



LIGIA GIBINI DOS SANTOS

**UTILIZAÇÃO DE CONSÓRCIO BACTERIANO PARA  
BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS  
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EM SOLO**

CAMPINAS

2013





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LIGIA GIBINI DOS SANTOS

**UTILIZAÇÃO DE CONSÓRCIO BACTERIANO PARA  
BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS  
AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EM SOLO**

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lucia Regina Durrant

Co-orientador: Prof. Dr. Matthew James Grossman

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do  
título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA LIGIA GIBINI DOS SANTOS  
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. LUCIA REGINA DURRANT**

Assinatura do Orientador

---

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647- BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Santos, Ligia Gibini dos.  
Sa59u Utilização de consórcio bacteriano para biodegradação  
de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em solo / Ligia  
Gibini dos Santos -- Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Lucia Regina Durrant.  
Coorientador: Matthew James Grossman.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Biorremediação. 2. Hidrocarbonetos  
policíclicos aromáticos. 3. Consórcios microbianos. 4.  
Degradação. 5. Hexaclorobenzeno. I. Durrant, Lucia  
Regina, 1957- II. Grossman, Matthew James. III.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** The utilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by  
microbial consortia

**Palavras-chave em inglês:**

Biorremediation

Polycyclic aromatic hydrocarbons

microbial consortia

Degradation

hexachlorobenzene

**Área de concentração:** Ciência de Alimentos

**Titulação:** Mestra em Ciência de Alimentos

**Banca examinadora:**

Lucia Regina Durrant [Orientador]

Rose Marry Araújo Gondim Tomaz

Luciana Frias Reyes

**Data da defesa:** 26-02-2013

**Programa de Pós Graduação:** Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Regina Durrant  
Orientadora

---

Dr. Alexandre Nunes Ponezi  
Membro Titular  
(CPQBA/UNICAMP).

---

Dr<sup>a</sup>. Rose Marry Araújo Gondim Tomaz  
Membro Titular  
(IAC-SP)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Frias Reyes  
Membro Suplente  
(FMU)

---

Dr<sup>a</sup>. Ísis Serrano Silva  
Membro Suplente  
(Wisetec/Pró Ambiente)



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elisabeth Gibbin e Antônio dos Santos, por todo o amor e dedicação; e ao meu irmão Guilherme, por toda a diversão. Amo vocês!

À Prof<sup>a</sup>. Lucia, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e por possibilitar a realização deste trabalho.

Ao Prof. Matthew, coorientador, por toda a ajuda, paciência e idéias que contribuíram imensamente na elaboração deste trabalho. Thank you for all the time spent on the GC and molecular analysis!

A todos os amigos da graduação, que tornaram meus anos de Unicamp maravilhosamente inesquecíveis.

Ao meu “mais que amigo” André Halley, por toda a paciência, carinho e compreensão durante todos esses anos. Obrigada pela ajuda nos finais de semana!

Ao meu eterno Bebezão, por fazer da minha casa em Campinas um verdadeiro lar.

À Dra. Francine Piubeli, por toda a ajuda a mim destinada desde o primeiro dia no laboratório e em especial pela grande colaboração na realização das análises moleculares.

À Dra. Andréia Faria, pelos grande auxílio na produção do biossurfactante.

Ao Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de São Carlos, pela infraestrutura oferecida para a realização das análises moleculares.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e por terem contribuído significativamente na construção dessa obra.

Aos colegas de laboratório, Emerson, Fernanda e Ivan, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos professores do Instituto de Ciências Biológicas e da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pela contribuição na minha formação acadêmica.

À agência de fomento CNPq, pelo auxílio financeiro, propiciando a realização deste trabalho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho,

*Muito obrigada!*



## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	xii
LISTA DE FIGURAS .....	xv
LISTA DE ABREVIACÕES .....	.xvii
RESUMO .....	.xviii
ABSTRACT .....	xx
<b>1. <u>INTRODUÇÃO</u> .....</b>	<b>1</b>
<b>2. <u>REVISO BIBLIOGRÁFICA</u> .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. <u>HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS</u> .....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Definição e contaminação ambiental .....	4
2.1.2. Efeitos sobre o ambiente e os seres vivos. ....	8
<b>2.2. <u>BIORREMEDIAÇÃO</u> .....</b>	<b>10</b>
2.2.1. Definição e tcnicas .....	10
2.2.2. Biorremediação de HAPs .....	12
2.2.3. Micro-organismos degradadores de HAPs .....	14
2.2.4. Marcadores internos e a molcula de hexaclorobenzeno .....	15
2.2.5. Fatores que afetam a biodegradação no solo .....	18
<b>2.3. <u>TOXICOLOGIA</u> .....</b>	<b>20</b>
<b>2.4. <u>TCNICAS MOLECULARES APLICADAS  BIORREMEDIAÇÃO</u> ..</b>	<b>21</b>
<b>3. <u>OBJETIVOS</u> .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. <u>OBJETIVOS GERAIS</u> .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. <u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u> .....</b>	<b>23</b>
<b>4. <u>MATERIAL E MTODOS</u> .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. <u>SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS</u> .....</b>	<b>25</b>

4.2. <u>SOLO UTILIZADO</u> .....	28
4.3. <u>MONTAGEM DOS MICROCOSMOS DE SOLO</u> .....	29
4.3.1. Preparo do solo .....	29
4.3.2. Preparo do inóculo .....	29
4.3.3. Parte I – Experimento preliminar .....	30
4.3.3.1. <i>Preparo dos microcosmos</i> .....	30
4.3.4. Parte II .....	32
4.3.4.1. <i>Produção de biossurfactante por <u>Gordonia amicalis</u></i> . . .	32
4.3.4.2. <i>Purificação parcial do biossurfactantes</i> .....	35
4.3.4.3. <i>Preparo dos microcosmos</i> .....	35
4.4. <u>ESTUDO DO HEXACLOROBENZENO COMO BIOMARCADOR</u> . . .	37
4.4.1. Microcosmos .....	37
4.4.2. Bandeja .....	38
4.5. <u>DETERMINAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DOS HAPs</u> .....	39
4.5.1. Extração dos HAPs do solo .....	39
4.5.2. Análise por Cromatografia Gasosa .....	40
4.6. <u>TESTE TOXICOLÓGICO: <i>Lactuca sativa</i></u> .....	40
4.7. <u>ANÁLISES MOLECULARES</u> .....	41
4.7.1. Extração e purificação de DNA .....	41
4.7.2. Amplificação do gene que codifica para o RNA ribossomal . . .	42
4.7.3. Purificação dos produtos de PCR e construção de bibliotecas genômicas .....	42
4.7.4. Análise dos clones .....	43
4.7.5. Sequenciamento dos produtos amplificados .....	44
4.7.6. Montagem dos contigs e análises filogenéticas .....	45
5. <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u> .....	46
5.1. <u>SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS</u> .....	46

<b>5.2. <u>PARTE I – EXPERIMENTO PRELIMINAR</u></b> . . . . .	46
5.2.1. Determinação da degradação dos HAPs . . . . .	46
5.2.1.1. <i>Solo sem histórico de contaminação</i> . . . . .	46
5.2.1.2. <i>Solo proveniente da REPLAN</i> . . . . .	53
<b>5.3. <u>PARTE II</u></b> . . . . .	54
5.3.1. Produção de biossurfactante <i>por Gordonia amicalis</i> . . . . .	54
5.3.2. Determinação da degradação dos HAPs . . . . .	56
<b>5.4. <u>ESTUDO DO HEXACLOROBENZENO COMO BIOMARCADOR</u></b> . . . . .	63
5.4.1. Microcosmos . . . . .	63
5.4.2. Bandeja . . . . .	67
<b>5.5. <u>TESTE TOXICOLÓGICO: <i>Lactuca sativa</i></u></b> . . . . .	69
<b>5.6. <u>ANÁLISES MOLECULARES</u></b> . . . . .	71
<b>6. <u>CONCLUSÕES</u></b> . . . . .	97
<b>7. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b> . . . . .	99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Bactérias isoladas de ambientes contaminados com derivados de petróleo e produtoras de biossurfactantes.....	<b>26</b>
<b>Tabela 2.</b> Composição do meio mínimo de sais (pH 7,3) em 1L de água destilada (Rambeloarisoa <i>et. al.</i> , 1984).....	<b>27</b>
<b>Tabela 3.</b> Composição da solução de vitaminas (Faria, 2010).....	<b>27</b>
<b>Tabela 4.</b> Microcosmos construídos para a primeira parte do projeto.....	<b>31</b>
<b>Tabela 5.</b> Solução padrão de HAPs.....	<b>31</b>
<b>Tabela 6.</b> Composição do meio mineral base para a produção de surfactante por <i>G. amicalis</i> em 1 L de água destilada (Franzetti, 2008 – adaptado).....	<b>33</b>
<b>Tabela 7.</b> Microcosmos construídos na segunda parte do projeto.....	<b>36</b>
<b>Tabela 8.</b> Porcentagem de degradação dos HAPs após 16 semanas, nos microcosmos da parte I do projeto. Média obtida das duplicatas.....	<b>47</b>
<b>Tabela 9.</b> Resultados de três tratamentos diferentes para a obtenção de biossurfactantes. Halo e absorvância obtidos após 24 horas de agitação.....	<b>55</b>
<b>Tabela 10.</b> Porcentagem de degradação dos HAPs após 4 semanas, nos microcosmos da parte II do projeto. Média obtida das duplicatas.....	<b>57</b>
<b>Tabela 11.</b> Características dos HAPs utilizados (Seabra, 2008).....	<b>59</b>
<b>Tabela 12.</b> Porcentagem de degradação dos HAPs após 14 dias. Microcosmos construídos para análise do hexaclorobenzeno como biomarcador.....	<b>63</b>
<b>Tabela 13.</b> Gêneros da ordem Oxalobacteraceae encontrados no microcosmo no tempo inicial (T0) e após 22 dias (T7).....	<b>77</b>
<b>Tabela 14.</b> Ordens da classe Alphaproteobacteria encontradas no microcosmo M1A no tempo inicial (T0) e após 22 dias (T7).....	<b>77</b>

<b>Tabela 15.</b> Famílias da ordem Sphingomonadales encontradas no microcosmo M1A no tempo inicial (T0) e após 22 dias (T7).....	<b>77</b>
<b>Tabela 16.</b> Classes do filo Firmicutes encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).....	<b>79</b>
<b>Tabela 17.</b> Subclasses do filo Actinobacteria encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).....	<b>79</b>
<b>Tabela 18.</b> Famílias da ordem Sphingomonadales encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).....	<b>81</b>
<b>Tabela 19.</b> Gêneros da família Sphingomonadaceae encontrados nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).....	<b>82</b>
<b>Tabela 20.</b> Ordens da classe Betaproteobacteria encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).....	<b>82</b>
<b>Tabela 21.</b> Gêneros da família Alcaligenaceae encontrados nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).....	<b>84</b>
<b>Tabela 22.</b> Ordens da classe Gammaproteobacteria encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).....	<b>84</b>
<b>Tabela 23.</b> Gêneros da ordem Pseudomonadales encontrados nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).....	<b>84</b>
<b>Tabela 24.</b> Gêneros da ordem Xanthomonadales encontrados nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).....	<b>85</b>
<b>Tabela 25.</b> Ordens da classe Betaproteobacteria encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).....	<b>87</b>

**Tabela 26.** Ordens da classe Gammaproteobacteria encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).....88

**Tabela 27.** Ordens da classe Alphaproteobacteria encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).....88

**Tabela 28.** Famílias da ordem Sphingomonadales encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).....88

**Tabela 29.** Gêneros da família Sphingomonadaceae encontrados nos microcosmos M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).....89

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Exemplos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.....	4
<b>Figura 2.</b> Rotas metabólicas da degradação de HAPs por bactérias e fungos em sistema aeróbio (Silva, 2007).....	14
<b>Figura 3.</b> Fórmula estrutural da molécula de hexaclorobenzeno.....	18
<b>Figura 4.</b> Esquema de divisões imaginárias da área total da bandeja utilizada para teste de estabilidade do hexaclorobenzeno.....	38
<b>Figura 5.</b> Porcentagem de degradação dos HAPs nos microcosmos construídos com solo sem histórico de contaminação, acrescidos de HAP (M2) Duplicatas (A e B) e média entre elas.....	49
<b>Figura 6.</b> Porcentagem de degradação dos HAPs nos microcosmos construídos com solo sem histórico de contaminação, acrescidos de HAP e inóculo (M3) Duplicatas (A e B) e média entre elas.....	50
<b>Figura 7.</b> Porcentagem de degradação dos HAPs nos microcosmos construídos com solo sem histórico de contaminação, acrescidos de HAP e <i>G. amicalis</i> (M8) Duplicatas (A e B) e média entre elas.....	51
<b>Figura 8.</b> Porcentagem de degradação dos HAPs nos microcosmos construídos com solo sem histórico de contaminação, acrescidos de HAP e inóculo, sem HCB (M10) Duplicatas (A e B) e média entre elas.....	52
<b>Figura 9.</b> Altura do halo formado após 24h da agitação com tolueno.....	56
<b>Figura 10.</b> Porcentagem de degradação relativa dos HAPs (HAP/HCB) nos microcosmos M2 (HAP sem inóculo), M4 (HAP + inóculo), M5 (HAP + inóculo + biossurfactante) e M6 (HAP + azido de sódio).....	62
<b>Figura 11.</b> Porcentagem de degradação total e relativa dos HAPs nos microcosmo A, construído para análise do hexaclorobenzeno como biomarcador. A, A1 e A11 indicam pontos de coleta distintos dentro do mesmo microcosmo.....	65

<b>Figura 12.</b> Porcentagem de degradação total e relativa dos HAPs no microcosmo B, construído para análise do hexaclorobenzeno como biomarcador. B, BI e BII indicam pontos de coleta distintos dentro do mesmo microcosmo.....	<b>66</b>
<b>Figura 13.</b> Porcentagem de degradação total e relativa dos HAPs nas diferentes regiões amostradas na bandeja (figura 4).....	<b>68</b>
<b>Figura 14.</b> Germinação das sementes de <i>Lactuca sativa</i> nas amostras dos diferentes microcosmos. M1 = controle, M2 = HAPs, M4 = HAPs + inóculo.....	<b>70</b>
<b>Figura 15.</b> Filos dominantes encontrados no microcosmos controle M1A no tempo inicial (T0) e após 22 dias (T7).....	<b>73</b>
<b>Figura 16.</b> Subordens de Actinomycetales predominantemente encontradas em M1A (controle) no tempo inicial (T0) e após 22 dias (T7).....	<b>74</b>
<b>Figura 17.</b> Principais classes do filo Firmicutes encontradas no microcosmo M1A no tempo inicial (T0) e após 22 dias (T7).....	<b>75</b>
<b>Figura 18.</b> Principais famílias da ordem Burkholderiales encontradas no microcosmo M1A no tempo inicial (T0) e após 22 dias (T7).....	<b>76</b>
<b>Figura 19.</b> Comparação entre os filotaxons encontrados em M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).....	<b>78</b>
<b>Figura 20.</b> Diferenças observadas nas classes do filo Proteobacteria entre os microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).....	<b>80</b>
<b>Figura 21.</b> Diferenças observadas nas ordens da classe Alphaproteobacteria entre os microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).....	<b>81</b>
<b>Figura 22.</b> Diferenças observadas nas famílias da ordem Burkholderiales entre os microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).....	<b>83</b>
<b>Figura 23.</b> Comparação entre os filotaxons encontrados em M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).....	<b>86</b>

<b>Figura 24.</b> Comparação entre as classes pertencentes ao filo Proteobacteria encontradas em M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).....	<b>87</b>
<b>Figura 25.</b> Comparação das subordens de Actinomycetales encontradas em M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).....	<b>90</b>
<b>Figura 26.</b> Filos encontrados M1A T0 (controle) e M1B T7 (microcosmo com HCB apenas, após 22 dias).....	<b>91</b>
<b>Figura 27.</b> Comparação entre as subordens do filo Actinobacteria encontradas em M1A T0 (controle) e M1B T7 (microcosmo com HCB apenas, após 22 dias).....	<b>92</b>
<b>Figura 28.</b> Comparação das classes, pertencentes ao filo Proteobacteria, encontradas em M1A T0 (controle) e M1B T7 (microcosmo com HCB apenas, após 22 dias).....	<b>94</b>

## **LISTA DE ABREVIÇÕES**

**CETESB** - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

**EPA** – Agência de Proteção Ambiental Americana

**CAS** - *Chemical Abstracts Service*

**GC** – Cromatografia Gasosa

**CG-FID** – Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chama

**HAP** – Hidrocarboneto Aromático Policíclico

**HCB** – Hexaclorobenzeno

**POP** – Poluente Orgânico Resistente

**REPLAN** – Refinaria de Petróleo de Paulínia

**K<sub>H</sub>** - Constante da lei de Henry

**K<sub>oc</sub>** - Coeficiente de partição normalizado para carbono orgânico.

## RESUMO

Dentre os contaminantes ambientais mais abundantes, destacam-se os Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), que apresentam elevado potencial tóxico, sendo imprescindível sua remoção do ambiente. O objetivo deste trabalho foi analisar, em microcosmos, a biodegradação de HAPs por um consórcio bacteriano e identificar fatores que influenciam nesta degradação e na análise dos dados. A degradação dos HAPs no solo sem histórico de contaminação foi muito semelhante em todos os microcosmos, apresentando uma porcentagem de aproximadamente 85%. Para analisar a toxicidade do solo antes e depois da biorremediação, realizou-se um testes de germinação de sementes de *Lactuca sativa* (alface). O teste mostrou baixa toxicidade do solo após 80 dias da contaminação, com ou sem a adição do consórcio. Durante estudos de remediação biológica, é necessário utilizar um marcador interno para minimizar a dispersão e extração irregulares dos contaminantes. Neste estudo foi utilizado o hexaclorobenzeno, que mostrou excelente, uma vez que não sofreu nenhum tipo de degradação. Análises moleculares mostram que a adição de HAPs alterou significativamente a comunidade microbiana, favorecendo os membros degradadores de tais poluentes. O consórcio adicionado inibiu o crescimento de alguns micro-organismos autóctones. Além disso, não houveram evidências de

que os micro-organismos degradadores de HAPs adicionados persistiram, sugerindo que eles podem não competir eficientemente com a população microbiana autóctone. Não houve efeito claramente identificado do hexaclorobenzeno sobre o crescimento de micro-organismos, com exceção de um aumento no número de organismos pertencentes da classe Alphaproteobacteria.

**Palavras-chave:** Biorremediação, Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, Consórcios microbianos, Degradação, Hexaclorobenzeno.

## ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) stand out as among the most abundant and toxic of environmental contaminants, and their removal from contaminated sites is indispensable for a healthy environment. The objective of this study was to analyze, in soil microcosms, the biodegradation of PAHs by a bacterial PAH degrading consortium and identify factors that influence this degradation and data analysis. Degradation of PAHs in soil with no history of contamination was very similar in microcosms with or without bioaugmentation, with the extent of PAH removal of about 85% in all cases. The germination of *Lactuca sativa* (lettuce) in soils taken from the microcosms was used to examine the toxicity of the soil before and after bioremediation. The test showed a low toxicity of the soil 80 days after PAH contamination, with or without the addition of the consortium. During studies of biological remediation it is necessary to use an internal non-biodegradable marker to minimize the effect of uneven dispersion and irregular extraction of pollutants. This study used hexachlorobenzene as the non-biodegradable marker and it proved to be an excellent marker as it did not suffer any significant degradation in the soil microcosms. Molecular analyzes showed that the addition of PAHs significantly altered the microbial community by encouraging the growth of PAH degraders. In addition, the added microbial consortium was

found to inhibit the growth of some of the indigenous microorganisms. Furthermore, there was no evidence that the added PAH degraders persisted, suggesting that they might not compete effectively with the native microbial population. There was little effect of hexachlorobenzene on the microbial community or on the removal of the PAH contaminants, with the exception of an increase in the number of organisms belonging to the class Alphaproteobacteria.

**Keywords:** Biorremediation, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Microbial consortia, Degradation, Hexachlorobenzene.

## **1. INTRODUÇÃO**

A contaminação ambiental crescente nas últimas décadas e acentuada após a segunda guerra mundial é o resultado direto de atividades petroquímicas, industriais, agrícolas e do próprio estilo de vida moderno. Substâncias provenientes do petróleo são as matérias-primas e fontes de energia mais utilizadas na indústria e em nosso cotidiano e, conseqüentemente, estão entre os contaminantes ambientais mais abundantes. Dentre essas substâncias, destacam-se os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, que apresentam elevado potencial tóxico e recalcitrante.

Além da emissão de resíduos durante a utilização, muitos acidentes e derramamento de óleo ocorrem durante a exploração, a produção, o refinamento, o transporte e o armazenamento de petróleo e seus produtos. A liberação de hidrocarbonetos no ambiente, acidentalmente ou por atividades humanas, é a maior causa de poluição da água e do solo. Essa contaminação é preocupante, pois muitos destes compostos são altamente tóxicos ao meio ambiente e à saúde dos seres humanos e de outros seres vivos, podendo ocasionar a morte desses organismos ou mutações genéticas.

Atualmente, dispõem-se de diversas estratégias para remediação de ambientes impactados, podendo ser empregadas ações químicas, físicas ou biológicas. No entanto, técnicas de remediação física e química são dispendiosas

e podem levar a uma decomposição incompleta dos contaminantes. A remediação biológica, ou biorremediação, é considerada a técnica menos invasiva e que apresenta melhor custo-benefício. Essa técnica consiste em utilizar a capacidade intrínseca de alguns micro-organismos metabolizarem determinados poluentes, mineralizando-os completamente até H<sub>2</sub>O e CO<sub>2</sub> ou reduzindo seu potencial tóxico inicial.

A intensidade da biodegradação é influenciada por vários fatores, tais como a disponibilidade de nutrientes, oxigênio, pH, temperatura, umidade, micro-organismos presentes, qualidade e quantidade de contaminantes biodisponíveis e propriedades do solo ou da água. Assim, a biorremediação pode ser realizada por bioestimulação, quando são otimizadas as condições do ambiente a ser remediado (temperatura, umidade, aeração, nutrientes e pH), promovendo o crescimento das populações de micro-organismos do local e o aumento de suas atividades metabólicas. Ou por bioaumentação, quando se introduz no local contaminado micro-organismos com potencial de degradação elevado.

Micro-organismos individuais podem metabolizar apenas uma limitada fração dos compostos orgânicos presentes no petróleo. No entanto, comunidades microbianas complexas, como as presentes no solo, dispõem de uma grande variedade de complexos enzimáticos que podem levar à completa mineralização dos contaminantes. Assim, em experimentos de bioaumentação, é importante que

se utilize um consórcio microbiano, ou seja, um conjunto de diferentes espécies de micro-organismos. Em resumo, a adição de diferentes micro-organismos aumenta a chance de um composto ser completamente mineralizado quando comparada à adição de uma única espécie de micro-organismos, o qual pode não ser capaz de degradar totalmente o composto estudado.

Em vista disso, este trabalho estudou a degradação de alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em solo, utilizando um consórcio bacteriano.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

#### 2.1.1. Definição e Contaminação Ambiental

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) representam uma classe de compostos orgânicos constituídos de dois ou mais anéis benzênicos (Clemente, 2002) (Figura 1). São produzidos principalmente pela combustão incompleta de matéria orgânica e vários HAPs são encontrados naturalmente no ambiente. Entretanto, nas últimas décadas, o aumento da população e o desenvolvimento de novas tecnologias, têm proporcionado um aumento significativo destas substâncias, causando transtornos ecológicos (Barbosa *et al.*, 2008).

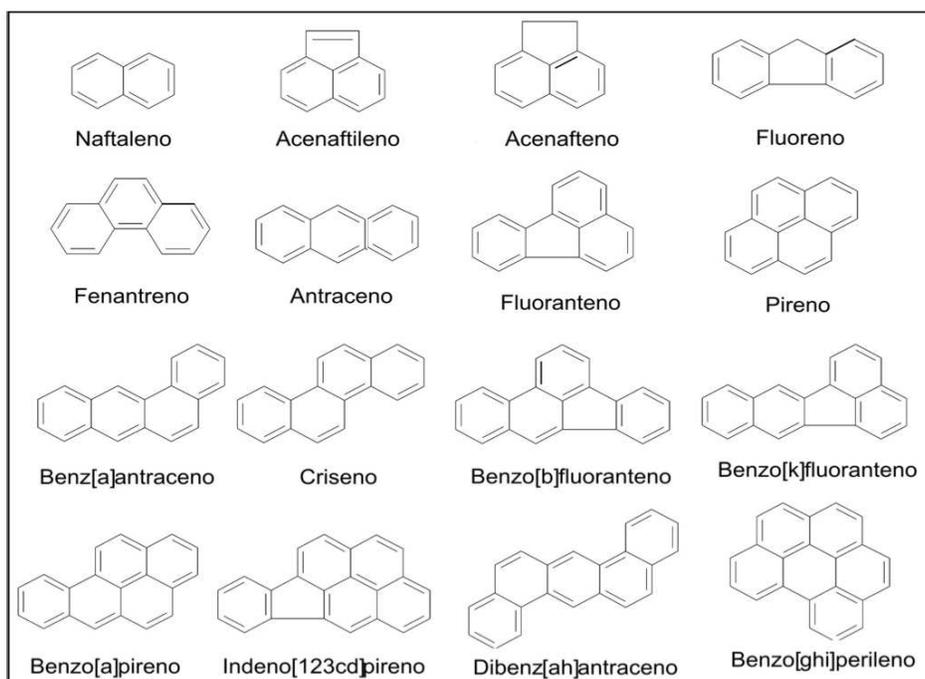


Figura 1. Exemplos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

O acúmulo de HAPs no ambiente ocorre por atividades humanas, como na queima de combustíveis fósseis, derramamento de petróleo e diversas atividades industriais. São encontrados também em produtos químicos, como tintas, repelentes de insetos e materiais de construção. Fontes não-antropogênicas incluem queimadas em florestas e erupções vulcânicas (Silva, 2007).

