Natália Franco Taketani

INFLUÊNCIA DO NÍQUEL NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO TROPICAL MULTICONTAMINADO COM HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO E NA ESTRUTURA DA COMUNIDADE MICROBIANA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímico. Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímico

Rio de Janeiro
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Taketani, Natália Franco

Influência do níquel na biorremediação de solo tropical multicontaminado com hidrocarbonetos de petróleo e na estrutura da comunidade microbiana / Natália Franco Taketani.

XIV, 77 p.: il. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 2010.

Orientadoras: Cláudia Duarte da Cunha e Selma Gomes Leite

1. Biorremediação. 2. Multicontaminação. 3. Níquel. 4. Hidrocarbonetos. 5. DGGE. 6. Biorreator.

Dedico este trabalho aos meus pais, Avílio e Glória, que com amor sempre me despertaram para a busca do conhecimento e do entendimento humano. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha orientadora e amiga Cláudia, que foi quem sempre confiou na minha capacidade profissional e me deu a oportunidade de realizar esse trabalho em que tanto fui feliz. Obrigada pela sua generosidade, não só profissional, como pessoal. Posso dizer que vivemos como em um casamento, onde a paciência e a compreensão foram nossas maiores aliadas e que em todo esse processo reafirmamos mais ainda a nossa amizade. Você me faz ser uma pessoa melhor! A minha querida orientadora Selma Gomes Leite pela confiança constante de que eu conseguiria realizar o projeto com sucesso. Obrigada por tudo!

Em segundo lugar, e não menos importante, a minha Família. Ao meu marido Rodrigo, que além de participar ativamente do trabalho, sempre se mostrou ao meu lado em todas as horas, mesmo que sua premeditada indiferença pudesse, ao final, me mostrar que daquela maneira eu acabaria aprendendo muito mais. Obrigada pelo amor e carinho sempre! Aos meus pais por TUDO, amor, educação, vontade de aprender e apoio incondicional as minhas escolhas. As minhas irmãs, Barbara e Isabela, e cunhados, Fabiano e Ricardo, pelo apoio e aos meus sobrinhos, Victor e Juliana e a minha afilhada Luísa, que iluminaram cada passo que dei. Vocês são minhas preciosidades. A minha avó Dorinha que sempre foi um exemplo de vivacidade. A Nina, Vagner, Vô Nesi e Vó Ruth pelo carinho e apoio e aos irmãos, Bruno, Juliana e Mariano pelo companheirismo. Não poderia esquecer da Gil pelo carinho e todos os mimos. Meu bebezinho Jéssica pelo amor e lealdade.

Ao Pessoal da CPMA, a Camila que chegou a pouco tempo, mas que fez toda diferença. Obrigada pela dedicação! A Dani pela sua amizade constante (Amada, vou sentir saudades das gargalhadas!), assim como o Fábio que sempre quando podia acompanhava o trabalho e me ajudava. A Maria Clara, Elton e Claudinha pela amizade. (já morro de saudades de vocês). Ao Juan, Junior, Jorginho e Ricardo pelos "papos sérios" normalmente acompanhados de uma cervejinha, obrigada pela companhia e pela força (Vocês são parceirassssos!). Ao, Emerson, Gabriel, Ricardo , Débora, Diego, Daniele, Letícia, Renata, Anderson, Ana, Jorge Moura, Jorge Luiz e

aos demais pelo trabalho em equipe. Em especial à Grace e ao Ary por todo suporte, torcida positiva e carinho. Vocês vão ficar no meu coração! Aos funcionários que sempre se colocaram a disposição para manter as coisas em ordem, além daquele café fresquinho! Valeu Wilson!

À Andrea Rizzo, que através da sua confiança na Cláudia, me recebeu com muito carinho e respeito se colocando sempre a disposição para apoiar o projeto.

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP) pelo suporte. A professora Siu Mui Tsai, pesquisadora chefe que me recebeu com muito carinho e generosidade. Obrigada por me ajudar nesta etapa tão importante.

À Escola de Química/ UFRJ, pela formação, graças ao programa me sinto uma pessoa mais forte e capaz. Em especial à Profa. Érika pelo carinho e suporte no planejamento de dados e nas análises estatísticas.

À Petrobras, em especial a Eng. Adriana Ururahy, pelo suporte no fornecimento de dados, do solo e do óleo usados nos experimentos.

Ao CETEM/MCT pelos recursos laboratoriais e pela bolsa. Ao Luiz Sobral, chefe de serviço. Ao Ronaldo Santos que sempre apoiou e valorizou o nosso trabalho. Espero, de coração, que eu tenha valido à pena.

"Existe alguma coisa que nos inclui, a todos. Eu não sei bem que nome dar a ela. Eu só sei que estamos irremediavelmente comprometidos. Todos! Uns com os outros. E é impossível escapar sozinho. A porta é estreita. Mas a gente só passa carregando os outros conosco!"

Fauzi Arap

RESUMO

TAKETANI, Natália Franco. **Avaliação da influência do níquel na biorremediação de solo tropical multicontaminado com hidrocarbonetos de petróleo e na estrutura de comunidade microbiana.** Rio de Janeiro, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

A atividade industrial petroquímica é responsável por grandes despejos de poluentes orgânicos e inorgânicos no ambiente, dentre os elementos inorgânicos podemos destacar o vanádio, arsênio, níquel entre outros que possuem uma característica de persistência no ambiente causando assim, o seu acúmulo. Há muitos estudos que mostram o efeito negativo de alguns desses elementos na degradação dos hidrocarbonetos, afetando diretamente os processos de biorremediação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do níquel na biorremediação do óleo cru em solo multicontaminado e estudar as alterações na estrutura da comunidade microbiana. Para tal, foram realizados ensaios em microcosmos verificando a influência da concentração do metal, da concentração do óleo e do teor de umidade na remoção dos hidrocarbonetos totais de petróleo por um período de 67 dias. Foi utilizado o planejamento fatorial completo (2^3) (Design Expert - Stat Easy®) como ferramenta para análise estatística dos resultados das influências. O parâmetro resposta foi o percentual de remoção dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), quantificados por espectrofotometria no infravermelho (Infracal®). Para o monitoramento das comunidades microbianas do solo foi realizada contagem de bactérias heterotróficas totais, bactérias degradadoras de óleo cru e a técnica de PCR-DGGE. Também foi feito um aumento para escala piloto em um reator com capacidade de 8 kg de solo, no qual foi simulado um processo de biorremediação de óleo cru (5% p/p) na presença de níquel (260 mg/kg). Os resultados obtidos de remoção de TPH indicam um atraso significativo na degradação do óleo na presença do metal, nos primeiros 15 dias de tratamento. A umidade foi o fator de maior influência positiva nos experimentos por todo o período analisado. Ao final do tratamento (67 dias) o óleo passou a ser o parâmetro de maior influência negativa, demonstrando uma adaptabilidade da comunidade microbiana a presença do níquel. Em relação as contagens, seus perfis foram diretamente influenciados pela umidade. As análises dos Géis de DGGE indicaram que todos os tratamentos se diferenciaram entre si, exceto os tratamentos óleo (5%) com Ni (130mg/kg) e óleo (5%) com Ni (260mg/kg). Quando comparamos os marcadores moleculares entre si, a maior parte demonstrou um comportamento distinto entre si, apenas o marcador para γ-proteobactéria em relação a Actinobacteria e a Bacteria demonstrou similaridade significativa. Pode-se concluir portanto, que o níquel promoveu uma alteração direta nos perfis da comunidade e um comportamento distinto entre os diferentes marcadores usados, porém o grupo das γ-proteobacterias provavelmente teve uma maior relação com as alterações, inclusive por possuir grupos importantes que participam desses processos, como as *Pseudomonas*. No entanto, a capacidade de adaptação dos microrganismos, assim como sua diversidade, foi capaz de superar a influência negativa inicial da presença do metal e promover um percentual de remoção final (próximos a 30%) bastante similar

nos diferentes sistemas que continham um valor de umidade máximo. Com relação ao biorreator, as taxas de remoção finais foram similares às obtidas em microcosmo, porém no biorreator o valor de 30% de remoção foi atingido em apenas 7dias, refletindo a eficiência de operação atribuída ao biorreator.

ABSTRACT

TAKETANI, Natália Franco. **Avaliation of nickel influence of the bioremediation of tropical soil multicontaminated with petroleum hydrocarbons and of changes on the bacterial community structure. .** Rio de Janeiro, 2010. Dissertation (Master in Sciences) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

Industrial activity is responsible for large petrochemical discharges of organic and inorganic pollutants in the environment. Among the inorganic elements, vanadium, arsenic, nickel have a characteristic persistence in the environment thus causing its accumulation. There are many studies showing the negative effect of some of these elements in the degradation of hydrocarbons, directly affecting the bioremediation process. The aim of this study was to evaluate the influence of nickel on the bioremediation of crude oil in soil multicontaminated and the changes in microbial community structure during the process. Therefore, tests were conducted in microcosms monitoring the influence of the concentration of metal, concentration of oil and moisture content in the removal of total petroleum hydrocarbons for a period of 67 days. Full factorial analysis (2^3) was used (Design Expert - Easy Stat®) as a tool for statistical investigation of the results of influences. The response parameter was the percentage removal of total petroleum hydrocarbons (TPH), quantified by infrared spectroscopy (Infracal®). For monitoring of soil microbial communities, total heterotrophic bacteria count, crude oil degrading bacteria and PCR-DGGE were performed. It was also made a scale up using a pilot bioreactor with capacity for 8 kg of soil containing crude oil (5% w/w) in the presence of nickel (260 mg/kg). The results of TPH removal showed a significant delay in the degradation of oil in the presence of metal in the first 15 days of treatment. The humidity was the factor of greatest positive influence in the experiments throughout the period analyzed. At the end of treatment (67 days), oil had become the most influential negative parameter, showing an adaptability of the microbial community to the presence of nickel. Regarding the counts, their profiles were directly influenced by moisture. Analyses of DGGE gels showed that all treatments differed from one another except oil treatments (5% w/w) with Ni (130 mg/kg) and oil (5% w/w) with Ni (260 mg/kg). When comparing the molecular markers between them, most showed a distinct behavior between them, and only the marker for γ-proteobacteria compared to Bacteria and Actinobacteria showed significant similarity. It can be concluded therefore that the nickel promoted a direct change in profiles of the community and a distinct behavior between the different markers used, but the group of γ-proteobacteria probably had a higher correlation with the changes, because contain the major groups involved in these processes, such as *Pseudomonas*. However, the adaptability of microorganisms, as well as its diversity was able to overcome the negative influence of the initial presence of the metal and promoted a final percentage of degradation (close to 30%) very similar in the different systems that had a maximum value of humidity. With respect to the bioreactor, the final oil removal rates were similar to those obtained in microcosm, but 30% was achieved in just 7days, reflecting an efficiency of operation attributed to the bioreactor.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais fontes antrópicas de metais tóxicos e elementos relacionados. 6

Tabela 2. Exemplos de transformações bióticas de elementos metálicos. 7

Tabela 3. Acúmulo de metais por alguns microrganismos 8

Tabela 4. Tabela contendo as características fisico-quimicas e de fertilidade do solo usado nos experimentos. 24

Tabela 5. Percentual de saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos 24

Tabela 6. Esquema dos tratamentos gerados pelo planejamento de dados com suas simbologias. 26

Tabela 7. Composição do meio Luria-Bertani (LB). 32

Tabela 8. Iniciadores utilizados nas reações de PCR-DGGE, programas e variações no preparo das reações. 34

Tabela 9. Valores de remoção do óleo cru nos sistemas gerados a partir da análise fatorial. 37

Tabela 10. Relação dos dados gerados pela construção do modelo para o tempo de 7 dias. 40

Tabela 11. Modelo gerado, desvio padrão e o R-quadrado para o tempo de 7 dias.....41

Tabela 12. Relação dos dados gerados pela construção do modelo no tempo de 15 dias. 41

Tabela 13. Modelo gerado, desvio padrão e o r-quadrado para o tempo de 15 dias. ..42

Tabela 14. Relação dos dados gerados pela construção do modelo para o tempo de 36 dias. 42

Tabela 15. Modelo gerado, desvio padrão e o R-quadrado para o tempo de 36 dias...43

Tabela 16. Relação dos dados gerados pela construção do modelo para o tempo de 67 dias. 43

Tabela 17. Modelo gerado, desvio padrão e o R-quadrado para o tempo de 67 dias...44

Tabela 18. Codificação das amostras usadas para as análises moleculares. 51

Tabela 19. Analises de similaridade (ANOSIM) dos perfis de DGGE entre os diferentes tratamentos. 58

Tabela 20. Teste de Mantel para os diferentes marcadores utilizados no DGGE. 59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico com o aumento do volume de material multicontaminado. 9

Figura 2. Esquema da interação do contaminante com o poluente.. 11

Figura 3. Dinâmica da PCR. Esquema mostrando o princípio da reação em cadeia da polimerase (PCR). 17

Figura 4. Diagrama de aplicação da PCR em associação com outras técnicas moleculares. 19

Figura 5. Diferença entre a eletroforese em gel de agarose e o DGGE. 20

Figura 6. Esquema ilustrativo do processo de desnaturação das sequências de DNA no DGGE.. 21

Figura 7. Esquema representativo da homogeneização feita no solo antes de sua utilização. 23

Figura 8. Sistemas montados no laboratório do CETEM/MCT. 27

Figura 9. Esquema da aeração.. 27

Figura 10. Biorreator usado nos experimentos. 29

Figura 11. Aparelho para quantificação de HTP, Infracal. 30

Figura 12. Esquema mostrando montagem da placa para contagem de microrganismos degradadores de óleo cru pela técnica de NMP. 33

Figura 13. Diagrama contendo os ensaios e as análises feitas neste trabalho. 36

Figura 14. Gráfico da remoção percentual do óleo nos diferentes sistemas de tratamento ao longo de 67 dias. 38

Figura 15. Gráficos da normal versus resíduo das análises nos diferentes tempos 39

Figura 16. Gráfico com os valores das influências dos parâmetros avaliados em relação aos tempos de coleta. 45

Figura 17. Gráfico da contagem de herotróficos totais (UFCs/g de solo) dos experimentos em relação aos tempos de coleta. 46

Figura 18. Dendrograma gerado a partir da matriz com os valores achados nas contagens das heterotróficas totais para cada tempo de coleta. 47

Figura 19. Gráfico com a contagem de bactérias degradadoras de óleo cru (NMP/g de solo) dos tratamentos em relação aos tempos de coleta. 48

Figura 20. Fotografia da ocorrência de Actinobacterias predominantes em 4 poços das placas de contagem por NMP dos degradadores de óleo cru.....49

Figura 21. Dendrograma gerado a partir da matriz com os valores achados nas quantificações de degradadoras por NMP/g de solo para cada tempo de coleta. 50

Figura 22. Imagem do gel de DGGE para o gene que codifica o rRNA 16S do domínio Bacteria. 52

Figura 23. Imagem do gel de DGGE para o 16S do filo Actinobacteria.. 53

Figura 24. Imagem do gel de DGGE para o 16S da classe α-proteobacteria.....54

Figura 25. Imagem do gel de DGGE para o 16S da classe γ-proteobacteria. 55

Figura 26. Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de DGGE obtidos dos experimentos em microcosmos. 57

Figura 27. Gráfico com as porcentagens de degradação obtidas. 60

Figura 28. Gráfico com as contagens de heterotróficas totais obtidas no biorreator e nos microcosmos.....61

Figura 29. Gráfico comparando as contagens de degradadoras de óleo cru obtidas no biorreator em comparação as obtidas nos microcosmos. 62

ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Adenina

AFC – Análise Fatorial Completa

ANOSIM – Analysis of Similarities

ARDRA – Amplified rDNA Restriction Analysis

C – Citosina

CETEM – Centro de Tecnologia Mineral

CETESB – Companhia Estadual de Tratamento de Esgoto e Saneamento Básico

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CRA – Capacidade de Retenção de Água

DGGE – Denaturing Gradient Gel Eletroforesis

DNA – Deoxiribonucleic Acid

EPS – Extracellular Polymeric Substance

FISH – Fluorescent In Situ Hybridization

G – Guanina

HPA – Hidrocarbonetos Poliaromáticos

HPLC – High Performance Liquid Chromatografy

LB – Luria-Bertani

MCT – Ministério da Ciência e Tacnologia

NMP – Número Mais Provável

PCoA – Principal Coordinates Analysis

PCR – Polimerase Chain Reaction

POA – Processo Oxidativo Avançado

qPCR – Quantitative Polimerase Chain Reaction

rDNA – Ribosomal Deoxiribonucleic Acid

RISA – Ribosomal Intergenic Spacer Length Polymorfism

RNA - Ribonucleic Acid

rRNA - Ribosomal Ribonucleic Acid

SARA – Saturados, Aromáticos, Resinas e Asfaltenos

SSCP – Single-Strand Conformational Polymorfism

T – Timina

T-RFLP – Terminal Restriction Fragment Length

TGGE – Temperature Gradient Gel Eletroforesis

UFC – Unidade Formadora de Colônia

USEPA – United States Environmental Agency

USGS - United States Geological Survey

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVOS 3

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

3.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO 4
3.2 OS METAIS 5
3.3 MULTICONTAMINAÇÕES: COMPOSTOS ORGÂNICOS E METAIS PESADOS 9
3.4 A BIORREMEDIAÇÃO E A ECOLOGIA MICROBIANA 12
3.5 BIORREATORES 14
3.6 FERRAMENTAS MOLECULARES NO MONITORAMENTO DO SOLO 14

4 METODOLOGIA 23

4.1 SOLO 23
4.2 ÓLEO 24
4.3 ENSAIOS E MICROCOSMO 24
4.4 ENSAIO EM BIORREATOR 28
4.5 ANÁLISES DA CONCETRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO 29
4.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 31
4.6.1 CONTAGEM DE HETEROTRÓFICAS TOTAIS 31
4.6.2 CONTAGEM DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE ÓLEO CRU 32
4.6.3 ANÁLISE POR BIOLOGIA MOLECULAR 33
4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS 35

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 37

5.1 ENSAIOS EM MICROCOSMOS 37
5.1.1 REMOÇÃO DO ÓLEO 37
5.1.2 ANÁLISE FATORIAL COMPLETA (AFC) 39
5.1.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 45
5.2 ENSAIO EM BIORREATOR 59
5.2.1 REMOÇÃO DO ÓLEO 59
5.2.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 61
5.2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS 62

6 CONCLUSÃO 64

7 SUGESTÕES 65

8 REFERÊNCIAS 66

1 INTRODUÇÃO

O petróleo é uma das maiores fontes de contaminação do meio ambiente, sendo uma importante fonte de poluentes orgânicos e também inorgânicos. Elementos como o vanádio, arsênio e níquel, além dos compostos orgânicos, também são constituintes do petróleo. Os resíduos gerados pela industria do petróleo não só oferecem grandes riscos ao meio ambiente, como à saúde pública (KNOX & GILMAN, 1997).

Dados fornecidos pela USEPA (USEPA, 1996; USEPA, 2004) mostram um aumento da contaminação de metais associados a compostos orgânicos de quase 300% de 1994 à 2003. A presença de compostos orgânicos influencia na mobilidade do metal no solo (GALVEZ-CLOUTIER & DUBE, 2002), prejudicando o tratamento destes poluentes no ambiente. Compostos orgânicos com maior viscosidade afetam por exemplo as técnicas de lavagem do solo e neste caso, portanto, deve-se remover prioritariamente os poluentes orgânicos para posterior remoção dos poluentes inorgânicos (DERMONT *et al.*, 2008).

Os efeitos tóxicos e inibitórios dos metais pesados sobre o crescimento microbiano requerem atenção, uma vez que os íons metálicos dependendo de sua natureza, concentração e disponibilidade irão interferir em atividades essenciais dos microrganismos presentes no solo ,assim como no processo de degradação dos compostos orgânicos por aqueles que são capazes de degradá-los (AMOR, KENNES & VEIGA, 2001).

