do uso de microrganismos seja eficiente, é importante que o ambiente possua, além dos microrganismos degradadores, outros fatores como: nutrientes, oxigênio e temperatura, os quais devem estar em quantidade e em condições ideais para promover a atividade microbiana (Boopathy, 2000).

A presença de nutrientes no ambiente é primordial para o crescimento de microrganismos. No entanto, normalmente este é um recurso limitado, impedindo ou retardando os microrganismos em degradar os poluentes. Deste modo, uma das técnicas de biorremediação é conhecida como "bioestimulação" e consiste na aceleração do processo de biodegradação do petróleo através adição de produtos ao sistema que fornecem nutrientes, como nitrogênio e fósforo (Jacques et al, 2007).

Desta forma, o desenvolvimento das metodologias de biorremediação tem sido alvo de diversas pesquisas cujo objetivo é otimizar as condições para a ação degradativa dos microrganismos de modo a eliminar o contaminante do local contaminado (Brito, 2009).

2. METODOLOGIA

2.1 Descrição dos Locais de Coleta

Os solos utilizados neste estudo foram provenientes do ecossistema de restinga em três pontos. Suas coordenadas geográficas, bem como as características ambientais, estão apresentadas na Tabela 1

Tabela 1: Coordenadas geográficas e características dos pontos de coleta de solo.

| Pontos de Coleta | Coordenadas Geográficas | Características Ambientais |
|------------------|------------------------------|--|
| Ponto 1 | 22°07'00.1"S 41°10'18.7"O | Solo de praia úmido, pela influência da maré |
| Ponto 2 | 22°14'50.9"S 41°35'30.0"O | Solo úmido, de local inundável, próximo a lagoas |
| Ponto 3 | 22°07'52.5"S 41°30'23.6"O | Solo seco |

2.2 Procedimentos de Coleta

Os solos foram amostrados utilizando-se tubos de PVC mantendo-se a informação topo-base do solo.

A água do mar da praia da Barra do Furado (PBF) e do Canal Campos-Macaé (CCM) foi coletada e armazenada em bombonas plásticas de 20 litros devidamente esterilizadas. Diariamente a água das bombonas era aerada.

2.3 Montagem das Colunas

Para a montagem das unidades de biorremediação e de controle dos experimentos, foram utilizadas provetas de vidro de 2 litros, com 50 cm de altura e 8 cm de diâmetro.

As unidades de biorremediação e de controle correspondentes ao Ponto 1 de coleta foram montadas de forma a simular um derrame de óleo no mar caso o vazamento do oleoduto ocorra em seu trecho submarino. Nesse caso, o óleo atingiria a costa e se espalharia sobre as areias da PBF.

Ao longo do percurso ao TECAB, o oleoduto percorre áreas de restinga, em locais alagáveis, ambientes representativos dos Pontos 2 e 3. O oleoduto está enterrado a profundidades que variam de 0,80 m a 2,00 m, portanto para estes pontos a simulação do derrame foi realizada subsuperficialmente.



A massa de 10g de NPK e 10g de Osmocote® foi utilizada em cada coluna.. Pelo fato do NPK solubilizar-se mais facilmente em água, a mesma massa de NPK (10g) foi reaplicada após 30 dias e a aplicação de água no ponto 3 se deu com menor frequência em relação aos Pontos 1 e 2, onde não foi utilizado o NPK.

As colunas do Ponto 1 receberam diariamente cerca de 250 mL de água da PBF. No Ponto 2 a quantidade de água do CCM aplicada nas colunas foi de 100 mL. Já no Ponto 3 um volume de 50 mL de água foi aplicado nas colunas a cada 5 dias.

2.4 Monitoramento Geoquímico da Biorremediação: n-alcanos

Após cromatografia líquida a biodegradação dos n-alcanos do petróleo foi realizado em um cromatógrafo em fase gasosa Agilent 6890N, equipado com uma coluna DB-5MS, de 30 metros de comprimento, diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 μm . O cromatógrafo está acoplado a um detector seletivo de massas 5973 MSD.