A forma mais comum de liberação de HAPs é na atmosfera, seja como vapores de alta temperatura, seja incluídos em partículas de fuligem. O processo industrial que apresenta maior liberação de HAPs é a coqueificação, no qual o carvão mineral é submetido a temperaturas elevadas na ausência de oxigênio, a fim de evitar a combustão. Ocorre então a liberação de gases presentes em sua estrutura, originando um resíduo sólido poroso e infusível, o carvão coque, constituído praticamente de carbono puro. Embora existam riscos de inalação, que aumentam com a exposição ocupacional, os compostos acabarão sendo depositados em solos e sedimentos (Prince, 1993).

Outras fontes importantes de HAPs são o petróleo e seus derivados. O petróleo é constituído por uma mistura complexa e variável de compostos orgânicos, dos quais a maioria é de hidrocarbonetos (50-98%) (Casellas et al, 1995). Esses hidrocarbonetos podem apresentar-se em uma ampla variedade de estruturas moleculares, como cadeias lineares ou ramificadas, anéis simples, condensados ou aromáticos (Speight,1991). Os HAPs mais abundantes no

petróleo são compostos com até quatro anéis benzênicos (Tissot e Welte, 1978), conhecidos como: naftaleno (2 anéis); fenantreno, antraceno, fluoreno e dibenzotiofeno (3 anéis); pireno, benzo(a)antraceno e criseno (4 anéis).

Embora essenciais à vida moderna como principal fonte de energia e matéria-prima para indústria petroquímica, o petróleo e seus derivados, quando dispostos no ambiente causam sérios problemas ambientais e oferecem um alto risco à saúde do homem e de outros seres vivos (Prince, 1993; Kanaly et. al., 2000, Valentin et. al., 2006). Historicamente, têm-se notícias de inúmeros acidentes ocorridos no mundo todo. Grande parte dos acidentes ocorre durante o transporte naval, representando 45,5% do total de petróleo lançado ao mar. Não muito distante dos acidentes durante o transporte naval, vazamentos em terra representam 29% (Sloan, 1999).

O primeiro grande acidente com petróleo ocorreu na Inglaterra em 1967 (Poffo, 2000). Contudo, o acidente mais conhecido ocorreu em 1989, no Alaska, com o petroleiro Exxon Valdez, que derramou 37.000 toneladas de petróleo que impactaram 5.000 quilômetros de costa desse estado e foi considerado o maior acidente ecológico dos Estados Unidos e um dos maiores do mundo (CETESB, 2007a). Em abril de 2010, o acidente envolvendo a plataforma de perfuração offshore - Deepwater Horizon, no Golfo do México, resultou no vazamento de aproximadamente 780.000 m<sup>3</sup> de óleo cru no mar (Inafuku e Helal, 2011).

No Brasil, os maiores acidentes ocorreram nos anos setenta envolvendo os petroleiros Tamika Maru, em 1974, no canal de São Sebastião, litoral norte de São Paulo; e Tarik Ibn Zyaid, em 1975, na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro. No entanto, o acidente com maior repercussão na mídia, devido a seu impacto sócio ambiental, ocorreu na Baía de Guanabara em 2000, com o rompimento de um oleoduto que verteu 1,3 toneladas de petróleo (CETESB, 2007a). Mais recentemente, em novembro de 2011, ao menos 2,4 mil barris de petróleo da plataforma pertencente à empresa multinacional americana, Chevron, vazaram na bacia de Campos, Rio de Janeiro. No ano seguinte, outra fissura deu origem a um novo vazamento (Pacheco, 2012).

No estado de São Paulo, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) é o órgão responsável pelo levantamento e monitoramento de áreas contaminadas. O último relatório divulgado, em dezembro de 2010, revelou um dado alarmante: de um total de 3.675 áreas contaminadas, 1.411 consideradas contaminadas por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, apenas 4% foram remediadas. Todas as áreas enquadradas como contaminadas devem fornecer uma proposta de remediação junto à CETESB. Porém, o levantamento sobre o estágio de remediação destas áreas demonstrou que apenas 163 locais contaminados tiveram o processo concluído, enquanto que 1674 áreas (46%) continuam sem qualquer proposta de remediação (CETESB, 2010).

Esta estatística submete à reflexão que existe uma alta demanda por tecnologias de remediação, das quais podemos destacar a biorremediação como uma plausível ferramenta biotecnológica para este emprego (CETESB, 2007b).

### **2.1.2. Efeitos sobre o ambiente e os seres vivos**

Após a entrada no ambiente, substâncias contaminantes sofrem alterações de suas características originais, devido a fatores físicos (evaporação, dissolução, dispersão, adsorção às partículas) e biológicos (biodegradação). As transformações físicas e biológicas são reguladas pelas características específicas das moléculas liberadas e do ambiente atingido. Assim, o grande impacto ambiental e persistência do contaminante no ambiente dependem de fatores como: habitat atingido, tipo e quantidade do composto emitido, espécies de organismos atingidos, época do ano, condições hidrográficas e meteorológicas, frequência e duração da exposição e práticas utilizadas na tentativa de descontaminação (Sloan, 1999).

O petróleo e seus derivados, por exemplo, podem persistir por mais de 20 anos nos manguezais, antes que a vegetação se recupere totalmente (Michel, 2002). Esta alta persistência é explicada pela lenta biodegradação destes compostos, devido à limitação de oxigenação do meio e ciclagem lenta dos nutrientes, essenciais para a atividade microbiana aeróbia. Os efeitos tóxicos

imediatos tendem a ser causados, principalmente, por moléculas de baixa massa molecular e que se degradam mais rapidamente. Já os efeitos tóxicos crônicos, são devidos às moléculas de alta massa molecular, geralmente aromáticas. Tais moléculas apresentam menor toxicidade aguda, mas são persistentes, causando efeitos mais duradouros e mais significativos do que os efeitos imediatos (Spies et al, 1996). Pequenas quantidades de petróleo podem ter efeitos de longo prazo na diminuição da diversidade de espécies em um sistema (Howarth, 1991). Essa alteração é causada principalmente por efeitos fisiológicos, carcinogênicos e citogenéticos de longo prazo, alterando a reprodução, crescimento, respiração, movimentação e susceptibilidade a doenças de espécies vegetais e animais em um ambiente contaminado (Suchanek, 1993; Neff, 2002). Foi observado que plantas de mangue diminuíram drasticamente a produção de sementes durante 17 meses após um derramamento de petróleo no sudeste da Austrália (Clark e Ward, 1994). Já em outras regiões, a presença do óleo exerceu impacto negativo sobre a vegetação durante 17 anos (Baker et al, 1993).

Os HAPs, por possuírem muitos anéis aromáticos, são muito resistentes à biodegradação, persistindo por um longo período nos ambientes contaminados. Como exemplos destes compostos altamente tóxicos e persistentes estão o antraceno, o pireno, o fenantreno e o naftaleno. O fenantreno e o benzo-a-pireno (outro HAP) estão entre os 16 HAPs prioritários pela EPA (Agência de Proteção

Ambiental) (Sisinno, 2003). Estes HAPs são de fácil solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água, por possuírem maior massa molar (Atlas, 1995 e Farahat e El-Gendy, 2008).

Dentre os efeitos carcinogênicos causados pelos HAPs, cita-se as alterações enzimáticas nas mucosas do trato gastrintestinal, aumento do peso do fígado, leucemia e tumores no fígado e estômago de animais. Os compostos mais solúveis em água podem ser adsorvidos pela corrente sanguínea, ocasionando danos às células, à medula óssea e, principalmente, ao sistema nervoso central (Dias, 2007).

## 2.2. BIORREMEDIAÇÃO

### 2.2.1. Definição e técnicas

Biorremediação é a utilização da atividade biológica de micro-organismos para a transformação de contaminantes em substâncias inertes, que não ofereçam riscos à saúde (Hollinger, 1997). Quando comparada às técnicas físico-químicas de remediação, apresenta melhor custo-benefício, mostrando-se uma alternativa promissora (Chauhan *et al.*, 2008).

Embora baseadas no princípio da biodegradação, as técnicas de biorremediação envolvem variações de tratamentos, podendo ser *in situ* (no local) ou *ex situ* (fora do local). A biorremediação *in situ* é uma ótima opção quando as

propriedades físico-químicas do solo e do contaminante favorecem a aplicação das técnicas de biorremediação, caso contrário, é necessária a remoção dos contaminantes para tratamento em local adequado - *ex situ* (Silva, 2007). Entre as estratégias para biorremediação de hidrocarbonetos no ambiente, destacam-se a biorremediação passiva, a bioestimulação, a bioaumentação e o *landfarming*.

Na biorremediação passiva ou intrínseca, os contaminantes são degradados pelos micro-organismos naturalmente presentes no solo, sem a aplicação de nenhum método que auxilie nesta degradação. Por depender apenas de processos naturais, a biorremediação passiva pode ser muito lenta, exigindo o monitoramento do local por um longo tempo (Jacques *et al.*, 2007). Já na bioestimulação, as condições de aeração, umidade, composição química e nutricional do solo são otimizadas, estimulando o crescimento de sua microbiota (Silva, 2007). A bioaumentação consiste da inoculação de micro-organismos selecionados (culturas puras ou consórcios) com alta capacidade de degradação e competição, para degradar compostos específicos (Skipper, 1999; Silva, 2007).

No *landfarming*, os resíduos podem ser tratados utilizando as três estratégias anteriormente mencionadas. A biorremediação realizada pela microbiota da camada superficial do solo é estimulada por diferentes processos: o solo é revolvido, com o intuito de aerar e homogeneizar as camadas com diferentes concentrações de contaminantes; são adicionados também corretivos,

fertilizantes e, se necessário, água; e pode-se, ainda, bioaumentar o solo e adicionar surfactantes, visando aumentar a biodisponibilidade dos contaminantes. Esta técnica pode ser realizada *in situ* ou *ex situ*. (Jacques, *et al.*, 2007; Silva, 2007).

A medida do sucesso da remediação de locais contaminados com petróleo e derivados depende de vários parâmetros, entre eles, a degradação dos HAPs presentes (Farahat e El- Gendy, 2008). Microcosmos em escala laboratorial servem como um estágio importante no estudo da eficiência da biodegradação por micro-organismos e também podem servir como um sistema de teste-padrão, que pode ser adaptado a diferentes condições ambientais. Os resultados destes estudos são, frequentemente, utilizados para o desenvolvimento de testes de biorremediação em escala piloto (Farahat e El-Gendy, 2008).

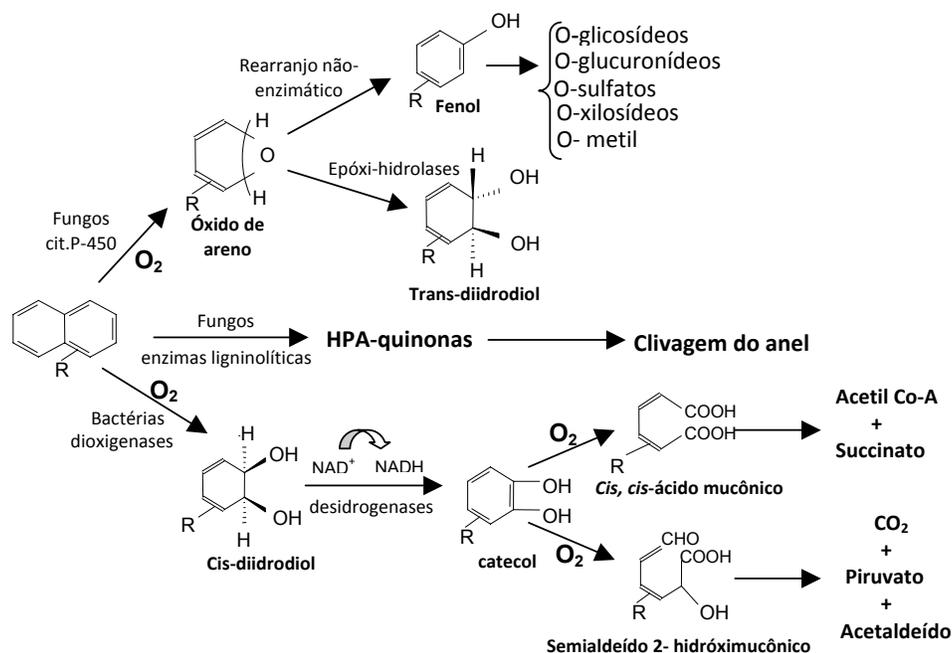
### **2.2.2. Biorremediação de HAPS**

Embora os hidrocarbonetos estejam amplamente distribuídos no ambiente, a capacidade de degradação destas moléculas por animais e plantas é muito limitada. Contudo, bactérias, fungos filamentosos e leveduras possuem alta capacidade para degradar e metabolizar estes compostos. Isto acontece porque alguns micro-organismos possuem um complexo sistema enzimático que confere a capacidade de utilizar os hidrocarbonetos como uma fonte de carbono e energia

(Jacques, 2005). O metabolismo dos hidrocarbonetos pode ser dividido em: metabolismo da fração saturada (n-alcanos, alcanos ramificados e cicloalcanos) e metabolismo da fração aromática, em função dos distintos passos, genes e enzimas envolvidas na degradação (Melo e Azevedo, 1997).

O primeiro passo para biodegradação de hidrocarbonetos por bactérias e fungos envolve a oxidação do substrato por oxigenases. A biodegradação da fração saturada começa por um ataque monoterminal, onde ocorre a formação de um álcool primário, seguido por um aldeído e um ácido monocarboxílico. O ácido carboxílico é degradado via  $\beta$ -oxidação, ocorrendo formação de ácidos graxos com dois carbonos a menos e formação de acetil-coenzima A, com liberação eventual de CO<sub>2</sub> (Melo e Azevedo, 1997).

A fração aromática começa a ser degradada por meio de uma reação de hidroxilação, formando dióis, seguida da clivagem do anel. Ocorre a formação de intermediários comuns (catecol, protocatecol e gentisato), que posteriormente são degradados em intermediários do ciclo de Krebs (Figura 2) (Alexander, 1997). O fator primordial para que ocorra a biodegradação é a existência de genes apropriados que poderão ser expressos na célula. Em micro-organismos, estes genes podem estar presentes em moléculas de DNA extracromossomal (em plasmídeos), e são genes indutíveis (Burlage *et al.*, 1989).



**Figura 2.** Rotas metabólicas da degradação de HAPs por bactérias e fungos em sistema aeróbio (Silva, 2007).

### 2.2.3. Micro-organismos degradadores de HAPs

Apesar de suas propriedades xenobióticas, uma grande variedade de bactérias, fungos e algas foram caracterizadas por sua habilidade em degradar HAPs (Chauhan, *et al.*, 2008). Desde 1950, bactérias degradadoras desses compostos vêm sendo isoladas. Os principais gêneros encontrados são: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Gordonia*, entre outros (Jacques, *et al.*, 2007).

Porém, comparados às culturas puras, consórcios microbianos mostram-se mais eficazes na degradação desses poluentes. Um conjunto de microorganismos possui maior capacidade de utilização de um grande número de HAPs como fonte de carbono, do que bactérias isoladas. Além disso, um consórcio consegue, mais facilmente, mineralizar completamente estes compostos, uma vez que as vias metabólicas de seus membros se complementam (Jacques, *et al.*, 2007). Um exemplo disso é o estudo de Richard e Vogel (1999), no qual verificou-se que, dos sete membros de um consórcio bacteriano degradador de óleo diesel em solo, quatro não utilizavam diretamente o óleo como fonte de carbono; contudo, essas bactérias consumiam os intermediários produzidos pelos demais membros, mineralizando-os.

#### **2.2.4. Marcadores internos e a molécula de hexaclorobenzeno**

Experimentos de biorremediação em solo apresentam alguns problemas de distribuição e extração dos contaminantes a serem estudados. O solo é uma mistura complexa e heterogênea de materiais sólidos, orgânicos ou inorgânicos, com superfícies altamente irregulares, diversos graus de porosidade e variadas propriedades químicas. Homogeneizar mecanicamente os contaminantes do solo não garante a homogeneização dos componentes do mesmo. Essa heterogeneia leva à ocorrência de variações nas concentrações dos compostos xenobióticos em

pontos distintos do solo contaminado. Assim, diferentes amostras apresentam quantidades variadas de contaminantes e, conseqüentemente, uma extração irregular destes. Com isso, a medição das taxas de remoção do resíduos é prejudicada, reduzindo a confiabilidade do estudo (Davis *et al.*, 2003).

Moléculas efetivamente não-biodegradáveis, que possam ser analisadas por cromatografia gasosa e que façam parte da composição do contaminante do solo, podem ser utilizadas como marcadores internos, também conhecidos por biomarcadores em estudos de biorremediação. Um exemplo de marcador interno é a molécula de hopano, encontrada e utilizada nas análises da eficiência de biorremediação no litoral impactado pelo derramamento de petróleo, ocorrido 1989, com o petroleiro Exxon Valdez (Douglas et al, 1992; Prince e Douglas 2005). A análise dos dados utiliza a relação entre a quantidade do contaminante e a quantidade do biomarcador extraídas da amostra (contaminante/biomarcador) para determinar a taxa de degradação. A aplicação desta técnica possibilita a realização de estimativas razoáveis da porcentagem de degradação.

Exemplos de marcadores que já foram utilizados em estudos anteriores são: metais, hidrocarbonetos e hidrocarbonetos clorados. A maioria dos metais não apresenta propriedades físicas semelhantes às dos hidrocarbonetos e, por isso, não podem ser analisados pela mesma técnica. Hopanos purificados são extremamente caros para serem usados em experimentos laboratoriais. Porém,

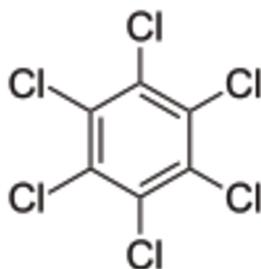
outros hidrocarbonetos, principalmente alcanos com muitas ramificações e alto peso molecular, e HAPs são úteis, se disponíveis, mas são mais facilmente degradados do que hopanos. Os hidrocarbonetos altamente clorados, por sua vez, são muito resistentes à degradação e seu custo-benefício permite que sejam usados em experimentos laboratoriais como biomarcadores (Prince *et al.*, 2008).

Já se demonstrou que o hexaclorobenzeno (HCB) (CAS 118-74-1), um hidrocarboneto altamente clorado (Figura 3), é um marcador eficaz para a análise de biodegradação de combustível B20 (20% de éster metílico de ácidos graxos de óleo de soja, 80% diesel de petróleo) em culturas líquidas em escala laboratorial. O HCB é considerado um poluente orgânico persistente (POP). Apresenta meia-vida longa, chegando 1.500 dias em solo (Beck e Hansen, 1974), com taxas de degradação química e biológica consideradas irrelevantes (Prince *et al.*, 2008; Barber *et al.*, 2005; Mansour *et al.*, 1986). Além disso, apresenta mobilidade nula no solo e sua alta adsorção e baixa pressão de vapor atenuam grande parte da volatilização deste composto (Yaws, 1994).

No ar, o HCB é encontrado quase que exclusivamente na forma gasosa, estando menos de 5% associados a partículas (Cortes *et al.*, 1998). Assim, o HCB pode ser transportado por longas distâncias na atmosfera – aproximadamente 105 km - antes de ser removido por deposição ou degradação. Desta maneira, o HCB é amplamente distribuído, em escala regional, nacional e global. Por possuir

natureza hidrofóbica, o HCB deposita-se preferencialmente em sedimentos, solos e superfícies vegetais. Uma taxa relativamente menor é encontrada na água e no ar (Barber *et al.*, 2005).

Assim como os HAPs, o HCB pode ser produzido por combustão incompleta de matéria orgânica e é encontrado em resíduos industriais. As principais fontes de HCB são aplicação direta de pesticidas, deposição atmosférica, derramamentos, erosão de áreas contaminadas próximas e irrigação por água contaminada.



**Figura 3.** Fórmula estrutural da molécula de hexaclorobenzeno.

### **2.2.5. Fatores que afetam a biodegradação no solo**

A degradação microbiana de hidrocarbonetos no solo depende de uma série de fatores abióticos, como as características das moléculas a serem degradadas e do local onde ocorrerá a remediação. As principais características químicas do produto que afetam a degradação são: tamanho, estrutura química, forma, carga da molécula e a existência de grupos funcionais. Esses fatores

determinam o comportamento da molécula no solo, sua toxicidade, rota metabólica e a absorção pelos micro-organismos. Em geral, quanto maior, mais condensada e mais ramificada for a molécula, maior a estabilidade química e menor será a degradação.

Entre os fatores abióticos do solo que afetam a biodegradação destacam-se água, temperatura, pH e raios UV recebidos. Dentre os processos físico-químicos naturais que ocorrem no solo e que reduzem as concentrações dos contaminantes, estão a volatilização e a sorção (Seabra, 2008). Algumas propriedades dos compostos químicos podem influenciar estes processos: a constante da lei de Henry ( $K_H$ ), cujo valor indica o grau de volatilidade de um composto (Prata, 2002); o coeficiente de partição normalizado para carbono orgânico ( $K_{oc}$ ), que indica o potencial de adsorção de um composto; e a pressão de vapor, são alguns exemplos. De acordo com Lyman e colaboradores (1982), um composto é pouco volátil se  $K_H < 10^{-7}$ , medianamente volátil se  $10^{-7} < K_H < 10^{-5}$ , consideravelmente volátil se  $K_H > 10^{-5}$  e muito volátil se  $K_H > 10^{-3}$ . Quanto maior o  $K_{oc}$ , menor a mobilidade e maior a adsorção (Mattos e Silva, 1999). E quanto maior a pressão de vapor, mais volátil é o composto.

Considerando a degradação biológica, o conteúdo de água no solo é considerado vital devido à essencialidade desta substância aos processos fisiológicos e por sua elevada participação na composição celular, sendo

imprescindível para uma alta atividade microbiana. O conteúdo de água no solo influencia indiretamente o volume de oxigênio, por ocuparem o mesmo espaço, e assim, determina o tipo de metabolismo (aeróbio e anaeróbio). A degradação de hidrocarbonetos de petróleo frequentemente requer a ação de enzimas oxigenases, fato que torna o processo biodegradativo dependente do oxigênio molecular (Atlas e Philip, 2005).

Por serem extremamente hidrofóbicos, os hidrocarbonetos formam ligações fortes com as partículas do solo. Assim, a presença de surfactantes (compostos constituídos por moléculas anfipáticas que facilitam a mistura de líquidos imiscíveis) em um processo de biorremediação é outro fator que influencia a eficiência da degradação. O composto aumenta a solubilidade em água dos hidrocarbonetos e, portanto, sua biodisponibilidade (Woo *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007).

### 2.3. TOXICOLOGIA

Embora alguns micro-organismos possam degradar poluentes do solo, a mineralização total dos compostos nem sempre é alcançada. Muitas vezes são produzidos metabólitos secundários também tóxicos (Plazaa *et al.*, 2005). Assim, em estudos de biorremediação, é importante avaliar não apenas a retirada dos contaminantes, mas também a ecotoxicidade do solo remediado. Indicadores

desta toxicidade incluem mortalidade de invertebrados terrestres, como *Lumbricus terrestris*; germinação de sementes; alongação de raízes; inibição do crescimento de algas e inibição de bioluminescência em bactérias (*Pseudomonas fluorescens*) (Cook *et al.*, 2002).

Estudos anteriores demonstram que sementes de alface (*Lactuca sativa*) são bastante sensíveis à toxicidade ocasionada por HAPs e compostos intermediários obtidos na sua degradação. Assim, a espécie é considerada um excelente indicador de toxicidade do solo (Plazaa *et al.*, 2005; Banks e Schultz, 2005; Charles *et al.*, 2011).

#### 2.4. TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS À BIORREMEDIAÇÃO

Estudos realizados por diversos autores concluíram que bactérias cultiváveis representam apenas de 0,1 a 10% da população bacteriana total no ambiente (Ferguson *et al.*, 1984; Amann *et al.*, 1995; Hugenholtz *et al.*, 1998). Este fato certamente impediu, por décadas, um avanço mais rápido do conhecimento da diversidade microbiana existente.

Recentemente, graças ao desenvolvimento de metodologias moleculares independentes de cultivo, foram realizadas grandes descobertas nesse campo (Forney *et al.*, 2004). Estas ferramentas moleculares podem ser a chave para uma melhor compreensão e para a utilização racional de micro-organismos envolvidos

nas diversas ciências ambientais aplicadas. Isto porque possibilitam uma integração do conhecimento da estrutura da comunidade microbiana com as consequências desta estrutura em processos ambientalmente relevantes (Head e Bailey, 2003).