Há vários métodos de tratamento de solos contaminados, tanto por processos físicos e/ou químicos quanto por biológicos. A biorremediação é uma estratégia freqüentemente adotada por permitir o tratamento do contaminante geralmente a um baixo custo (DOBLER, SANER & BACHOFEN, 2000). Esta pode ser definida como um processo baseado no emprego de microrganismos ou suas enzimas que sejam capazes de transformar substâncias tóxicas em substâncias menos ou não tóxicas. A biorremediação pode ser classificada como *in situ* (no local) ou *ex situ* (fora do local) e engloba diferentes técnicas, como o bioestímulo, que é a adição ou correção de

nutrientes, umidade, ou gases importantes para os microrganismos presentes no solo, entre outras (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Uma das tecnologias de tratamentos *ex situ* é a biorremediação utilizando biorreatores que possibilita uma melhor homogeneização do solo durante o tratamento assim como possibilita o controle das condições do tratamento de forma mais efetiva. Existem diferentes tipos de reatores, os horizontais, por exemplo, são reatores de fase sólida com tambores rotativos ou fixos, sendo empregados para resíduos sólidos com teor de umidade suficiente apenas para a manutenção da atividade microbiana (RIZZO, 2008).

A caracterização completa das comunidades microbianas do solo é difícil de ser realizada, uma vez que este ambiente possui uma enorme diversidade genotípica e fenotípica, heterogeneidade, e inacessibilidade. Porém, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, associadas ao conhecimento em bioinformática, tornou-se possível essa caracterização, revelando os grupos atuantes, muitos destes até então desconhecidos (FRANCO *et al.*, 2006).

A utilização de técnicas moleculares permite, portanto, um conhecimento mais aprofundado dos grupos microbianos presentes, após a seleção natural imposta por condições extremas, como a presença de substâncias poluentes e de suas formas distintas de tratamento. Do ponto de vista técnico, estes métodos são viáveis porque são rápidos e sensíveis para identificar e monitorar a população microbiana presente e atuante no processo de biorremediação (CUNHA 2004; WATANABE & HAMAMURA, 2003).

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do níquel na degradação do óleo cru durante o processo de biorremediação de um solo multicontaminado, assim como avaliar seus efeitos nos perfis das comunidades microbianas dominantes deste solo sob os diferentes parâmetros estudados.

Objetivos específicos:

1. Avaliar em microcosmos a influências dos parâmetros (óleo, metal e umidade) utilizando uma análise fatorial completa;
2. Avaliar os perfis das comunidades microbianas dominantes do solo nos diferentes tratamentos em microcosmos utilizando uma técnica de "fingerprinting"(DGGE);
3. Aplicar a condição do processo, definida como mais apropriada em microcosmo, em biorreator de bancada, para verificar a eficiência da ampliação de escala.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO

As práticas industriais dos últimos 200 anos provocaram grandes distúrbios na maioria dos ecossistemas. Como resultado desses distúrbios, podemos citar a diminuição da diversidade, a extinção de muitas espécies sensíveis e seleção de espécies cosmopolitas adaptadas ao ambiente sobre determinado estresse (KOZDRÓJ & VAN ELSAS, 2001).

De acordo com a Agência de Proteção ambiental dos EUA (EPA), as principais categorias de contaminantes do solo são: os cloralifáticos, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos, cloroaromáticos, aromáticos simples e outros. Estes originam-se da industrialização do petróleo bruto, indústrias químicas diversas e atividades agrícolas, sendo muitos destes produtos de difícil decomposição e, por isto, causam sérios impactos ambientais (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

O processamento do petróleo pode oferecer riscos de acidentes e conseqüentes contaminações. Os impactos ambientais e de saúde pública gerados podem ocorrer desde a etapa de exploração, passando pela geração de resíduos (sólidos e líquidos) e emissões atmosféricas durante o processo de refino, até os eventuais vazamentos acidentais ocorridos em terra ou em mar (CORRÊA, 2003; RIZZO, 2008). O Trabalho de KNOX & GILMAN (1997) que verificou os efeitos de tais resíduos, relata um aumento de incidência de câncer nos ossos, cérebro e pulmões, além de leucemias em indivíduos residentes próximos as industrias petroquímicas, induzidas pelas mesmas.

Todo esse impacto gerado pela contaminação dos recursos naturais promove uma alteração no meio ambiente, principalmente na atividade microbiana presente, que tenta restabelecer um novo equilíbrio.

A participação dos microrganismos nos processos de biodegradação dos hidrocarbonetos foi estabelecida como sendo uma função do ecossistema (nicho ecológico) e das condições locais do ambiente (ALEXANDER, 1994). A microbiota

heterotrófica da maioria dos ambientes inclui a população degradadora de hidrocarbonetos que ocorre naturalmente. Essa característica inerente proporciona um grande potencial de metabolizar os hidrocarbonetos. Assim sendo, a adição de petróleo e seus derivados ao solo, de forma acidental ou não, enriquece, seletivamente a comunidade capaz de utilizar esse substrato (HILL, 1984). Por outro lado, a percolação do petróleo através do solo reduz a aeração e modifica o balanço C:N para as comunidades microbianas presentes, alterando a diversidade e o número de microrganismos no ecossistema (ALEXANDER, 1994).

A primeira exposição da comunidade microbiana aos hidrocarbonetos seja por derrame acidental de óleo, disposição de resíduos oleosos ou por fenômenos naturais, é importante para a determinação do tempo do processo de eliminação do hidrocarboneto no ambiente. Este fenômeno que resulta em um aumento do potencial da comunidade oxidante dos hidrocarbonetos é chamada de adaptação (ATLAS, 1991). Os três mecanismos inter-relacionados os quais levam à adaptação são: (a) indução de enzimas específicas; (b) mudanças genéticas que resultam em novas capacidades metabólicas; (c) enriquecimento seletivo de microrganismos capazes de transformar o composto em questão. Com relação ao enriquecimento seletivo, o número de microrganismos que utilizam hidrocarbonetos, assim como a sua proporção na comunidade heterotrófica, aumenta com a exposição ao petróleo e seus derivados, geralmente, refletindo o grau de contaminação do ecossistema (KORDA *et al.*, 1997).

3.2 OS METAIS

Tem-se verificado ao longo do desenvolvimento tecnológico mundial, uma contribuição crescente das fontes antrópicas de metais para o solo, o que resulta na poluição de extensas áreas e no avanço do impacto negativo destes sobre o meio ambiente. Os principais metais poluidores e respectivas fontes mais importantes encontram-se na Tabela 1 (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). De acordo com Gadd & White (1993), a combustão do carvão mineral é a atividade que contribuiu com maior número de metais poluentes para o solo, sendo esta seguida pela deposição de lodo de esgoto e resíduos da indústria petrolífera e siderúrgica. A elevação na concentração

de metais no solo interfere diretamente no ciclo desses elementos na natureza e também pode influênciar de modo negativo os demais processos com interferência no ecossistema (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Tabela 1. Principais fontes antrópicas de metais tóxicos e elementos relacionados. (adaptado de MOREIRA E SIQUEIRA, 2002)

Metais	Atividade			Metalúrgica		Agricul-tura	Manufa-turados	Rejeitos Sólidos	Lodo de Esgoto
	Carvão	Petróleo	Energia	Não ferrosa	Ferrosa				
As	X*			X		X	X		X*
Cd	X*			X		X	X		X*
Cr	X*		X	X	X	X*	X*	X	X
Cu	X	X		X*			X	X*	X*
Hg	X*		X			X*		X*	
Mn	X*		X	X	X	X*	X	X	X
Ni	X*	X	X	X		X			X*
Pb		X*					X	X*	X
Se	X*								
V	X	X*				X			
Zn	X		X	X	X	X*	X	X	X*

- Fonte com mais contribuição relativa para a concentração de metais no solo

Os estudos das transformações inorgânicas dos metais tiveram início no final do século XIX, quando o pesquisador russo Serguei Winogradsky evidenciou o modo quimiolitotrófico da vida microbiana. Por este metabolismo, microrganismos fixam CO_2 através da energia de oxidação de compostos inorgânicos. A atividade quimiolitotrófica, além de ter grande importância geoquímica, tem aplicação na lixiviação ou solubilização de minerais através do processo conhecido como biolixiviação ou biometalurgia. A microbiota interfere ativamente nas transformações e ciclos de vários outros elementos no solo, Tabela 2, influênciando o fluxo destes no ecossistema e podendo causar deficiência ou fitotoxidez de micronutrientes e problemas ambientais.

Tabela 2. Exemplos de transformações bióticas de elementos metálicos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Elemento	Mecanismo ou reação	Microrganismos
K, Ca e Mg	Mineralização e imobilização Solubilização por mecanismos diversos	Maioria dos heterotróficos Vários microrganismos
Fe	Oxidação-energia para litotróficos Redução-receptor de elétrons	*T. ferroxidans* *Desulfovibrio*
Mn	Oxidação Mn^{+2} por bactérias do solo Redução Mn^{+4}	*Leptothrix, Anthrobacter* *Pseudomonas*
Hg	Redução Hg^{+2} para Hg^{0} pela Hg-redutase Metilação pela metilcobalamina Desalquilação R-Hg→ R+Hg	*Cochiearium*
Cu e Zn	Mineralização e imobilização Solubilização e precipitação	Vários Alguns
As e Se	Oxi-redução e metilação $Se^{-} \rightarrow Se^{0}$	*Bacillus* *Thiobacillus, Desulfovibrio*
Cr	Redução $Cr^{+6} \rightarrow Cr^{+3}$ (menos tóxico)	*Aeromonas, Bacillus*
U	Redução $U^{+6} \rightarrow U^{+4}$ (insolúvel)	*Geobacter metallireductans*
Mo	Redução $Mo^{+6} \rightarrow Mo^{+5}$	*Pseudomonas*
V	Redução $V^{+5} \rightarrow V^{+4,+3}$	*Pseudomonas vanadium reductans*
Sb	Oxidação $Sb^{+3} \rightarrow Sb^{+5}$	*Sulfolobus senarmonti*

Os metais no solo podem sofrer lixiviação e/ou serem absorvidos pela vegetação. Após a morte desta, o processo de decomposição dos restos orgânicos libera grandes quantidades desses elementos na forma iônica, pela simples destruição física dos materiais. Isso porque a maioria desses metais se encontra em formas mono ou divalentes nos resíduos e não fortemente ligadas aos compostos orgânicos. Também esses não sofrem reações complexas como ocorre com nitrogênio, fósforo e enxofre. Para o potássio, por exemplo, apenas 1/3 da quantidade encontrada nos restos vegetais requer ataque microbiano pra ser liberado, sendo os 2/3 restantes prontamente solúveis em água, requerendo apenas transformações físicas na matriz

do resíduo para serem liberados para o solo. Mesmo assim, sua biodisponibilidade pode ser reduzida quando grandes quantidades de carbono orgânico são adicionadas.

Os metais encontram-se em formas diversas no solo, como: solúveis em água, retidos nos sítios de troca, adsorvidos ou complexados aos colóides orgânicos e inorgânicos. Esses elementos, quando presentes em resíduos orgânicos vegetais, animais e outros como lodo de esgoto, por exemplo, são liberados mediante biodegradação produzindo quelatos orgânicos e metais livres, os quais vão para a biomassa, entram nas diversas formas do estoque de metais do solo ou são absorvidos pelas plantas ou ainda lixiviados. Assim, como ocorre com outros elementos, os metais passam por uma biociclagem no solo através da absorção pelas plantas, biomassa microbiana e transformação em formas livres (iônica) ou de quelatos, que se equilibram com as demais formas encontradas no solo. Portanto, os elementos metálicos, além de sofrerem inúmeras transformações, estão também sujeitos a mineralização e imobilização temporária na biomassa (Tabela 3). Muito pouco se conhece sobre a capacidade da biomassa microbiana do solo em armazenar metais, especialmente daqueles metais sem função fisiológica conhecida, como o Cd e Hg (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Tabela 3. Acúmulo de metais por alguns microrganismos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Microrganismos	Metais absorvidos (mg/g de biomassa)					
	Cu	Cd	Au	Ag	Pb	Zn
Aspergillus niger	1,7	3,7	176	22	-	-
Penicillium chrysogenum	122	56	-	-	122	6
Rhizopus arrhizus	16	30	164	54	91	20
Sacharomyces cerevisiae	1,9	71	-	-	-	-
Bacillus subtilis	146	-	79	-	189	-

Os tratamentos de locais contaminados com metais são difíceis de serem realizados pois: (1) a contaminação normalmente é heterogênea, em escala macro (distribuição do metal no ambiente, tanto na sua dispersão vertical, quanto na horizontal) e / ou escala micro (formas químicas ou físicas da interação do metal com a matriz do solo);

(2) o metal não pode ser degradado ou destruído e (3) as diferentes formas do metal e da matriz do solo contaminado interferem diretamente na avaliação de risco e no tratamento do solo contaminado. O conhecimento apenas da quantidade de metal que contaminou um determinado volume de solo não é suficiente para uma avaliação de risco e escolha de uma estratégia de tratamento. É preciso identificar as diferentes formas do metal assim como características do solo como o valor de pH, capacidade de troca catiônica, granulometria, mineralogia e quantidade de matéria orgânica (DERMONT *et al.* 2008).

3.3 MULTICONTAMINAÇÕES: COMPOSTOS ORGÂNICOS E METAIS PESADOS

Dermont e colaboradores (2008) abordaram a questão do tratamento de solos multicontaminados por metal e por compostos orgânicos, mostrando (Figura 1) um aumento de mais de 300% do volume deste tipo de material (sedimentos, solo e lodo) de 1994 a 2003 (USEPA, 1996; USEPA, 2004).

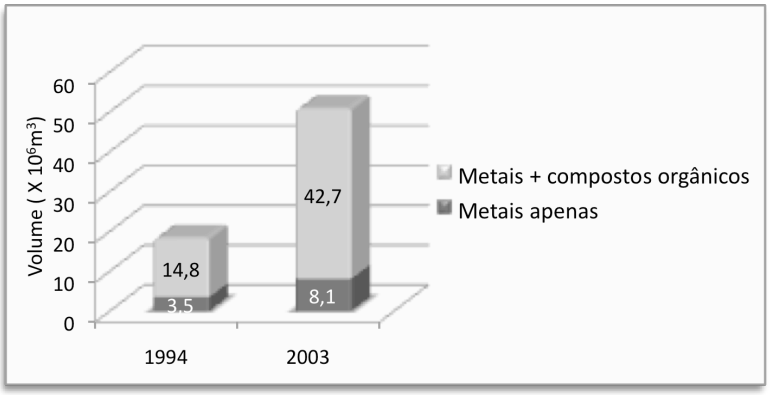

Figura 1. Aumento do volume de material multicontaminado no período de 1994 a 2003. Estimativa da quantidade de material (solo, lodo e sedimento) em aproximadamente 1.000 locais prioritários considerados pela USEPA nos Estados Unidos. (adaptado de DERMONT ,2008).

A importância da elucidação dos processos de multicontaminações vem também aumentando em consequência da necessidade de monitoramento e remediação dessas áreas. Em 2007, Nadal e colaboradores (2007) publicaram um trabalho de monitoramento de áreas com atividade industrial química, petroquímica, urbana e não poluída no ano de 2002 e 2005, sendo que a única área que apresentou aumento da concentração de todos os metais avaliados (arsênio, cádmio, cromo, chumbo e vanádio), foi a de atividade petroquímica.

Irha e colaboradores (2003) estudaram o efeito de metais pesados e hidrocarbonetos policíclicos armáticos (HPA) na estrutura de comunidade microbiana de diferentes tipos de solo usando a atividade desidrogenásica e concluíram que o efeito negativo dos poluentes na comunidade microbiana do solo variava em relação a quantidade de matéria orgânica encontrada em cada tipo de solo. A matéria orgânica do solo é importante para reduzir a fração solúvel dos contaminantes e a biodisponibilidade, destes, diminuindo o efeito de persistência dos poluentes orgânicos. Muitos outros trabalhos também obtiveram um efeito negativo, por testes enzimáticos (urease e desidrogenase), em solos multicontaminados com hidrocarbonetos e metais pesados (CHANDER & BROOKES, 1991; KELLY & TATE, 1998; KELLY, HAGGBLOM & TATE, 1999; AL-SALEH & OBUEKWE, 2005; SHEN *et al.* 2005).

Com o objetivo de esclarecer a inibição da biodegradação de hidrocarbonetos monoaromáticos pela presença de metais pesados, Amor e colaboradores (2000) testaram vários metais pesados (zinco, níquel e cádmio) na inibição da biodegradação do tolueno em meio de cultura e obtiveram como resultado que o níquel foi o metal com maior influência negativa, seguido pelo Cádmio e por último o zinco.

Dermont e colaboradores (2008) abordaram a questão da influência dos compostos orgânicos nos tratamentos de solos contaminados por metais. Neste sentido, o poluente orgânico altera a mobilidade do metal no solo (GALVEZ-CLOUTIER & DUBE 2002) e acaba por prejudicar os tratamentos físico-químicos para retirada o metal. Em relação aos tratamentos, os compostos orgânicos voláteis afetam os processos de solidificação e/ou estabilização, já os compostos viscosos afetam as técnicas de

lavagem do solo. Portanto, primeiramente os compostos orgânicos devem ser retirados para a posterior remoção do metal.

Para a remoção do óleo, o tratamento mais adequado é a biorremediação como discutido anteriormente, porém o impacto no solo pela contaminação por petróleo e metais pesados pode resultar em grandes perdas de sua qualidade (COYNE, 1999). A perda, em grande parte, é consequência da toxidez desses poluentes aos processos biológicos catalisados pelos microrganismos do solo (TESTA, 1997).

As fontes de informações sobre áreas multicontaminadas ainda são bastante escassas em termos específicos para cada metal, sendo que existe um fator complicador que é a alta influência do tipo de solo para cada caso. O esquema da Figura 2 mostra as interações entre o poluente e o organismo presente no ambiente, assim como os efeitos da toxidez do poluente. Neste esquema é possível ver a complexidade dessa interações assim como o número de variáveis, porém só é possível ter controle do processos de descontaminação se esclarecermos tais informações.

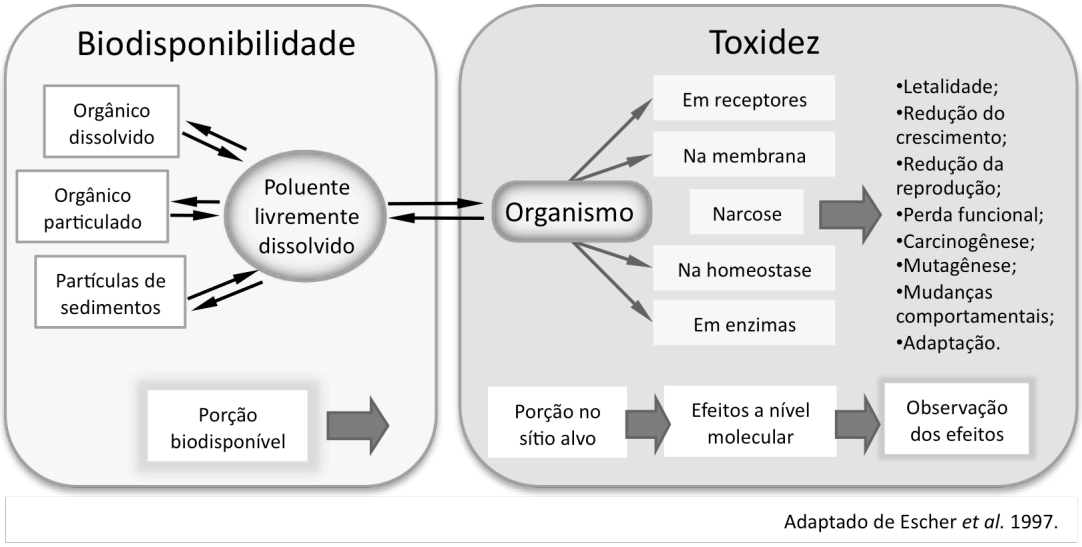

Figura 2. Esquema da interação do contaminante com o poluente. Adaptado de Escher *et al.* 1997.