2.5 Contagem de Bactérias Heterotróficas Totais

Foram coletados 5 g de amostra de solo e armazenadas em tubos falcon. O procedimento foi realizado a cada duas semanas no período de 42 dias de experimento. Para se realizar a contagem, primeiramente pesou-se 1g de amostra úmida. Para se realizar a diluição seriada esta amostra foi transferida para um tubo com 9 mL de solução de NaCl 0,85% e foi agitada em vortex por 1 minuto, sendo considerada a primeira diluição. Subsequentemente precedeu-se a diluição até 10⁻⁶ em tubos com 9mL de solução de NaCl 0,85% estéril. Posteriormente às diluições foram inoculados 100 μl em duplicata em placas com meio de cultura para heterotróficos totais contendo extrato de carne 3 – 5 g/L; peptona 10 g/L; NaCl 5 g/L; ágar bacteriológico 25 g/L a pH 7,0 (Li et al, 2000). As placas foram incubadas em estufa a 30° C e a contagem das colônias foi realizada após 48 h de crescimento com o auxílio de um contador de colônias (Vieira & Nahas, 2000).

3. Resultados e discussão

Os resultados apresentados na Tabela 2 indicaram que houve um decaimento dos n-alcanos nas unidades de biorremediação do Ponto 1, principalmente aos 21 dias do experimento, com uma redução de 86% em relação à quantidade inicial de tais compostos. Após 28 dias já não foi mais detectada presença de n-alcanos nestes sistemas. Os valores apresentados indicaram ainda a biodegradação dos n-alcanos nas unidades de biorremediação com Osmocote® no Ponto 2, com a total remoção desses compostos após 28 dias de experimento. Em 21 dias de experimento, o Osmocote® foi responsável pela redução de mais de 88% dos n-alcanos no Ponto 2. Com relação ao Ponto 3, as unidades de biorremediação com Osmocote® reduziram pouco mais de 30% a composição dos n-alcanos do óleo derramado aos 42 dias, apresentando uma degradação similar à do controle, que obteve 20% de degradação neste mesmo tempo. Já nas unidades com NPK houve uma redução de cerca de 68% para os compostos saturados lineares, ou seja, 48% maior que o controle. No entanto, no Ponto 3 em nenhum dos casos houve a remoção completa desses compostos ao final do experimento, como ocorreu nos Pontos 1 e 2 com a aplicação de Osmocote®.

Tabela 2 Valores do somatório dos n-alcanos normalizados pelo $\alpha\beta\text{C}_{30}$ hopano, componente do petróleo resistente à biodegradação, para os Pontos 1, 2 e 3 durante 42 dias de experimento

| Tempo | Σ n-alcanos/ $\alpha\beta\text{C}_{30}$ hopano | | | | | | |
|--------|---|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|----------------|
| | Ponto 1 | | Ponto 2 | | Ponto 3 | | |
| | Osmocote® | Controle | Osmocote® | Controle | Osmocote® | NPK | Controle |
| Dia 0 | 24,1 \pm 14,3 | 23,5 \pm 11,0 | 23,9 \pm 10,6 | 24,3 \pm 10,00 | 23,0 \pm 10,7 | 23, 9 \pm 10,4 | 22,1 \pm 7,3 |
| Dia 7 | 16,9 \pm 8,0 | 23,2 \pm 10,8 | 18,2 \pm 5,7 | 19,1 \pm 7,4 | 19,1 \pm 8,2 | 18,6 \pm 9,6 | 18,6 \pm 9,5 |
| Dia 14 | 11,3 \pm 11,8 | 17,9 \pm 8,3 | 9,6 \pm 0,7 | 18,6 \pm 8,7 | 19,0 \pm 7,4 | 16,0 \pm 8,1 | 19,0 \pm 8,8 |
| Dia 21 | 3,3 \pm 2,6 | 6,2 \pm 2,9 | 4,6 \pm 0,4 | 17,7 \pm 9,1 | 18,9 \pm 6,6 | 9,9 \pm 5,1 | 19,5 \pm 7,1 |
| Dia 28 | 0,5 \pm 0,3 | 2,6 \pm 1,2 | 2,8 \pm 0,7 | 17,5 \pm 8,1 | 17,3 \pm 6,8 | 8,1 \pm 4,2 | 18,6 \pm 6,2 |
| Dia 42 | n.d. | 3,00 \pm 1,4 | n.d. | 17,4 \pm 6,1 | 16,6 \pm 6,5 | 7,6 \pm 3,3 | 17,6 \pm 6,5 |

3.1 Monitoramento Microbiológico do Crescimento de Bactérias Heterotróficas

Os resultados da contagem de UFC do Ponto estão demonstrados no gráfico da Figura 1.