Acredita-se atualmente que estudos de ecologia microbiana, baseados em métodos moleculares, fornecerão a base teórica definitiva para o projeto inteligente e operação de estações de tratamento, gerando grande economia de espaço e recursos (Curtis *et al.*, 2003). O mesmo pode ser esperado em relação às tecnologias de remediação de ambientes contaminados que se baseiam em processos microbiológicos. Técnicas moleculares baseadas em sequências do gene RNA ribossomal 16S têm se mostrado extremamente úteis em estudos de caracterização da estrutura de comunidades microbianas (Brito *et al.*, 2006; Hong *et al.*, 2007; Muckian *et al.*, 2007). Dentre elas, uma abordagem bastante utilizada é a construção e análise de bibliotecas de clones do gene RNA ribossomal 16S, que provê informações filogenéticas detalhadas dos membros da comunidade. Ou seja, torna possível a identificação das espécies presentes, sem a necessidade de isolamento e cultivo dos micro-organismos (Forney *et al.*, 2004).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Estudar a capacidade de um consórcio composto por bactérias produtoras de biossurfactantes e com habilidade para degradar diferentes tipos de hidrocarbonetos de petróleo, incluindo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, em microcosmo de solo, para fins de biorremediação.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar parâmetros para a construção dos microcosmos.
- Determinar a degradação dos HAPs por um consórcio de bactérias em microcosmos de solo contaminado, por meio de cromatografia gasosa;
- Avaliar a capacidade de produção de biossurfactante pela bactéria *Gordonia amicalis* e determinar a qualidade do biossurfactante produzido por diferentes métodos.
- Avaliar a influência do biossurfactante produzido pela *G. Amicalis* na taxa de degradação dos HAPs.
- Selecionar os microcosmos que melhor promoveram a degradação dos HAPs;
- Avaliar a estabilidade do composto Hexaclorobenzeno como biomarcador;

- Avaliar a ecotoxicidade dos microcosmos antes e após a remediação do solo.
- Conhecer a composição da comunidade microbiana, do Domínio Bactéria, do solo dos microcosmos selecionados antes e após a inoculação do consórcio bacteriano.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

OBS: Todos os ensaios descritos a seguir foram realizados em duplicata.

### **4.1. SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS**

Foram utilizadas bactérias isoladas de solos contaminados com hidrocarbonetos, coletados perto da REPLAN, refinaria de petróleo de Paulínia, SP, e bactérias isoladas do efluente de oficinas de lavagem a vapor dos tanques de caminhões de petróleo, produtoras de biossurfactantes, comprovados em estudos anteriores (Carvalho *et al.*, 1997 e Jacobucci, 2000), pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP (Tabela 1).

As linhagens foram reativadas em meio Caldo Nutriente e, após 24 horas, inoculadas em ágar nutriente. Após o crescimento na placa, uma verificação de cada linhagem foi realizada através da coloração de Gram e visualização microscópica. Como a linhagem de *Gordonia amicalis* não se desenvolveu bem em NA (nutriente ágar), foi utilizado um meio diferente, composto por 0,5% de extrato de levedura, 2% de glicose, 1% de ágar e 1% de peptona.

**Tabela 1.** Bactérias isoladas de ambientes contaminados com derivados de petróleo e produtoras de biossurfactantes.

<b>Linhagem</b>	<b>Identificação</b>
4002	<i>Bacillus firmus</i>
4004	<i>Bacillus circulans</i>
4005	<i>Bacillus megaterium</i>
4007	<i>Bacillus brevis</i>
4008	<i>Bacillus sp.</i>
4010	<i>Bacillus sphaericus</i>
4012	<i>Bacillus badius</i>
4013	<i>Bacillus subtilis</i>
4015	<i>Chromobacterium sp.</i>
4018	<i>Gordonia amicalis</i>
4019	<i>Aeromonas sp.</i>
4021	<i>Micrococcus luteus</i>
4023	<i>Enterobacter aerogenes</i>
4024	<i>Staphylococcus sp.</i>
5B4	<i>Flavobacterium sp.</i>
B1A	<i>Enterobacter agglomerans</i>
B1F	<i>Bacillus sp.</i>

As culturas puras (2 alçadas cada) foram inoculadas separadamente em 30mL de meio mínimo de sais (Tabela 2) adicionado de 30µL de vitamina (Tabela 3) e 3 mL da solução padrão de fonte de carbono (Grossman, 2009) (mg . 100mL acetona<sup>-1</sup>): 300 naftaleno (CAS 91-20-3) e fenantreno (CAS 85-01-8), 200 de antraceno (CAS 120-12-7) e de pireno (CAS 129-00-0); sendo incubadas a 30°C em agitador rotatório a 150 rpm para conferir a aeração adequada. Também foram

preparados dois frascos controle, com meio mínimo de sais, vitamina e solução padrão de fonte de carbono, sem a adição de inóculo.

**Tabela 2.** Composição do meio mínimo de sais (pH 7,3) em 1L de água destilada. (Rambeloarisoa *et. al.*, 1984)

Componente	Quantidade
Tris(hidroximetil)aminometano (0,1 M)	12,1g
NaCl	23g
KCl	0,75g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,47g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5,08g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6,16g
NH <sub>4</sub> Cl	3,74g
Solução de sulfato de ferro (1 g/L)	2mL
Solução de fosfato de sódio (0,1 M).	4mL

**Tabela 3.** Composição da solução de vitaminas para 500mL de água destilada (Faria, 2010).

Componente	Quantidade (mg)
Biotina	1
Ácido Fólico	1
Piridoxina	5
Riboflavina	2,5
Tiamina	2,5
Ácido Nicotínico	2,5
Ácido Pantotênico	2,5
Cobalamina	0,05
Ácido Tióctico	2,5

Esses HAPs foram selecionados por serem comuns dentre substâncias contaminantes no ambiente contaminado com petróleo e seus derivados (Grossman, 2009). Além disso, apresentam propriedades distintas entre si e, portanto, possibilitam uma análise mais completa da degradação destes compostos (Clemente, 2002).

O crescimento visual foi acompanhado por 24, 48, 72, 96 e 120 horas e as linhagens que apresentaram maior crescimento foram selecionadas.

#### **4.2. SOLO UTILIZADO**

Dois tipos de solo foram utilizados na montagem dos microcosmos:

- Solo sem histórico de contaminação, coletado em uma área localizada no Campo Experimental da Faculdade de Engenharia Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, sob as seguintes coordenadas geográficas: latitude 22°48'57" sul, longitude 47°03'33" oeste e altitude média de 640 m. Está classificado como Latossolo Roxo distrófico textura argilosa, pertencente à Unidade Barão Geraldo, o que corresponde na classificação norte americana, a um solo Typic Haplorthox, localizado no terço médio de uma encosta com 9% de declive, orientação norte-sul e exposição oeste.

- Solo proveniente do "landfarming da REPLAN, sob as seguintes coordenadas geográficas: latitude 22°43'41.8" sul, longitude 47°7'54.5" oeste e

altitude média de 600m. O landfarming foi construído em 1987 e ocupa uma área de 40.000 m<sup>2</sup> (250 X 160 m), onde são recebidos a borra oleosa proveniente do refino do óleo bruto. Com isso, este solo apresenta, teoricamente, uma microbiota adaptada para degradação de compostos derivados de petróleo (Dias, 2007).

Os solos foram peneirados com peneira Granutest ABNT 16 (1,18mm) para retirada de pedaços de raízes e para uma melhor homogeneização.

#### **4.3. MONTAGEM DOS MICROCOSMOS DE SOLO**

##### **4.3.1. Preparo do solo**

Após a correção da umidade dos solos para 55% da capacidade de campo (CC) e homogeneização, amostras de 400 g de solo foram colocados em frascos herméticos de vidro com capacidade de 1,5 L.

##### **4.3.2. Preparo do inóculo**

As linhagens selecionadas foram cultivadas separadamente em meio Caldo Nutriente em agitador rotatório a 150 rpm e 30°C até atingirem o crescimento desejado ( $DO_{590nm} = 1$ ). Foi realizada a contagem por plaqueamento em superfície. Para cada bactéria, foram retiradas alíquotas de 1000µL e colocadas em frasco Eppendorf. Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 50.400 G, ressuspensas em 200µl de solução salina 0,75% e misturadas para inoculação nos microcosmos em uma concentração final de 100 UFC. g solo<sup>-1</sup>.

Além das linhagens selecionadas, em alguns microcosmos foi adicionada a bactéria *Gordonia amicalis*, devido à sua alta capacidade de produção de biossurfactantes (Faria, 2010).

#### **4.3.3. Parte I – Experimento preliminar**

Esta primeira parte do projeto teve como objetivo determinar as condições mínimas necessárias para a condução dos experimentos e averiguar o tempo máximo requerido para a degradação dos HAPs.

##### ***4.3.3.1. Preparo dos microcosmos***

A primeira parte do projeto foi realizada com o solo sem histórico de contaminação e com o solo da REPLAN. Sete microcosmos foram construídos em duplicata (Tabela 4). Os HAPs foram dissolvidos em 60mL de acetona por microcosmo (Tabela 5) de modo a se obter as concentrações finais de (mg.kg solo<sup>-1</sup>): 375 de naftaleno, 375 de fenantreno, 250 de antraceno e 250 de pireno. Em seguida, 50 mg de hexaclorobenzeno foram dissolvidos em 30 mL de acetona e adicionados em cada microcosmo separadamente, exceto no microcosmo M10, no qual o composto não foi colocado, afim de se verificar uma possível inibição dos micro-organismos por esta molécula. O inóculo foi adicionado logo em

seguida aos HAPs e a homogeneização foi realizada com mixer, após a adição de todos os componentes de cada microcosmo.

Amostras foram retiradas no dia da montagem dos microcosmos e após, 1, 3, 4, 6, 8, 10, 12 e 16 semanas.

**Tabela 4.** Microcosmos construídos para a primeira parte do projeto.

Microcosmos	Descrição
M2	Solo sem contaminação + HAPs + HCB
M3	Solo sem contaminação + inóculo + HAPs + HCB
M4	Solo sem contaminação esterilizado + inóculo + HAPs + HCB
M6	Solo Replan + HAPs + HCB
M7	Solo Replan + inóculo + HAPs + HCB
M8	Solo sem contaminação + G. amicalis + HAPs + HCB
M10	M3 sem hexaclorobenzeno

**Tabela 5.** Solução padrão de HAPs.

HAP	Quantidade (mg/dL acetona)
Naftaleno	300
Fenantreno	300
Antraceno	200
Pireno	200

#### 4.3.4. Parte II

Após o experimento preliminar, algumas metodologias foram alteradas durante a realização da segunda parte do projeto:

- O solo da Replan foi descartado, pois não apresentou biodegradação;
- O hexaclorobenzeno foi adicionado juntamente com os HAPs para que pudesse ser avaliado como biomarcador de maneira mais eficaz;
- Os HAPs foram dissolvidos em tolueno, ao invés de acetona, pois é necessária uma quantidade muito menor de tolueno (6mL) para esta dissolução;
- O tempo do experimento foi reduzido de 16 semanas para 4 semanas;
- O microcosmo controle para a presença de micro-organismos foi esterilizado quimicamente, pois a esterilização por autoclavagem mostrou-se ineficaz.

A produção de biossurfactantes por *G. amicalis* e o teste de toxicidade com sementes de alface foram realizados apenas na segunda parte do projeto.

##### **4.3.4.1. *Produção de biossurfactante por Gordonia amicalis***

A *Gordonia amicalis* foi cultivada em Erlenmeyer de 100mL contendo 50mL de meio composto (por Litro) por: 5g de extrato de levedura, 10g de triptona e 5g NaCl (Maniatis *et al.*, 1982), e foi incubada em shaker rotatório a 200 rpm e

30°C por 24h. E seguida, as células foram removidas por centrifugação a 50.400G por 10 minutos, lavadas duas vezes com meio mineral (Tabela 6) e ressuspensas no mesmo meio mineral e medida a absorvância ( $DO_{600nm}$ ). A cultura foi inoculada em 50mL do meio mineral base em concentração inicial referente a OD de 0,40. Foram testados como fontes de carbono hexadecano e 1-hexadeceno, ambos a 1% (v/v). Também foi testada a produção de biossurfactantes no meio de cultura utilizado para o crescimento do inóculo.

**Tabela 6.** Composição do meio mineral para a produção de surfactante por *G. amicalis* em 1L de água destilada (Franzetti, 2008 - adaptado)

Componente	Concentração (g)
$K_2HPO_4$	1,32
$KH_2PO_4$	1,00
$NH_4Cl$	0,81
$NaNO_3$	0,84
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0,01
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,40
$CaCl_2$	0,02

Após o crescimento da bactéria nas diferentes fontes de carbono, foram testados três diferentes tipos de tratamento:

1- O meio de cultura foi congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para que ocorresse o rompimento das células e, em seguida, descongelado. As células foram retiradas por centrifugação a 50.400G por 10 minutos.

2- O meio de cultura foi sonificado a 200W, por 2 intervalos de 10 minutos, visando o rompimento celular, e centrifugado a 50.400G por 10 minutos para a retirada das células.

3- O meio de cultura não foi tratado e as células não foram retiradas.

Em seguida, a qualidade biossurfactante do sobrenadante de cada tratamento foi testada, separadamente, pelo seguinte procedimento : em tubos de ensaios foram colocados 3,5mL dos sobrenadantes e 2mL de tolueno; Os tubos foram agitados com vortex por 1 minuto e colocados em descanso. Após 24 horas da agitação, a altura do halo formado foi medida em centímetros, com o auxílio de uma régua. Quanto maior a altura do halo, melhor é a capacidade de emulsão água em óleo (A/O) do sobrenadante (Clemente, 2002).

O melhor tratamento foi escolhido de acordo com a maior altura do halo formado no procedimento descrito anteriormente e também pela absorvância ( $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ) mensurada após 24h da agitação - emulsão óleo em água (O/A) (Clemente, 2002).

A fonte de carbono que apresentou melhor resultado foi utilizada para o inóculo e crescimento de uma maior quantidade de *G. amicalis*, e o melhor tratamento foi utilizado para a obtenção do surfactante.

#### **4.3.4.2. Purificação parcial do biosurfactante** (Faria, 2010)

O meio selecionado foi precipitado com sulfato de amônio (65%) *overnight* e centrifugado posteriormente a 18.000G por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em água destilada. A suspensão foi colocada em membranas de celofane (10 kD), as quais permaneceram em água destilada sob agitação durante 24 horas. Em seguida, o substrato restante dentro das membranas foi colocado em béquer e congelado para posterior liofilização.

Uma pequena parte do liofilizado obtido foi reidratado e analisado segundo o halo formado e a absorvância mensurada (processos descritos no item anterior). Além disso, a tensão superficial do meio foi medida utilizando tensiômetro (Marca K10S- Krüss), sem acréscimo de tolueno, afim de testar a qualidade do surfactante. O restante foi adicionado ao microcosmo M5, descrito a seguir (item 4.3.4.3).

#### **4.3.4.3. Preparo dos microcosmos**

Nesta segunda parte do projeto foi realizada apenas com o solo sem histórico de contaminação. Seis microcosmos foram construídos em duplicata

(Tabela 7). O microcosmo acrescido de azido de sódio (composto de esterilização) teve por objetivo verificar a ocorrência de degradação abiótica dos HAPs no solo (Arias *et al.*, 2008), assim como a sua adsorção.

**Tabela 7.** Microcosmos construídos na segunda parte do projeto.

Microcosmos	Descrição
M1	Solo
M2	Solo + HAPs
M3	Solo + inóculo
M4	Solo + inóculo + HAPs
M5	Solo + inóculo + HAPs + biossurfactantes*
M6	Solo + HAPs + 0,5M azido de sódio

\*biossurfactantes produzidos por *Gordonia amicalis* (item 3.4.1)

Os HAPs foram dissolvidos em tolueno (mg. 6mL tolueno<sup>-1</sup> por microcosmo): 150 naftaleno e fenantreno, 100 antraceno e pireno, 50 hexaclorobenzeno, de modo a se obter as concentrações citadas no item 4.3.1. A acetona foi substituída por tolueno pois o volume de tolueno (6mL) necessário para dissolver as mesmas quantidades de HAPs é muito menor que o volume de acetona (50mL).

Após a dos HAPs adição no solo, os recipientes foram deixados abertos durante 48h para a evaporação do tolueno. Depois do acréscimo do azido de sódio e do biossurfactante, o solo de todos os microcosmos foi homogeneizado com ajuda de um “mixer” antes da adição do inóculo. Foram retiradas amostras durante 30 dias, três vezes por semana, obtendo-se um total de 12 amostragens.

#### **4.4. ESTUDO DO HEXACLOROBENZENO COMO BIOMARCADOR**

##### **4.4.1. Microcosmos**

Para analisar a eficácia da molécula de hexaclorobenzeno como biomarcador, foram construídos dois microcosmos (A e B) com 400g de solo sem contaminação, acrescidos de solução de HAPs dissolvidos em tolueno (mg. 6mL tolueno<sup>-1</sup> por microcosmo): 150 naftaleno e fenantreno, 100 antraceno e 50 hexaclorobenzeno. Não foi utilizado o pireno com o objetivo encurtar o tempo de cromatografia durante a análise de degradação, uma vez que esta molécula apresenta um tempo maior de retenção na coluna cromatográfica. Após a adição dos HAPs, o solo foi homogeneizado manualmente e com a ajuda de um mixer e os frascos foram deixados abertos durante 48h, para evaporação do solvente.

Três amostras de três pontos distintos foram retiradas de cada microcosmos (A, AI e AII; B, BI e BII) imediatamente após a construção do microcosmo (tempo zero) e após 2, 7 e 14 dias do início do experimento. A

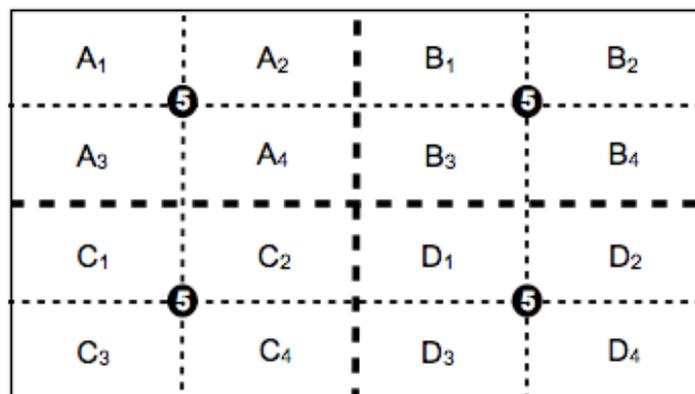
degradação dos HAPs e do hexaclorobenzeno foram analisadas de acordo com os protocolos apresentados no item 4.5.

#### 4.4.2. Bandeja

Um segundo teste foi realizado para reproduzir a distribuição desigual dos HAPs que ocorre em casos de contaminação ambiental, utilizando HCB como biomarcador.

Para tanto, o solo sem histórico de contaminação foi colocado em uma bandeja de alumínio e uma solução de HAPs dissolvidos em tolueno (mg. 6mL tolueno<sup>-1</sup> por bandeja): 150 naftaleno e fenantreno, 100 antraceno e pireno e 50 hexaclorobenzeno, borrifada sobre o solo. A solução foi borrifada de modo a simular um derramamento de petróleo, cuja dispersão é irregular.

A bandeja foi dividida em quadrantes, com linhas imaginárias, em 4 zonas de mesmo tamanho (A, B, C e D) e cada zona foi subdividida em 4 partes iguais, como mostra a Figura 4.



**Figura 4.** Esquema de divisões imaginárias da área total da bandeja utilizada para teste de estabilidade do hexaclorobenzeno.

No dia de início do experimento, foram retiradas amostras dos quadrantes A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub> e D<sub>1</sub> (uma amostra de cada quadrante). Após 3 dias, foram retiradas amostras dos quadrantes A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>2</sub> e D<sub>2</sub>. No 7º dia de experimento, foram retiradas amostras dos quadrantes A<sub>3</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>3</sub> e D<sub>3</sub>. Após 14 dias do início do experimento, foram retiradas amostras dos quadrantes A<sub>4</sub>, B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> e D<sub>4</sub>. E após 35 dias de experimento, foram retiradas amostras nos pontos de intercessão de cada quadrante (ponto 5 da Figura 4). A extração a degradação dos HAPs e do hexaclorobenzeno foram analisadas de acordo com os protocolos apresentados no item 4.5.

#### **4.5. DETERMINAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DOS HAPs**

##### **4.5.1 Extração dos HAPs do solo** (Silva, 2007 - modificado)

O protocolo de extração de HAPs da matriz do solo foi modificado do protocolo de US EPA (1992). Em resumo, foi coletado 1g de solo de cada microcosmo e colocado em frascos contendo diclorometano (DCM, 1mL). Os frascos com o solo foram, então, sonicados por cinco minutos, com intervalos de 30 segundos a cada meio minuto. Em seguida, adicionou-se 1g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, com o intuito de retirar a umidade da amostra. O sobrenadante foi transferido a um eppendorf e centrifugado por 5 minutos a 50.400G a 4°C. Em seguida, 1µL do

sobrenadante de cada amostra foi colocado em frascos de 2mL e estocado a -20°C para posterior análise.

#### 4.5.2. Análise por cromatografia gasosa (Silva, 2007 – adaptado)

Uma alíquota de 1µl foi retirada de cada frasco, usando seringa de 1µl (Agilent), e injetada no modo *splitless* em cromatógrafo a gás (Shimadzu GC 14A) equipado com detector de ionização de chama (GC-FID), usando coluna BPX-5 de sílica fundida em 5% fenil polisilfenilene-siloxane como fase estacionária (com 25 m x 0.22 mm ID x 0.25 µm de espessura de filme SGE-Austrália), sob vazão de Hélio a 0,7 mL por minuto. A temperatura do forno foi programada da seguinte maneira: 70°C por 1 minuto, aumentando 30°C por minuto, até chegar aos 160°C. O segundo aumento de temperatura foi de 15°C por minuto até chegar a 310°C, diminuindo imediatamente.

#### 4.6. TESTE TOXICOLÓGICO: *Lactuca sativa*.

Para analisar a ecotoxicidade dos microcosmos antes e após a remediação do solo, foi realizado um teste de germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*), de acordo com o protocolo da EPA (Linder *et al.*, 1992).

Três microcosmos de solo foram construídos para a realização do teste: controle (sem nenhum aditivo) (M1), com HAP (M2) e com HAP e inóculo (M4). O

microcosmo controle (M1) indica a porcentagem de germinação do lote de sementes utilizado. Após 80 dias da construção dos microcosmos realizou-se o teste toxicológico da seguinte forma: primeiramente, a umidade do solo foi ajustada a 85% da capacidade de campo; Em seguida, o solo de cada microcosmo foi distribuído em 7 placas de Petri (com 50 sementes em cada placa), sendo 350 sementes por microcosmo.

As sementes foram incubadas por 120 horas a 25°C. Durante as primeiras 48 horas, foram mantidas na escuridão total. Nas 72 horas restantes, as sementes foram mantidas em um ciclo de 16 horas de luz, seguidas de 8 horas de escuridão.

#### **4.7. ANÁLISES MOLECULARES**

##### **4.7.1. Extração e purificação de DNA**

A extração de DNA seguiu o protocolo do kit PowerSoil DNA Isolation, com as seguintes etapas:

- dispersão das partículas do solo;
- lise das células microbianas;
- separação de DNA dos materiais orgânicos e inorgânicos restantes;
- isolamento do DNA com a utilização de uma membrana de sílica;
- retirada de impurezas presentes no DNA isolado;

- desprendimento do DNA da membrana de sílica, com uso de tampão;
- armazenamento do DNA em baixas temperaturas.

#### **4.7.2. Amplificação do gene que codifica para o RNA ribossomal**

As reações de amplificação foram realizadas com o uso dos primers universais 27f (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') e 1401r (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'). O ciclo de PCR foi de 94°C por 5 minutos seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos. No último ciclo, a temperatura de 72°C foi mantida por 10 minutos, ao invés de 3. Isto assegura que todos os produtos da PCR estejam completos, não restando produtos parciais.

Utilizou-se o equipamento BioRad modelo iCycler. A quantidade de DNA utilizada variou entre 1µL e 2µL.

#### **4.7.3. Purificação dos produtos de PCR e construção de bibliotecas genômicas**

As próximas etapas descritas foram realizadas no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de São Carlos, com a colaboração da Dr<sup>a</sup>. Francine Amaral Piubeli.

Os produtos de PCR foram purificados em gel de agarose, usando o kit de purificação GFX™ PCR DNA e *Gel Band Purification* kit, (GE Healthcare). As bibliotecas foram construídas em vetor pGEM-T (Promega), de acordo com instruções do fornecedor, usando o produto de várias ampliações (entre 5 a 10). As transformações ocorreram em células competentes *E. coli* JM109. Os clones positivos foram selecionados em meio LB com ampicilina (100 mg/mL) e X-gal (80 mg/mL) e estocados em glicerol 15% a -70°C.

#### **4.7.4. Análise dos clones**

Os clones obtidos nas bibliotecas genômicas foram sequenciados a partir da amplificação do fragmento rDNA 16S, utilizando os primers universais M13f (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC - 3') e M13r (5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC - 3'). Os clones foram inoculados em meio *Circle Grow* com ampicilina (100 mg/mL) e mantidos a 37°C com agitação (100 rpm) por 18-24hs. Uma alíquota (1-2 mL) do crescimento de cada clone foi transferida para microplaca de PCR (96 orifícios), contendo os seguintes reagentes para amplificação: 2,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 1 μl Tampão da Taq (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM de uma mistura de dNTP e 0,4 mM de cada primer (M13f e M13r). O programa de amplificação consistiu de um passo de desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, 30 ciclos a 94°C por 20 seg., 60°C por 20

seg. e 72°C por 1 min e 30 seg. As reações de PCR foram feitas em equipamento BioRad modelo iCycler.