3.4 A BIORREMEDIAÇÃO E A ECOLOGIA MICROBIANA

Há registros de contaminação por petróleo deste 1754, porém foi a partir da década de 60 que as atenções foram voltadas para este problema gerando o desenvolvimento de várias técnicas de tratamento. Essas técnicas baseiam-se em processos físico (lavagem, extração a vapor), químicos (extração por solvente, processos oxidativos avançados – POAs, desalogenação química), térmicos (dessorção térmica, incineração) e biológicos ("landfarming", biopilhas, biorreatores etc.) (URURAHY, 1998).

Há várias definições para o termo biorremediação, porém é importante ressaltarmos duas delas. A primeira descrita pela Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) que conceitua *Biorremediação como o processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de microrganismos para degradar substâncias toxicamente perigosas transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas*. A segunda definição feita pelo Escritório de Estudos Geológicos do Departamento do Interior do Governo Americano (USGS), leva em consideração o uso de plantas nos processos de biorremediação considerando *o uso de agentes biológicos tais como bactérias e plantas para remover ou neutralizar contaminantes, como poluentes do solo e da água* (MARTINS et al. 2004 apud RIZZO, 2008).

A biorremediação do petróleo é mediada por microrganismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de energia e carbono (RON, 2000). Esses microrganismos são versáteis sendo capazes de degradar vários tipos de hidrocarbonetos –alcanos lineares de cadeia curta e longa, inúmeros compostos aromáticos e policíclicos aromáticos (RON & ROSENBERG, 2002).

O aprimoramento da biorremediação como uma ferramenta útil na recuperação de solos contaminados tem sido, em grande parte, baseado no aumento do conhecimento da fisiologia, ecologia e bioquímica das populações hidrocarbonoclásticas presentes no solo e de como os contaminantes são metabolizados pelos microrganismos.

A biorremediação explora a diversidade genética e a versatilidade metabólica dos microrganismos para a transformação de contaminantes em produtos finais menos tóxicos, os quais são integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais (ALEXANDER, 1994).

O conhecimento da diversidade bacteriana e os estudos de ecologia microbiana são essenciais para o entendimento do papel das comunidades microbianas nos diferentes processos que ocorrem no solo. Várias condições devem ser satisfeitas para que a biodegradação aconteça, entre elas: a) existência de organismos que possuam as enzimas necessárias para que os processos ocorram; b) que este organismo esteja presente no ambiente que contenha as substâncias a serem biodegradadas. Apesar de muitos microrganismos estarem presentes em muitos ambientes, sítios específicos podem não conter o organismo que possui as enzimas necessárias; c) a substância deve estar acessível ao organismo que contém estas enzimas. Muitas vezes a persistência se deve ao fato do microrganismo não ter acesso ao composto que ele tem capacidade de metabolizar (VAN ELSAS &, SMALLA, 1997).

Durante muitos anos, a metodologia empregada no estudo desses microrganismos era baseada em técnicas de cultivo e isolamento (HEAD *et al.*, 1998). Desta forma, apenas uma pequena parcela desses organismos era estudada. Um exemplo é o domínio Bactéria que são descritas de 3 a 4 mil espécies que compõem apenas 10% do total de espécies estimadas (COLEMAN *et al*., 1994). A esse respeito, o progresso das metodologias aplicadas é determinante para o estudo da diversidade e de novas funções ecológicas contidas nesses ecossistemas (KOZDRÓJ & VAN ELSAS, 2001).

A utilização de métodos moleculares, através da análise por indicadores moleculares (por exemplo, DNA, RNA e fosfolipídios) extraídos diretamente do solo, é eficiente para superar as limitações das técnicas convencionais de cultivo (VAN ELSAS *et al.,* 1998).

3.5 BIORREATORES

A maior parte dos processos de biorremediação se depara com problemas como a heterogeneidade do contaminante no solo, assim como a incorporação homogênea de aditivos e oxigênio. A utilização de biorreatores é capaz de sanar tais limitações favorecendo, principalmente, o tratamento de solos argilosos que possuem uma maior dificuldade de percolação intrínseca.

Dentre as vantagens associadas a essa tecnologia estão o controle maior das condições do tratamento (pH, temperatura, teor de umidade, etc.), assim como das emissões de gases e efluentes gerados no processo. Outro fator muito importante é a homogeneização controlada (agitação contínua ou descontínua) possibilitando também o controle da degradação do óleo no solo de forma mais representativa. A característica de ser um sistema fechado oferece maior segurança física e ambiental. E por fim, o tempo de tratamento para a descontaminação do solo, em geral, é menor comparado a outros métodos biológicos. O tempo de tratamento de biorremediação está diretamente relacionado ao custo, onde este se situa entre U$30,00 e U$85,00 por tonelada de solo tratado (ALEF & NANNIERI, 1995; RIZZO, 2008).

3.6 FERRAMENTAS MOLECULARES NO MONITORAMENTO DO SOLO

O uso de ferramentas moleculares no estudo da diversidade microbiana em ambientes degradados constitui uma excelente oportunidade para se entender como se comporta a estrutura das comunidades e processos no solo, frente a distúrbios (JACKSON *et al.*, 2003).

A diversidade biológica é a variante de espécies em um ecossistema, assim como a variante genética intra-específica (KENNEDY & SMITH, 1995). Em termos microbiológicos, não existe um conceito para diversidade porque sua unidade principal, espécie, não é bem definida (ROSADO *et al.*, 1997). Já em termos moleculares, diversidade pode ser definida como o número e a distribuição das diferentes seqüências de DNA extraídas de uma comunidade de um determinado habitat.

A caracterização completa das comunidades microbianas do solo é difícil de ser realizada, uma vez que este ambiente possui uma enorme diversidade genotípica e fenotípica, heterogeneidade, e inacessibilidade. Porém, com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, associadas ao conhecimento em bioinformática, tornou-se possível essa caracterização, revelando os grupos atuantes, muitos destes até então desconhecidos (FRANCO *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, diversos artigos foram publicados reconhecendo a importância dos estudos voltados a melhor entender a dispersão, distribuição e seleção de populações microbianas (MARTINY *et al.*, 2006). Entretanto, apenas alguns estudos foram conduzidos com o objetivo de testar a hipótese dos microrganismos apresentarem biogeografia (CHO & TIEDJE, 2000; CRUMP et al., 2004; BUCKLEY et al., 2006; OLINE, 2006; CRUMP et al., 2007; POMMIER et al., 2007). De fato, a grande maioria destes usou como guia a hipótese de que "Tudo está em todo lugar, o ambiente seleciona" (BEIJERINCK, 1913 apud MARTINY et al., 2006), e assim tem se focado na questão de endemismo, muitas vezes negligenciando os fatores que levam a seleção, como a história e tipo de habitat.

Sabe-se hoje em dia que apenas uma pequena fração dos microrganismos presente no meio ambiente (1 a 10%) pode ser cultivada por técnicas convencionais conhecidas. Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, associadas ao conhecimento em bioinformática, tornou-se possível à caracterização de comunidades microbianas mistas em determinados ecossistemas, revelando os grupos atuantes, muitos destes até então desconhecidos (ROSADO *et al.,* 1997).

A utilização de técnicas moleculares permite, portanto, um conhecimento mais aprofundado dos grupos microbianos presentes, após a seleção natural imposta por condições extremas, como a presença de substâncias poluentes e de suas formas distintas de tratamento. Do ponto de vista técnico, estes métodos são viáveis porque são rápidos e sensíveis para identificar e monitorar a população microbiana presente e atuante no processo de biorremediação (CUNHA 2004; WATANABE & HAMAMURA, 2003).

O desenvolvimento das técnicas moleculares tornou possível o estudo da diversidade de comunidades microbianas através de análise e comparação de seqüências de genes que codificam para o rRNA (rDNA) ou do próprio rRNA, possibilitando, assim, o estudo da parcela das comunidades representada pelos microorganismos não cultiváveis. O crescente aumento do número de seqüências depositadas no banco de dados via internet (www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/) possibilitou a comparação de seqüências por todo o mundo, logo a análise de diversidade microbiana alcançou altos níveis de resolução (grupos, espécies e estirpes). Todos os avanços citados anteriormente só foram possíveis de serem realizados com o advento da técnica de PCR ("Polymerase chain reaction").

Essa técnica consiste na amplificação do número de uma determinada seqüência especifica, definida por iniciadores também específicos, a partir do DNA total, seja de um determinado organismo, seja de uma amostra ambiental. O mecanismo de funcionamento da PCR (Figura 3) é baseado em dois componentes principais, os iniciadores, também chamados de "primers", que vão se ligar ao genoma por homologia de seqüência definindo qual região do mesmo que deverá ser copiada, e a enzima DNA polimerase que é responsável pela realização da reação adicionando os desoxiribonucleotídeos a nova fita a ser sintetizada. E essa atividade enzimática se tornou responsável pelo próprio nome da técnica, reação da polimerase em cadeia (ou "Polymerase Chain Reaction") – PCR (FRANCO *et al.*, 2006).

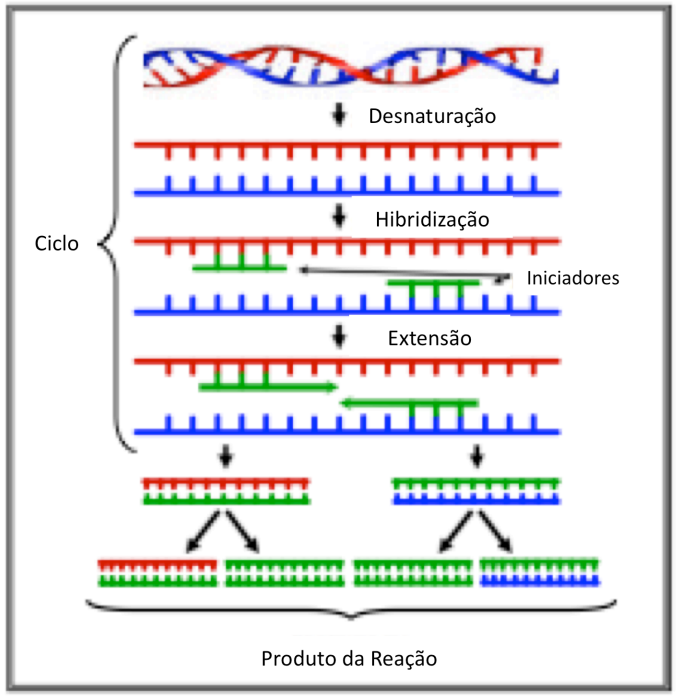

Figura 3. Dinâmica da PCR. Esquema representativo do princípio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

A utilização desta técnica em biologia molecular tornou-se uma prática básica e muitas vezes essencial para realização de outras técnicas, sendo que hoje quase todas as técnicas mais avançadas dependem da PCR. A evolução dessa técnica gerou o desenvolvimento da PCR em tempo real ("Realtime PCR"), que é capaz de quantificar seqüências homólogas aos iniciadores. Tal método tornou possível a elucidação de questionamentos relacionados ao número de indivíduos com características específicas detectadas por homologia dos iniciadores. O que antes era apenas detectável passou a ser passível de quantificação (FRANCO, *et al.* 2006).

Utilizando a técnica de qPCR vários grupos e espécies de bactérias têm sido alvos de quantificação (ZHANG & FANG, 2006). Sistemas de detecção e quantificação de diversos grupos de microrganismo, funções ecológicas e metabolismos específicos estão publicados na literatura (AN *et al.*, 2006; FURUKAWA *et al.*, 2006; POWELL, *et al.,* 2006; ZHANG & FANG, 2006).

Os RNAs ribossomais 16S e 18S ou seus genes (DNAr) são importantes marcadores moleculares de procariotos e eucariotos, respectivamente. Os produtos de PCR, gerados a partir de iniciadores baseados em regiões conservadas dos genes que codificam para o rRNA 16S, resultam em uma mistura de fragmentos de DNA que representam todas as espécies do solo potencialmente acessíveis ao PCR. Esses produtos de PCR podem ser utilizados para construção de bibliotecas de clones (MCCAIG *et al.*, 2001) e em técnicas de *fingerprinting* (GARBEVA *et al.,* 2004).

Essas "bibliotecas de clones" são úteis para identificação e caracterização de grupos dominantes de bactérias ou fungos no solo, possibilitando o acesso a mais informações sobre a diversidade desse solo (CURTISS, SLOAN & SCANNELL 2002). Com o aperfeiçoamento da técnica, como a maior capacidade do sequenciamento dos clones, tanto em termos de quantidade de amostras, quanto na velocidade e o desenvolvimento das análises estatísticas, haverá um aumento da reprodutibilidade dos resultados (GARBEVA *et al*., 2004).

O desenvolvimento de técnicas de "fingerprinting" torna possível a caracterização das comunidades microbianas do solo. Dentre elas estão: eletroforese em gel com gradiente de desnaturante ou de temperatura (DGGE-"Desnaturing Gradient Gel Eletroforesis"; TGGE-"Temperature Gradient Gel Eletroforesis") (MUYZER *et al.*, 1993; HEUER *et al.*, 1997; MUYZER & SMALLA, 1998); análise de restrição dos âmplicons de DNAr (ARDRA-"Amplified rDNA Restriction Analysis") (MASSOL-DEYA *et al.*, 1995); análise do polimorfismo do comprimento do fragmento terminal de restrição (T-RFLP-"Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism") (LIU *et al*., 1997); polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP-"Single-Strand Conformacional Polymorphism") (SCHMALENBERGER & TEBBE, 2002); e polimorfismo do comprimento de espaço intergênico ribossomal (RISA-"Ribosomal Intergenic Spacer Length Polymorphism") (RANJARD *et al*., 2001).

Na Figura 4 é apresentado um diagrama com algumas técnicas moleculares, mostrando algumas das possibilidades de utilização e suas possíveis combinações, além da versatilidade do uso destas técnicas.

Figura 4. Diagrama de aplicação da PCR em associação com outras técnicas moleculares.

A técnica de DGGE tem sido a metodologia mais utilizada para o estudo de estruturas de comunidades microbianas assim como de grupos funcionais específicos de amostras ambientais. A análise com DGGE permite um melhor estudo de grupos específicos de comunidades em ambientes complexos, principalmente para grupos procariotos, como por exemplo, Actinobacterias (HEUER *et al.*, 1997), *Bacillus* (GARBEVA *et al.,* 2003), *Paenibacillus* (DA SILVA *et al.,* 2003), *Pseudomonas* (GARBEVA *et al.,* 2004; GYAMFI *et al.,* 2002), α- e β-Proteobacteria (GOMES *et al.,* 2001), bactérias metanotróficas de α- e β-proteobacteria (HENCKEL *et al.,* 1999), bactérias oxidadoras de amônia (KOWALCHUK *et al.*, 1999), e bactérias fixadoras de nitrogênio (LOVELL *et al.*, 2001).

Inicialmente desenvolvida para análises de mutações, a técnica de DGGE (eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes) foi posteriormente ajustada e utilizada por Muyzer e colaboradores (1993) para análises de comunidades microbianas. Desde então vem sendo amplamente utilizada e é hoje considerada uma técnica importante para estudos em ecologia microbiana. Nesses estudos, regiões de DNA das diferentes

espécies microbianas presentes em uma determinada comunidade, previamente amplificadas por PCR, são separadas em função das suas seqüências de bases nucleotídicas ao invés de seu tamanho (como em um gel de agarose), conforme mostrado na Figura 5. É necessário que um dos iniciadores apresente uma região rica em G+C (grampo G-C) para impedir a total desnaturação da dupla fita do DNA durante a eletroforese (FRANCO *et al.* 2006).

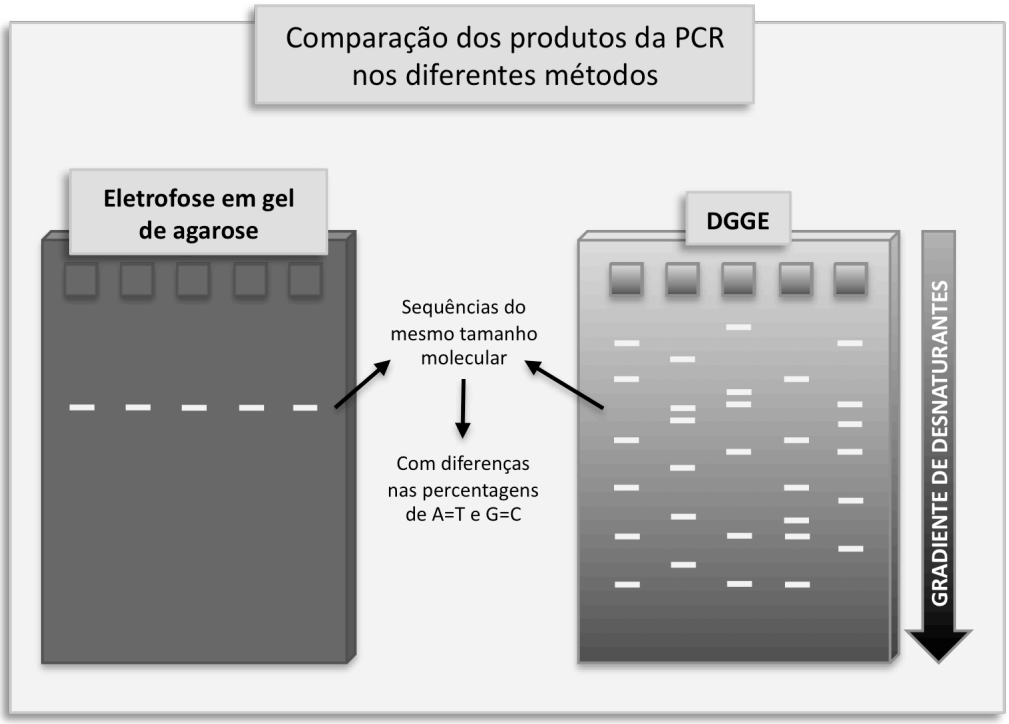

Figura 5. Diferença entre a eletroforese em gel de agarose e o DGGE. No esquema, os géis contém as mesmas amostras, mostrando o comportamento de migração em ambas as técnicas.

Esta técnica consiste em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente crescente de uréia e formamida (desnaturantes). Esses agentes desnaturantes favorecem o rompimento das ligações (pontes de hidrogênio) entre os nucleotídeos, provocando a abertura das fitas. Variações nas sequências nucleotídicas levam a uma diferença nas condições de desnaturação e as moléculas com diferentes seqüências vão cessar sua migração em posições diferenciadas no gel (FRANCO *et al.* 2006).

À medida que as fitas de DNA vão se abrindo, sua mobilidade no gel vai diminuindo até o momento em que esta cessa. Regiões com maiores concentrações de timina e adenina possuem ligações mais fracas (duas pontes de hidrogênio) em contraste com ligações entre citosina e guanina (três pontes de hidrogênio). Portanto, pode-se dizer que quanto mais rica em GC for a sequência, mais abaixo em um gel de DGGE esta banda se apresentará. Tais características da técnica de DGGE são apresentadas na Figura 6.