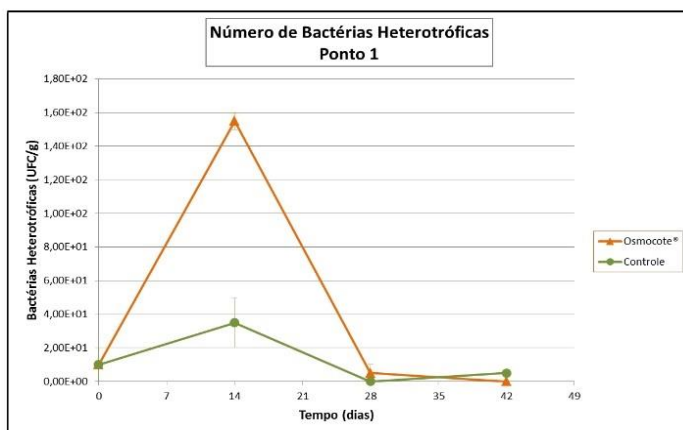


Figura 1: Valores médios do número de bactérias heterotróficas (UFC/g) medidos nas unidades de biorremediação e de controle do Ponto 1.

Foi possível observar que a quantidade de bactérias heterotróficas no início do experimento (Dia 0) foi muito reduzida, com uma média de 10 UFC/g, sendo menor que a quantidade de bactérias presentes no solo de praia e na água do mar, 23 UFC/g e 7,1.103 UFC/mL respectivamente. Essa queda na quantidade das bactérias se deu provavelmente pela contaminação do solo com petróleo, que é tóxico para muitos microrganismos levando à redução significativa deles. No entanto, após a adição de nutrientes pelo Osmocote®, as bactérias heterotróficas aumentaram sua população, conforme observado entre os Dias 0 e 14.

Neste período, a bioestimulação com o Osmocote® aumentou em quase 8 vezes a contagem em comparação ao controle, levando assim a uma degradação 30% maior quando comparado o mesmo período no controle. A queda na totalidade de bactérias heterotróficas entre os dias 14 e 28 pode ser explicada pelo fato de que neste período houve uma diminuição de aproximadamente 45% do total de n-alcanos, perfazendo assim 98% do total inicial, o que significa que neste ponto a presença de substrato para as bactérias já era muito reduzida, diminuindo assim a presença das mesmas. As bactérias heterotróficas remanescentes foram responsáveis por degradar os 2% restantes de n-alcanos que, ao dia 42, já não foram mais identificados nas amostras. Nas colunas controle até o dia 28, 90% dos n-alcanos foram degradados, valor próximo do observado para o mesmo período sob bioestimulação. No ponto 1 apesar de os valores para os compostos saturados e lineares do petróleo, indicarem que o processo de biorremediação com Osmocote® não foi tão vantajoso, pois o controle sofreu expressiva atenuação natural, houve crescimento de bactérias quando foi adicionado nutriente. E, somente com a aplicação do fertilizante é que os n-alcanos foram completamente biodegradados no ambiente contaminado.

Gallego e colaboradores (2005) realizaram um estudo para avaliar a atenuação natural e a biorremediação através da adição de um fertilizante oleofílico em uma praia da Espanha após o

derramamento do navio-tanque Prestige em 2002. Em seus experimentos eles observaram que a atenuação natural retirou dos sedimentos quase 100% dos n-alcanos e 35% dos aromáticos nos primeiros meses após o derramamento. Contudo, com a bioestimulação ocorreu uma maior degradação dos hidrocarbonetos mais recalcitrantes, especialmente os aromáticos. Desta forma, apesar de não relacionarmos a degradação de aromáticos em nossos experimentos, existe um paralelo de extensão da biodegradação quando se utiliza um fertilizante. Além destes dados, os autores notaram uma marcante redução de hidrocarbonetos em locais onde fluía água constantemente, sugerindo ainda em seu trabalho a implementação de novas formas de biorremediação baseadas na irrigação com água fresca fluindo pelos locais contaminados.

Em ambos os Pontos 2 e 3, a simulação do derrame acidental de petróleo foi feita na camada sub-superficial do solo de restinga, representando um vazamento do oleoduto enterrado, com resultados mostrados no gráfico da figura 2.