#### **4.7.5. Sequenciamento dos produtos amplificados**

Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o kit GFX™ PCR-DNA e Gel Band Purification Kit (GE Health Care) e utilizados para o sequenciamento no sequenciador automático MegaBace (GE Health Care), empregando o kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems (GE Health Care). Os primers utilizados para sequenciamento foram o T7 (5'- GTA ATA GGA GTG AGT ATA GGG C- 3'), M13r (5'-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC - 3') e 782r (5'- ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT- 3'). Reações de sequenciamento (10 µL) contendo 1 a 2 µL de produto de PCR purificado; 3,2 pmoles/mL de primer e 4 µL de Kit Dye ET (GE Health Care) foram submetidas ao programa de amplificação com 30 ciclos, iniciando com a desnaturação a 95°C/20 seg., seguido de anelamento a 50°C/15 seg. e extensão de 60°C/1 min em ciclizador térmico BioRad modelo iCycler. Os produtos do sequenciamento foram aplicados no sequenciador automático MegaBace, de acordo com os parâmetros especificados pelo fabricante.

#### 4.7.6. Montagem dos contigs e análises filogenéticas

As sequências parciais de rDNA 16S obtidas com cada *primer* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do software phredPhrap (<http://www.phrap.org/>) (Erwing et al. 1998). As regiões do vetor plasmidial e sequências com baixa qualidade (< 20, segundo o score do Phred) foram removidas. As sequências foram comparadas com as sequências de rDNA 16S de organismos representados nas bases de dados RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA; <http://rdp8.cme.msu.edu/html/>) e Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequências de organismos relacionados à sequência do organismo desconhecido foram selecionadas e alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1994) e analisadas no programa Mega 2.0 (Kumar *et al.*, 2001), utilizando-se o método de distância e o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980). A reconstrução filogenética foi executada com o algoritmo *neighbor-joining* (NJ), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 amostragens, utilizando o software de rotina incluído no programa MEGA 2.0.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. SELEÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS**

Quando comparadas aos controles, as linhagens que apresentaram melhor crescimento foram: *Bacillus brevis* (linhagem 4007), *Bacillus sphaericus* (linhagem 4010), *Bacillus subtilis* (linhagem 4013), *Chromobacterium* sp. (linhagem 4015) e *Bacillus* sp. (linhagem B1F). Este resultado assemelha-se ao obtido no estudo realizado por Neves (2002), no qual bactérias do gênero *Bacillus* foram as que melhor degradaram HAPs.

### **5.2. PARTE I – EXPERIMENTO PRELIMINAR**

Como dito anteriormente, a parte I do projeto teve como objetivo determinar parâmetros e aprimorar metodologias. Assim, os resultados obtidos neste experimento preliminar serão discutidos sob esta visão.

#### **5.2.1. Determinação da degradação dos HAPs**

##### ***5.2.1.1. Solo sem histórico de contaminação***

Na primeira parte do projeto, não foi construído um microcosmo controle (sem presença de micro-organismos), impossibilitando a determinação da porcentagem de diminuição dos HAPs por degradação físico-química e por

adsorção do solo. Assim, a discussão destes resultados limitou-se à comparação entre os microcosmos e não foram analisados os valores absolutos de degradação de cada HAP.

Além disso, a esterilização do solo em M4 por autoclavagem não se mostrou eficaz. Ocorreu ruptura do frasco durante o processo e, no decorrer do experimento, visualizou-se crescimento de micro-organismos, incluindo fungos, no microcosmo. Assim, não foi possível detectar as diferenças entre a degradação realizada pela microbiota natural do solo e a realizada isoladamente pelo inóculo, e os resultados obtidos em M4 não foram analisados.

Todos os microcosmos estudados apresentaram taxa de degradação semelhantes (Tabela 8), indicando que os micro-organismos inoculados não alteraram a decomposição total dos HAPs adicionados.

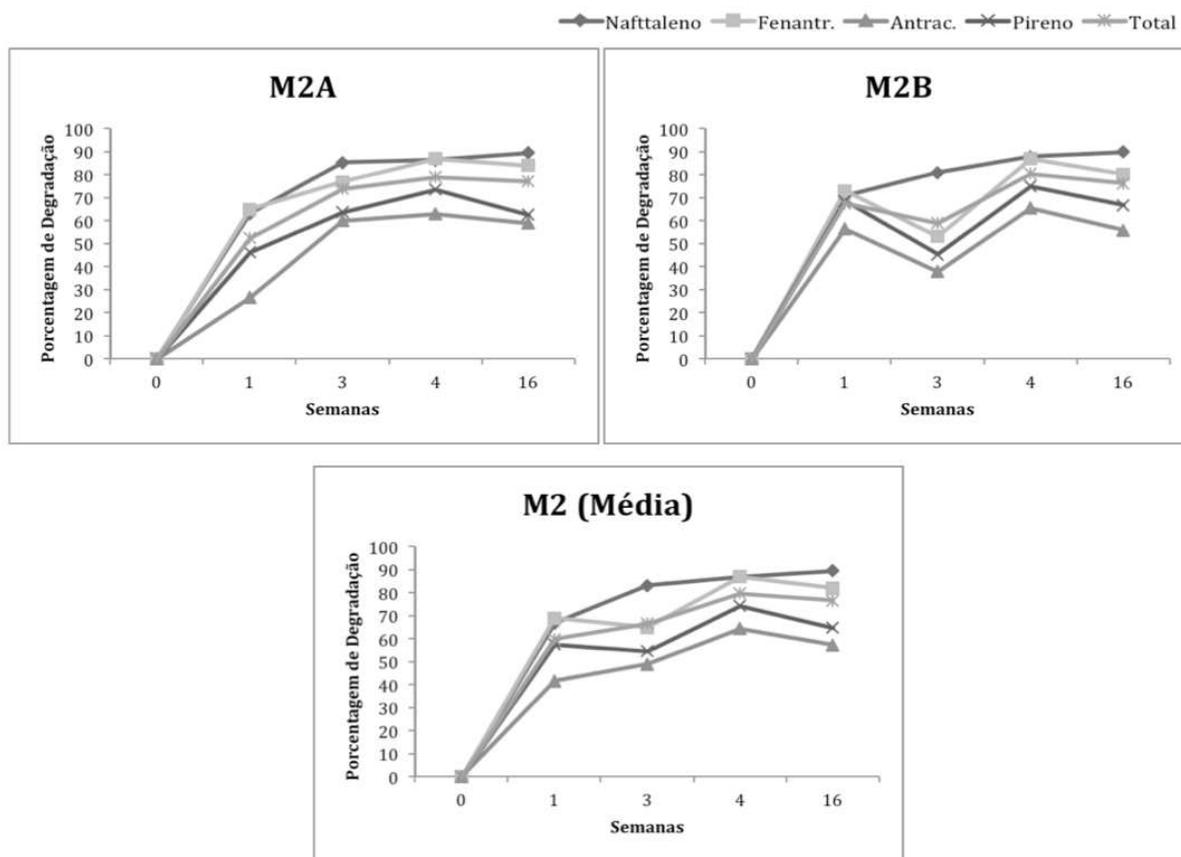
**Tabela 8.** Porcentagem de degradação dos HAPs após 16 semanas, nos microcosmos da parte I do projeto. Média obtida das duplicatas.

<u>Microcosmo</u>	Degradação (%)				
	Naftaleno	Fenantreno	Antraceno	Pireno	Total
<b>M2</b>	90	82	57	65	77
<b>M3</b>	87	81	59	69	76
<b>M8</b>	86	75	49	56	71
<b>M10</b>	81	77	48	77	71

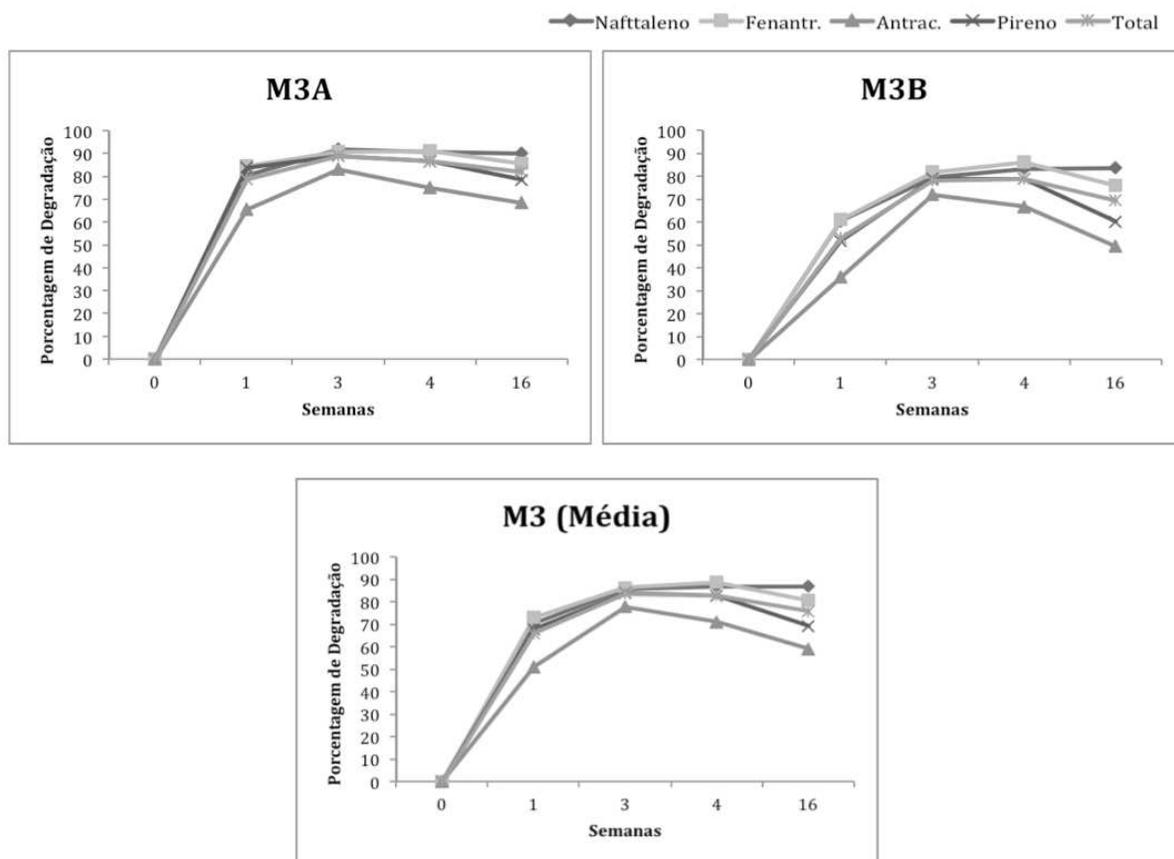
Em experimentos anteriores (Silva *et al.*, 2009; Sayaraa, *et al.*, 2011), o inóculo também não ocasionou um aumento na remoção de poluentes. Sayaraa *et al.* (2011) obtiveram, ainda, resultados que demonstraram uma maior degradação com métodos de bioestimulação, quando comparados à bioaumentação. No entanto, no experimento de Sayaraa e colaboradores, a microbiota natural do solo apresentou um baixo índice de degradação intrínseca. No experimento de Bento *et al.* (2003), os resultados foram opostos, com maior degradação por bioaumentação, quando comparada com a degradação natural e degradação ocasionada por bioestimulação.

Micro-organismos capazes de degradar poluentes orgânicos quando cultivados em meio líquido podem falhar em ambientes naturais, por estarem sujeitos a toxinas presentes neste ambiente. Além disso, podem utilizar outros compostos preferencialmente aos poluentes, ou serem incapazes de se mover pelo solo até o contaminante (Mariano, *et al.*, 2007).

Analisando as figuras 5 e 6, que mostram a porcentagem de degradação dos HAPs em M2 (HAP) e M3 (HAP+ inóculo), notamos que a velocidade de degradação dos HAPs foi maior no microcosmo M3, com inóculo. Em apenas 3 semanas, as taxas de degradação dos HAPs no microcosmo M3 chegaram ao mesmo nível que as taxas de degradação no microcosmo M2, após 4 semanas.



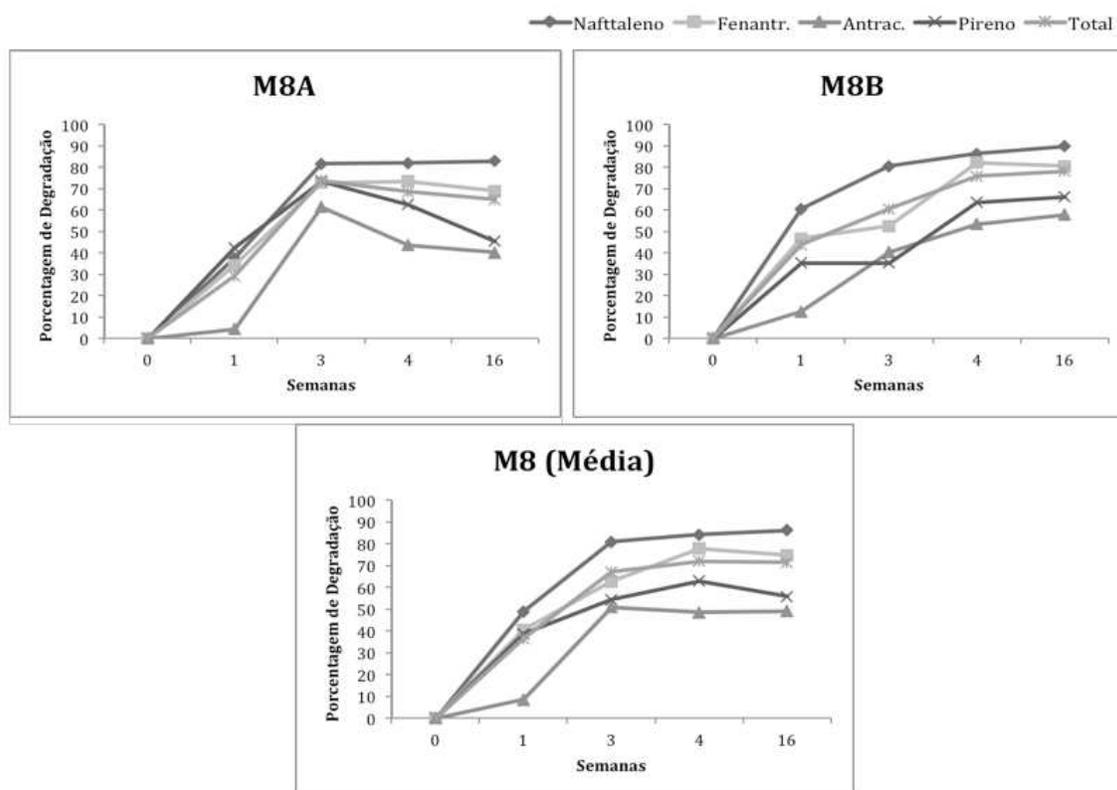
**Figura 5.** Porcentagem de degradação dos HAPs nos microcosmos construídos com solo sem histórico de contaminação, acrescidos de HAP (M2) Duplicatas (A e B) e média entre elas.



**Figura 6.** Porcentagem de degradação dos HAPs nos microcosmos construídos com solo sem histórico de contaminação, acrescidos de HAP e inóculo (M3) Duplicatas (A e B) e média entre elas.

A diferença entre a ação do consórcio bacteriano, no microcosmo M3, e a ação de apenas uma espécie de bactéria (*G. amicalis*), no microcosmo M8, foi pequena, quando comparamos a degradação total dos dois microcosmos (Tabela 8). O consórcio bacteriano apresentou uma capacidade de degradação sutilmente maior do que a bactéria *G. amicalis* isoladamente (5%). Esta diferença se mostrou mais evidente para os compostos de mais difícil degradação (antraceno: 10%, e pireno: 13%), indicando uma possível necessidade de cooperação entre diferentes

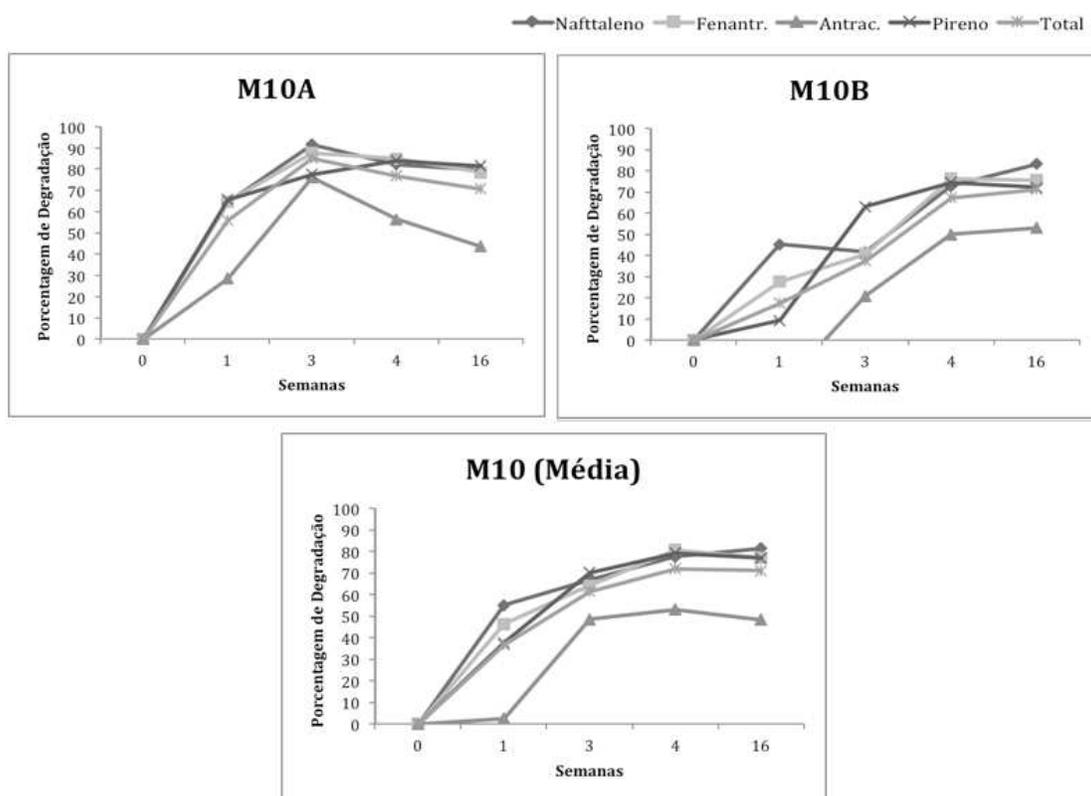
espécies para a quebra de suas moléculas. Em adição, a velocidade de degradação do fenantreno, antraceno e pireno foi mais elevada em M3 que em M8 (Figuras 6 e 7).



**Figura 7.** Porcentagem de degradação dos HAPs nos microcosmos construídos com solo sem histórico de contaminação, acrescidos de HAP e *G. amicalis* (M8) Duplicatas (A e B) e média entre elas.

Em todos os microcosmos, a degradação inicial, durante as 3 primeiras semanas, foi rápida, seguida por uma degradação mais lenta até o final do experimento (Figuras 5, 6, 7 e 8). Uma quantidade residual dos compostos não foi degradada, tratando-se, provavelmente da fração não biodisponível dos poluentes

ou de uma porção resistente à biodegradação. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos anteriores (Silva, 2007).



**Figura 8.** Porcentagem de degradação dos HAPs nos microcosmos construídos com solo sem histórico de contaminação, acrescidos de HAP e inóculo, sem HCB (M10) Duplicatas (A e B) e média entre elas.

As duplicatas (A e B) de cada microcosmo apresentaram resultados significativamente diferentes (Figuras 5, 6, 7 e 8). Isso mostra a importância de se utilizar um biomarcador e de aplicá-lo em conjunto com os HAPs, como na parte II do projeto. Mesmo homogeneizando o solo, os HAPs e o biomarcador não se distribuem uniformemente. Assim, pode-se coletar quantidades diferentes dos compostos em diferentes pontos do solo. Por este motivo obteve-se diferentes

porcentagens de degradação nas duplicatas e, algumas vezes, diminuição e aumento destas porcentagens ao longo do experimento.

O hexaclorobenzeno não foi utilizado no microcosmos M10 para verificar se sua presença prejudicaria a microbiota e diminuiria a biodegradação. Os resultados indicam que este composto não altera significativamente a capacidade de degradação dos micro-organismos (Tabela 8), embora diminua um pouco sua velocidade (Figura 8).

#### ***5.2.1.2. Solo proveniente da REPLAN***

Não ocorreu degradação dos HAPs no microcosmo M6, construído com solo proveniente da REPLAN e sem inóculo. Esperava-se que, por ser um solo com histórico de contaminação por petróleo, sua microbiota estivesse mais adaptada aos HAPs e que, conseqüentemente, apresentasse uma maior capacidade de degradação dos mesmos. No entanto, é possível que, devido a uma contaminação muito elevada e prolongada, como é o caso deste solo de *landfarming*, não existiam mais micro-organismos, ou que os micro-organismos existentes não foram suficientes para degradar os HAPs já existentes no solo e os HAPs adicionados.

Quando o inóculo foi adicionado ( em M7), houve apenas a degradação do naftaleno (60%). A falta de alguns compostos essenciais aos micro-organismos no

solo pode ser uma das explicações deste resultados, conforme observados por Dias (2007), que também utilizou solo da REPLAN em experimentos de biodegradação e conseguiu melhores resultados adicionando uréia como fonte de nitrogênio, fosfato de potássio como fonte de fósforo e sulfato de ferro como fonte de ferro.

### 5.3. PARTE II

#### **5.3.1. Produção de biossurfactante por *Gordonia amicalis***

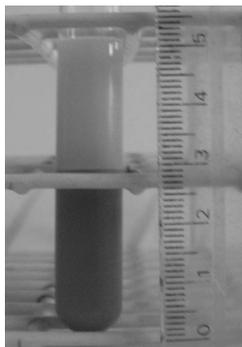
Como observado em estudo anterior (Faria, 2010), a *Gordonia amicalis* produziu surfactante capaz de diminuir a tensão superficial e formar emulsões. A fonte de carbono usada para o crescimento do inóculo que apresentou melhor resultado foi a composta por 5g de extrato de levedura, 10g de triptona e 5g NaCl (meio de cultura). A altura do halo formado, de acordo com a fonte de carbono, foi de 0,3cm para o hexadecano;, de 0,4cm para o hexadeceno; e de 2,3cm para o meio de cultura. Embora muitos biossurfactantes sejam produzidos por micro-organismos em meios de cultivo contendo substâncias imiscíveis em água, existem estudos que relatam a produção de biossurfactante em substratos solúveis em água (Faria, 2010). Meios de cultivo solúveis em água normalmente apresentam menor custo e fermentação mais fácil (Makkar e Cameotra, 1997).

O tratamento que mostrou melhores resultados para a recuperação do biossurfactante produzido foi o congelamento (-20°C) do meio de cultura, seguido de descongelamento e a retirada das células por centrifugação (Tabela 9).

**Tabela 9.** Resultados de três tratamentos diferentes para a obtenção de biossurfactantes. Halo e absorvância obtidos após 24 horas de agitação.

Tratamento	Halo (cm)	Absorvância (OD <sub>600nm</sub> )
Congelamento	2,5	0,05
Sonicação	2,1	0,03
Sem tratamento	1,8	0,04

Após a seleção da melhor fonte de carbono e tratamento, 2 litros do meio de cultura foram inoculados com *Gordonia amicalis* para a produção e purificação parcial do surfactante e posterior liofilização. Neste processo, foram obtidos 1,542g de biossurfactante. Destes, 0,03g foram ressuspensos em água e analisados. Os resultados obtidos foram: emulsão óleo/água (absorvância) - 0,1; emulsão água/óleo (altura do halo) - 2,5cm (Figura 9) ; Tensão superficial - 48,6 mN.m<sup>-1</sup>. O restante do surfactante (1,539g) foi adicionado ao microcosmos M5.



**Figura 9.** Altura do halo formado após 24h da agitação com tolueno.

### **5.3.2. Determinação da degradação dos HAPs**

Na segunda parte do projeto, o microcosmo M6 foi eficazmente esterilizado pela adição do composto azido de sódio. Assim, a análise dos resultados deste microcosmo mostra a redução da quantidade de HAPs por fatores físicos como volatilização, fotólise e adsorção. Para determinar a degradação biológica (DB) dos HAPs, os valores obtidos no microcosmo M6 foram subtraídos dos valores obtidos nos demais microcosmos (Tabela 10).

**Tabela 10.** Porcentagem de degradação dos HAPs após 4 semanas, nos microcosmos da parte II do projeto. Média obtida das duplicatas.