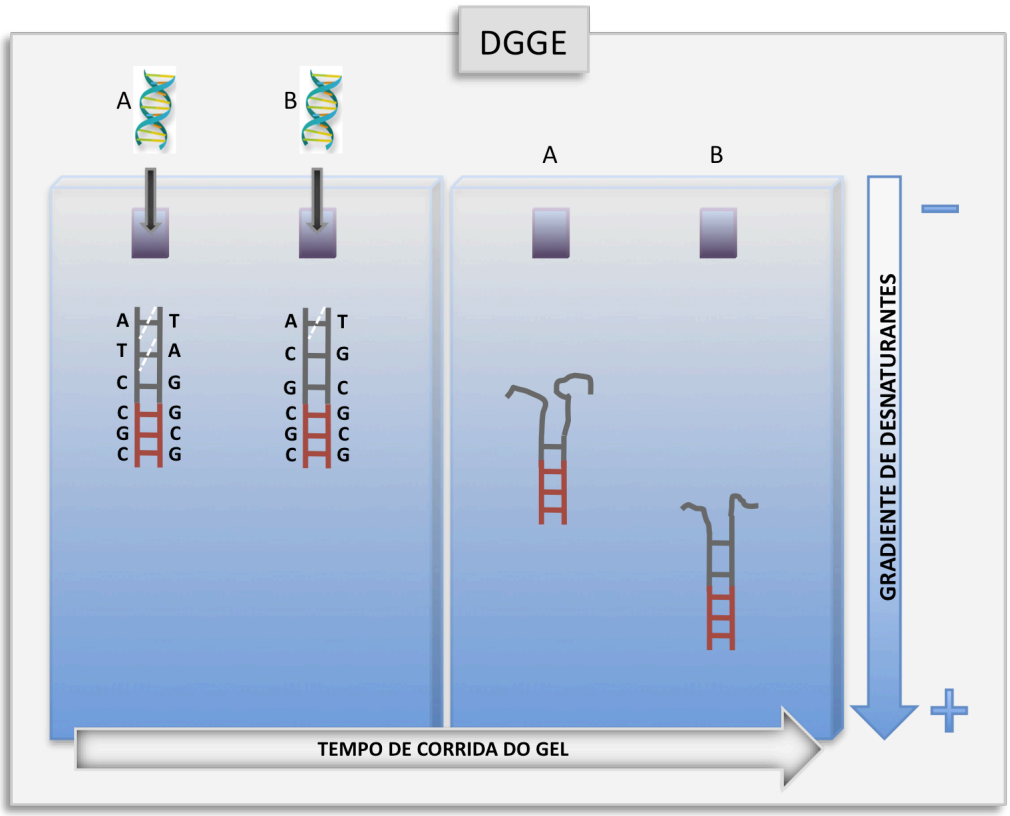

Figura 6. Esquema ilustrativo do processo de desnaturação das sequências de DNA no DGGE. Esta ocorre em suas regiões ricas em timina e adenina por possuírem ligações mais fracas (apenas duas pontes de hidrogênio), com relação às ligações entre citosina e guanina (que são três). Separação de bandas por diferenças na porcentagem de AT e GC. Em vermelho pode-se observar o grampo GC usado para impedir a desnaturação total das fitas.

Evans e colaboradores (2004) avaliaram a degradação do óleo em solo tropical sob o processo de bioestímulo durante 360 dias. Seus resultados pelas técnicas dependentes de cultivo não mostraram alterações nas comunidades microbianas, porém usando a técnica de DGGE, foi possível visualizar as alterações nas comunidades microbianas

provocadas não só pelo contaminante mas também pela adição de compostos inorgânicos para a aplicação da técnica do bioestímulo.

Apesar da utilização destas novas técnicas para o estudo da diversidade microbiana, as técnicas tradicionais, que envolvem enriquecimento e cultivo, ainda são fundamentais para a obtenção de um conhecimento mais detalhado a respeito de capacidades metabólicas e caracterização fenotípica, neste sentido, faz-se necessário uma abordagem polifásica para chegar o mais próximo possível da caracterização do ambiente.

Embora necessite de aprimoramentos (JANSSEN *et. al.,* 2002), estas ferramentas serão de grande importância para o entendimento dos microrganismos do solo, das relações entre os grupos funcionais dos organismos do solo e outras variáveis de relevância biotecnológia (STOCK & EGGLETON, 1992).

A utilização polifásica dessas técnicas, tanto por métodos de cultivo, como por métodos independentes de cultivo, permitem definir com mais precisão o melhor processo de biorremediação a ser implementado, desenvolvendo mecanismos que promovam a utilização máxima da comunidade microbiana total (CUNHA *et al.* 2000).

4 METODOLOGIA

4.1 SOLO

O solo utilizado nos experimentos foi coletado na região Nordeste do Brasil, próximo a uma área de exploração de petróleo. O óleo cru também é proveniente da mesma região. Esse solo (aproximadamente 235 kg) foi seco, submetido a desagregação em um britador de mandíbulas e classificado em uma peneira de malha 4 mesh (5 mm) , para separar folhas, galhos e raízes. Logo após, foi feita a homogeneização cônica e quarteamento da amostra (Figura 7).

Figura 7. Esquema representativo da homogeneização feita no solo antes de sua utilização.

As características físico-químicas do solo, que foram realizadas em laboratório externo, estão apresentadas na Tabela 4 . Através dos dados de fertilidade obtidos, foram realizados cálculos para certificar se haveria a necessidade da adição de nutrientes para manter uma relação de C:N:P de 100:10:0,39, conforme estudos realizados por Rizzo, 2008. Com os teores apresentados, não foi necessário a incorporação de nitrogênio e Fósforo ao solo.

Tabela 4. Características fisico-quimicas e de fertilidade do solo usado nos experimentos. (adaptado de TELHADO, 2009)

Propriedades físico-químicas														
pH		Densidade Bulk (g/ml)				Densidade de Partícula (g/ml)					Porosidade (%)		CRA (%)	
6,0		0,96				1,86					48		42	
Fertilidade														
Na	Ca	Mg	K	H+Al	Al	S	T	V	m	n	C.org	P	K	N
----------Cmol/dm^3----------								----------%----------				--mg/L--		-%-
0,066	24	7,7	0,02	9,2	0	31,79	40,99	78	0	0	6	10	8	1,4

Foram realizadas as determinações de hidrocarbonetos totais de petróleo pelo método USEPA 8015B e de metais presentes no solo pelos métodos USEPA 6010B e 3050B, ambas em laboratório externo.

4.2 ÓLEO

A fim de simular uma situação real de contaminação foi utilizado o óleo cru da mesma região onde o solo foi coletado. Na Tabela 5 encontram-se os percentuais das frações de compostos saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos do óleo cru utilizado.

Tabela 5. Percentual de saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos - SARA (%) do óleo cru.

SARA (%)	
Saturados	55,00
Aromáticos	20,46
Resinas + Asfaltenos	24,52

4.3 ENSAIOS EM MICROCOSMO

Foi realizada uma análise fatorial completa (Design Expert – Stat Easy®) para verificar estatisticamente a influência da presença do níquel na degradação do óleo. Para tal, levou-se em consideração três fatores em dois níveis (2^3), são eles:

a) Concentração de Óleo – foi usada a concentração mínima de 0,5% (p/p) de óleo cru, por ser este o valor de intervenção de acordo com a Lista Holandesa (CETESB, 2005), e 5% (p/p) de óleo cru, como concentração máxima por representar um nível de contaminação alto;

b) Concentração de Níquel (Ni) – o metal escolhido para a análise da influência se destaca por ser um elemento constituinte do óleo utilizado, porém em baixa concentração, além de estar presente nos catalisadores de refino do petróleo os quais acabam sendo incorporados aos resíduos oleosos em áreas de produção e refino. Seguindo a mesma razão do óleo, o nível mínimo do Ni usado foi de 130 mg/kg, já o ponto máximo foi de 260 mg/kg por ser o dobro da concentração de intervenção industrial de acordo com a resolução nº 420 do CONAMA (2009). Como foi levado em consideração a alta toxidez no Ni, não foi usado uma concentração muito elevada em relação ao nível mínimo para podermos alcançar respostas mais próximas a realidade;

c) Umidade – o teor de umidade foi escolhido como um dos parâmetros de análise por ser um fator muito importante não só para a atividade biológica do solo, mas como um fator compactador do solo, que poderia prejudicar o revolvimento do mesmo no processo de biorremediação em biorreatores. Os níveis escolhidos foram baseados no trabalho de Rizzo 2008 que levou em consideração os melhores valores referentes a capacidade de retenção de água do solo (CRA) para um bom desempenho do biorreator. Portando, fixou-se os valores de 45 e 70% da CRA deste solo.

Foram usados erlenmeyers de 250 mL com 50 g de solo. Estes foram contaminados com óleo cru e o metal nas concentrações definidas e a umidade ajustada de acordo com o nível testado. Não houve necessidade de ajuste das condições nutricionais , uma vez que os teores de nitrogênio e fósforo já eram suficientes para manter uma relação de C:N:P de 100:10:1 nos sistemas com alta concentração de óleo.

Apos a montagem do sistema, seu peso era registrado para posteriores reajustes de umidade.

Com a montagem experimental foi obtido um total de 9 tratamentos, sendo 8 experimentos em duplicata e mais um experimento como ponto central (em triplicata). A análise temporal ocorreu durante 67 dias tendo 4 pontos de coleta (7, 15, 36, 67 dias) totalizando 76 ensaios.

A Tabela 6 apresenta a relação dos experimentos com os parâmetros e níveis definidos, além da simbologia que será considerada ao longo deste trabalho.

Tabela 6. Esquema dos tratamentos gerados pelo planejamento de dados com suas simbologias.

	Óleo (%)	Níquel (mg/kg)	Umidade (%CRA)	Simbologia
1	0,5	130	45	oleo-ni-agua
2	5	130	45	OLEO-ni-agua
3	0,5	260	45	oleo-NI-agua
4	5	260	45	OLEO-NI-agua
5	0,5	130	70	oleo-ni-AGUA
6	5	130	70	OLEO-ni-AGUA
7	0,5	260	70	oleo-NI-AGUA
8	5	260	70	OLEO-NI-AGUA
9	2,75	190	57,5	Ponto Central

Como parâmetro resposta foi usado o percentual de remoção (%) dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs) nos experimentos gerados. Além da quantificação dos HTPs residuais do solo, foi feito o monitoramento dos sistemas através da quantificação dos microrganismos heterotróficos totais e degradadores, além da avaliação da comunidade microbiana utilizando técnicas moleculares.

Foram feitas nos sistemas, aerações forçadas com ar comprimido (20 L/min) por 2 min, reposição de água por diferença de peso e homogeneização com bastão de vidro de 3 em 3 dias durante os 67 dias de experimento. A Figura 8 mostra os sistemas de tratamento utilizados.

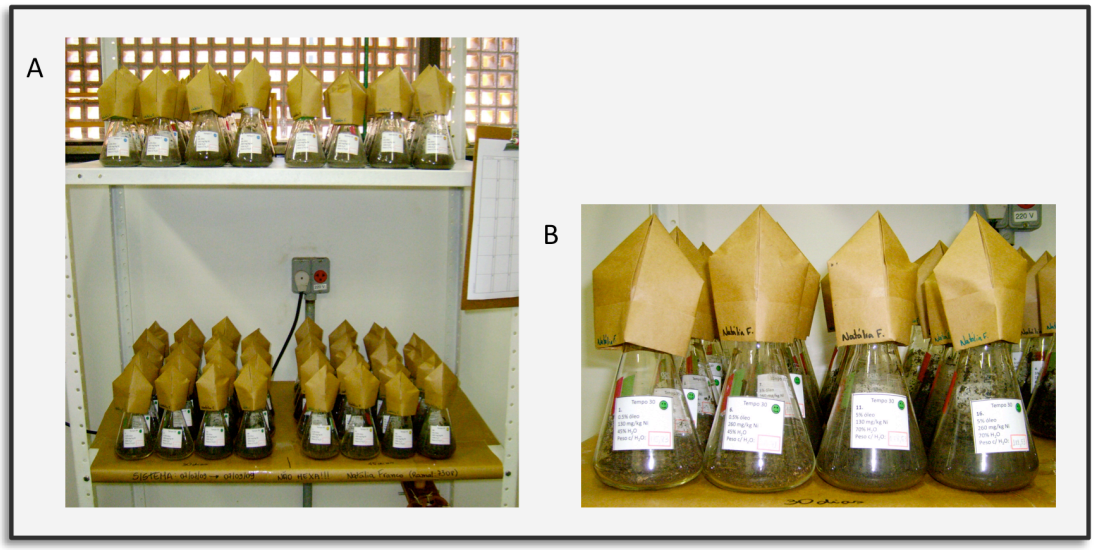

Figura 8. Sistemas montados no laboratório do CETEM/MCT. A) fracos agrupados por tempo de coleta. B) Detalhe dos rótulos contendo os dados de cada experimento e do peso total.

Para simplificar o processo de aeração, já que o número de frascos era bastante alto, foi montado um sistema para possibilitar a utilização de 6 frascos simultaneamente como mostrado na Figura 9.

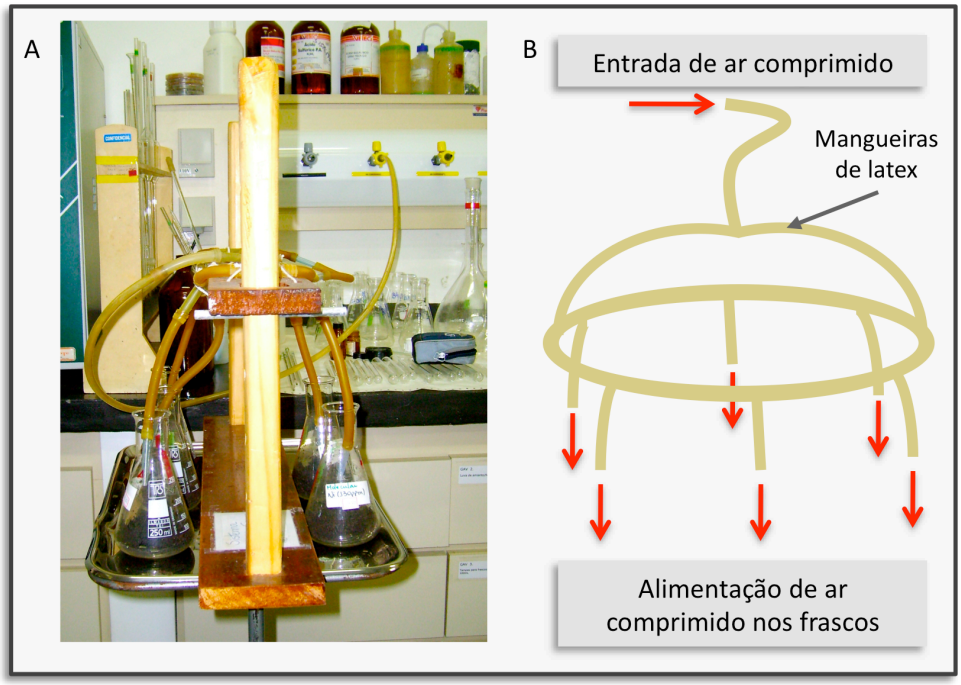

Figura 9. Esquema da aeração. A) Foto do processo de aeração. B) Esquema representativo detalhando da distribuição do ar comprimido.

Para confirmar que os resultados obtidos com os fatores estudados são referentes a atividade biológica do solo, foi realizado um sistema similar ao descrito acima, contendo o solo utilizado, autoclavado 5 vezes com adição periódica (a cada semana) de uma solução biocida (azida de sódio 1%) para garantir a inatividade biológica deste solo. A aeração e o revolvimento foram realizados como descritos anteriormente, porém a umidade foi reposta juntamente com a solução biocida.

Para a avaliação das alterações das comunidades microbianas do solo por biologia molecular, foram feitos alguns controles onde só foi colocado o solo com óleo na concentração de 5% e o solo com níquel na concentração de 260 mg/kg, além do ajuste da umidade que são as condições estabelecidas para a realização dos ensaios no biorretor de bancada. Os sistemas foram mantidos como anteriormente descritos, porém por apenas um período de 29 dias.

Todos os sistemas foram mantidos sob temperatura interna do laboratório (23-26°C), não sofrendo influência de grandes variações de temperatura e de luz solar direta, porém possíveis efeitos foram avaliados através dos controles abióticos.

4.4 ENSAIO EM BIORREATOR

Vários tipos de biorreatores podem ser usados no tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, entre eles os de fase semi-sólida e sólida, horizontais ou verticais, com tabor fixo ou rotativo, sendo o de fase sólida o mais indicado para tratamento de solo com alto teor de partículas finas (RIZZO *et. al.* 2010).

A Figura 10 mostra a configuração do biorreator utilizado nos experimentos. O projeto, execução e os testes de eficiência foram realizados na tese de doutorado desenvolvida por Rizzo (2008), que testou e padronizou as melhores condições de aeração e agitação.

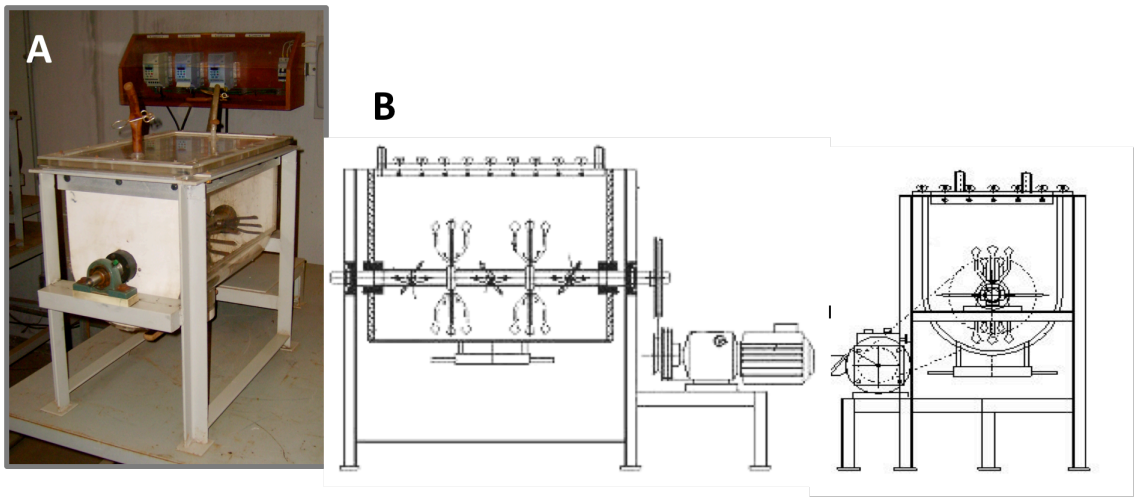

Figura 10. Biorreator usado nos experimentos. **A**. Foto. **B**. Esquema do biorreator com visão frontal e lateral.

As condições usadas neste experimento foram de uma contaminação de 5% (p/p) de óleo, 260 mg/kg de Ni e 70% da CRA. A operação consistiu de agitação 2 vezes ao dia por 15min a 4rpm, sendo a aeração realizada por 1 hora à um vazão de 20L/min. O biorreator teve um período total de operação de 29 dias. Foram retiradas amostras a cada semana para quantificação dos HTPs residuais do solo, além da quantificação dos microrganismos heterotróficos totais e degradadores.

4.5 ANÁLISES DA CONCETRAÇÃO DE HIDROCARBONETOS TOTAIS DE PETRÓLEO

As análises foram feitas através do Infracal (modelo HART-T da Wilks Enterprise), que é um equipamento portátil capaz de quantificar óleos e graxas totais / HTP por espectrofotometria de infravermelho (Figura 11).

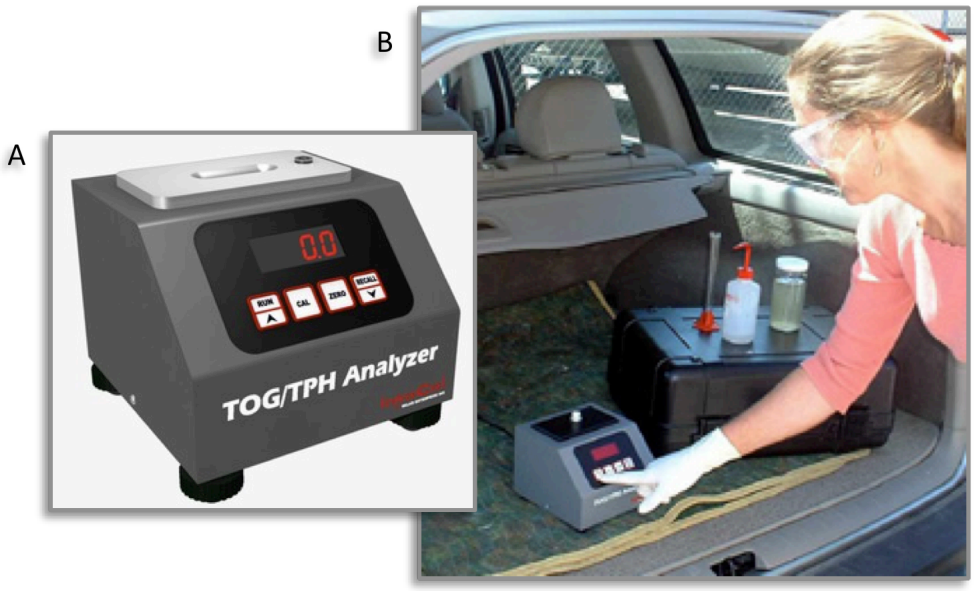

Figura 11. Aparelho para quantificação de HTP, Infracal. A) O aparelho; B) Ilustração mostrando sua portabilidade.