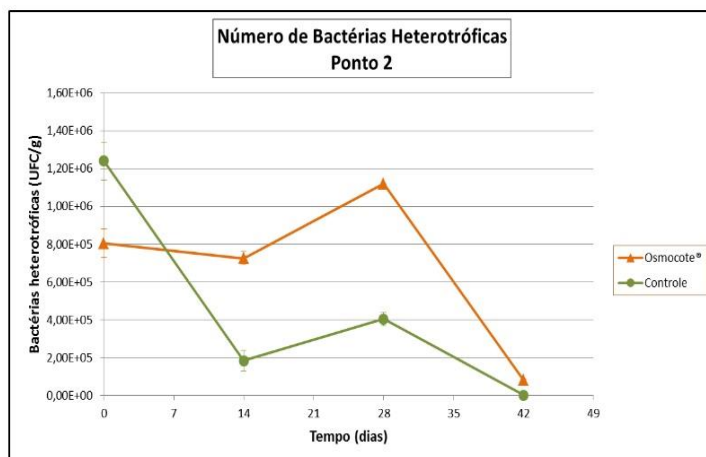


Figura 2: Valores médios do número de bactérias heterotróficas (UFC/g) medidos nas unidades de biorremediação e de controle do Ponto 2.

A partir do gráfico da Figura 2 foi possível observar um comportamento similar em relação ao crescimento das bactérias, tanto para as unidades de biorremediação quanto para as de controle.

Em 28 dias de experimento, as colunas com Osmocote® tiveram redução de 88% dos n-alcanos no Ponto 2. Para o mesmo tempo, o Osmocote® reduziu em 98% os n-alcanos do Ponto 1, apesar de a contaminação no Ponto 2 ser subsuperficial e a introdução de oxigênio à região contaminada ter ocorrido somente pela água do CCM, aplicada diariamente nas unidades de biorremediação e de controle ao longo do experimento.

Ainda, a diminuição do número de bactérias heterotróficas posteriormente aos 28 dias pode ser atribuída à queda na concentração dos hidrocarbonetos lineares. Estes resultados são compatíveis com os resultados apresentados por Xu e colaboradores (2005), no qual os autores compararam a ação da biorremediação na presença de Osmocote e de um combinado de Osmocote com quitosana, um polímero natural. No experimento a degradação do petróleo foi avaliada através de análises por cromatografia gasosa e a ação dos microrganismos foi verificada através de ensaios de atividade

enzimática para desidrogenase, enzima chave para o consumo de hidrocarbonetos, como visto anteriormente. A maior atividade enzimática foi encontrada também aos 28 dias de estimulação, com posterior queda ao nível inicial por volta dos 42 dias. Os resultados referentes aos hidrocarbonetos apontaram para um declínio de cerca de 90% dos alcanos totais para este mesmo período, sendo que para ambos os tratamentos, em presença de quitosana e sem, o resultado obtido para estas frações foi o mesmo.

Para o Ponto 3, apesar de o gráfico A da Figura 3 abaixo mostrar um aumento das bactérias heterotróficas totais não houve aumento significativo com relação ao controle. Houve uma diminuição de somente 25% da concentração inicial na unidade bioestimulada quando analisados aos 28 dias, momento em que foi observado o pico da presença de bactérias. Os n-alcanos se mantiveram relativamente estáveis, com uma diminuição de apenas 4% entre o dia 28 e 42. No controle, ao dia 28, foi verificado que 15% do total dos n-alcanos foi eliminado e entre este e o dia 42 ocorreu uma diminuição de 5% em seu conteúdo. No entanto, ainda assim, na coluna bioestimulada ocorreu uma degradação de 10% mais que na do controle.