	Naftaleno		Fenantreno		Antraceno		Pireno		Total		HCB	
	TR	DB	TR	DB	TR	DB	TR	DB	TR	DB	T	DB
<b>M2</b>	100	16	98	98	99	98	89	89	98	84	0	0
<b>M4</b>	100	16	99	99	99	98	98	98	99	86	15	15
<b>M5</b>	100	16	97	97	99	98	99	99	99	85	12	12
<b>M6</b>	84	---	0	---	1	---	0	---	14	---	0	---

T=degradação total TR=taxa relativa de degradação (HAP/HCB) DB=degradação biológica( $TR_M - TR_{M6}$ )

Em todos os microcosmos estudados, o naftaleno foi o composto que apresentou a maior redução (100%). No entanto, a maior parte desta redução (84%) foi ocasionada por fatores físico-químicos, devido à sua elevada degradação abiótica. Os demais HAPs mostraram uma taxa de redução por fatores físicos insignificante (máx. 1%) e uma elevada taxa de degradação biológica (acima de 85%) (Tabela 10).

O naftaleno apresenta um valor de  $K_{oc}$  (coeficiente de partição normalizado para carbono orgânico) de 440 a 830 (Kishi, *et al.*, 1990), indicando tratar-se de um composto de moderada a baixa mobilidade no solo. De acordo com o valor de  $K_H$  (constante da lei de Henry - grau de volatilidade) ( $4,4 \times 10^{-4} \text{atm.m}^3.\text{mol}^{-1}$ ) (Shiu *et al.*, 1997), espera-se que o naftaleno apresente uma volatilização considerável, que pode ser explicada também por seu tamanho reduzido e sua alta pressão de vapor, quando comparada à dos demais HAPs utilizados (Tabela 11). A meia-vida

estimada do naftaleno por volatilização em solo é de 1,1 e 14 dias quando incorporado a 1cm e 10 cm de profundidade, respectivamente (Jury, *et al.* 1984).

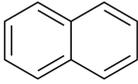
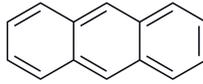
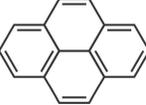
O fenantreno, o antraceno e o pireno apresentam baixa mobilidade e alta adsorção, com valores de  $K_{oc}$  elevados:  $K_{oc \text{ fenantreno}} = 9180$  (Bonin e Simpson, 2007) a 25300 (Carmo, 2000);  $K_{oc \text{ antraceno}} = 2600$  a 8600 (Brusseau, 1993); e  $K_{oc \text{ pireno}} = 61936$  a 90000 (Abdul e Gibson, 1987; Enfield, *et al.*, 1989). De acordo com os valores de  $K_H$  (Tabela 11) espera-se que estes compostos apresentem volatilização considerável. No entanto, seus altos valores de adsorção e baixas pressões de vapor (Tabela 11), acabam por atenuar esse processo (Sonnefeld, *et al.*, 1983).

Com exceção do pireno, todos os contaminantes foram degradados igualmente nos microcosmos M2, M4 e M5. Isto indica que a microbiota natural do solo apresenta uma alta capacidade de degradação do naftaleno, do fenantreno e do antraceno, e que a adição do inóculo e do biossurfactante não alterou a redução final destes hidrocarbonetos. Estudos anteriores também relatam o sucesso na degradação de HAPs pela microbiota nativa (Horunouchi, 2000; Roper e Pfaender, 2001; Silva, 2007).

O pireno, por sua vez, apresentou uma maior degradação na presença de inóculo (M4) (98%) e na presença do biossurfactantes (M5) (99%), resultado semelhante ao obtido por Silva *et al.* (2009). De acordo com Eggen e Majcherczyk

(1998) e Eggen (1999), o potencial de biodegradação é inversamente proporcional ao número de anéis benzênicos da molécula. Assim, por apresentar o maior número de anéis dentre os HAPs estudados, o pireno pode ser considerado o composto de mais difícil degradação. A presença de micro-organismos pré-selecionados pela sua alta capacidade de degradação de HAPs mostrou facilitar a degradação desta substância, aumentando de 89% para 99% sua taxa de redução (Tabela 10).

**Tabela 11.** Características dos HAPs utilizados (Seabra, 2008)

<i>HAP</i>	<i>Naftaleno</i>	<i>Fenantreno</i>	<i>Antraceno</i>	<i>Pireno</i>
Fórmula molecular	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>
Nº de anéis benzênicos	2	3	3	4
Massa molar (g/mol)	128,16	178,22	178,22	202,4
Ponto de Fusão (°C)	80	101	217	150
Ponto de Ebulição (°C)	218	340	354	360
Solubilidade (mg.L <sup>-1</sup> )	31,7	1,1	0,04	0,13
Pressão de vapor a 25 °C (mmHg)	0,085	1,2x10 <sup>-4</sup>	2,6x10 <sup>-6</sup>	4,5x10 <sup>-6</sup>
Volatilidade - K <sub>H</sub> (atm.m <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> )	4,4x10 <sup>-4</sup>	4,23x10 <sup>-5</sup>	4,88x10 <sup>-5</sup>	1,19x10 <sup>-5</sup>
Estrutura Química				

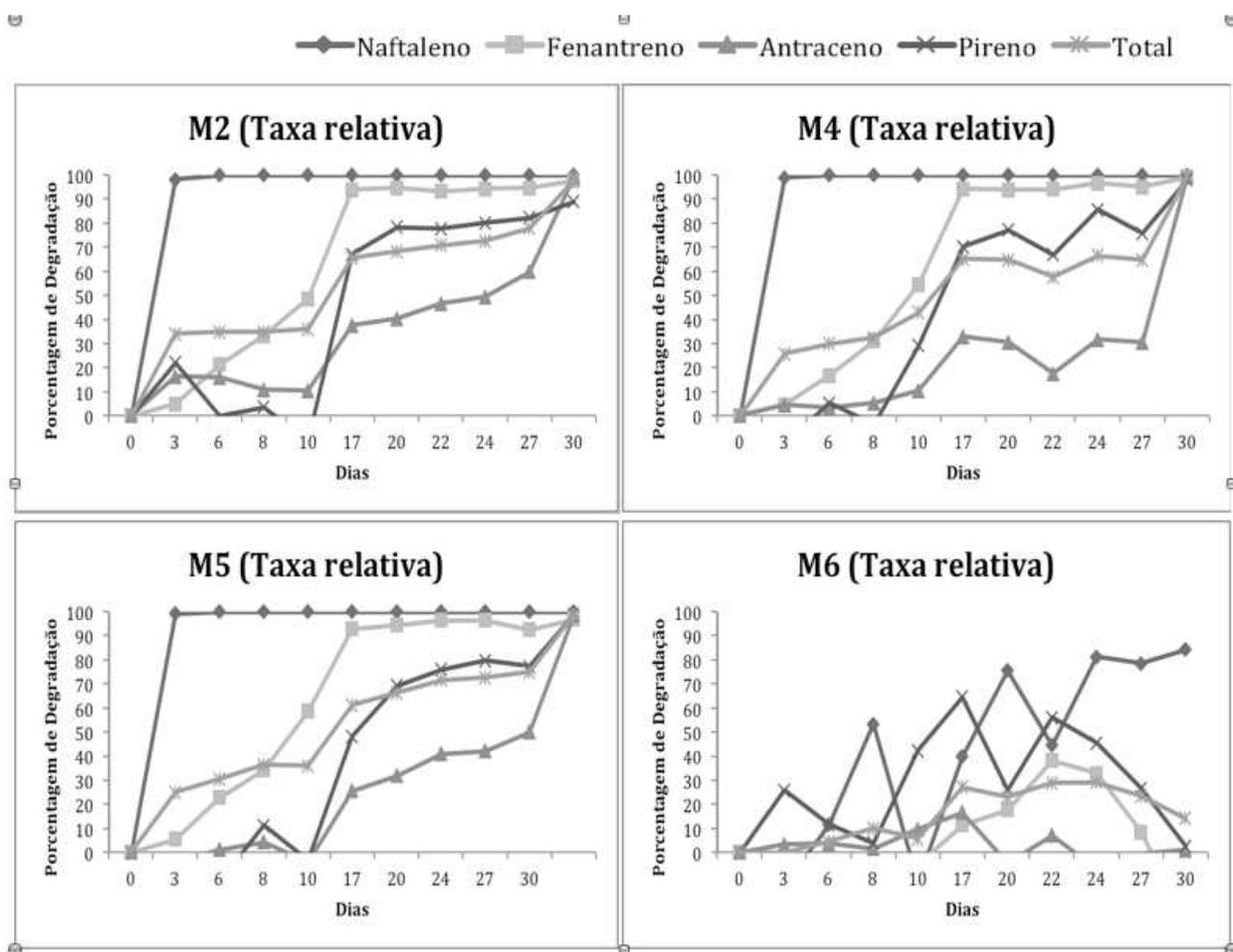
Não ocorreram diferenças entre as taxas de degradação do microcosmo com inóculo (M4) e do microcosmo com inóculo e biossurfactantes (M5). Isto pode ter ocorrido devido à presença de micro-organismos produtores de biossurfactantes no inóculo e na microbiota do solo. Estudos anteriores mostraram, por exemplo, que bactérias do gênero *Bacillus*, como as utilizadas no inóculo, apresentam grande capacidade de produção de biossurfactantes com altas taxas de emulsificação (Neves, 2002; Fonseca, *et al.*, 2007; Faria, 2010).

A molécula de hexaclorobenzeno mostrou-se muito estável, apresentando taxas de degradação físico-químicas nula e de biodegradação muito baixa (máx. 15%) (Tabela 10).

Analisando a Figura 10, nota-se que o naftaleno foi o primeiro composto a ser degradado. Por ser menor, sua degradação é mais fácil e estimula a utilização dos HAPs de maior massa molar (Dean-Ross *et al.*, 2002). O naftaleno apresentou também a maior velocidade de degradação. Embora a adição de azido de sódio no microcosmo M6 mostre que o naftaleno apresenta uma alta taxa de degradação por fatores físicos, a velocidade de degradação deste composto é muito maior na presença de micro-organismos: nos microcosmos M2, M4 e M5, 100% do naftaleno foi degradado em, aproximadamente, 3 dias; enquanto que no microcosmo M6, a maior taxa de degradação só foi alcançada em cerca de 24 dias.

A velocidade de degradação dos demais HAPs não se alterou com a presença do inóculo ou do biossurfactantes. Nos 3 microcosmos, a maior porcentagem de degradação do fenantreno (97%-99%) foi obtida em aproximadamente 17 dias. O tempo necessário para a degradação total do antraceno e do pireno foi de, aproximadamente, 30 dias (Figura 10).

Todos os HAPs mostraram uma redução inicial rápida, seguida por um decaimento, representando a fração menos biodisponível desses poluentes.



**Figura 10.** Porcentagem de degradação relativa dos HAPs (HAP/HCB) nos microcosmos M2 (HAP sem inóculo), M4 (HAP + inóculo), M5 (HAP + inóculo + biossurfactante) e M6 (HAP + azido de sódio).

## 5.4. ESTUDO DO HEXACLOROBENZENO COMO BIOMARCADOR

### 5.4.1. Microcosmos

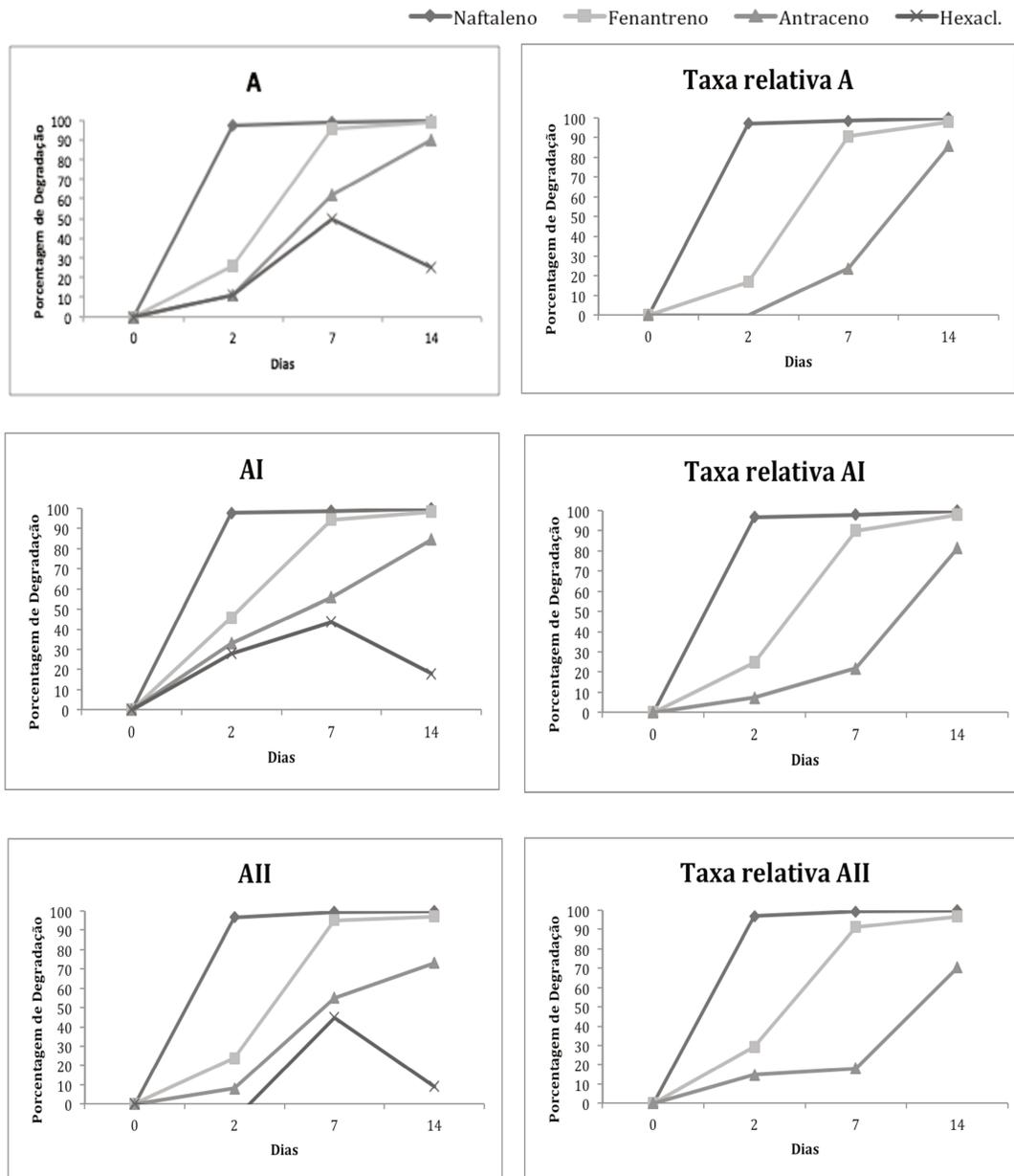
A degradação final obtida em todos os pontos amostrados foi muito semelhante para os três HAPs adicionados, assim como as degradações finais totais e relativas (Tabela 12). Isso demonstra que o processo de homogeneização foi muito eficiente. Além disso, a degradação do hexaclorobenzeno foi muito baixa (máx. 25%), evidenciando, mais uma vez, sua eficácia como biomarcador. Opostamente, a degradação de todos os HAPs estudados foi elevada (acima de 70%), comprovando a alta capacidade degradativa da microbiota do solo.

**Tabela 12.** Porcentagem de degradação dos HAPs após 14 dias. Microcosmos construídos para análise do hexaclorobenzeno como biomarcador.

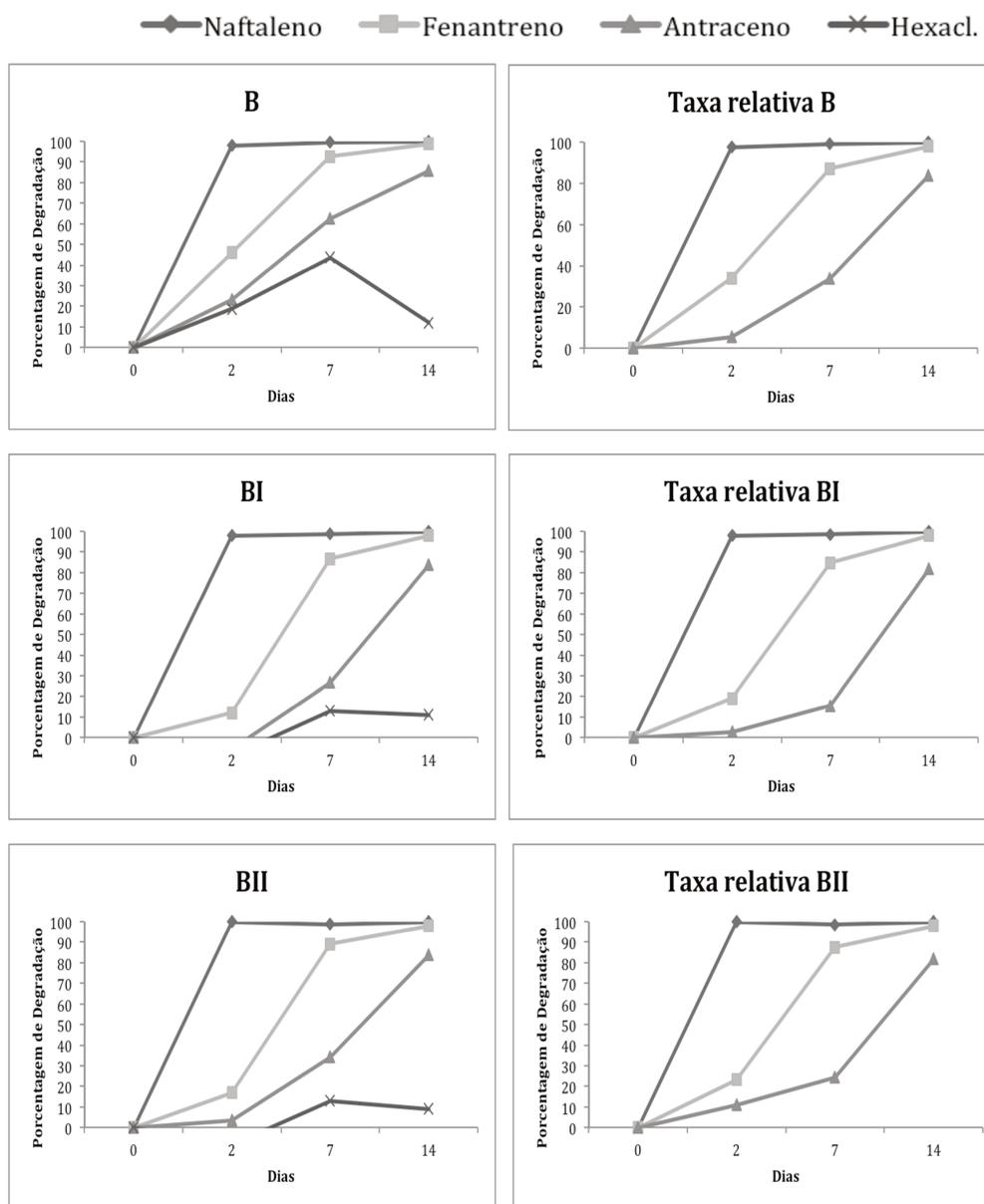
	Naftaleno		Fenantreno		Antraceno		HCB
	T	TR	T	TR	T	TR	
<b>A</b>	100	100	99	98	89	86	25
<b>AI</b>	100	100	99	98	95	81	18
<b>AII</b>	100	100	97	97	73	71	9
<b>B</b>	100	100	99	98	86	84	12
<b>BI</b>	100	100	98	98	84	82	12
<b>BII</b>	100	100	98	98	84	82	9

T= degradação total TR= taxa relativa de degradação (HAP/HCB)

O naftaleno foi o composto com maior velocidade de degradação ( 3 dias), seguido pelo fenantreno (7 dias) e pelo antraceno (14 dias), repetindo-se os resultados obtidos anteriormente (Figuras 11 e 12). Além disso, o antraceno foi o composto que apresentou menor degradação (71-95%). Isto pode ser explicado pela sua estrutura química, mais complexa que a estrutura do naftaleno e do fenantreno, com mais anéis benzênicos e massa molar. Assim como por sua menor solubilidade (Tabela 11), dificultando o acesso dos micro-organismos à molécula.



**Figura 11.** Porcentagem de degradação total e relativa dos HAPs no microcosmo A, construído para análise do hexaclorobenzeno como biomarcador. A, AI e AII indicam pontos de coleta distintos dentro do mesmo microcosmo.

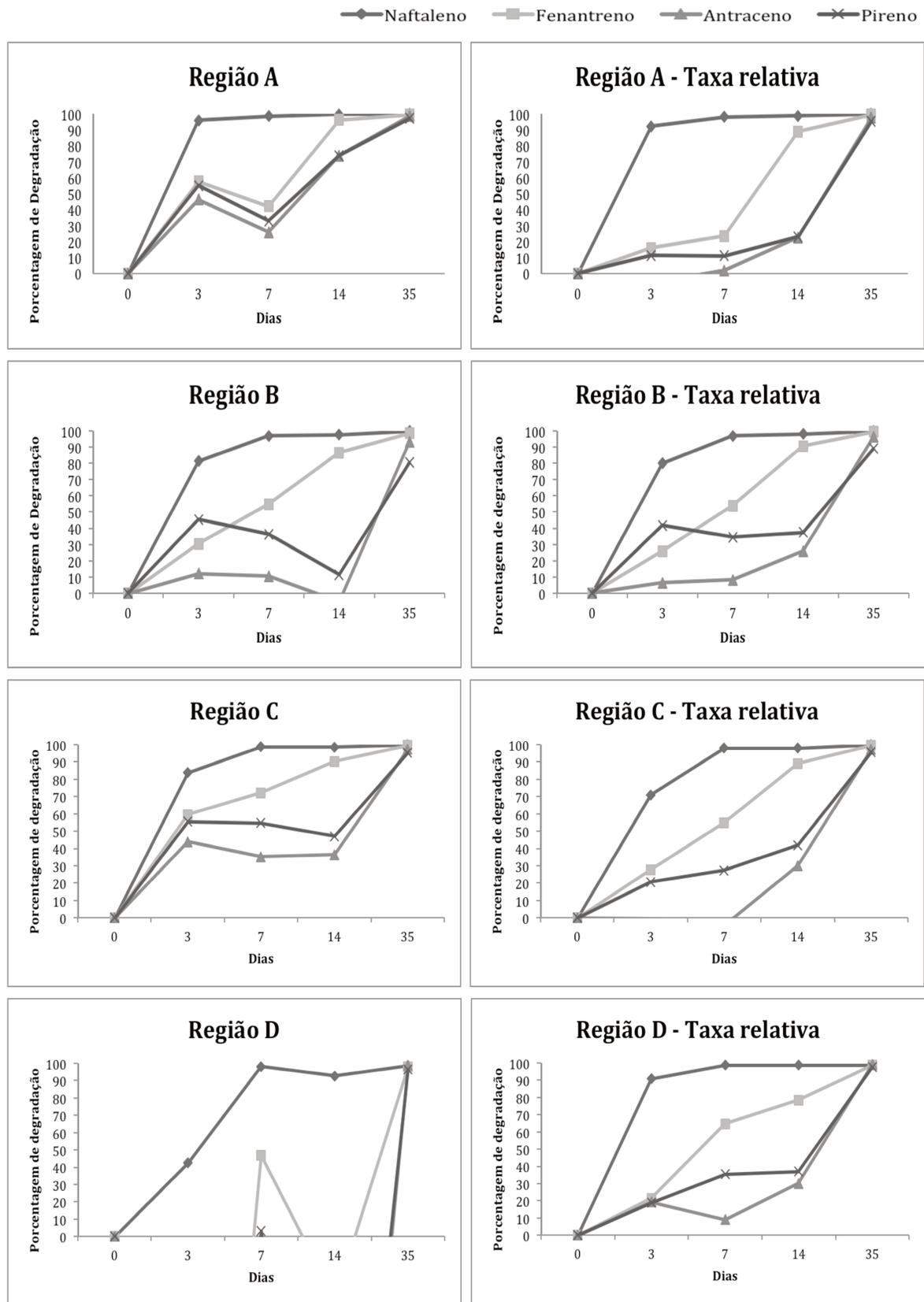


**Figura 12.** Porcentagem de degradação total e relativa dos HAPS no microcosmo B, construído para análise do hexaclorobenzeno como biomarcador. B, BI e BII indicam pontos de coleta distintos dentro do mesmo microcosmo.

#### 5.4.2. Bandeja

Analisando a Figura 13, nota-se que os resultados obtidos para a degradação de HAPs das amostras coletadas nas diferentes regiões da bandeja são mais semelhantes quando utilizamos o hexaclorobenzeno como parâmetro (taxa relativa de degradação). Além disso, quando o hexaclorobenzeno não é considerado na análise dos resultados, a porcentagem de degradação apresenta elevações e quedas ao longo do experimento, evidenciando a distribuição aleatória dos HAPs entre as regiões amostradas. Isso não acontece com as taxas relativas. Com isso, conseguimos comprovar a importância de se utilizar uma molécula estável como biomarcador e também a eficácia do hexaclorobenzeno como tal.

O naftaleno foi o composto que apresentou menor variação entre as regiões amostradas e entre as taxa totais de degradação e as taxas relativas. Uma possível explicação para essa melhor distribuição da molécula é a maior solubilidade do naftaleno (Tabela 11). Por ser mais solúvel do que os outros HAPs na água do solo, consegue distribuir-se mais uniformemente pela bandeja, mostrando resultados mais estáveis nas diferentes regiões.



**Figura 13.** Porcentagem de degradação total e relativa dos HAPs nas diferentes regiões amostradas na bandeja (figura 4).