Este aparelho permite a quantificação de HTP após extração do óleo com solvente orgânico (n-hexano PA padrão HPLC), sendo a determinação por infravermelho baseada na medida da absorbância da ligação C-H dos hidrocarbonetos. Estas ligações alifáticas absorvem energia num comprimento de onda específico e a intensidade de absorção é proporcional a quantidade de moléculas de hidrocarbonetos numa amostra (NASCIMENTO *et al*., 2008).

A extração de HTP do solo foi feita após secagem do mesmo à 60°C por 16h. O solo foi então macerado e adicionado ao frasco EPA de 40 mL junto com sulfato de sódio anidro (proporção 1:1), e n- hexano (Tedia) em proporção pré-definida. A mistura foi submetida ao ultrasom por 60 min, deixada em repouso (30 min) para sedimentação dos sólidos para posterior leitura no infracal (TELHADO, 2009). Foram aplicados 50µL do extrato no cristal do aparelho, e após 3 min de corrida o solvente foi evaporado e a leitura feita, dando o resultado em absorbância.

Foi calculado o valor da concentração (mg/L) em cada amostra através da curva de calibração, a qual foi obtida após a leitura com diferentes concentrações conhecidas de óleo em hexano.

A escolha por tal método foi baseada nos resultados obtidos por Telhado (2009) que usou o mesmo solo e óleo submetidos a diferentes métodos de análises(Cromatografia gasosa, Óleos e graxas – método gravimétrico e infravermelho). Dentre estas análises, o infravermelho utilizando o Infracal se mostrou mais preciso que o método gravimétrico e bem próximo ao cromatográfico, indicando ser uma técnica rápida e barata, e melhor opção para análise.

4.6 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Como a maior parte da degradação de poluentes orgânicos está sob responsabilidade direta da atividade microbiana do ambiente impactado e visto que o tempo de geração dos microrganismos é alto, sua diversidade nos diferentes momentos e condições normalmente apontam alterações associadas às condições impostas. Levando tal aspecto em consideração, foram realizados métodos de análises microbiológicas com o objetivo de monitorar os bioprocessos que ocorrem durante a biorremediação. As análises usadas foram contagem de microrganismos heterotróficos totais e degradadores e análise do perfil da comunidade microbiana por DGGE.

4.6.1 Contagem de Heterotróficas totais

A quantificação de microrganismos heterotróficos totais foi realizada conforme Trindade (2002). Acrescentou - se, em erlenmeyer, 5 g de solo em 50 mL de solução salina (NaCl, 0,75%). Fez-se a agitação da suspensão em shaker por 1 hora a 25°C a 150 rpm. Após a agitação, os extratos obtidos sofreram diluições sucessivas. Posteriormente, realizou-se o plaqueamento por espalhamento ou *spread plate* em meio LB (Luria-Bertani) (Tabela 7), acrescentando-se 0,1 ml das diluições em cada placa (em duplicata). As placas foram incubadas em estufa a 30°C por 24 horas e, em seguida, contou-se o número de unidades formadoras de colônias (resultados expressos em UFC / g de solo).

Tabela 7. Composição do meio Luria-Bertani (LB).

Meio Luria-Bertani (LB)*

Reagente	Quantidade (g/L)
Triptona	5
Extrato de levedura	10
Cloreto de sódio	5
Ágar	15

*Composição baseada na Difco®

4.6.2 Contagem de microrganismos degradadores de óleo cru

A quantificação dos microrganismos degradadores de óleo cru foi realizada empregando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP) descrita por Ururahy (1998) e Van Hamme e colaboradores (2003). Acrescentou -se, em erlenmeyer, 5 g de solo em 50 mL de solução salina (NaCl, 0,75%). Fez-se a agitação da suspensão em shaker por 1 hora a 25°C a 150 rpm. Após a agitação, as amostras sofreram diluições, as quais 0,1mL de cada diluição foi adicionado em quintuplicata a 1,8 mL de meio Bushnell-Haas (Difco®) previamente dispostos em cavidades da placa de polietileno com 24 cavidades (Figura 12). Por fim, 0,1mL de óleo cru foi acrescentado como única fonte de carbono orgânico em cada cavidade. As placas foram então incubadas em estufa a 30°C por uma semana e, em seguida, observou-se alterações no filme do óleo sendo estas consideradas positivas. Foi feita então, a estimativa do número mais provável (NMP) por grama de solo (OBLINGER & KOBURGER 1975). O teste em branco (controle negativo) foi realizado com adição de meio, seguido da adição do óleo, sem adição de inóculo.

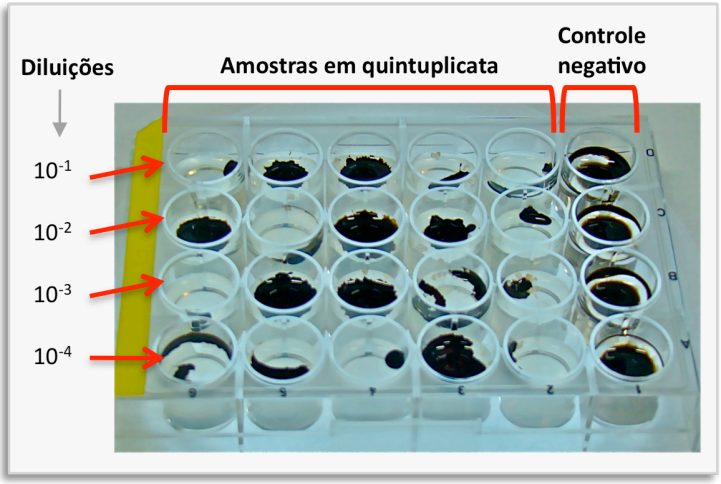

Figura 12. Esquema mostrando montagem da placa para contagem de microrganismos degradadores de óleo cru pela técnica de NMP.

4.6.3 ANÁLISE POR BIOLOGIA MOLECULAR

4.6.3.1 Extração do DNA da comunidade bacteriana total no solo

O DNA total da comunidade presente no solo foi extraído a partir de amostra de solo utilizando o kit Powersoil™ DNA Kit (MoBio Laboratories, USA) seguindo as especificações do fabricante. O DNA extraído foi submetido a eletroforese em gel de agarose para avaliar a integridade do DNA e sua pureza através de espectrofotometria em NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

4.6.3.2 PCR-DGGE

De modo a obter perfis da comunidade bacteriana total, α-, γ-proteobacteria, actinobacteria (HEUER et al., 1997; GOMES et al., 2001; MUHLING et al., 2008) as amostras foram amplificadas por PCR usando os iniciadores apresentados na Tabela 8. As reações foram realizadas em aparelho GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Todas as misturas de reação utilizadas (volume total de 50 µl) continham tampão 1x Taq Platinum Buffer (Invitrogen), 200 µM de cada deoxinucleosídeo trifosfato, 400 nM de cada iniciador, 0,05U Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen), ≈20 ng de DNA molde. A amplificação do rDNA da comunidade bacteriana total foi realizada pelo seguinte programa de PCR em

"touchdown" : 94˚C por 3 min; 94˚C por 1 min, 65˚C (decrescendo 1˚C por ciclo) por 1 min, 72˚C por 3 min (10 ciclos); 94˚C por 1 min, 55˚C por 1 min, 72˚C por 3 min (35 ciclos); 72˚C por 30 min. As demais amplificações foram realizadas conforme apresentado na Tabela 8. Com uma alíquota de 5 µL dos amplicons foi feita uma corrida de eletroforese em gel de agarose para avaliar a especificidade e rendimento da reação. Como todas as reações resultaram em produtos de mesma intensidade no gel de agarose 5 µL de cada amplicon foi então usado em corrida de DGGE.

Tabela 8. Iniciadores utilizados nas reações de PCR-DGGE, programas e variações no preparo das reações.

Iniciador	Alvo	Sequência (5' → 3')	Referência	Conjunto de iniciadores	Programa termociclador/variações no preparo das reações
R1378	16S rRNA bacteriano	CGGTGTGTAC AAGGCCCGG GAACG	HEUER *et al.*, 1997	F203/R1378	94 °C 5 min; 30 ciclos: 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min; 72 °C 10 min
F203α	16S das α-proteobactérias	GGATGAGCC CGCGGCCTA	GOMES *et al.* 2001		3,75 mM $MgCl_2$, , 0,25 µL formamida
Gamma395f	16S das γ-proteobactérias	CGGTGTGTAC AAGGCCCGG GAACG	MÜHLING *et al.*, 2008	Gamma395f/R1378	96 °C 4 min; 30 ciclos: 96 °C 1 min, 54 °C 1 min, 74 °C 1 min; 74 °C 10 min 2,5 mM $MgCl_2$
F243	16S de actinobactérias	GGATGAGCC CGCGGCCTA	HEUER *et al.*, 1997	F243/R1378	94 °C 4 min; 30 ciclos: 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min; 72 °C 10 min 3,75 mM $MgCl_2$, 0,25 µL formamida
F984GC	16S rRNA bacteriano	gc.- AACGCGAAG AACCTTAC	HEUER *et al.*, 1997	F984GC /R1378**	94 °C 4 min; 30 ciclos: 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 2 min; 72 °C 10 min 2,5 mM $MgCl_2$, 0,25 µL formamida
gc.		CGCCCGGGG CGCGCCCCGG GCGGGGCGG GGGCACGGG GGG			

*f - *forward primer*; r - *reverse primer*; gc. - seqüência rica em G+C inserida na extremidade 5'; ** *Nested*-PCR – utilizou como molde os produtos resultantes da amplificações anteriores.

As análises de DGGE foram realizadas em aparato PhorU2 system (Ingeny International, Goes, The Netherlands) de acordo com instruções do fabricante. Foram utilizados gradientes de 45–60 % de desnaturantes (uréia/formamida) (100% de desnaturantes corresponde a uma solução 8M de uréia e 40% (V/V) de formamida), temperatura do tampão de 60˚C e corrida a 110V por 18 h. O gel foi posteriormente corado por coloração de prata (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

As imagens dos géis de DGGE foram digitalizadas em HP Scanjet G4050 e foram analisadas através do software Bionumerics (Applied Maths, Bélgica) para gerar perfis densitométricos.

O processamento de dados gerados a partir dos géis de DGGE foi realizado através da comparação dos perfis de bandas das diferentes amostras. Em Ecologia microbiana, estudam-se, principalmente, diferenças espaciais e temporais de amostras ambientais, assim como entre diferentes condições abióticas. Essas análises podem ser feitas através de construção de matrizes que possibilitam o estudo estatístico dos perfis (FRANCO, CUNHA & ROSADO 2006).

4.7 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Para realizar testes multivariados nos dados de contagens microbiológicas e DGGE utilizou-se o software Past (HAMMER et al., 2001). As análises de coordenadas principais (PCoA) foram realizadas baseando-se em matrizes de similaridade construídas pelo método de Bray-Curtis, assim como para fazer análise de grupamento, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean" (UPGMA), com os valores das contagens microbiológicas em relação a cada tempo analisado. Análises de similaridade (ANOSIM) foram realizadas usando 999 permutações para avaliar a significância das diferenças nas comunidades (CLARKE, 1993).

Para um entendimento geral do trabalho, a Figura 13 mostra um diagrama com os ensaios realizados, assim como os métodos.

ENSAIOS DE BANCADA

Análise fatorial completa **(67 dias)**

Parâme-tro	Mínimo	Ponto Central	Máximo	Unidade
Óleo	0,5	2,75	5	% p/p
Níquel	130	190	260	mg/kg
Água	45	57,5	70	% da CRA

Controles para análises moleculares **(29 dias)**

Símbolo	**Óleo (%p/p)**	**Níquel (mg/kg)**	**Água (% da CRA)**
C -ÓLEO	5	-	70
C-NI	-	260	70

ENSAIOS NO BIORREATOR **(29 dias)**

Símbolo	Óleo (% p/p)	Ni (mg/kg)
Bior. OLEO-NI	5	260

ANÁLISES REALIZADAS:
•Contagem de heterotróficas totais;
•Contagem de bactérias degradadoras de óleo cru;
•Análise de *fingerpreinting* (DGGE);
•Quantificação de HTP por infravermelho.

ANÁLISE ESTATÍSCA DOS DADOS

Figura 13. Diagrama contendo os ensaios e as análises feitas neste trabalho.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ENSAIOS EM MICROCOSMOS

5.1.1 REMOÇÃO DO ÓLEO

As análises de quantificação por espectrofotometria por infravermelho dos níveis de HTP dos diferentes sistemas de tratamentos foram realizadas e convertidas para porcentagem de remoção com o objetivo de melhor expressar os resultados (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de remoção do óleo cru nos sistemas gerados a partir da análise fatorial. Onde pela simbologia óleo= 0,5% p/p; ÓLEO= 5%p/p; ni= 130mg/kg; NI= 260mg/kg; água= 45% da CRA; ÁGUA= 70% da CRA

EXPERIMENTO	7 dias		15 dias		36 dias		67 dias	
	Óleo no solo (mg/g)	Remoção (%)	Óleo no solo (mg/g)	Remoção (%)	Óleo no solo (mg/g)	Remoção (%)	Óleo no solo (mg/g)	Remoção (%)
óleo - ni - água	5,87 ±0,00	0,00	4,82 ±0,07	4,76	3,70 ±0,30	26,88	2,83 ±0,40	44,04
ÓLEO - ni - água	55,91 ±3,03	0,00	52,34 ±1,21	0,00	51,06 ±4,65	0,00	44,20 ±3,84	12,70
óleo - NI - água	5,58 ±0,40	0,00	5,63 ±0,40	0,00	4,46 ±0,17	11,82	2,26 ±0,09	55,33
ÓLEO - NI - água	56,20 ±3,03	0,00	46,20 ±3,43	8,75	45,20 ±4,44	10,72	41,34 ±2,63	18,34
óleo - ni - ÁGUA	4,10 ±0,20	18,88	3,53 ±0,20	30,17	3,44 ±0,40	32,05	2,80 ±0,00	44,66
ÓLEO - ni - ÁGUA	40,77 ±4,24	19,47	36,63 ±2,42	27,65	36,06 ±0,00	28,78	33,06 ±0,20	34,71
óleo - NI - ÁGUA	5,06 ±0,07	0,00	4,06 ±0,44	25,94	3,87 ±0,13	21,70	3,02 ±0,34	35,57
ÓLEO - NI - ÁGUA	47,49 ±1,21	6,21	43,34 ±2,22	14,39	35,63 ±3,84	29,63	32,77 ±0,61	35,27
Ponto Central	22,27 ±3,03	27,87	20,41 ±1,30	25,86	18,55 ±2,70	38,16	20,32 ±1,24	30,78
CONCENTRAÇÕES INICIAIS	Téorico	0,5% = 5mg/g 2,75% = 27,5mg/g 5% = 50mg/g			Real	0,5% = 5,06mg/g 2,75% = 28,46mg/g 5% = 50,63mg/		

Foram obtidos valores nulos de remoção para o controle abiótico para todos os tratamentos em todos os tempos analisados. Portanto, podemos considerar que todas as variações obtidas pelos sistemas acima vistos, são de origem biológica.

As variações no percentual de remoção para os diferentes tratamentos ao longo do tempo podem ser melhor visualizadas através do gráfico em barras (Figura 14). Foi possível verificar que nos experimentos com nível de umidade mínimo, valores percentuais de remoção significativos ocorreram apenas após o décimo quinto dia. Já nos frascos com umidade máxima, os valores de remoção atingiram até 30% neste mesmo tempo, mostrando que a água foi um fator de grande influência positiva nos sistemas, neste tempo.

Apesar de parecer óbvio o efeito positivo da umidade na atividade microbiana, é importante a definição de um ponto mínimo de umidade necessário para a obtenção de bons níveis de degradação e para um bom funcionamento dos biorreatores, cujo desempenho é prejudicado com o uso de solos muito úmidos.

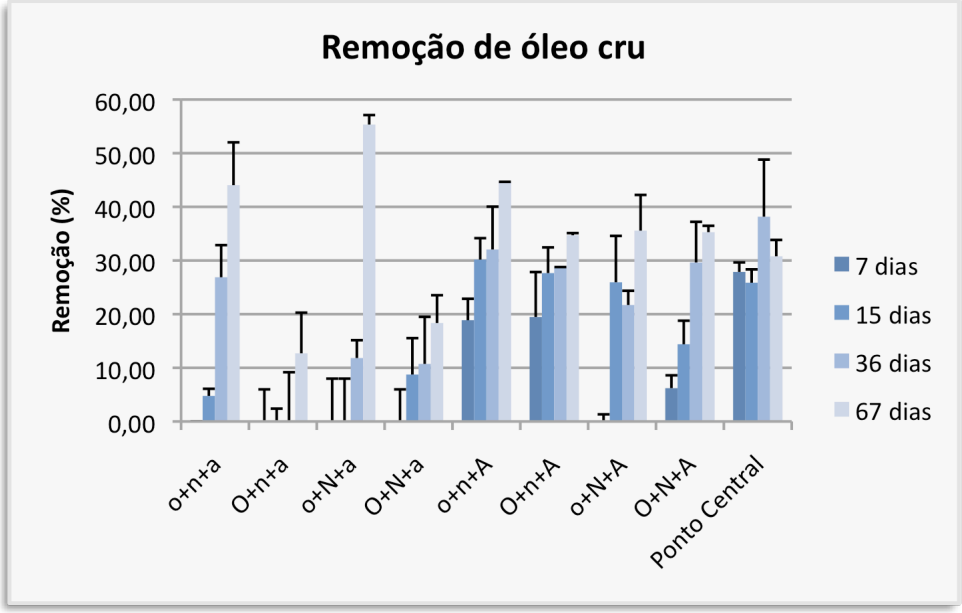

Figura 14. Gráfico da remoção percentual do óleo nos diferentes sistemas de tratamento ao longo de 67 dias. Onde pela simbologia o= 0,5% p/p; O= 5%p/p; n= 130mg/kg; N= 260mg/kg; a= 45% da CRA; A= 70% da CRA

Os resultados obtidos com o ponto central mostram que o nível de umidade foi o suficiente para que o perfil de degradação fosse muito similar aos experimentos de alta umidade. Com isto obtivemos dois fatores favoráveis para o manejo da umidade nesse processo. O primeiro é que o tipo de solo permite o uso do teor de água de 70% da CRA sem que ocorra a sua compactação e conseqüente travamento do motor do biorreator. O outro aspecto é que, pelos resultados obtidos, a umidade requerida para uma remoção quase em seu nível máximo, através dos parâmetros estudados, encontra-se próximo ao valor de 58% da CRA (ponto central). Unidos, estes dois fatos, oferecem uma ampla margem de trabalho, em relação ao teor de umidade a ser utilizado no biorreator.

5.1.2 ANÁLISE FATORIAL COMPLETA (AFC)

Conforme descrito na metodologia, os experimentos foram montados seguindo uma análises fatorial completa gerada pelo software Design Expert (Stat Easy®), resultando em 8 experimentos em duplicata mais 3 repetições do ponto central (Tabela 9). Usando como variável resposta a porcentagem de remoção, foi possível obter uma análise para cada tempo estudado.

Os gráficos da normal versus resíduos nos diferentes tempos estão apresentados na Figura 16. É possível verificar que a distribuição dos pontos (em laranja) em relação ao modelo gerado (linha rosa) configuram uma distribuição normal, portanto podemos levar em consideração os resultados gerados a partir de cálculo de probabilidade.