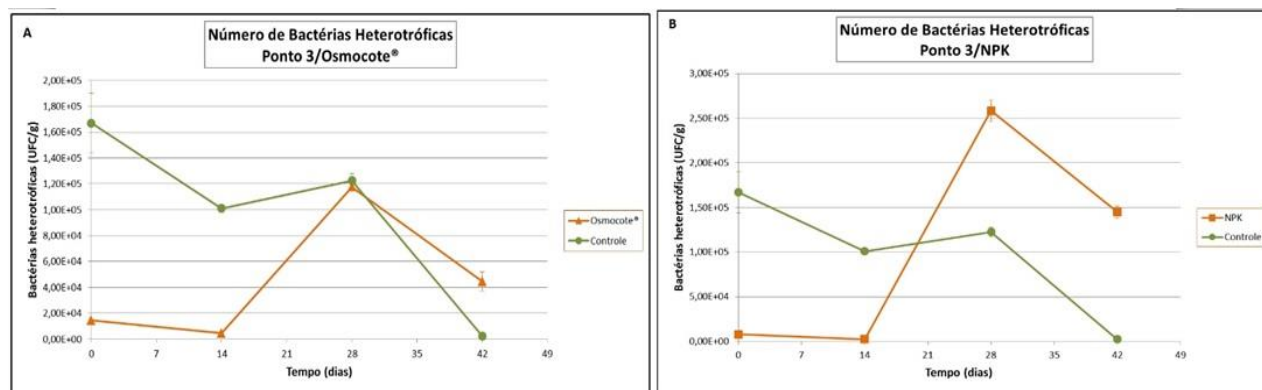


Figura 3: Valores médios do número de bactérias heterotróficas (UFC/g) medidos nas unidades de biorremediação e de controle do Ponto 3. Na figura (A) com Osmocote e na (B) com NPK.

Assim, na coluna biorremediada com o NPK, entre os dias 14 e 28 houve um acentuado crescimento que elevou a contagem de maneira a ultrapassar também em 2 vezes o observado para o seu controle no dia 28. Neste mesmo período foi verificada a degradação de 66% dos n-alcanos. No período que se seguiu até o dia 42, apenas mais 2% foi consumido se mantendo neste nível até o fim das análises químicas. Este tratamento acarretou em uma diminuição 48% maior de n-alcanos quando comparado ao controle.

Como o Ponto 3 era o representativo de um solo seco, a adição de água foi realizada em intervalos de 5 dias. O fato de o NPK ser altamente solúvel em água pode ter feito com que a biorremediação com este produto tivesse um melhor resposta. Segundo Xu (et al, 2004) o produto Osmocote® é formado por esferas revestidas de uma resina semi-permeável cujo interior está preenchido com nutrientes, e, à medida que a água se infiltra na esfera, a membrana incha e se rompe, liberando os nutrientes no meio e tornando-se assim altamente dependente da presença de água.

Neste sentido, a maior presença de água estimulou a total degradação da fração de n-alcanos do petróleo nestes dois pontos através dos microrganismos hidrocarbonoclásticos por conta da maior inserção de oxigênio, fator que foi demonstradamente decisivo para a diminuição na concentração de n-alcanos. o qual além de ser o aceptor de elétrons para a respiração, é também um reagente indispensável na ativação dos mecanismos de catabolização de hidrocarbonetos (Widdel, 2001). E ainda, a adição dos nutrientes provenientes deste fertilizante também ficou comprometida, já que a água, o elemento necessário para o transporte destes compostos foi subtraída na maior parte do desenvolvimento do experimento. Além desses fatores, características intrínsecas dos três diferentes solos mostraram que eles tinham diferentes potencialidades para responder à bioestimulação.

4. Conclusões

No Ponto 1, onde foi aplicado o Osmocote®, o número total de unidades formadoras de colônias foi reduzido durante o período de contagem após o início da simulação. Contudo, o fertilizante de liberação lenta aumentou em 8 vezes a população de bactérias, mostrando assim que ele foi mais efetivo que o controle. Desta maneira, as bactérias que foram bioestimuladas contribuíram à degradação total dos n-alcanos, fato que não ocorreu na unidade controle.

No Ponto 2, onde a contaminação foi simulada subsuperficialmente, a presença de Osmocote® e da água do CCM com oxigenação estimulou o crescimento de bactérias de modo que as limitações criadas na simulação foram transpostas, levando à degradação de 100% dos n-alcanos, enquanto o controle obteve uma diminuição de 30% ao fim dos 42 dias de experimento.

Para o Ponto 3, foi observado que a aplicação do NPK levou a uma bioestimulação 2 vezes maior que o Osmocote® e que assim teve uma redução 48% maior que a dos n-alcanos na simulação com o Osmocote®. Contribuiu para isto o fato de o NPK ser mais solúvel em água, se tornando deste modo mais indicado para bioestimulação de ambientes secos. No entanto, em nenhum dos dois casos foi observada a total degradação dos n-alcanos.