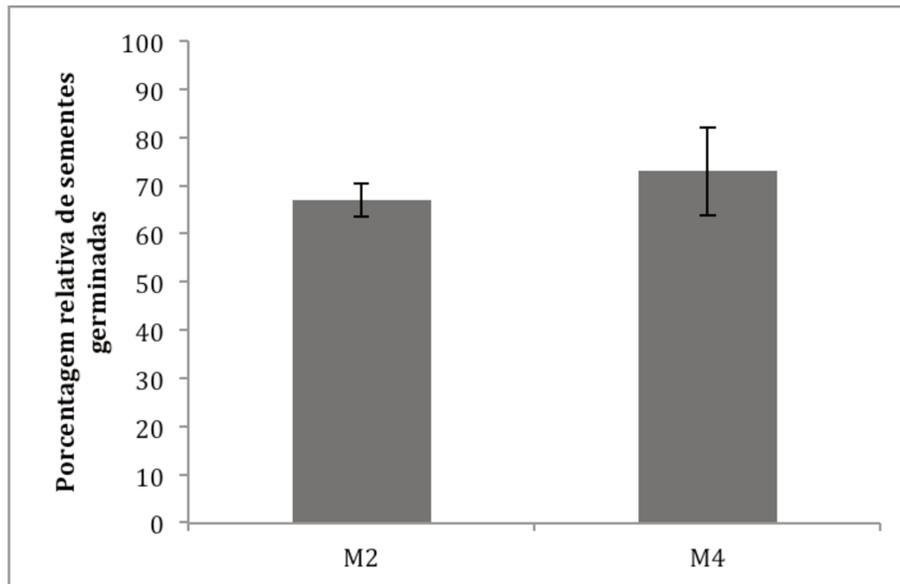
### 5.5. TESTE TOXICOLÓGICO: *Lactuca sativa*

O microcosmos M1 (solo sem histórico de contaminação e sem adição de HAPs e inóculo) foi utilizado como controle, para determinar a taxa germinativa do lote de sementes utilizado no experimento. Neste microcosmo, houve um total de 156 sementes germinadas.

No microcosmo com HAP (M2), germinaram, aproximadamente, 65% das sementes em cada placa, somando um total de 104 sementes germinadas. No microcosmo com HAP em que foi acrescentado o inóculo (M4), germinaram, em média, 73% das sementes de cada placa, com um total de 115 sementes germinadas. Nos dois microcosmos, ocorreu uma redução na taxa de germinação de sementes, quando comparados à situação controle (M1), indicando a presença de substâncias tóxicas em M2 e M4.

Considerando o desvio padrão dos dados amostrados (Figura 14), as amostras dos microcosmos M2 e M4 não apresentaram diferenças significativas, entre si, na taxa de germinação das sementes (Figura 14). Isso indica que o inóculo não foi mais eficiente no tratamento deste solo, em relação à toxicidade do mesmo, do que a microbiota natural. Como os experimentos de degradação dos HAPs mostraram uma grande redução destes contaminantes (item 5.3.2), é possível que os micro-organismos biodegradadores não tenham mineralizado

completamente os HAPs, mas sim os transformado em outras substâncias também tóxicas às sementes.



**Figura 14.** Germinação das sementes de *Lactuca sativa* nas amostras dos M2 = HAPs, M4 = HAPs + inóculo.

Porém, a germinação de sementes nos microcosmos M2 e M4 não foi baixa, indicando que o solo não apresenta toxicidade elevada para sementes de alface. A alta taxa de degradação obtida nos experimentos anteriores e o longo tempo transcorrido após a adição dos HAPs (80 dias) podem ter ocasionado esta baixa toxicidade. Resultados semelhantes foram obtidos em experimento realizado por Cook *et al.* (2002), no qual a contaminação do solo por derivados do petróleo não alterou significativamente a germinação das sementes. Contudo, Plaza *et al.* (2005), que testaram a toxicidade de derivados de petróleo em diversos vegetais,

obtiveram resultados de uma maior toxicidade em solo não tratado, sendo as sementes de alface mais sensíveis do que as de outras espécies.

## 5.6. ANÁLISES MOLECULARES

A diversidade taxonômica das comunidades bacterianas dos diferentes microcosmos foi determinada utilizando-se o programa CLASSIFIER da base de dados RDP (Wang *et al.*, 2006; Cole *et al.*, 2009.). A comparação entre essas comunidades foi realizada através do programa RDP LIBCOMPARE. O programa estima a probabilidade de se obter as diferenças observadas em um determinado táxon, utilizando a identificação taxonômica das sequências dos genes 16S rRNA produzidas pelo programa RDP CLASSIFIER e um teste estatístico desenvolvido por Audic *et al.* (1997).

O DNA genômico total do solo dos microcosmos M1A, M1B, M2 e M4 foi extraído e utilizado para a amplificação por PCR, clonagem e sequenciamento dos genes eubacterianos 16S rRNA presentes. M1A é o microcosmo controle sem HAP e sem hexaclorobenzeno (HCB) e M1B é o controle sem HAP mas com HCB. Esses microcosmos mostram o efeito isolado do HCB e de tolueno residual (utilizado na dissolução dos HAPs e do HCB) sobre a comunidade microbiana. Ao microcosmo M2 foram adicionados HAPs e HCB, sem inóculo. Já o microcosmo M4 recebeu HAPs, HCB e inóculo. Nesses microcosmos, permitiu-se avaliar o

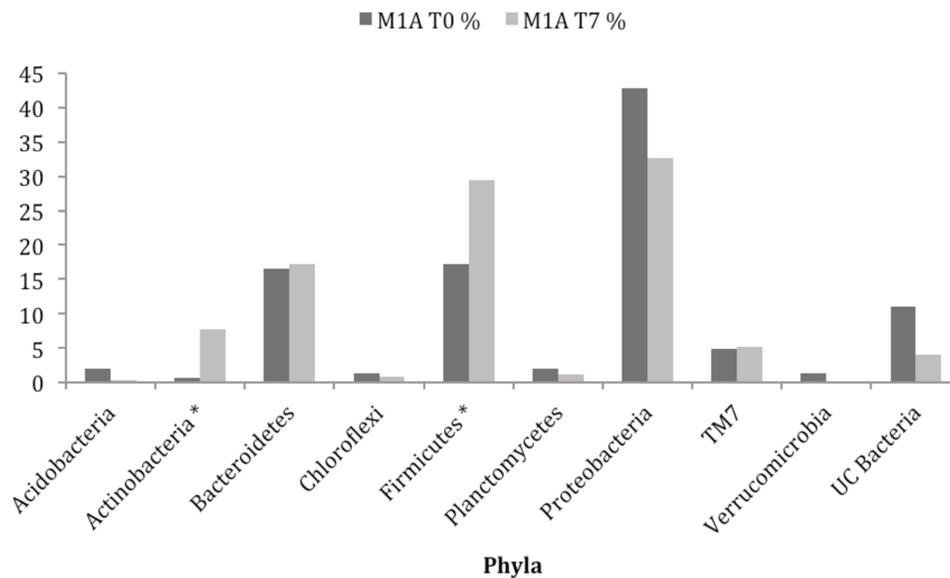
efeito da adição de degradadores exógenos de HAPs sobre a comunidade microbiana local.

Foram analisadas amostras de 2 períodos distintos: T0 de M1A, que representa a comunidade microbiana inicial do solo, e T7 (após 22 dias do início do experimento) de todos os microcosmos.

Os seguintes números de sequências de boa qualidade, acima de 300bp, foram obtidas de cada microcosmo [microcosmo (número de sequências)]: M1A T0 (145), M1A T7 (248), M1B T7 (255), M2 T7 (118) e M4 T7 (188). Os táxons com um asterisco (\*) nas figuras indicam que duas populações comparadas são estatisticamente significantes a um nível de 1%, ou 1 chance em 100, conforme determinado pelo programa Libcompare. No entanto, deve-se notar que, no geral, outras diferenças claramente significantes foram encontradas entre amostras que não possuem o critério de serem estatisticamente significantes a 1% e a maioria delas foi incluída na análise das mudanças das comunidades microbianas.

Além disso, existe um número de sequências que não puderam ser classificadas em gênero e são designadas UC (*unclassified*) nas figuras 15 a 27. Sequências não classificadas além de um certo nível, por exemplo filo, classe, ordem ou família, são frequentemente encontradas em amostras ambientais devido à presença de micro-organismos que ainda não foram isolados e caracterizados em sua forma pura.

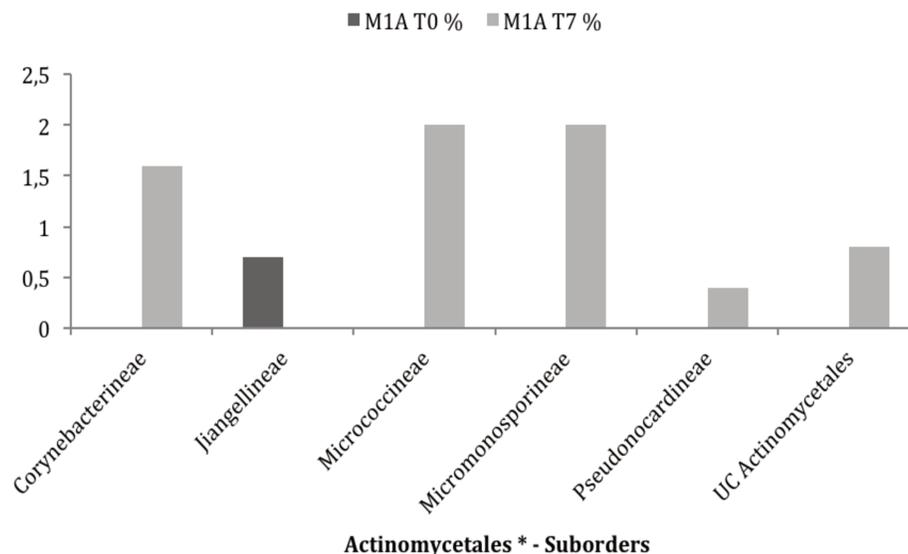
Para determinar as mudanças que ocorreram na estrutura da comunidade microbiana no solo controle de T0 a T7, M1A T0 foi comparado a M1A T7. A Figura 15 mostra as diferenças entre M1A T0 e M1A T7, no que se concerne ao filo.



**Figura 15.** Filos dominantes encontrados no microcosmos controle M1A no tempo inicial (T0) e após 22 dias (T7).

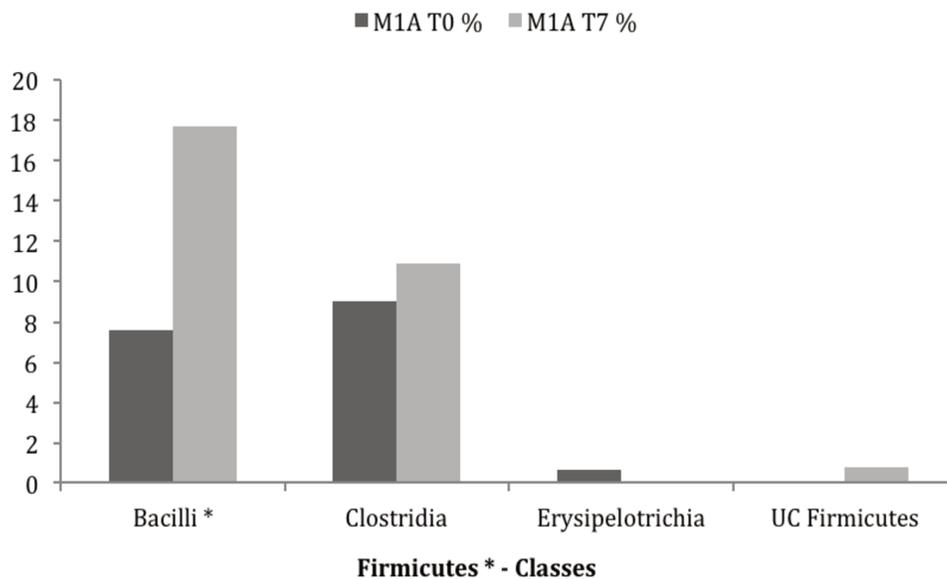
Os filos encontrados em maior quantidade nos microcosmos de solo deste trabalho são consistentes com outros estudos de comunidades microbianas em solo, os quais mostraram que membros dos filos Acidobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, e Verrucomicrobia são frequentemente os mais dominantes (Janssen, 2006; Schloss e Handelsman, 2006). As mudanças mais significantes em relação ao filo foram observadas entre os filos Actinobacteria\* e Firmicutes\*.

Considerando o filo Actinobacteria\*, as mudanças são quase inteiramente atribuídas ao crescimento da ordem Actinomycetales\* e subordens Corynebacterineae, Jiangellineae, Micrococcineae, Micromonosporineae, Pseudonocardineae (Figura 16). Essas ordens de micro-organismos utilizam amplas variações de substratos e os membros tanto das subordens Corynebacterineae e Pseudonocardineae são conhecidos por serem degradadores de HAPs (Tsitko, 2007) . No entanto, neste caso, o crescimento desses grupos não pode ser explicado pela presença de HAPs e, portanto, deve ser ocasionado por outros fatores, tais como o ambiente do microcosmo, a homogeneização regular durante cada amostragem ou mudanças no substrato, conforme a degradação dos componentes presentes naturalmente no solo.



**Figura 16.** Subordens de Actinomycetales dominantemente encontradas em M1A (controle) no tempo inicial (T0) e após 22 dias (T7).

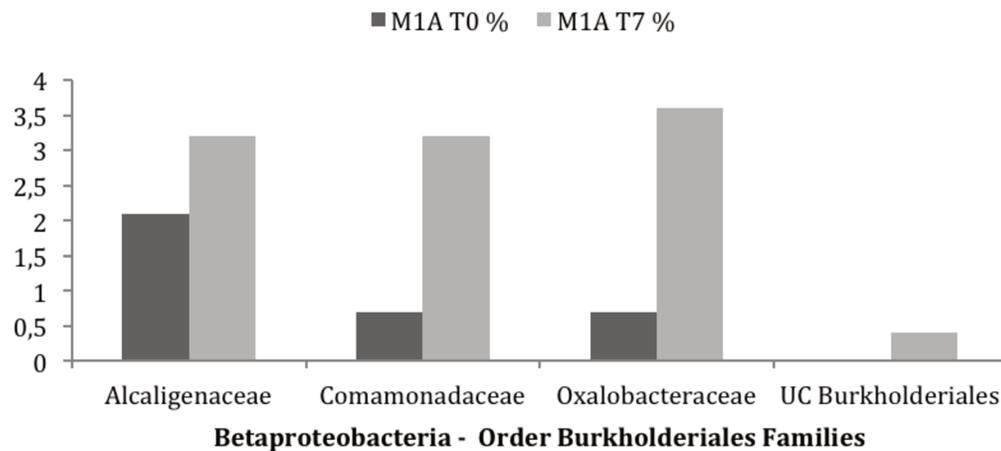
Em relação ao filo Firmicutes\* (Figura 17), as mudanças são atribuídas ao crescimento da classe Bacilli\*, principalmente o gênero *Bacillus* e, em menor proporção, o gênero *Paenibacillus*. Ambos contém degradadores de HAP mas, neste microcosmo, essas mudanças não podem ser atribuídas à presença dos contaminantes e podem ser consideradas apenas o resultado das condições do microcosmo.



**Figura 17.** Principais classes do filo Firmicutes encontradas no microcosmo M1A no tempo inicial (T0) e após 22 dias (T7).

Em relação ao filo Proteobacteria, ocorreu um grande aumento no número de clones da classe Betaproteobacteria, principalmente nas famílias Comamonadaceae e Oxalobacteraceae, ordem Burkholderiales (Figura 18). Embora a ordem Burkholderiales contenha muitos degradadores de HAPs,

sobretudo nas famílias Alcaligenaceae, Burkholderiaceae (com destaque para *Burkholderia* sp.) e Comamonadaceae, os gêneros degradadores de HAP da família Comamonadaceae, *Acidovorax* e *Comomonas*, não estavam entre os gêneros que apresentaram crescimento entre M1A T0 e M1A T7 (Ní Chadhain, *et.al.*, 2006)



**Figura 18.** Principais famílias da ordem Burkholderiales encontradas no microcosmo M1A no tempo inicial (T0) e após 22 dias (T7).

Além disso, na família Oxalobacteraceae foram encontrados membros do gênero *Oxalicybacterium*, o qual não é conhecido como degradador de HAP mas sim de oxalato (Tabela 13).

**Tabela 13.** Gêneros da ordem Oxalobacteraceae encontrados no microcosmo no tempo inicial (T0) e após 22 dias (T7).

	M1A T0 (%)	M1A T7 (%)
<b>Oxalicibacterium</b>	0	0,8
<b>UC Oxalobacteraceae</b>	0,7	0

Em relação à classe Alphaproteobacteria, a ordem Sphingomonadales apresentou a mudança mais significativa (Tabela 14), a qual ocorreu na família Erythrobacteraceae (Tabela 15), não associada à degradação de HAP.

**Tabela 14.** Ordens da classe Alphaproteobacteria encontradas no microcosmo M1A no tempo inicial (T0) e após 22 dias (T7).

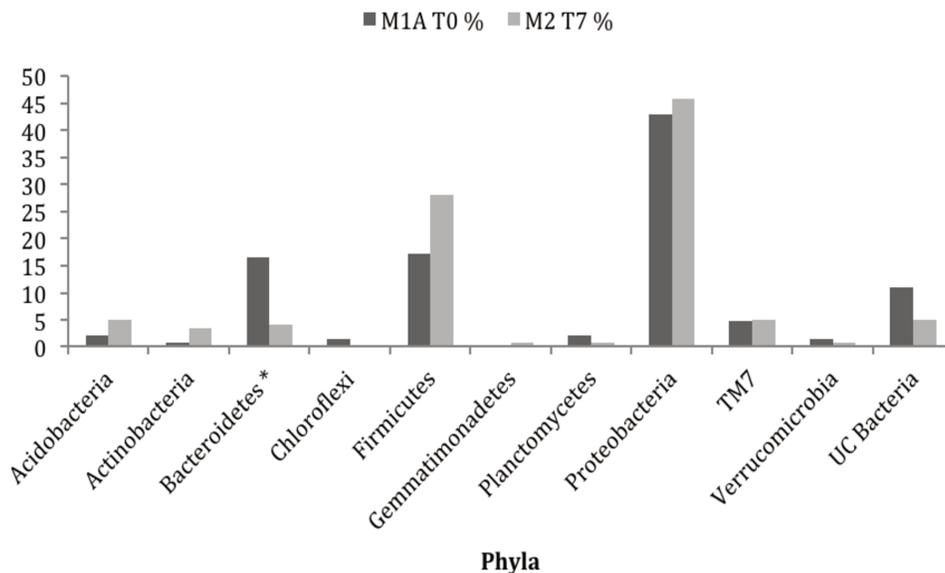
	M1A T0 (%)	M1A T7 (%)
<b>Caulobacterales</b>	0,7	1,2
<b>Sphingomonadales</b>	1,4	4
<b>Rhizobiales</b>	8,3	7,3
<b>Rhodospirillales</b>	2,1	0,4
<b>UC Alphaproteobacteria</b>	5,5	0,8

**Tabela 15.** Famílias da ordem Sphingomonadales encontradas no microcosmo M1A no tempo inicial (T0) e após 22 dias (T7).

	M1A T0 (%)	M1A T7 (%)
<b>Erythrobacteraceae</b>	0	1,6
<b>Sphingomonadaceae</b>	1,4	1,6
<b>UC Sphingomonadales</b>	0	0,8

A comparação entre M1A T0 (controle) e M2 T7 (com HAP) revela um número de diferenças significantes na composição da comunidade microbiana presente nas amostras de solo, que podem ser atribuídas ao efeito do HAP

adicionado. A mudança mais significativa foi no filo Bacteroidetes\* , que caiu de 16,6% do total de clones do gene 16S rRNA para 4,2% (Figura 19). Tal queda é observada em todas as classes identificadas. Não há evidência de seleção de degradadores de HAP neste filo e o declínio pode indicar a toxicidade dos HAPs para este grupo ou uma possível inibição pela emergência de outras bactérias em resposta à adição de HAPs.



**Figura 19.** Comparação entre os filós encontrados em M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).

Analisando o filo Firmicutes, notamos que seu crescimento (de 17,2% para 28%) (Figura 19) é maior na classe Bacilli (Tabela 16), gênero *Bacillus*, como ocorreu em M1A T0 e, portanto, não pode ser atribuída à presença dos HAPs.

**Tabela 16.** Classes do filo Firmicutes encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).

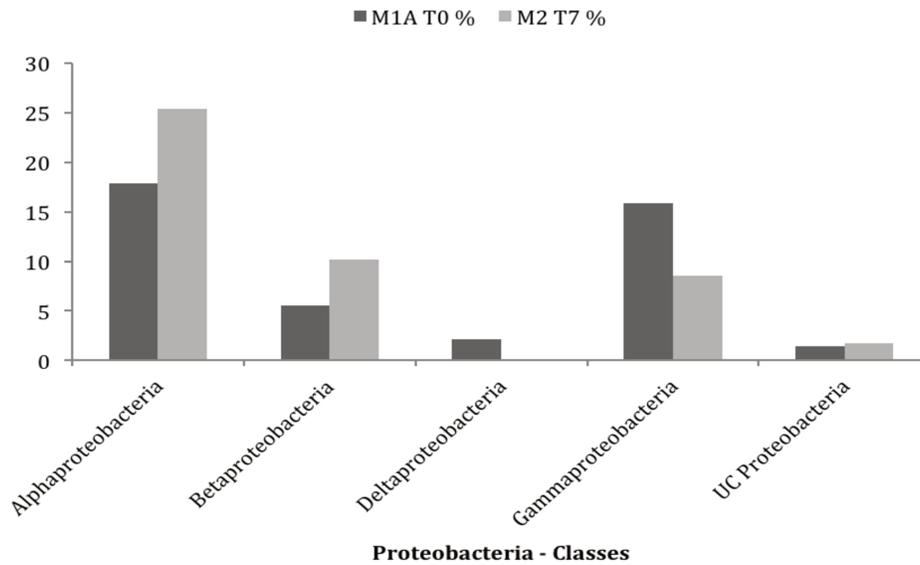
	M1A T0 (%)	M2 T7 (%)
<b>Bacilli</b>	7,6	13,6
<b>Clostridia</b>	9	13,6
<b>Erysipelotrichia</b>	0,7	0
<b>UC Firmicutes</b>	0	0,8

O número de clones do filo Actinobacteria também aumentou (Figura 19), sobretudo na subclasse Actinobacteridae (Tabela 17), como observado em M1A T0, porém em uma menor extensão e onde a maioria não pôde ser identificada ao nível família ou gênero. Considerando as similaridades com M1A T7, provavelmente essas mudanças não são resultado da presença de HAPs.

**Tabela 17.** Subclasses do filo Actinobacteria encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).

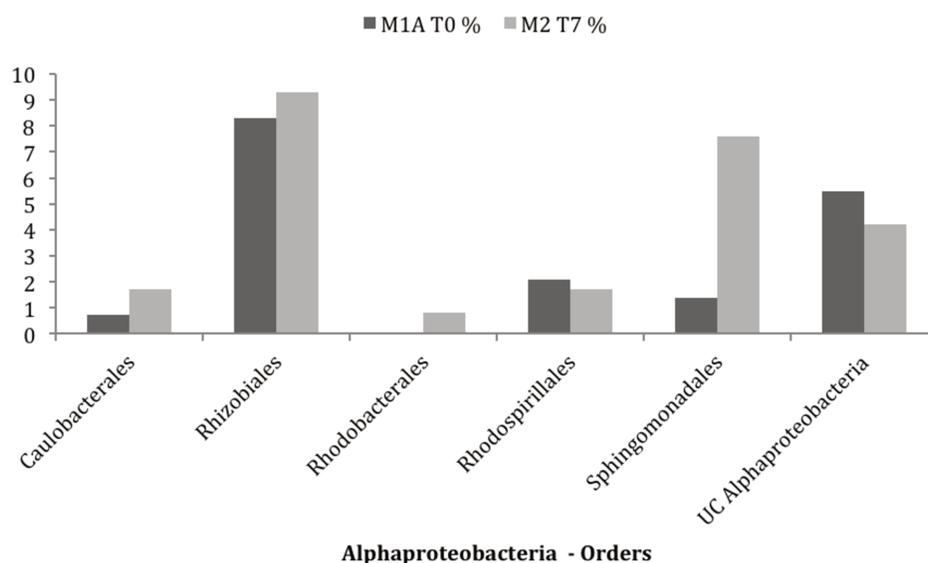
	M1A T0 (%)	M2 T7 (%)
<b>Acidimicrobidae</b>	0	0,8
<b>Actinobacteridae</b>	0,7	2,5

Observando o filo Proteobacteria, percebemos um crescimento de Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria e uma diminuição no número de Gamaproteobacteria (Figura 20).



**Figura 20.** Diferenças observadas nas classes do filo Proteobacteria entre os microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).

Entre as Alphaproteobacteria, a mudança mais significativa foi o crescimento dos membros da ordem Sphingomonadales (Figura 21), que mostrou um grande aumento no número de bactérias das famílias Erythrobacteraceae e, sobretudo, Sphingomonadaceae (Tabela 18).



**Figura 21.** Diferenças observadas nas ordens da classe Alphaproteobacteria entre os microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).