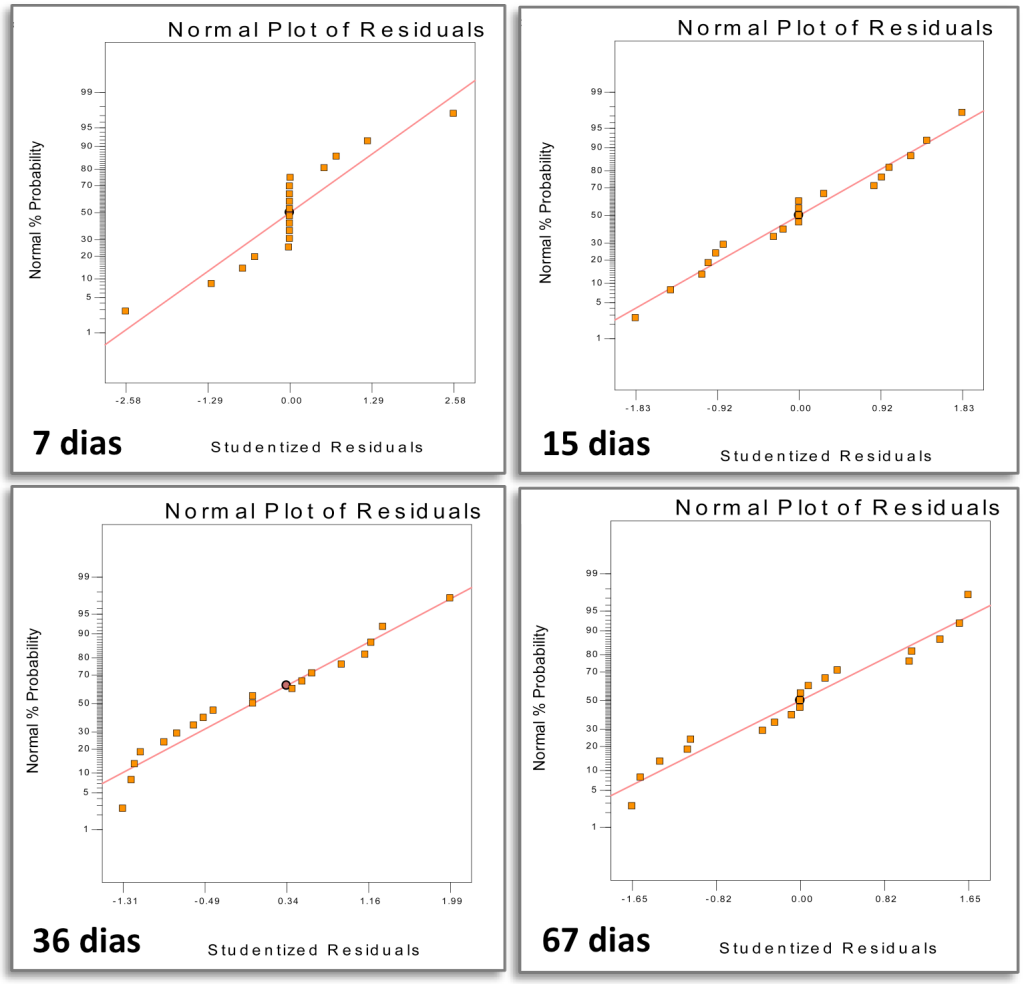

Figura 15. Gráficos da normal versus resíduo das análises nos diferentes tempos .

5.1.2.1 AFC EM 7 DIAS

No sétimo dia de tratamento foi obtido um modelo significativo (p <0.05) (Tabela 10). Em uma análise do diagnóstico estatístico foi possível verificar que tanto o modelo quanto a curvatura são significativos, o que permite a análise das influências geradas pelo modelo, porém sem avaliação dos valores intermediários nos diferentes níveis estudados, para isso seria necessário utilizar uma análise por mistura de superfície.

Tabela 10. Relação dos dados gerados pela construção do modelo para o tempo de 7 dias.

Fonte	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média dos Quadrados	Valor de F	Prob > F
Modelo	1051,19	7	150,17	14,22	0,0003*
Óleo (O)	11,48	1	11,48	1,09	0,3244
Metal (M)	257,79	1	257,79	24,41	0,0008*
Umidade (U)	497,04	1	497,04	47,07	<0,0001*
O * M	7,81	1	7,81	0,74	0,4122
O * U	11,48	1	11,48	1,09	0,3244
M * U	257,79	1	257,79	24,41	0,0008*
O * M * U	7,81	1	7,81	0,74	0,4122
Curvatura	883,69	1	883,69	83,68	<0,0001*
Erro Puro	95,04	9	10,56	-	-

* Valores significativos (<0,05).

No modelo apresentado na Tabela 11, o valor de R-quadrado foi 0,9171, mostrando um bom ajuste dos dados. Levando em consideração o cálculo de Prob> F, os parâmetros com a influência significativa foram o metal, a umidade e a interação entre estes (valores absolutos maiores que o desvio padrão) . Neste tempo, a umidade foi o parâmetro de maior influência, sendo este positivo, enquanto, o metal mostrou influência negativa. Já o óleo, não apresentou influência significativa, mostrando que em 7 dias, independente da concentração, não houve mudança na porcentagem de remoção do óleo.

Outro trabalho (AMOR KENNES & VEIGA, 2001) estudou a influência de metais pesados (zinco, níquel e cádmio) na biodegradação do tolueno e obtiveram como resultado que

o níquel foi o metal com maior influência negativa, logo seguido do Cádmio e por último o zinco.

A única interação significativa entre 2 parâmetros foi entre o metal e a umidade, podendo estar relacionado ao fato de que o metal na presença de umidade se encontra em uma forma mais disponível, aumentando assim sua toxidez aos microrganismos degradadores.

Tabela 11. Modelo gerado, desvio padrão e o r-quadrado para o tempo de 7 dias.

Modelo – 7 dias		
Desvio Padrão	R-quadrado	R-quadrado ajustado
3,25	0,9171	0,8526
Remoção do óleo (%) = +5,57 +0,85 *Óleo -4,01 *Metal +5,57 *Umidade +0,70 *Óleo*Metal +0,85 *Óleo*Umidade -4,01 *Metal*Umidade +0,70 *Óleo*Metal*Umidade		

5.1.2.2 AFC EM 15 DIAS

Igualmente ao resultado obtido no tempo de 7 dias, foi possível obter um modelo significativo (Tabela 12), e também uma curvatura significativa.

Tabela 12. Relação dos dados gerados pela construção do modelo no tempo de 15 dias.

Fonte	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média dos Quadrados	Valor de F	Prob > F
Modelo	2190,97	7	313,00	14,08	0,0002*
Óleo (O)	25,36	1	25,36	1,14	0,3105
Metal (M)	45,62	1	45,62	2,05	0,1825
Umidade (U)	1791,13	1	1791,13	80,59	<0,0001*
O * M	5,03	1	5,03	0,23	0,06445
O * U	81,43	1	81,43	3,66	0,0846
M * U	115,39	1	115,39	5,19	0,0459*
O * M * U	126,99	1	126,99	5,71	0,0379*
Curvatura	518,68	1	518,68	23,34	0,0007*
Erro Puro	222,25	10	22,23	-	-

* Valores significativos (<0,05).

Para o modelo gerado também foi obtido um valor de R-quadrado em torno de 0,91 (Tabela 13). No entanto, levando em consideração a significância dos parâmetros no modelo, o único parâmetro com influência significativa foi a umidade, sendo bastante positiva.

Neste tempo de 15 dias, o metal já não apresentou influência negativa, assim como o óleo e as interação de dois e três fatores. Isto pode ter relação com as características do solo usado. No trabalho de Maliszewska-Kordybach & Smreczak (2003) que estudou a influência de metais pesados (zinco, chumbo e cádmio) e HPAs nas comunidades microbianas de diferentes culturas de plantas (trigo, aveia, milho, feijão, girassol e tomate), foi mostrado que o efeito dos dois tipos de contaminantes juntos sempre possuem um impacto inicial negativo, porém a capacidade de desenvolvimento das plantas e o grau de impacto nas comunidades microbianas está intimamente relacionado com as características do solo.

Tabela 13. Modelo gerado, desvio padrão e o r-quadrado para o tempo de 15 dias.

Modelo – 15 dias		
Desvio Padrão	R-quadrado	R-Quadrado ajustado
4,71	0,9079	08434

Remoção do óleo (%) = +13,96 -1,26 *Óleo -1,69 *Metal +10,58 *Umidade +0,56 *Óleo*Metal -2,26 *Óleo*Umidade -2,69 *Metal*Umidade -2,82*Óleo*Metal*Umidade

5.1.2.3 AFC EM 36 DIAS

Em 36 dias, podemos observar que o modelo e a curvatura foram significativos, da mesma forma que nas análises anteriores. No entanto, o valor de R-quadrado obtido pelo modelo foi de 0,7832 (Tabelas 14 e 15).

Tabela 14. Relação dos dados gerados pela construção do modelo para o tempo de 36 dias.

Fonte	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média dos Quadrados	Valor de F	Prob > F
Modelo	1621,81	7	213,69	5,16	0,0103*
Óleo (O)	104,98	1	104,98	2,34	0,1572
Metal (M)	69,40	1	69,40	1,55	0,2421
Umidade (U)	897,67	1	897,67	20,00	0,0012*
O * M	291,69	1	291,69	6,50	0,0289*
O * U	222,12	1	222,12	4,95	0,0503
M * U	1,38	1	1,38	0,031	0,8643
O * M * U	34,58	1	34,58	0,77	0,40007*
Curvatura	513,78	1	513,78	11,45	0,0070*
Erro Puro	448,85	10	44,88	-	-

* Valores significativos (<0,05).

A umidade é um fator conhecidamente positivo aos processos de biodegradação de compostos orgânicos que geralmente envolve reações de hidrólise, além disso quase todas as reações enzimáticas das células ocorrem em meio aquoso, portanto este parâmetro quando oferecido de forma limitada gera um atraso nas reações de biodegradação. No entanto, quando há a presença de metais a níveis tóxicos no ambiente, uma oferta alta de umidade pode acarretar uma maior biodisponibilidade destes, e consequentemente aumento de sua toxidez. Neste trabalho em que encontramos os dois tipos de contaminantes juntos, a umidade teve uma influência positiva mostrando que as vantagens oferecidas a comunidade hidrocarbonoclástica é maior do que o aumento da biodisponibilidade do metal (DERMONT *et al.*, 2008).

Tabela 15. Modelo gerado, desvio padrão e o R-quadrado para o tempo de 36 dias.

Modelo – 36 dias		
Desvio Padrão	R-quadrado	R-quadrado
6,70	0,7832	0,6315
Remoção do óleo (%) = +20,55 -2,56*Óleo -2,08*Metal +7,49*Umidade +4,27*Óleo*Metal +3,73*Óleo*Umidade -0,29*Metal*Umidade -1,47*Óleo*Metal*Umidade		

5.1.2.4 AFC DE 67 DIAS

A análise gerada (Tabela 16) apresentou uma curvatura não significativa, o que nos permite avaliar além dos níveis estudados, toda a faixa de estudo incluindo os valores intermediários.

Tabela 16. Relação dos dados gerados pela construção do modelo para o tempo de 67 dias.

Fonte	Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Média dos Quadrados	Valor de F	Prob > F
Modelo	2727,05	7	389,58	16,58	<0.0001*
Óleo (O)	1543,43	1	1543,43	65,67	<0.0001*
Metal (M)	17,65	1	17,65	0,75	0,4064
Umidade (U)	98,03	1	98,03	4,17	0,0684
O * M	4,02	1	4,02	0,17	0,6878
O * U	843,13	1	843,13	35,87	0,0001*
M * U	162,17	1	162,17	6,90	0,0253*
O * M * U	58,61	1	58,61	2,49	0,1454
Curvatura	106,03	1	106,03	4,51	0,0596
Erro Puro	235,03	10	23,50	-	-

* Valores significativos (<0,05).

O modelo gerado (Tabela 17), mostrou um valor de R-quadrado de 0,9207, sendo o óleo o único parâmetro significativo com influência negativa. Já a interação do óleo com a umidade foi significante e positiva. A influência negativa se deve provavelmente ao efeito tóxico do óleo cru sobre as comunidades microbianas do solo, principalmente com teor de água baixo, o que limita a atividade microbiana. Quanto maior a concentração do óleo maior o impacto nestas comunidades, mesmo que esteja apenas relacionado a perda de abundância desses indivíduos.

Tabela 17. Modelo gerado, desvio padrão e o R-quadrado para o tempo de 67 dias.

Modelo – 67 dias		
Desvio Padrão	R-quadrado	R-quadrado
4,85	0,9207	0,8651
Remoção do óleo (%) = +35,08 -9,82*Óleo +1,05*Metal +2,48*Umidade +0,50*Óleo*Metal +7,26*Óleo*Umidade -3,18*Metal*Umidade +1,91*Óleo*Metal*Umidade		

Após as análises individuais de cada tempo de coleta foi possível unir os dados dos modelos e levando em consideração os valores das influências, gerou-se um gráfico comparando os valores de influência de cada parâmetro em todos os tempos estudados (Figura 17). Foi possível verificar que a umidade mostrou influência positiva ao longo de todo o estudo e que o metal apresentou influência negativa no início do tratamento, confirmando uma adaptação rápida dos microrganismos presentes. Já o óleo apresentou uma influência significativa e negativa mais tardia (67 dias). Isto pode ser devido a composição do óleo cru, que é uma mistura complexa de substâncias e que muitas vezes seus produtos de degradação geram compostos ainda mais tóxicos, forçando a comunidade degradadora a se adaptar e se modificar constantemente a essa gama de substâncias (MAILA & CLOETE, 2005).

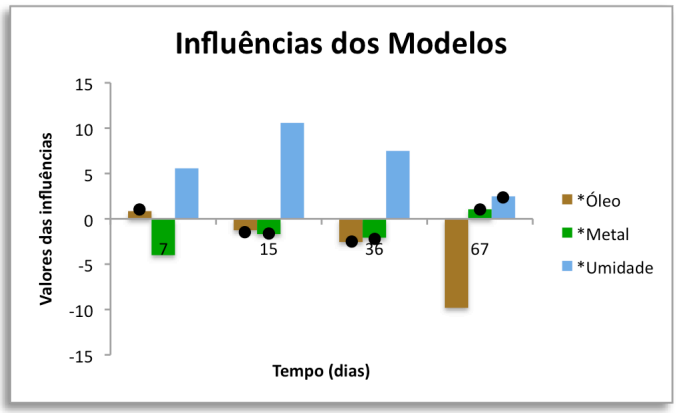

Figura 16. Gráfico com os valores das influências dos parâmetros avaliados em relação aos tempos de coleta. As esferas pretas marcam valores de influência não significativos.

5.1.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Através das análises microbiológicas foi possível determinar a quantificação de microrganismos heterotróficos totais e degradadores de óleo cru cultiváveis e estudar as alterações nos perfis das comunidades bacterianas dominantes do solo independentes de cultivo.

5.1.3.1 CONTAGEM DE HETEROTRÓFICOS TOTAIS

Os valores de contagem dos microrganismos heterotróficos totais estão apresentados na Figura 17. É possível verificar valores com ordens de grandeza muito parecidas entre si, sendo assim, difícil de visualizar diferenças significativas entre os experimentos As linhas em tons quentes (vermelho, laranja, amarelo e laranja escuro) do gráfico representam os tratamentos com baixa umidade que apresentaram valores de contagem mais baixos, se destacando dos restantes. Já as linhas em tons frios (azul, lilas, verde e roxo) mostraram valores de contagens mais altos.

Em 15 dias, o tratamento que apresentou maior contagem em relação aos demais foi o que continha quantidade mínima dos poluentes e teor máximo de água, possivelmente devido à maior velocidade de adaptação desses microrganismos sob menores concentrações de contaminantes e alto teor de umidade.

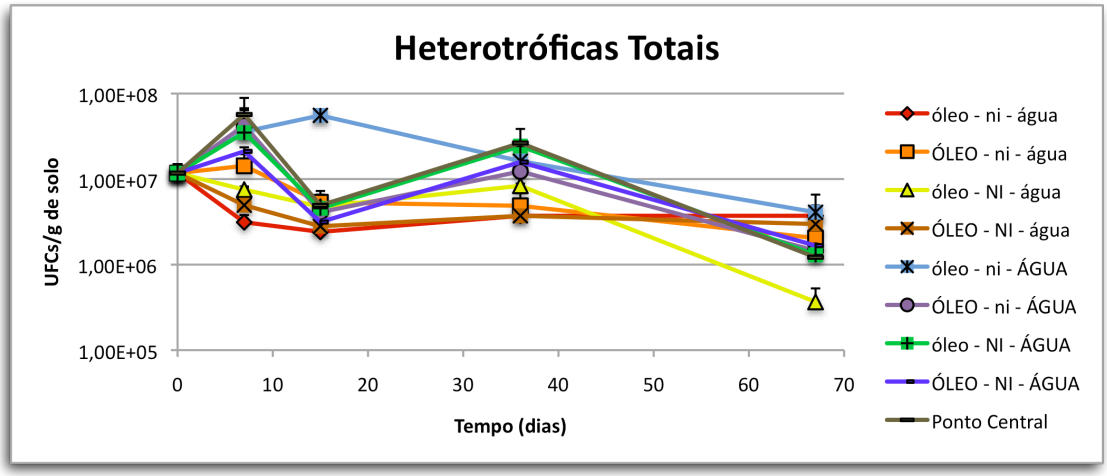

Figura 17. Gráfico da contagem de herotróficos totais (UFCs/g de solo) dos experimentos em relação aos tempos de coleta. Onde pela simbologia óleo= 0,5% p/p; ÓLEO= 5%p/p; ni= 130mg/kg; NI= 260mg/kg; água= 45% da CRA; ÁGUA= 70% da CRA.

O resultado gerado pela construção do dendrograma (Figura 18) mostrou melhor a separação dos dois grandes grupos pelo teor de umidade. A correlação cofenética, que neste caso foi de 0,955, significa que a análise de grupamento apresenta uma correlação com os dados originais representativa.

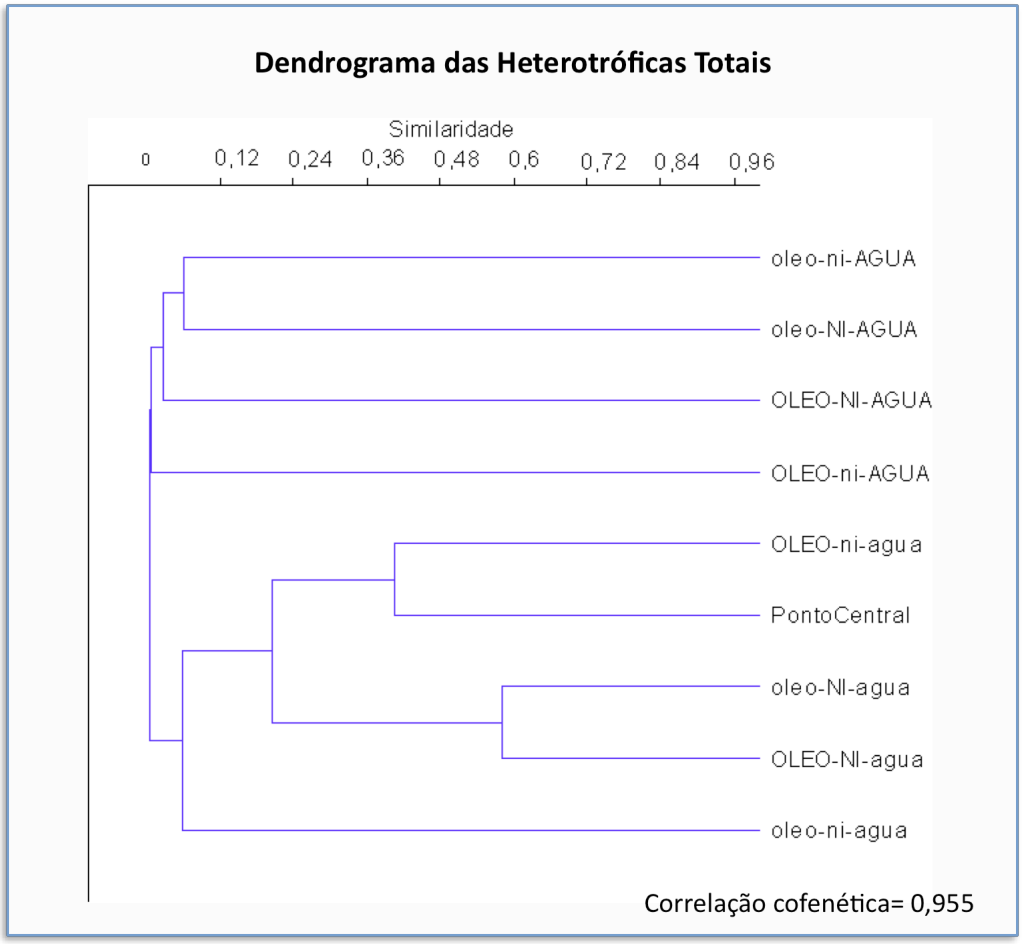

Figura 18. Dendrograma gerado a partir da matriz com os valores achados nas contagens das heterotróficas totais para cada tempo de coleta. Onde pela simbologia óleo= 0,5% p/p; ÓLEO= 5%p/p; ni= 130mg/kg; NI= 260mg/kg; água= 45% da CRA; ÁGUA= 70% da CRA

5.1.3.2 CONTAGEM DE DEGRADADORAS

Os valores de contagem de bactérias degradadoras nos diferentes tempos estão apresentados na Figura 19. Esta análise teve como objetivo avaliar o perfil dos microrganismos hidrocarbonoclásticos capazes de usar o óleo como fonte de carbono nos diferentes tratamentos. Como igualmente visto para os microrganismos heterotróficos totais, a umidade foi o fator que mais diferenciou os tratamentos. Para o tratamento contendo o ponto central, especificamente, após o sétimo dia, houve uma semelhança com os perfis dos tratamentos com menor umidade.