6. REFERÊNCIAS

- ATLAS, R. M. (1995). Petroleum Degradation and Oil Spill Bioremediation. Marine Pollution Bulletin, v. 31, p. 178-192.
- BAKER, K. H; HERSON D.S. (1994). Bioremediation. New York: McGraw-Hill, p. 375.
- BOOPATHY, R. (2000). Factors Limiting Bioremediation Technologies. Bioresource Technology, v. 74, p. 63-67.
- BRITO, E. M. S.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; OTEYZA, T. G; CRAPEZ, M. A. C; ALELUIA, I.; WASSERMAN J. C. A. (2009). A Case Study in Situ Oil Contamination in a Mangrove Swamp (Rio De Janeiro, Brazil). Marine Pollution Bulletin, v. 58, p. 418–423.
- CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DE SÃO PAULO. (2012). Acidentes – vazamentos de dutos. Disponível Em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/oleo/a_toxicologicos.asp>. Acesso em: jul/2012.

- COOKSON, T. (1995). *Bioremediation Engineering: Design and Application*. McGraw-Hill Incorporation, New York, p. 525.
- CRAPEZ, M.A.C.; Borges, A. L. N. Bispo, M G. S.; Pereira, D. C. (2002) Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência Hoje*, v. 30: 179, p. 32-37.
- DÍAZ, E. (2004). Bacterial Degradation of Aromatic Pollutants: A Paradigm Of Metabolic Versatility. *International Microbiology*, v. 7, p.173-18.
- GALLEGO, J. R.; GONZÁLEZ-ROJAS, E.; PELÁEZ, A. I.; SÁNCHEZ, J.; GARCÍAMARTINEZ, M. J.; ORTIZ, J. E.; TORRES, T.; LLAMAS, J. F. (2006). Natural attenuation and bioremediation of Pretige Fuel oil Along the Atlantic coast of Galicia (Spain). *Organic Geochemistry*, v.37, p. 1869-1884.
- JACQUES R. J. S; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. (2007). Biorremediação De Solos Contaminados Com Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos. *Ciência Rural*, v.37, n.4, p.1192-1201.
- JUWARKAR, A. A.; SINGH, S. K.; MUDHOO, A. (2010). A Comprehensive Overview of Elements in Bioremediation. *Environmental Science Biotechnology*, v.9, p. 215-288.
- LI, G.; HUANG, W.; LERNER, D. N. & ZHANG, X. (2000). Enrichment of Degrading Microbes and Bioremediation of Petrochemical Contaminants in Polluted Soil. *Water Research*, v. 34, p. 3845-3853.
- LING, N.L.A. (2003). *Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons in Oil-Contaminated Beach Sediments*. Tese Doutorado. Department of Chemical and Environmental Engineering. National University of Singapore, p. 184.
- ROTH, C. G.; GARCIAS, C. M. (2008). A Influência dos Padrões de Consumo na Geração de Resíduos Sólidos Dentro do Sistema Urbano. *Revista do Desenvolvimento Regional*, v. 13, n. 3, p. 5 -13.
- TONINI, R. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e Biorremediação de Compostos de Petróleo por Bactérias: Revisão. *Oecologia Australis*, v.14, n. 4, p. 1025-1035, 2010.
- VIEIRA, F. C. S.; NAHAS, E. (2000) Quantificação de Bactérias Totais e Esporuladas no Solo. *Scientia Agrícola*, v.57, n.3, p.539-545.
- WIDDEL, F.; RABUS, R., (2001). Anaerobic Biodegradation of Saturated and Aromatic Hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, p. 259-27.
- XU, R.; LAU, N.L.A.; NIG, K.L.; OBBARD, J. F. (2004). Application of a Slow-Release Fertilizer for Oil Bioremediation in Beach Sediment. *Journal of Environmental Quality*, V. 33, p. 1210-1216.
- XU, R.; YONG, L. C.; LIM, Y. G.; OBBARD, J. F., (2005). Use of Slow-Release Fertilizer and Biopolymers for Stimulating Hydrocarbon Biodegradation in Oil-Contaminated Beach Sediments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 51, p. 1101-1110.
- YANG, S.; HUI-JAN, J.; ZHI, W.; RUI-XIA, H.; YAN-JUN, J.; XIU-MEI, L.; SHAO-PENG, Y. (2009). Bioremediation Of Oil Spills In Cold Environments: A Review. *Pedosphere*, ed.19, v. 3, p. 371-381.