**Tabela 18.** Famílias da ordem Sphingomonadales encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).

	M1A T0 (%)	M2 T7 (%)
<b>Erythrobacteraceae</b>	0	2,5
<b>Sphingomonadaceae</b>	1,4	4,2
<b>UC Sphingomonadales</b>	0	0,8

A família Sphingomonadaceae possui muitos degradadores de HAP, principalmente nos gêneros *Sphingomonas* e *Sphingopyxis*. Neste caso, foi o gênero *Sphingopyxis* que apresentou o maior crescimento, de 0% a 2,5% do total da população (Tabela 19).

**Tabela 19.** Gêneros da família Sphingomonadaceae encontrados nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).

	M1A T0 (%)	M2 T7 (%)
<b>Sphingomonas</b>	0,7	0
<b>Sphingopyxis</b>	0	2,5
<b>UC Sphingomonadaceae</b>	0,7	1,7

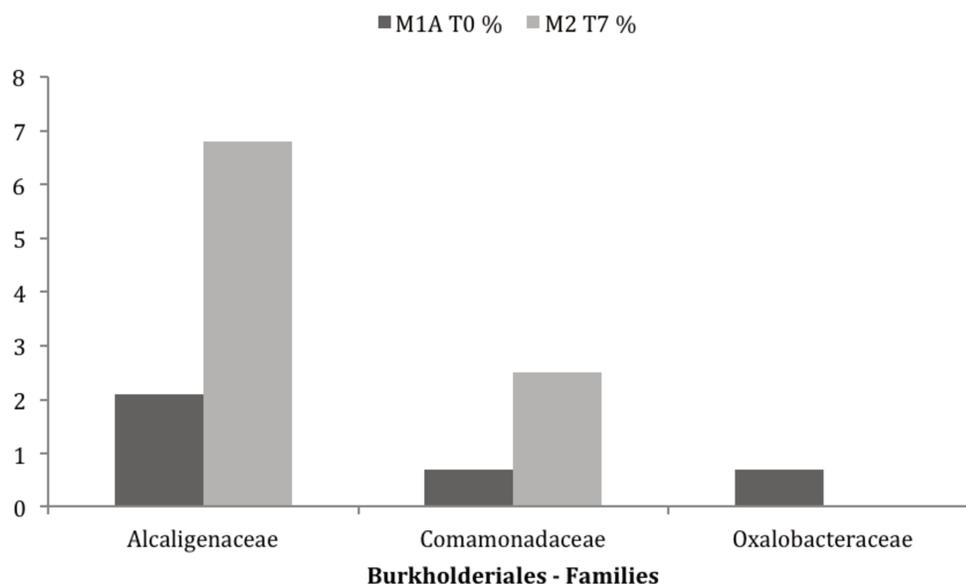
Além disso, houve um aumento no gênero *Brevundimonas*, da família Caulobacteraceae, ordem Caulobacterales. Tal gênero tem sido frequentemente identificado em solos contaminados com HAP e é conhecido por possuir diversas espécies degradadoras de HAP (Phillips *et al.*, 2008). Assim, o crescimento do número de *Sphingopyxis* e *Brevundimonas* pode ser atribuído à presença de HAPs e representa uma diferença significativa entre solo não contaminado e solo contaminado com HAP, demonstrando a seleção de degradadores de HAPs.

A avaliação da classe Betaproteobacteria revela um amplo crescimento relativo no número de membros da ordem Burkholderiales de 3,4% para 9,3% da comunidade microbiana total (Tabela 20).

**Tabela 20.** Ordens da classe Betaproteobacteria encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).

	M1A T0 (%)	M2 T7 (%)
<b>Burkholderiales</b>	3,4	9,3
<b>Rhodocyclales</b>	0,7	0,8
<b>UC Betaproteobacteria</b>	1,4	0

Porém, em contraste ao microcosmo M1A T7 (Figura 18), membros da família Alcaligenaceae mostraram os maiores aumentos, de 2,1% para 6,8% da comunidade microbiana total (Figura 22).



**Figura 22.** Diferenças observadas nas famílias da ordem Burkholderiales entre os microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).

O crescimento em Alcaligenaceae ocorreu nos gêneros *Achromobacter*, *Bordetella*, *Pusillimonas* (Tabela 21) e todos esses grupos são descritos como degradadores de HAPs (Eriksson *et al.*, 2003; Hilyard *et al.*, 2008). Portanto, seu crescimento indica claramente uma seleção de degradadores de HAPs e pode ser atribuído à presença de HAPs no solo.

**Tabela 21.** Gêneros da família Alcaligenaceae encontrados nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).

	M1A T0 (%)	M2 T7 (%)
<b>Achromobacter</b>	0	0,8
<b>Bordetella</b>	0	2,5
<b>Pigmentiphaga</b>	0,7	0
<b>Pusillimonas</b>	1,4	3,4

Observando as Gammaproteobacteria, um grande declínio em todas as ordens identificadas é notado, com exceção para Pseudomonadales (Tabela 22). Esta ordem mostrou um pequeno aumento atribuído a um leve crescimento do gênero *Pseudomonas* (Tabela 23), o qual é conhecido por ter habilidade em degradar um amplo número de substratos, particularmente HAPs e outros hidrocarbonetos.

**Tabela 22.** Ordens da classe Gammaproteobacteria encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).

	M1A T0 (%)	M2 T7 (%)
<b>Aeromonadales</b>	1,4	0
<b>Methylococcales</b>	1,4	0,8
<b>Pseudomonadales</b>	1,4	1,7
<b>Xanthomonadales</b>	9	5,1
<b>UC Gammaproteobacteria</b>	2,8	0,8

**Tabela 23.** Gêneros da ordem Pseudomonadales encontrados nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).

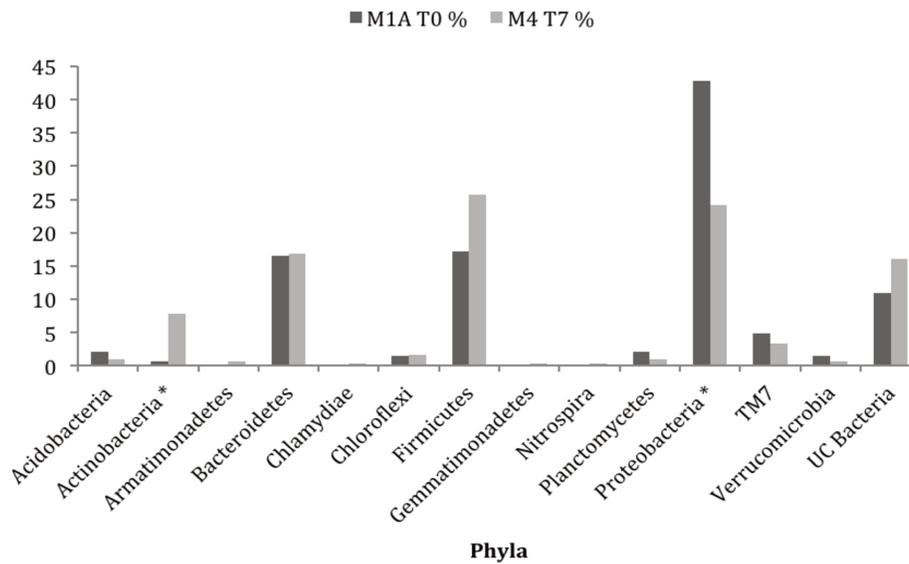
	M1A T0 (%)	M2 T7 (%)
<b>Pseudomonas</b>	0,7	0,8
<b>UC Pseudomonadaceae</b>	0,7	0,8

Em adição, embora membros da ordem Xanthomonadales tenham diminuído de 9 para 5,1% (Tabela 22), o gênero *Pseudoxanthomonas*, pertencente a Xanthomonadales, cresceu de 0% para 1,7% (Tabela 24) e membros deste grupo também são conhecidos como degradadores de HAP (Patel *et al.*, 2011). Assim, as mudanças no grupo Gammaproteobacteria indicam também uma seleção de degradadores de HAP.

**Tabela 24.** Gêneros da ordem Xanthomonadales encontrados nos microcosmos M1A T0 (controle) e M2 T7 (microcosmo com HAP, após 22 dias).

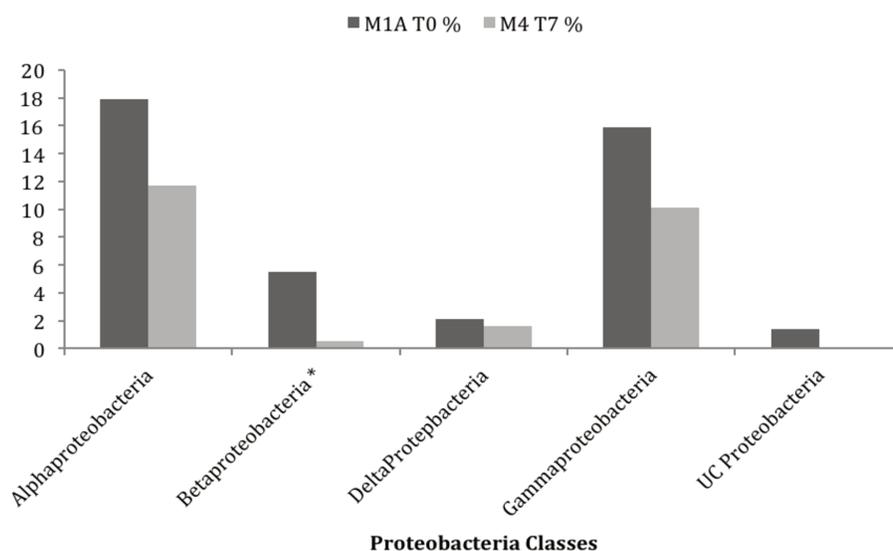
	M1A T0 (%)	M2 T7 (%)
<b>Dokdonella</b>	0,7	0
<b>Luteimonas</b>	1,4	2,5
<b>Lysobacter</b>	2,1	0
<b>Pseudoxanthomonas</b>	0	1,7
<b>Rhodanobacter</b>	0,7	0
<b>UC Xanthomonadaceae</b>	2,8	0,8

Uma comparação de M1A T0 (controle) com M4 T7 (HAP e inóculo) em relação aos filos é mostrada na Figura 23. Ocorreu uma enorme queda no número de Proteobacteria\*, de 42.8% para 24.1% dos clones da comunidade microbiana total, em contraste com o leve crescimento geral observado em M2 T7 (Figura 19).



**Figura 23.** Comparação entre os filós encontrados em M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).

Mudanças no filo Proteobacteria\* mostram uma quase completa depleção da classe Betaproteobacteria (Figura 24), incluindo a ordem Burkholderiales (Tabela 25), em contraste ao grande crescimento observado em M2 T7 (Tabela 20). Sugerindo que a adição no inóculo suprimiu essa população.



**Figura 24.** Comparação entre as classes pertencentes ao filo Proteobacteria encontradas em M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).

**Tabela 25.** Ordens da classe Betaproteobacteria encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).

	M1A T0 (%)	M4 T7 (%)
Burkholderiales	3,4	0,5
Rhodocyclales	0,7	0
UC Betaproteobacteria	1,4	0

Gamaproteobacteria também mostrou um significativo declínio no número de clones em todas as ordens identificadas, com exceção da Legionellales, que cresceu de 0% para 1,6% da população total (Tabela 26). O crescimento desta ordem pode ser inteiramente atribuído à emergência do gênero *Aquicella*, que foi previamente identificado como um degradador de fenantreno em solos poluídos

por esse HAP (Ding *et al.*, 2012). O aparecimento de membros do gênero sugere, portanto, um enriquecimento seletivo como resultado da adição de HAPs ao solo.

**Tabela 26.** Ordens da classe Gammaproteobacteria encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).

	M1A T0 (%)	M4 T7 (%)
<b>Legionellales</b>	0	1,6
<b>Pseudomonadales</b>	1,4	0
<b>Methylococcales</b>	1,4	0,5
<b>Aeromonadales</b>	1,4	0
<b>Xanthomonadales</b>	9	5,3
<b>UC Gammaproteobacteria</b>	2,8	2,7

Entre a classe Alphaproteobacteria, a alteração mais significativa foi o aumento dos membros da ordem Sphingomonadales (Tabela 27), primariamente da família Sphingomonadaceae (Tabela 28), como em M2 T7 (Tabela 18).

**Tabela 27.** Ordens da classe Alphaproteobacteria encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).

	M1A T0 (%)	M4 T7 (%)
<b>Caulobacterales</b>	0,7	0
<b>Rhizobiales</b>	8,3	5,3
<b>Rhodospirillales</b>	2,1	1,6
<b>Sphingomonadales</b>	1,4	2,7
<b>UC Alphaproteobacteria</b>	5,5	1,1

**Tabela 28.** Famílias da ordem Sphingomonadales encontradas nos microcosmos M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).

	M1A T0 (%)	M4 T7 (%)
<b>Erythrobacteraceae</b>	0	0,5
<b>Sphingomonadaceae</b>	1,4	2,1

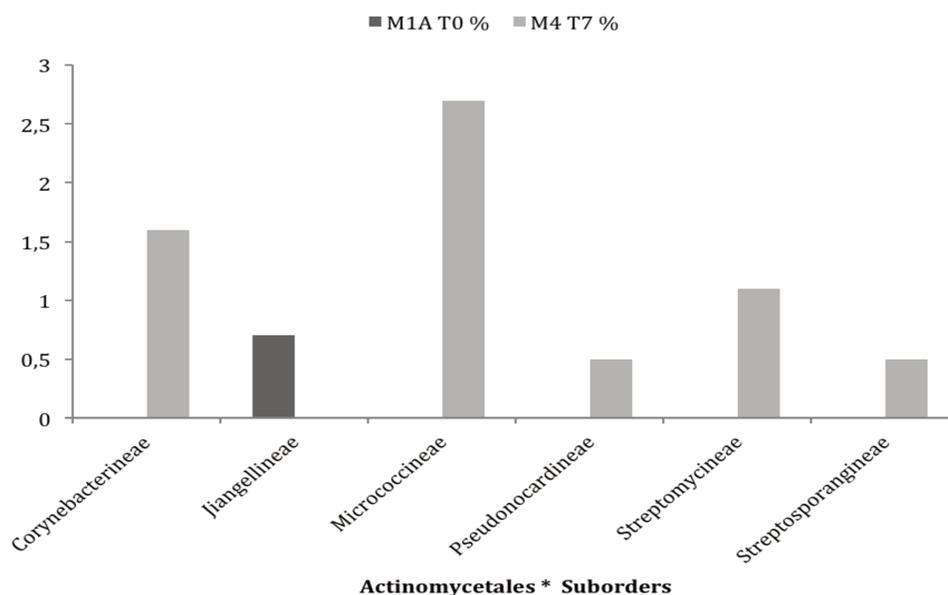
No entanto, diferentemente de M2 T7 (Tabela 19), o gênero *Sphingomonas* apresentou crescimento, aos invés do gênero *Sphingopyxis* (Tabela 29). A razão para o maior enriquecimento *Sphingomonas* sobre *Sphingopyxis* não está clara, uma vez que ambos possuem o mesmo número de membros degradadores de HAPs (Kertsz e Kawasaki, 2010). Todavia, tanto M2 T7 quanto M4 T7 mostraram um crescimento similar na família Sphingomonadaceae (Tabelas 18 e 28), indicando que a adição de HAP aumentou o número de membros degradadores deste grupo.

**Tabela 29.** Gêneros da família Sphingomonadaceae encontrados nos microcosmos M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).

	M1A T0 (%)	M4 T7 (%)
<b>Sphingomonas</b>	0,7	1,6
<b>UC Sphingomonadaceae</b>	0,7	0,5

Em oposição ao filo Proteobacteria\*, o filo Actinobacteria\* cresceu destacadamente de 0,7% para 79% do total da comunidade microbiana identificada (Figura 23). O maior crescimento ocorreu na ordem Actinobacteria\* e, espelhando-se ao ocorrido entre M1A T0 e M1A T7, não pode ser considerado resultado da presença de HAPs. Porém, ao contrário de M1A T7 (Figura 16), membros da subordem Micromonosporineae não foram favorecidos, enquanto membros da subordem Streptomycineae cresceram de 0% para 1.1%, assim como membros da subordem Streptosporangineae, que cresceram sutilmente de

0% para 0.5% (Figura 25). Na subordem Streptomycineae, o crescimento ocorreu no gênero *Streptomyces*, conhecido por possuir membros que degradam HAPs. E na subordem Streptosporangineae, ocorreu no gênero *Actinomadura* (Balachandran *et al.*, 2012).



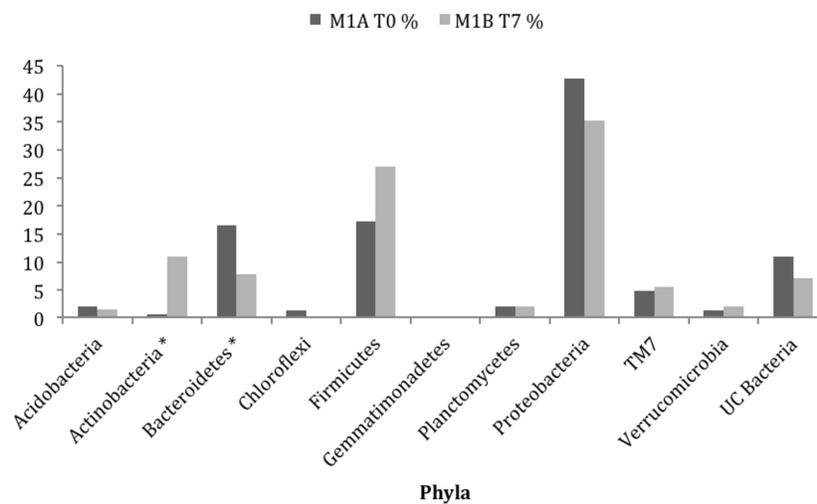
**Figura 25.** Comparação das subordens de Actinomycetales encontradas em M1A T0 (controle) e M4 T7 (microcosmo com HAP e inóculo, após 22 dias).

A avaliação das mudanças em Firmicutes entre M1A T0 e M4 T7 (Figura 23) mostra uma larga mudança no gênero *Bacillus* (0,7% para 4,8%) e no gênero *Thermoactinomyces*, que cresceu de 0% para 1,1%. Como um grande aumento do gênero também foi observado em M1A T7 e M2 T7, não podemos atribuí-lo à adição do inóculo, composto amplamente por espécies de *Bacillus*.

De maneira geral, as diferenças entre M2 T7 e M4 T7 indicam que a adição do inóculo alterou a população microbiana, principalmente diminuindo ou

eliminando membros do grupo de Proteobacteria. Além disso, membros do gênero *Sphingopyxis*, que cresceu no microcosmo M2, foram substituídos pelo gênero mais próximo, o *Sphingomonas*. O gênero degradador de HAP *Aquicellai*, do grupo Gamaproteobacteria, também aumentou seletivamente. O gênero *Chromobacterium*, das Betaproteobacteria, que também compunha o inóculo, não foi identificado nas amostras de M4 T7, também indicando que as bactérias adicionadas não persistem no solo durante o período de incubação.

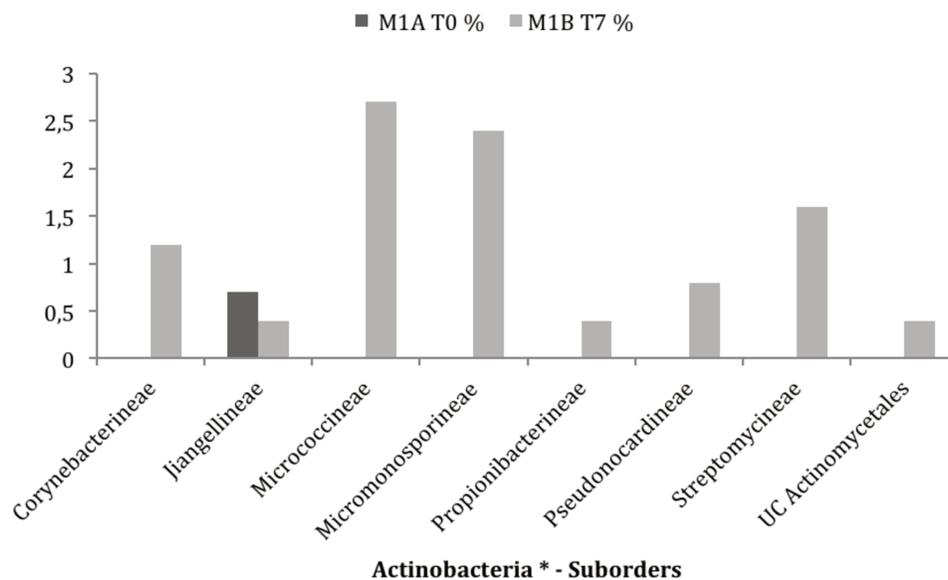
A comparação entre M1A T0 (controle) e M1B T7 (com HCB) mostra um grande declínio dos filos Bacteroidetes\* e Proteobacteria e um crescimento correspondente dos filos Actinobacteria\* e Firmicutes (Figura 26).



**Figura 26.** Filos encontrados M1A T0 (controle) e M1B T7 (microcosmo com HCB apenas, após 22 dias).

O crescimento do filo Actinobacteria\* espelha-se àquele observado em M1A T7, ocorrendo predominantemente na ordem Actinomycetales\*. Com exceção dos

membros da subordem Jiangellineae (Figura 27), a ordem aumentou de 0% para 1,6% da população total, principalmente no gênero *Streptomyces*, como observado em M4 T7. O aparecimento de membros do gênero *Streptomyces* em M1B T7 e M4 T7 é provavelmente o resultado da presença de HCB e/ou resíduo de tolueno.



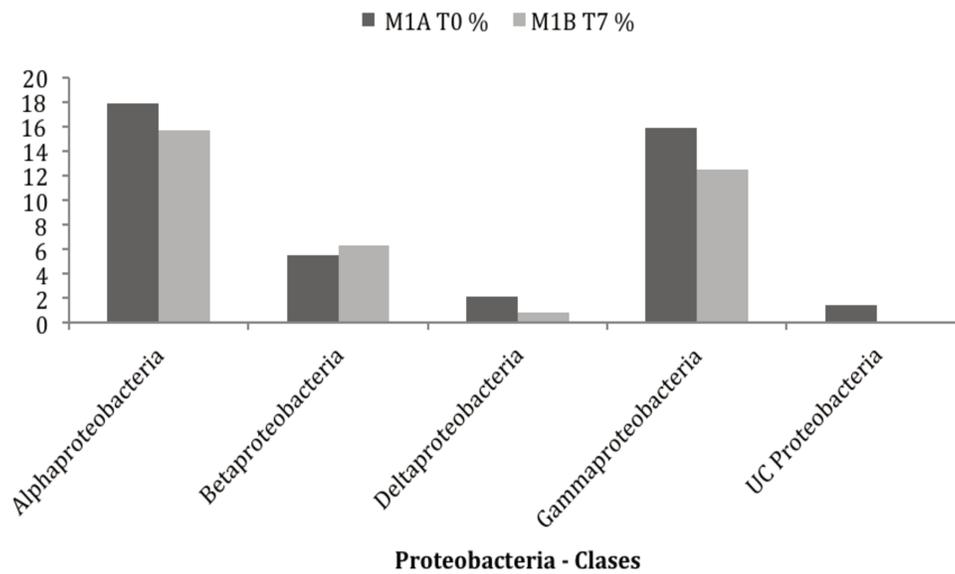
**Figura 27.** Comparação entre as subordens do filo Actinobacteria encontradas em M1A T0 (controle) e M1B T7 (microcosmo com HCB apenas, após 22 dias).

O crescimento do filo Firmicutes mais uma vez ocorreu primariamente na classe Bacillales\*, que cresceu de 7.6% para 21.2%, e principalmente no gênero *Bacillus*\*, da família Bacillaceae. Esse crescimento é similar ao observado em todos os microcosmos, incluindo M1A T0. Com exceção para o gênero

*Thermoactinomyces* (assim como em M4 T7), que também cresceu de 0% para 1,2% do total da comunidade microbiana.

O grande declínio no número de clones do filo Bacteroidetes\* é muito contrastante ao observado em M1A T7 (Figura 15), que mostrou um leve crescimento. A diminuição do filo Bacteroidetes\* assemelha-se à observada em M2 T7 (Figura 19) e também pode ser atribuída à presença de tolueno residual e/ou de hexaclorobenzeno. Porém, diferentemente de M2 T7, membros de Bacteroidetes, classe Sphingobacteria, não decaíram significativamente, reduzindo apenas de 8,3% para 7,1%, e isto provavelmente se deve a uma ausência de HAPs.

No filo Proteobacteria houve também um modesto declínio geral de 42,8% para 35,3% da comunidade microbiana total (Figura 26). Ocorreu uma queda de Deltaproteobacteria de 2,1% para 0,8% (Figura 28) mas isto ocorreu em todos os outros microcosmos e, por isso, não pode ser atribuído ao tolueno residual ou ao hexaclorobenzeno.



**Figura 28.** Comparação das classes, pertencentes ao filo Proteobacteria, encontradas em M1A T0 (controle) e M1B T7 (microcosmo com HCB apenas, após 22 dias).