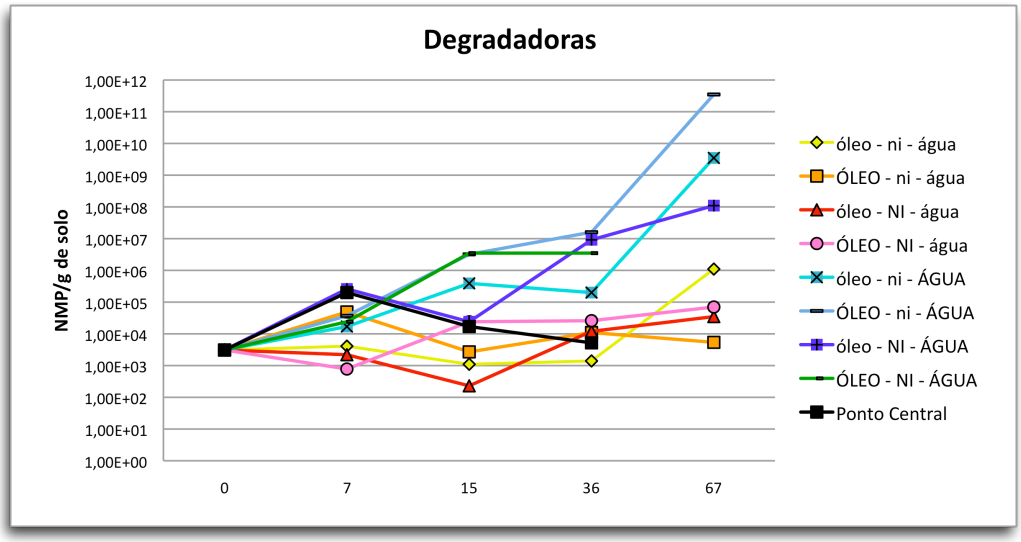

Figura 19. Gráfico com a contagem de bactérias degradadoras de óleo cru (NMP/g de solo) dos tratamentos em relação aos tempos de coleta. Onde pela simbologia óleo= 0,5% p/p; ÓLEO= 5%p/p; ni= 130mg/kg; NI= 260mg/kg; água= 45% da CRA; ÁGUA= 70% da CRA.

Para alguns tratamentos, principalmente nos tempos finais, as contagem não foram possíveis de serem realizadas pois havia a presença microrganismos (Actinobacterias) que interferiam na avaliação da técnica de NMP (Figura 20). No trabalho realizado por Telhado (2009), utilizando este mesmo solo e óleo, foi observada também a presença destes Actinobacterias nas contagens de degradadores, sendo estes identificados por seqüenciamento do gene que codifica o rRNA 16S como 9 Actinobacterias diferentes sendo de 2 gêneros diferentes (*Amycolatopsis* e *Arthrobacter*) e 1 classificado como actinobacteria não cultivado, mostrando sua prevalência e alta capacidade de adaptação ao meio. Portanto para que os resultados não fossem superestimados, não foi realizada a contagem nestes tempos.

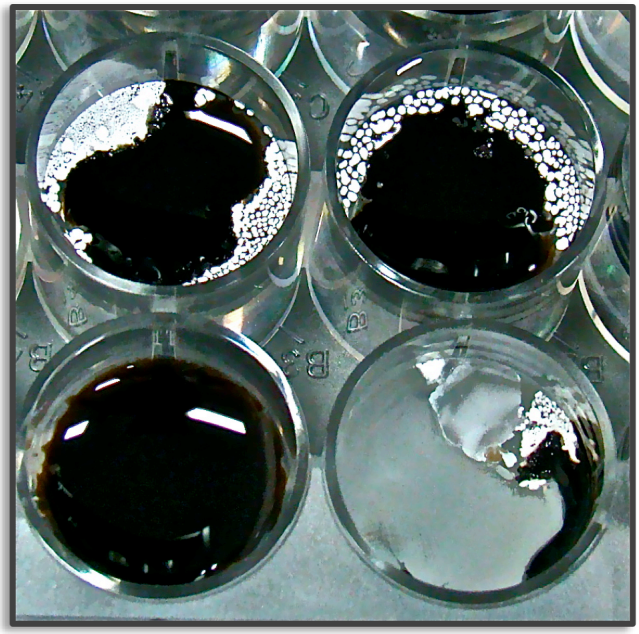

Figura 20. Fotografia da ocorrência de Actinobacterias predominantes em 4 poços das placas de contagem por NMP dos degradadores de óleo cru. Presença de colônias brancas e foscas) o qual impossibilitou a contagem de alguns pontos de coleta.

O resultado gerado pela construção do dendrograma (Figura 21) mostrou mais uma vez a separação em dois grandes grupos pelo teor de umidade, assim como ocorrido com as heterotróficas totais. A correlação cofenética, que neste caso foi de 0,8116, significa que a análise de grupamento também apresenta uma correlação com os dados originais representativa.

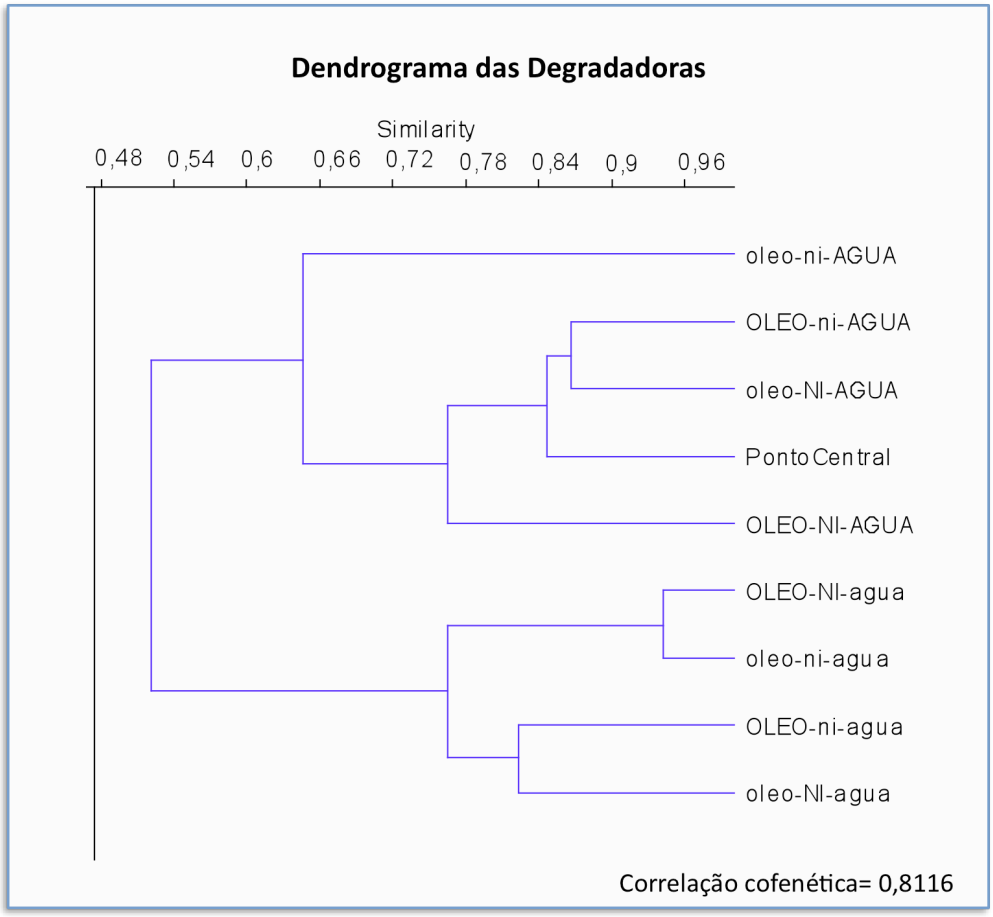

Figura 21. Dendrograma gerado a partir da matriz com os valores achados nas quantificações de degradadoras por NMP/g de solo para cada tempo de coleta. Onde pela simbologia óleo= 0,5% p/p; ÓLEO= 5%p/p; ni= 130mg/kg; NI= 260mg/kg; água= 45% da CRA; ÁGUA= 70% da CRA.

Usando esses métodos como monitoramento da atividade biológica, os resultados foram pouco discriminatórios em relação aos diferentes tratamentos, tendo apenas a umidade como um fator de influência direta e principal.

5.1.3.3 MÉTODOS MOLECULARES

5.1.3.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Com o objetivo de avaliar e identificar o possível efeito do níquel na estrutura de comunidade bacteriana do solo em questão foram escolhidos alguns dos tratamentos para serem submetidos as análises moleculares. Foram estudados diferentes níveis de óleo, níquel e umidade para avaliar o processo de biorremediação. Para fazer uma

avaliação molecular da influência do níquel, foram escolhidos os tratamentos com seus diferentes níveis, sendo o óleo fixado na concentração máxima de 5% (p/p) e a umidade em seu nível máximo, para o aproveitamento da sua influência positiva no processo.

Paralelamente foram realizados ensaios controles, um deles contendo apenas óleo (5% p/p) e o outro apenas níquel (260mg/kg), ambos com o nível máximo de umidade, para que fossem observadas as alterações isoladamente. A Tabela 18 mostra o conjunto de amostras usadas nas análises moleculares, assim como suas codificações para facilitar a avaliação dos resultados obtidos. Todas essas amostras foram analisadas em três tempos de coleta (7, 15 e 30 dias) e realizadas em triplicata.

Tabela 18. Codificação das amostras usadas para as análises moleculares.

CODIFICAÇÃO	ÓLEO	NÍQUEL
ÓLEO – ni	5%	130mg/kg
ÓLEO – NI	5%	260mg/kg
ÓLEO	5%	-
NI	-	260mg/kg

Todas as amostras continham 75% da CRA do solo

As amostras obtidas através da extração de DNA geraram bandas visíveis e únicas no gel de agarose. Já a analise no Nanodrop mostrou baixo teor de impurezas para todas as amostras, isto é a relação de absorbância de 260nm/280nm atingiu valores próximos a 1,8, o que significa um baixo teor de proteínas presentes.

5.1.3.3.2 PCR-DGGE

Os perfis de bandas gerados usando os iniciadores para gene que codifica o rDNA 16S (Figura 22) se mostram muito parecidos entre si, além de apresentarem muitos ribotipos em cada amostra. Portanto, não foi possível visualizar diferenças claras entre os diferentes tratamentos.

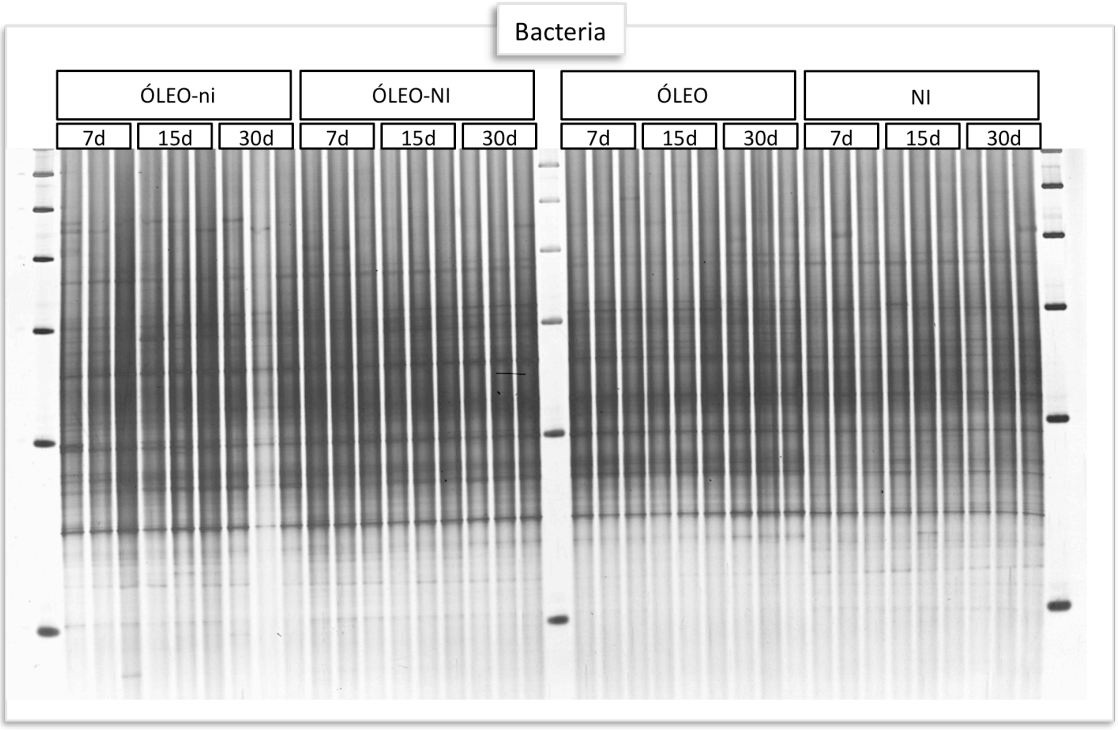

Figura 22. Imagem do gel de DGGE para o gene que codifica o rRNA 16S do domínio Bacteria. ÓLEO = 5% de óleo; NI = 260 mg/kg; ni = 130 mg/kg. Os valores seguidos da letra d (de dias) são referentes aos tempos de coleta.

O gel gerado pelo uso dos iniciadores que codificam o gene rDNA 16S de Actinobacteria apresentou as mesmas características observadas para o Domínio Bactéria, porém, foi possível verificar o comportamento peculiar de uma banda nas diferentes amostras, indicada pela seta vermelha na Figura 23 A intensidade desta banda é maior nos tratamentos contendo níquel, em relação ao tratamento contendo somente óleo. Tal aspecto pode estar relacionado com a possível capacidade de adaptação desse ribotipo à presença do metal.

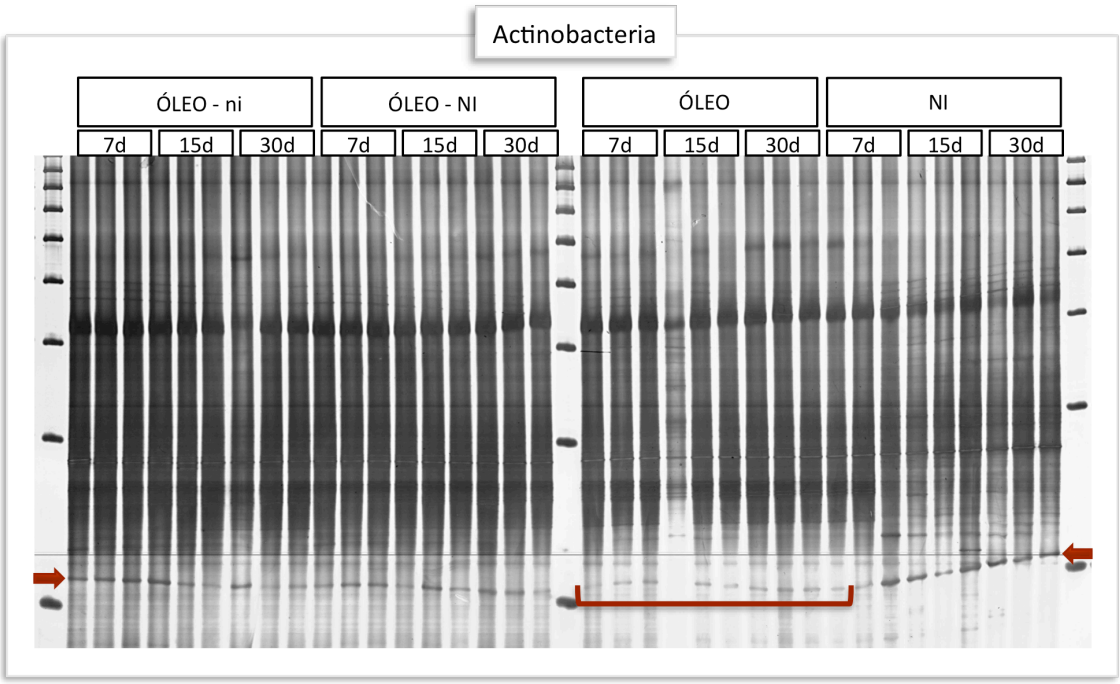

Figura 23. Imagem do gel de DGGE para o 16S do filo Actinobacteria. ÓLEO = 5% de óleo; NI = 260 mg/kg; ni = 130 mg/kg. Os valores seguidos da letra d (de dias) são referentes aos tempos de coleta. As setas em vermelho apontam a linha de bandas que foram influênciadas em sua intensidade pela presença do níquel.

O comportamento dos perfis de bandas gerados para o gel de α-proteobacteria (Figura 24) foi bem parecido com o obtido para o domínio Bactéria. Apesar de ter uma riqueza de ribotipos, também não foi possível visualizar diferenças entre os diferentes tratamentos.