Alphaproteobacteria caiu suavemente de 17,9% para 15,7% (Figura 28), porém, isto ocorreu primariamente na ordem Rhizobiales, a qual não é associada à degradação de HAP. Em contraste, Alphaproteobacteria, gênero *Phenylobacterium*, família Caulobacteraceae, cresceu de 0,7% para 1,2%. O crescimento em *Phenylobacterium* sugere que estes organismos foram selecionados pela presença de hexaclorobenzeno, uma vez que são conhecidos por utilizarem compostos xenobióticos clorados (Lingens *et al.*, 1985). Ocorreu ainda um aumento dos membros da família Erythrobacteraceae, o qual também foi observado em M1A T7 e, portanto, não pode ser atribuído à adição de hexaclorobenzeno e tolueno.

Betaproteobacteria também aumentou de 5,5% para 6,3% (Figura 28), ocorrendo inteiramente na ordem Burkholderiales e predominantemente na família Alcaligenaceae e nos gêneros *Achromobacter*, *Bordetella* e *Pusillimonas*, similarmente ao observado em M2 T7. O enriquecimento desses grupos, os quais todos possuem organismos degradadores de HAP, sugere que eles foram selecionados pela presença de tolueno e/ou hexaclorobenzeno.

A classe Gammaproteobacteria apresentou uma queda generalizada de 15,9% para 12,5% (Figura 28), que ocorreu sobretudo na ordem Xanthomonadales. Opostamente, a ordem Pseudomonadales mostrou um aumento de 1,4% para 2,7%, principalmente no gênero *Pseudomonas*, que cresceu de 0,7% para 2,0% da população total. Este foi o único microcosmo que apresentou um crescimento significativo de Pseudomonadales, o qual, no caso de M4 T7, diminuiu de 1,4% para 0%. Na amostra de M2 T7, o grupo Pseudomonadales permaneceu constante, crescendo apenas de 0,7% para 0,8%. Membros do gênero *Pseudomonas* estão entre os degradadores de aromáticos mais frequentemente isolados e o aumento em seu número indica que o tolueno residual e/ou o hexaclorobenzeno foram os responsáveis por sua seleção.

Os resultados destas comparações mostram claramente que a adição de HAPs alterou significativamente a comunidade microbiana, favorecendo os membros degradadores de tais poluentes. O aumento em HAP não ocorreu em

bactérias degradadoras amplamente documentadas da ordem Pseudomonadales (e.g., *Pseudomonas*), da classe Gammaproteobacteria. O crescimento de degradadores de HAP ocorreu primariamente na classe Alphaproteobacteria, gêneros *Sphingomonas* e *Sphingopyxis*, e na classe Betaproteobacteria, na família Alcaligenaceae, na ordem Burkholderiales, entre os gêneros *Achromobacter*, *Bordetella* e *Pusillimonas*. No entanto, o crescimento dos degradadores de HAPs Burkholderiales não ocorreu no microcosmo M4, o qual recebeu o inóculo de degradadores previamente isolados. Isso indica que o inóculo inibiu o crescimento desses organismos.

Além disso, não houve evidências de que os micro-organismos degradadores de HAPs adicionados pelo inóculo persistiram, sugerindo que eles podem não competir eficientemente com a população microbiana autóctone. Também não houve efeito claramente identificado do hexaclorobenzeno, com exceção de um aumento do número de Alphaproteobacteria, gênero *Phenylobacterium*.

## 6. CONCLUSÕES

Este trabalho estabeleceu as condições mínimas necessárias e alguns procedimentos para a condução de estudos de biodegradação de HAPs em solo.

Apontou a importância de se utilizar um biomarcador e um microcosmo controle que mostre a degradação físico-química dos contaminantes.

Determinou-se a capacidade da bactéria *Gordonia amicalis* de produzir biosurfactante. Estipulou uma metodologia eficaz para tal produção, explorando diferentes meios de crescimento para a bactéria e diferentes formas de recuperação do surfactante.

Os resultados da análise da degradação dos HAPs demonstraram a eficiência de micro-organismos na remoção destas substâncias do solo. Sejam estes micro-organismos autóctones ou inoculados. Ocorreu uma elevada remoção de todos os poluentes e o solo tratado apresentou uma baixa toxicidade às sementes de alface *Lactuca sativa*, espécie descrita na literatura como sensível à poluição.

Os experimentos conduzidos com o hexaclorobenzeno comprovaram sua qualidade como biomarcador, podendo ser utilizado com credibilidade em estudos futuros.

As análises moleculares produziram um vasto conhecimento sobre a comunidade microbiana do solo estudado e os efeitos sobre essa comunidade, causados pelos HAPs e pelo consórcio inoculado.

A partir desta pesquisa, outros projetos podem ser delineados, explorando fatores adicionais não analisados neste trabalho, tais como nutrientes do solo, bioestimulação e diferentes HAPs.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul, A.S. e Gibson, T.L. Hazardous Waste. *Journal of Hazardous Material*. 4: 211-22. 1987.
- Alexander, M. *Biodegradation and bioremediation*. Ithaca, NY: Academic Press, pp.302. 1997.
- Amann, R. I.; Ludwig, W. e Schleifer, K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169. 1995.
- Arias, L., Bauza, J., Tobella, J, Vila, J. e Grifoll, M. A microcosm system and an analytical protocol to assess PAH degradation and metabolite formation in soils. *Biodegradation*. 19:425–434, 2008.
- Atlas, R. M. e Philip, J. *Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup*. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp.366. 2005.
- Atlas, R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*, Oxford, v.31, p.178-182, 1995.
- Audic S. e Jean-Michel C. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res.* 7: 986-995. 1997
- Baker, J.M.; Guzamn, L.; Bartlett, P.D.; Little, D.I.; Wilson, C.M. Bécart, V. 1993. Production et caractérisation d'un consortium microbien pour le traitement de

sol contaminé aux produits de preservation du bois (résumé et abstract).  
Disponível em: [http://gch.polymtl.ca/Presentations/Abs\\_becaert.htm](http://gch.polymtl.ca/Presentations/Abs_becaert.htm), Acesso em  
20 julho 2008.

Balachandran C, Duraipandiyan V, Balakrishna K, Ignacimuthu S (2012)  
Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and  
naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil  
contaminated soil. *Bioresour Technol.* 112:83-90. Epub 2012 Feb 25.

Banks, M.K.; Schultz, K.E. Comparison Of Plants For Germination Toxicity  
Tests In Petroleum-Contaminated Soils. *Water, Air, and Soil Pollution.* 167: 211–  
219. 2005.

Barber, J. L.; Sweetman, A.J.; van Wijk, D.; Jones, K.C. Hexachlorobenzene  
in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes.  
*Science of the Total Environment* 349. 1–44. 2005.

Barbosa, A. M.; Giese, E.C.; Covizzi, L.G. Biodegradação de Compostos  
Aromáticos. In: Melo, I.S.; Azevedo, J. L., ed. *Microbiologia Ambiental*. Embrapa,  
2008.

Beck, J. e Hansen, K. E. The degradation of quintozene,  
pentachlorobenzene, hexachlorobenzene and pentachloroaniline in soil. *Pestic Sci*  
5: 41-48. 1974.

Bento, F.M.; Camargo, F. A. O.; Okeke, B.; Frankenberger-Júnior, W. T.

Bioremediation Of Soil Contaminated By Diesel Oil. Brazilian Journal of Microbiology. 34 (Supl.1): 65-68. 2003.

Bonin, J.L. e Simpson, M.J. Variation in phenanthrene sorption coefficients with soil organic matter fractionation: the result of structure or conformation? Environ Sci Technol 41: 153-9. 2007.

Brito, E.M.S.; Guyoneaud, R.; Goñi-Urriza, M.; Ranchou-Peyruse, A.; Verbaere, A.; Crapez, M.A.C.; Wasserman, J.C.A.; Duran, R. Characterization of hydrocarbonoclasticbacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil, Res. Microbiol. 157: 752–762. 2006.

Brusseau, M.L. Using QSAR to Evaluate Phenomenological Models for Sorption of Organic Compounds by Soil. Environmental Toxicology and Chemistry, 12(10), 1835-1846, 1993.

Burlage, R. S. et al. The TOL (pWWO) Catabolic Plasmid. Applied and Environmental Microbiology, v. 55, p.1323-1328, 1989.

Carmo, A.M.; Hundal, L. S.; Thompson, M. L. Sorption of Hydrophobic Organic Compounds by Soil Materials: Application of Unit Equivalent Freundlich Coefficients. Environ Sci Technol 34: 4363-9. 2000.

Carvalho, D.; Marchi, D. D.; Durrant, L. R. Production of extracellular surface-ative compounds by microorganisms grown on hydrocarbons. In:

International In Situ And On-Site Bioremediation Symposium, 4.,1997, New Orleans. In situ and on site bioremediation. Columbus: Battelle Press. v. 4, p. 91 – 97. 1997.

Casellas, M., P. Fernández, J. M. Bayona Y A. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain). Chemosphere v.30, p. 725-740, 1995.

CETESB. Principais acidentes em São Paulo - Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/acidentes/vazamento/acidentes/acidentes.asp>. Acesso em: 23 de out. 2007a.

CETESB. Relação de áreas contaminadas - Novembro de 2006- Disponível em: CETESB Valores orientadores para solo e água subterrânea - Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/valores.asp>. Acesso em: 23 de out. 2007b

CETESB. Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no estado de São Paulo. Dezembro de 2010. Disponível em: [http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/areascontaminadas/texto\\_explicativo\\_dez\\_10.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/areascontaminadas/texto_explicativo_dez_10.pdf). Acesso em: 7 de mar. 2012

Charles, J.; Sancey, B.; Morin-Crini, N.; Badot, P. M.; Degiorgi, F.; Trunfio, G.; Crini, G. Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 74, n. 7, p. 2057–2064. 2011.

Chauhan, A.; Oakeshott, J.G.; Jain, R.K. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48:95–113. 2008.

Clark, P.J.; Ward, T.J. The response of southern hemisphere saltmarsh plants and gastropods to experimental contamination by petroleum hydrocarbons. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 175, p.43-57, 1994.

Clemente, A.R. Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por fungos lignolíticos e sua aplicação na biorremediação de solos contaminados. Campinas. Tese (doutorado). FEA – Unicamp. 2002.

Cole, J. R., Q. Wang, E. Cardenas, J. Fish, B. Chai, R. J. Farris, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D. M. McGarrell, T. Marsh, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 37 (Database issue): D141-145; doi: 10.1093/nar/gkn879 [PMID: 19004872]. 2009.

Cook, S.V.; Chu, A.; Goodman, R.H. Leachability And Toxicity Of Hydrocarbons, Metals And Salt Contamination From Flare Pit Soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 133: 297–314, 2002.

Cortes DR, Basu I, Sweet CW, Brice KA, Hoff RM, Hites RA. Temporal trends in gas-phase concentrations of chlorinated pesticides measured at the shores of the Great Lakes. *Environ Sci Technol.* 32:1920–7. 1998.

Curtis, T. P.; Head, I. M. e Graham, D. W. Theoretical ecology for engineering biology. Environ. Sci. Tech. 37:64-70. 2003.

Davis, C., Cort, T., Dai, D., Illangasekare, T.H., Munakata-Marr, J. Effects of heterogeneity and experimental scale on the biodegradation of diesel. Biodegradation 14, 373–384. 2003.

Dean-Ross, D., Moody, J., Cerniglia, C.E. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. FEMS Microbiol. Ecol. 41: 1-7. 2002.

Dias, F.G. Utilização De Consórcio Microbiano Para Biorremediação Do Meio Ambiente Contaminado Com Derivados De Petróleo. Campinas. Tese (doutorado). FEA – Unicamp. 2007.

Ding GC, Heuer H, Smalla K (2012) Dynamics of bacterial communities in two unpolluted soils after spiking with phenanthrene: soil type specific and common responders. Front Microbiol. 2012;3:290. Epub 2012 Aug 21.

Douglas, G.S., McCarthy, K.J., Dahlen, D.T., Seavey, J.A., Steinhauer, W.G., Prince, R.C., Elmendorf, D.L. The use of hydrocarbon analyses for environmental assessment and remediation. J. Soil Contam. 1, 197–216. 1992.

Eggen, T. Application of fungal substrate from commercial mushroom production- *Pleurotus ostreatus*- for bioremediation of creosote contaminated soil. Int. Biodet. Biodegr., 44,117-126. 1999.

Eggen, T.; Majcherczyk, A. 1998. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. Int. Biodet. Biodegr., 41, 111-117.

Enfield, C.G.; Bengtsson, G.; Lindqvist, R. Influence of macromolecules on chemical transport. Environ Sci Technol 23: 1278-86. 1989.

Eriksson, M., E. Sodersten, Z. Yu, G. Dalhammar, and W. W. Mohn (2003) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. Appl. Environ. Microbiol. 69:275-284.

Farahat, L. A. e El-Gendy, N. S. 2008 Biodegradation of Baleym Mix crude oil in soil microcosm by some locally isolated Egyptian bacterial strains. Soil and Sediment Contamination, 17:150-162.

Faria, A. F. 2010. Produção, purificação e caracterização química de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual. Campinas. Tese (doutorado). FEA – Unicamp

Ferguson, R. L.; Buckley, E. N. e Palumbo, A. V. Response of marine bacterioplankton to differential centrifugation and confinement. Appl. Environ. Microbiol. 47:49-55. 1984.

Forney, L. J.; Zhou, X. e Brown, C. J. Molecular microbial ecology: land of the oneeyed king. Curr. Opin. Microbiol. 7:210-220. 2004.

Fonseca, R.R.; Silva, A.J.R.; De França, F.P.; Cardoso, V.L.; Sérvulo, E.F.C. Optimizing Carbon/Nitrogen Ratio for Biosurfactant Production by a *Bacillus subtilis* Strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Vol. 136–140, 2007.

Franzetti, A., Bestetti, G., La Colla, P. e Tamburini, E. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains. *Microbiol. Ecol.* 63, 238-248, 2008.

Grossman, M. J. 2009 – Informação pessoal.

Head, I. M., e Bailey, M. J. Environmental biotechnology methodological advances Spawn new concepts in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Microbiol.* 14:245-247. 2003.

Hilyard EJ, Jones-Meehan JM, Spargo BJ, Hill RT (2008) Enrichment, isolation and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River sediments. *Appl Environ Microbiol.* 74:1176-1182. doi: 10.1128/AEM.01518-07. 2008.

Hollinger, C. Contaminated environmental in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. *FEMS Microbiology Review*, Amsterdam, 20:517-523. 1997.

Hong, H.; Pruden, A.; Reardon, K.F. Comparison of CE-SSCP and DGGE for monitoring a complex microbial community remediating mine drainage, J. *Microbiol. Meth.* 69:52–64. 2007.

Horunouchi, M., Nishio, Y., Shimpo, E., Rugsaseel, S., Juntongjin, K., Thaniyavarn, S., Nojiri, H., Yamane, H., Omori, T. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbon from oil-contaminated Kuwait soil. *Biotechnol. Lett.*, 22, 687-691. 2000.

Howarth, R.W. Assessing the ecological effects of oil pollution. <http://www.Plato.acadiau.ca/isme/Symposium24/venosa.PDF> 1991. 1991.

Hugenholtz, P.; Goebel, B.M. e Pace, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180:4765-4774. 1998.

Inafuku, L.Y.; Helal, M. P. 2011. Avaliação da capacidade de resposta a um acidente envolvendo vazamento de grande magnitude de óleo no mar durante a atividade de perfuração *offshore* no Brasil. Projeto de final de curso. Escola Politécnica da UFRJ, Rio de Janeiro. Disponível em: <http://monografias.poli.ufrj.br/monografias/monopoli10001761.pdf>. Acesso em 30. Mar. 2012.

Jacobucci, D. F. C. Estudo da influência de biossurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos. Campinas. 117 p. Dissertação (mestrado) – FEA, UNICAMP. 2000.

Jacques, R. J. S. Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo. 2005. 188 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em

Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

Jacques, R.J.S.; Bento, F. M.; Antonioli, Z. I.; Camargo, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.4, p.1192-1201, 2007.

Janssen PH. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes (2006) *Appl Environ Microbiol.* 72:1719–28. doi: 10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006.

Jury, W. A.; Spencer, W. F.; Farmer, W.J. Behavior Assessment Model for Trace Organics in Soil: IV. Review of Experimental Evidence. *Journal of Environ. Quality.* 13 (4): 580-86. 1984.

Kanaly, R.A.; Harayama,S. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182: 2059–2067. 2000.

Kästner, M.; Breuer-Jammali, M.; Mahro, B. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(1), 359-362. 1998.

Kertsz, M. A. e Kawasaki, A. Hydrocarbon-Degrading Sphingomonads: *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*, and *Sphingopyxis*. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* pp 1693-1705. 2010.

Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120. 1980.

Kishi, H.; Kogure, N.; Hashimoto, Y. Contribution of soil constituents in adsorption coefficient of aromatic compounds, halogenated alicyclic and aromatic compounds to soil. *Chemosphere* 21 (7): 867-76. 1990.

Kumar, S.; Tamura, k. Jakobsen, I. B.; Nei, M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics*, 12: 1244-1245. 2001.

Lee, H.J.; Lee, M.W.; Lee, D.S.; Woo; S.H. ; Park, J.M. Estimation of direct-contact fraction for phenanthrene in surfactant solutions by toxicity measurement, *J. Biotechnol.* 131: 448–457. 2007.

Linder, G.; Ingham, E.; Brandt, C.J.; Henderson, G.. Evaluation of terrestrial indicators for use in ecological assessments at hazardous waste sites. United States Environmental Protection Agency. EPA/600/R-92/183. 1992.

Lingens, F., R. Blecher, H. Blecher, F. Blobel, J. Eberspacher, C. Frohner, H. Gorisch, H. Gorisch, and G. Layh. *Phenylobacterium* immobile gen. nov., sp. nov., a gram-negative bacterium that degrades the herbicide chloridazon. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 35:26–39. 1985.

Lyman, W.J.; Reehl, W.F. e Rosenblatt, D.H. Handbook of chemical property estimation methods: Environmental behavior of organic compounds. Nova Iorque: McGraw-Hill, Inc. 1982. 752p.

Makkar, S.R.; Cameotra, S.S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at the thermophilic conditions. Journal of American oil Chemist's Society, 74:887-889. 1997.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. e Sambrook, J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1982.

Mansour M, Schenert I, Viswanathan R, Korte F. Assessment of the persistence of hexachlorobenzene in the ecosphere. In: Morris JRP, Cabra JRP, editors. Hexachlorobenzene: Proceedings of an international symposium, vol. 77. IARC Sci Publ; 1986. p. 53-9. Lyon.

Mariano, A. P.; Kataoka, A.P.A.G.; de Angelis, D.F.; Bonotto, D.M. Laboratory Study On The Bioremediation Of Diesel Oil Contaminated Soil From A Petrol Station. Brazilian Journal of Microbiology. 38:346-353, 2007

Melo, I. S. e Azevedo, J. L. Microbiologia ambiental. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, pp.440, 1997.

Michel, J. Adverse effects from oil. 2002. Disponível em: [http://www.darcnw.noaa.gov/iad\\_apd.pdf](http://www.darcnw.noaa.gov/iad_apd.pdf)

Muckian, L.; Grant, R.; Doyle, E.; Clipson, N. 2007. Bacterial community structure in soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons, *Chemosphere* 68: 1535–1541.

Neff, J.M., 2002. *Bioaccumulation in Marine Organisms*, Elsevier, Oxford, 452pp.

Neves, E.B. Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por bactérias. Campinas. Tese (doutorado). FEA – Unicamp. 2002.

Ní Chadhain, S. M.; Norman, R. S.; Pesce, K. V.; Kukor, J. J. e Zylstra, G. J. 2006. Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4078-4087.

Pacheco, G. Jornal eletrônico. “ Vazamento de óleo acontece em nova fissura, a 3 km de acidente de 2011, diz petroleira.” 15.03.2012. Disponível em: <http://noticias.r7.com/rio-de-janeiro/noticias/vazamento-de-oleo-acontece-em-nova-fissura-a-3-km-de-acidente-de-2011-diz-petroleira-20120315.html>. Acesso em: 29 mar. 2012.

Patel, V.; Cheturvedula, S.; Madamwar, D. Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India. *J Hazard Mater* 2012 Jan 30;201-202:43-51. Epub 2011 Nov 22.

Phillips LA, Germida JJ, Farrell RE, Greer CW. Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants *Soil Biology e Biochemistry* 40(12):3054-3064. 2008.

Płazaa, G.; Nałęcz-Jaweckib, G.; Ulfiga, K.; Brigmonc, R.L. The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere*. v. 59, n. 2, p. 289–296. 2005.

Poffo, I.R.F. Vazamentos de óleo no Litoral Norte do Estado de São Paulo: análise histórica (1974 a 1999). Dissertação de mestrado. USP/PROCAM-Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais. 2000.

Prata, F. Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazine. Piracicaba. Tese (doutorado). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- USP. 2002.

Prince, R.C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Reviews in Microbiology*, v.19, p.217-242, 1993.

Prince, R.C., Douglas, G.S. Quantification of hydrocarbon biodegradation using internal markers. In: Margesin, R., Schinner, F. (Eds.), *Manual of Soil Analysis – Monitoring and Assessing Soil Bioremediation*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 179–188. 2005.

Prince, R.C.; Haitmanek, C.; Lee, C.C.. The primary aerobic biodegradation of biodiesel B20. *Chemosphere* 71 (2008) 1446–1451.

Rambeloarisoa, E.; Rontani, J. F.; Giusti, G.; Duvvnjak, Z.; Bertrand, J. C. Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams. *Marine Biology*, v. 83, p: 69 – 81, 1984.

Richard, J.Y.; Vogel, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration e Biodegradation*, London, v.44, n.2-3, p.93-100, 1999.

Roper, J.C. and Pfaender, F.K. Pyrene and chrysene fate in surface soil and sand microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 223-230. 2001.

Sayaraa, T.; Borràsa, E.; Caminalb, G.; Sarràa, M.; Sáncheza, A. Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. *International Biodeterioration e Biodegradation*. V. 65, n. 6, p. 859–865. 2011.

Schloss PD, Handelsman J (2006) Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comp Biol* 2(7): e92. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0020092).

Seabra, P. N. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In: Melo, I.S. ; Azevedo, J. L., ed. *Microbiologia Ambiental*. Embrapa, 2008.

Shiu, W.Y e, Mackay, D. Henry's Law Constants of Selected Aromatic Hydrocarbons, Alcohols, and Ketones. *J. Chem. Eng. Data* (42): 951-953. 1997.

Silva, I.S. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos utilizando consórcios microbianos visando a biorremediação de solos contaminados. Campinas, 2007. Tese (doutorado). FEA – Unicamp. p. 49

Silva, I.S.; Santos, E.C.; Menezes, C.R.; Faria, A.F.; Franciscan, E.; Grossman, M.; Durrant, L.R. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology*. V. 100, n. 20, p. 4669–4675. 2009.

Sisinno, C. L., et al. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 6p, Mar./Abr. 2003.

Skipper, H.D. Bioremediation of contaminated soils. In : SYLVIA, D. M. et al. (Ed.) *Principles and applications of soil microbiology*. New Jersey: Prentice Hall, 1999. p.469-481.

Sloan, N. A. Oil impacts on cold-water marine resources: a review relevant to Parks Canada`s evolving marine mandate. (1999). Disponível em: [http://parkscanada.pch.gc.ca/library/DownloadDocuments/DocumentsArchive/occasio\\_al\\_paper11\\_e.pdf](http://parkscanada.pch.gc.ca/library/DownloadDocuments/DocumentsArchive/occasio_al_paper11_e.pdf). Acesso em: 16 Abr.2005.

Sonnefeld, W.J .; Zoller, W.H.; May, W. E. Dynamic coupled-column liquid-chromatographic determination of ambient-temperature vapor pressures of

polynuclear aromatic hydrocarbons. *Anal. Chem.* 55 (2): 275-80. 1983.

Speight, J. G. *The chemistry and technology of petroleum.* John Wiley and Sons. New York. 1991.

Spies, R.B.; Rice, S.D.; Wolfe, D.A.; Wright, B.A. The effects of Exxon Valdez oil spill on the Alaskan coastal environment. In: *EXXON VALDEZ Proceedings of the Exxon Valdez oil spill symposium.* Bethesda: American Fisheries Society Symposium, 1996. v.18, p.1-16.

Suchanek, T.H. Oil impacts on marine invertebrate populations and communities. *American Zoologist*, v.33, p.510-523, 1993.

Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.

Tissot, B.P. e Welte, D.H. *Petroleum formation and occurrence: a new approach to oil and gas exploration.* Berlin-Heidelberg-New York - Springer-Verlag. p. 234-240. 1978

Tsitko, I. *Characterization of Actinobacteria Degrading and Tolerating Organic Pollutants.* Faculty of Agriculture and Forestry University of Helsinki. 2007.

Valentin, L.; Feijoo, G.; Moreira, M.T.; Lema, J.M. 2006. *Biodegradation of*

polycyclic aromatic hydrocarbons in forest and salt marsh soils by white-rot fungi, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 58: 15–21.

Yaws, C. L. *Handbook of Vapor Pressure. Vol. 2. C5-C7 Compounds.* Houston, TX: Gulf Publ Co. 1994.

Wang, Z.; Zhang, J.; Zhang, Y.; Hesham, A.L.; Yang, M. Molecular characterization of a bacterial consortium enriched from an oilfield that degrades phenanthrene, *Biotechnol. Lett.* 28: 617–621. 2006.

Woo, S.H.; Lee M.W.; Park, J.M. Biodegradation of phenanthrene in soil-slurry systems with different mass transfer regime and soil content, *J. Biotechnol.* 130: 235 – 250. 2004.