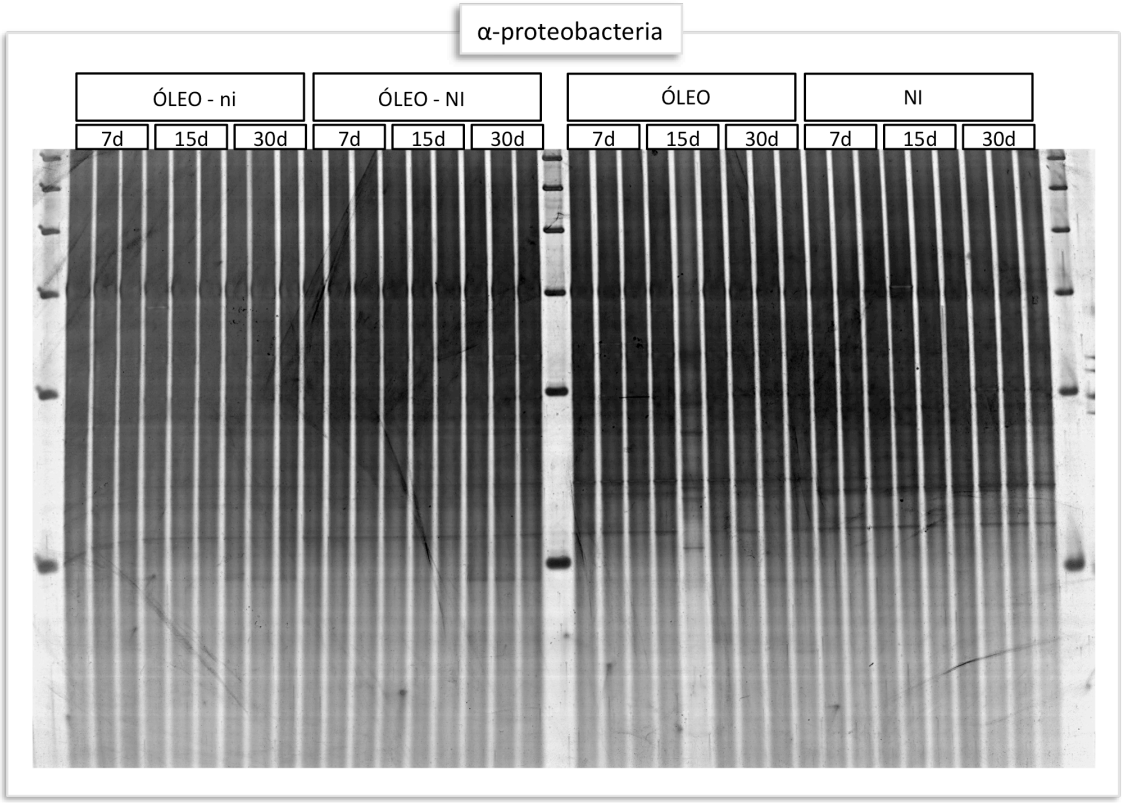

Figura 24. Imagem do gel de DGGE para o 16S da classe α-proteobacteria. ÓLEO = 5% de óleo; NI = 260 mg/kg; ni = 130 mg/kg. Os valores seguidos da letra d (de dias) são referentes aos tempos de coleta.

Os perfis obtidos para o grupo das γ-proteobacterias (Figura 25) também se mostraram ricos em ribotipos, porém com diferenças visíveis entre os tratamentos. O sistema contendo apenas níquel se mostrou diferente dos demais, e comparado ao sistema contendo óleo (5%) e níquel (260mg/kg) apresentou diferenças principalmente no que diz respeito a intensidade das bandas (marcação em verde).

A diferença de intensidade das bandas entre as amostras com diferentes concentrações de níquel (130mg/kg e 260mg/kg) na presença de óleo (5%p/p), no tempo de 7 dias, estão marcadas em vermelho. Essa alteração foi a que mais se relacionou com os resultados obtidos de remoção do óleo cru. A diminuição da intensidade das bandas nos tratamentos com o nível máximo de níquel nesse período em relação ao nível mínimo pode estar relacionada ao atraso ocorrido na degradação do óleo.

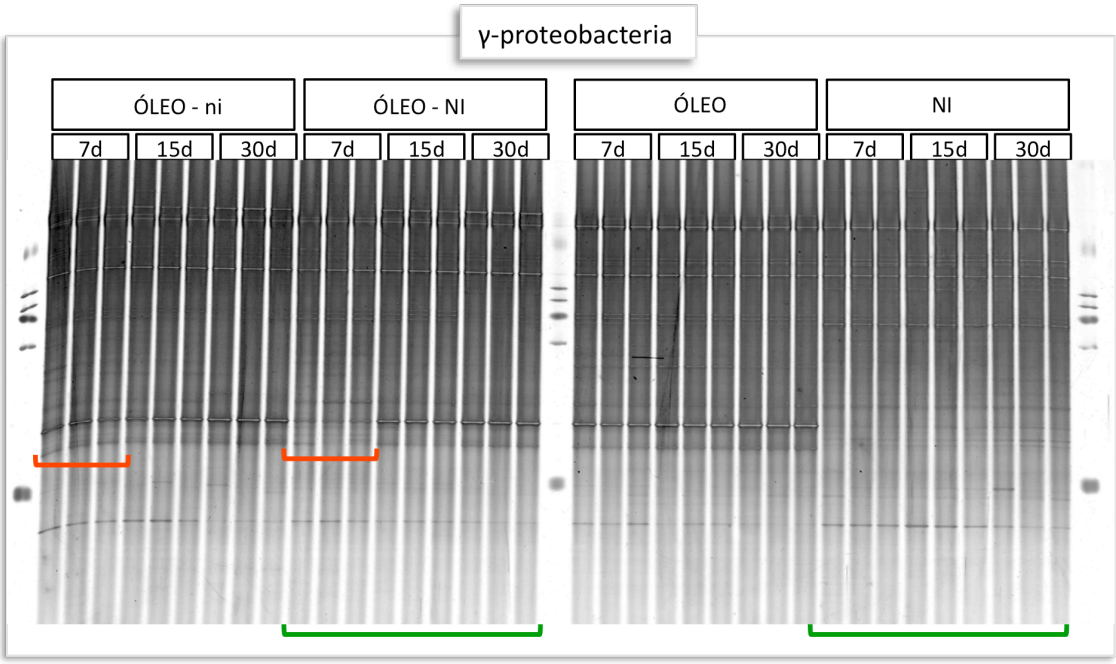

Figura 25. Imagem do gel de DGGE para o 16S da classe γ-proteobacteria. ÓLEO = 5% de óleo; NI = 260 mg/kg; ni = 130 mg/kg. Os valores seguidos da letra d (de dias) são referentes aos tempos de coleta. As indicações em vermelho mostram as diferenças nos grupos de bandas dos tratamentos com baixo e alto teor de Ni. Em verde, as diferenças entre os tratamentos com 260mgkg de Ni na presença e ausência de óleo (5%).

Para uma análise mais robusta dos perfis gerados foi feito para cada marcador, por matriz de similaridade (coeficiente de Bray-Curtis), um gráfico de PCoA mostrado na Figura 26. Estes gráficos mostram a dispersão espacial das amostras e cada cor refere-se a cada tratamento (ÓLEO-ni, ÓLEO-NI, ÓLEO e NI). A observação mais clara para todos os marcadores avaliados, foi a separação do tratamento NI (concentração de níquel alta) do restante das amostras, portanto quando havia a presença do óleo na amostras essas se alteravam para um perfil mais similar entre si, o que demonstra que o óleo foi o parâmetro de maior influência na estrutura da comunidade bacteriana neste estudo.

No trabalho de Evans e colaboradores (2004), usando a mesma técnica de DGGE, foi possível visualizar alterações nas comunidades microbianas provocadas pelo contaminante orgânico (óleo cru) e também pela adição de nutrientes (compostos inorgânicos como fósforo, potássio, cálcio e magnésio) para a aplicação da técnica do bioestímulo.

Analisando as amostras com os dois diferentes níveis de multicontaminação com níquel em relação a amostras apenas contaminadas com óleo, foi possível verificar a similaridade entre elas, demonstrando que apenas a presença do níquel no solo contaminado por óleo, independentemente de sua concentração, é capaz de gerar a alteração.

As γ-proteobacterias se mostraram mais sensíveis as alterações provocadas pelos contaminantes, o que foi possível de observar através da comparação entre os tratamentos Óleo-ni e Óleo-Ni no tempo de 7 dias. Estes se destacaram na parte central do gráfico em relação às outras amostras e entre si. Estes resultados se relacionam com os obtidos com a degradação do óleo nesse período, que mostra um atraso pelo alto teor de níquel no sistema.

Popp e colaboradores (2006) encontraram uma grande participação das γ-proteobacterias na biodegradação de hidrocarbonetos durante processo de biorremediação, descrevendo que nesta classe se encontram vários grupos de microrganismos degradadores, entre eles Pseudomonas e Arthrobacter, sendo então de grande destaque nos estudos de biorremediação.

O trabalho realizado por Gomes e colaboradores (2008) avaliou a estrutura da comunidade microbiana de sedimentos de mangue eutrofizado, com diferentes níveis de contaminação por hidrocarbonetos, em diferentes locais da Baía de Guanabara. A análise da estrutura da comunidade bacteriana total não foi capaz de discriminar as amostras com diferentes níveis de contaminação. Porém, usando marcadores moleculares para *Actinobacteria* e *Proteobactéria* , houve aumento da resolução dessas alterações calculadas por teste de permutação, mostrando a significância das diferenças entre os diferentes locais estudados.

Eles justificaram este fato usando o calculo do índice de Shannon que revelou uma alta diversidade microbiana, o que diminuiria a parcela de microrganismos afetados pelos contaminantes e que a alteração obtida pode ter ocorrido por perda de abundância. É Importante ressaltar que o grupo das *Pseudomonas* foi o que mais se associou com as contaminações por hidrocarbonetos.

A alta diversidade microbiana no ambiente está associadas a múltiplas funções o que acarreta em uma maior estabilidade do ambiente na presença de contaminantes (HOOPER *et al.*, 2005), esta estabilidade pode ser observada nos experimentos deste trabalho pela baixa diferenciação dos grupos na análises de PCoA, mesmo essas diferenças sendo significativas.

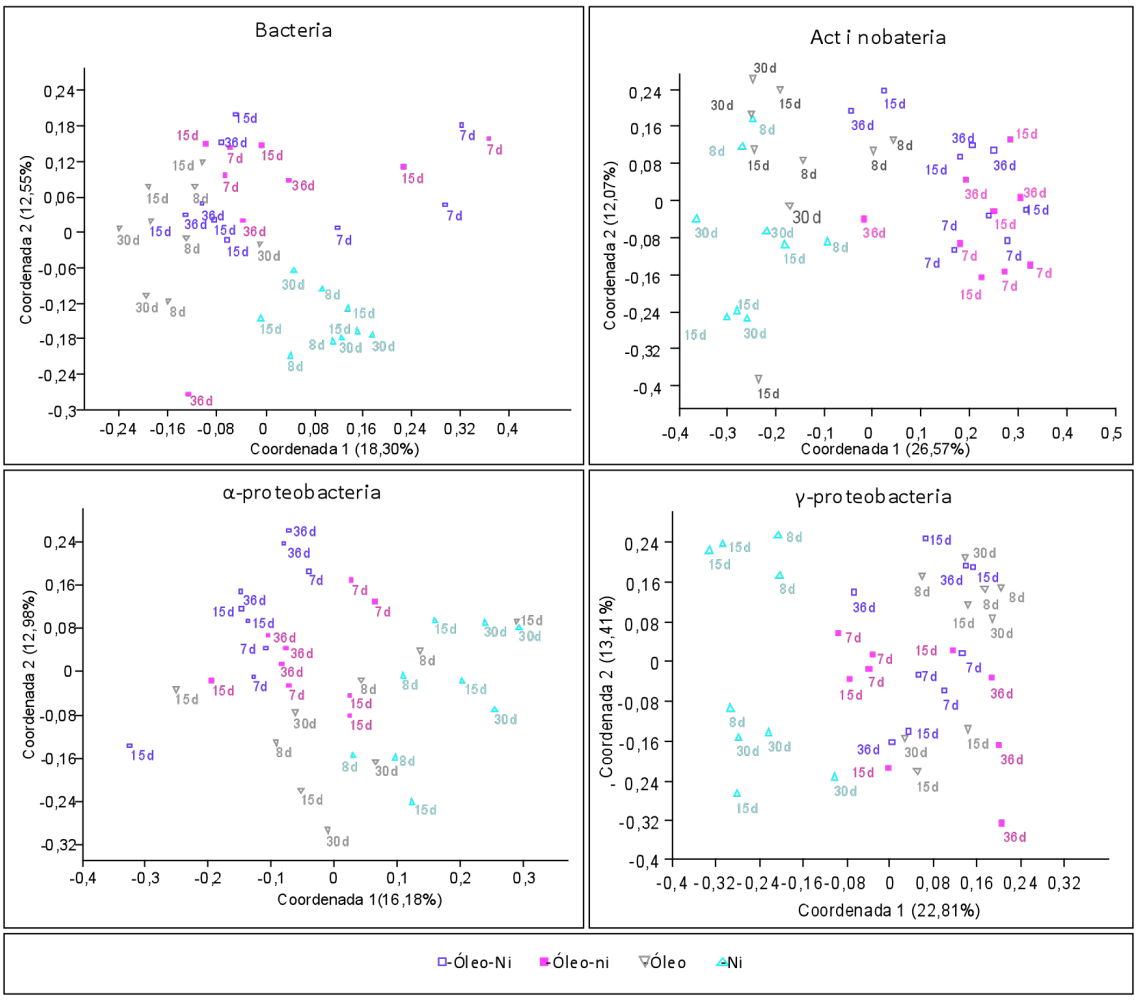

Figura 26. Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de DGGE obtidos dos experimentos em microcosmos. PCoA obtido a partir de matriz de similaridade calculada pelo método de Bray-Curtis. Os gráficos representam as comunidades bacteriana total, de actinobacterias, α- e γ-proteobacterias conforme indicado acima dos gráficos. Os tratamentos estão separados por cores e formas conforme indicado na legenda. Valores próximos os pontos representam o tempo de tratamento.

As análises de similaridades feitas pelo teste ANOSIM utilizam o método Bray-curtis, que se baseia em uma matriz de similaridade para comparar as diferentes condições de tratamento testadas. Na Tabela 19 estão apresentados os valores de R que

diferenciam os tratamentos. Portanto, quanto menor o valor de R, mais parecidos são os tratamentos. Os valores entre parênteses referem-se ao valor de *p* que quando menor que 0,05 conferem significância estatística na diferenciação dos tratamentos.

Em relação aos resultados obtidos, apenas a relação entre os tratamentos Óleo-Ni e Óleo-ni de Actinobacteria obtiveram diferenças não significativas, sendo portanto consideradas iguais. Por outro lado, o tratamento Ni se destacou em todos os marcadores moleculares por ser o que obteve os maiores valores de R, e portanto o que mais se diferenciou do restante.

Tabela 19. Analises de similaridade (ANOSIM) dos perfis de DGGE entre os diferentes tratamentos.

Bacteria			
	Óleo-ni	Óleo-Ni	Ni
Óleo-ni	0		
Óleo-Ni	0,1101* (0,0476)**	0	
Ni	0,4571 (<0,00001)	0,4628 (0,0001)	0
Óleo	0,2932 (0,0002)	0,1638 (0,0087)	0,7356 (<0,0001)

Actinobacteria			
	Óleo-ni	Óleo-Ni	Ni
Óleo-ni	0		
Óleo-Ni	**0,0823 (0,1438)**	0	
Ni	0,8114 (<0,00001)	0,7922 (<0,00001)	0
Óleo	0,583 (<0,00001)	0,4472 (0,0005)	0,2545 (0,0044)

α-proteobacteria			
	Óleo-ni	Óleo-Ni	Ni
Óleo-ni	0		
Óleo-Ni	0,2191 (0,0055)	0	
Ni	0,4247 (0,0001)	0,7178 (<0,0001)	0
Óleo	0,2179 (0,0026)	0,41840 (0,00001)	0,3416 (0,001)

γ-proteobacteria			
	Óleo-ni	Óleo-Ni	Ni
Óleo-ni	0		
Óleo-Ni	0,2383 (0,0100)	0	
Ni	0,6187 (<0,00001)	0,7771 (<0,00001)	0
Óleo	0,3573 (<0,00001)	0,3824 (0,0004)	0,9057 (<0,00001)

Valores em negrito indicam correlações não significativas entre as matrizes (>0,05).
*- Valores representam os valores de R observados.
**- Valores entre parênteses representam os valores de *p* observados.

Levando tais resultados em consideração, é possível concluir que o óleo foi o fator de maior influência na alteração das comunidades bacterianas avaliadas.

Para a avaliação da similaridade entre os diferentes marcadores moleculares foi usado o teste de Mantel (Tabela 20). Este utiliza a matriz de Bray-curtis, porém o valor de R dado reflete o grau de similaridade (quanto maior o valor de R, maior a similaridade). Os valores entre parênteses mostram o valor de *p*, sendo que apenas os valores em negrito foram significativos.

Conforme o teste de Mantel, o comportamento das γ-proteobacterias foi significativamente parecido com o comportamento das Actinobacterias e das bactérias.

Tabela 20. Teste de Mantel para os diferentes marcadores utilizados no DGGE.

	Actinobacteria	α-proteobacteria	Bactéria
Actinobacteria			
α-proteobacteria	0,107* (0,119)**		
Bacteria	-0,289 (0,515)	-0,095 (0,830)	
γ-proteobacteria	**0,183 (0,021)**	0,084 (0,176)	**0,266 (0,014)**

Valores em negrito indicam correlações significativas entre as matrizes.
#- Matrizes de similaridade obtidas por Bray-Curtis.
*- Valores representam os valores de R observados.
**- Valores entre parênteses representam os valores de *p* observados.

5.2 ENSAIO EM BIORREATOR

Para a avaliação em escala ampliada do processo de biodegradação do óleo cru na presença de níquel, foi selecionada a condição com os níveis altos estudados (5% óleo e 260mg/kg do metal) e o melhor teor de umidade obtido na etapa anterior (70% da CRA) .

5.2.1 REMOÇÃO DO ÓLEO

A Figura 27 apresenta o gráfico do percentual de remoção de óleo entre as duas diferentes escalas testadas (microcosmos e biorretor de bancada), sendo importante ressaltar que os microcosmos foram mantidos com um controle maior da temperatura,

em torno de 25°C, e o biorreator foi mantido em temperatura ambiente em torno de 40°C (período do verão).

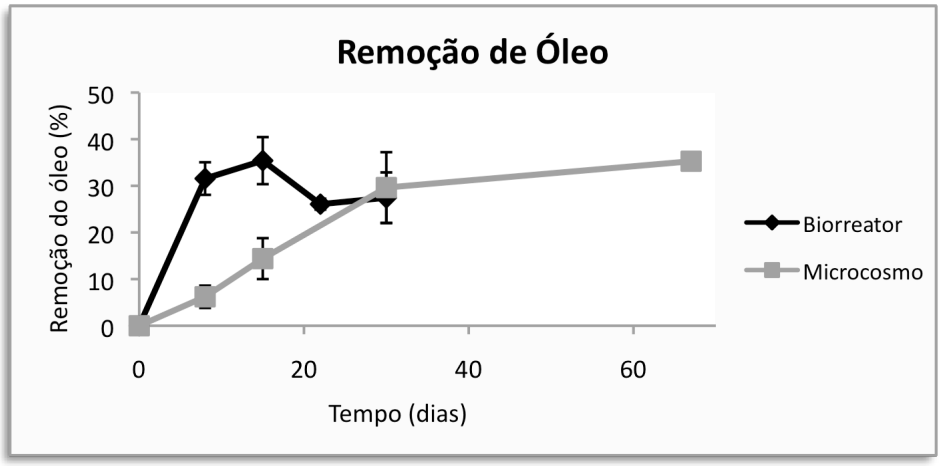

Figura 27. Gráfico com as porcentagens de degradação obtidas.

Foi possível observar a eficiência da ampliação de escala, onde há um aumento da remoção de óleo nos 20 primeiros dias, mostrando uma aceleração inicial no processo de biodegradação. As diferentes temperaturas utilizadas também podem ter uma relação direta com as diferenças de remoção observadas entre o ensaio em microcosmo e no biorreator. Ao final de 30 dias o percentual de remoção foi muito próximo nos dois sistemas (em torno de 35% de remoção do óleo cru), sugerindo que a ampliação de escala se mostrou eficiente na biodegradação do óleo cru.

No trabalho desenvolvido por Rizzo e colaboradores (2010), que utilizou os mesmos biorreatores deste trabalho, observou-se de forma clara o efeito negativo do aumento da umidade pela formação de aglomerados do solo, que por sua vez tinha característica argilosa. Isto agravava o problema, e o nível máximo de umidade utilizado neste caso foi de 60% da CRA. Já no presente estudo, o valor máximo de umidade que não interferia operacionalmente no biorreator foi de 70% da CRA. Isto pode ter relação com o aumento da eficiência de remoção.

5.2.2 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

5.2.2.1 CONTAGEM DE HETEROTRÓFICAS TOTAIS

Com relação as contagens de microrganismos, houve no biorreator um aumento inicial do numero de bactérias heterotróficas totais (de 1,21E+05 para 1,35E+06 UFC/g de solo) que depois se manteve estável, em contraste com os valores obtidos no microcosmo que oscilou entre 1E+06 e 1E+07 UFC/g de solo (Figura 28).

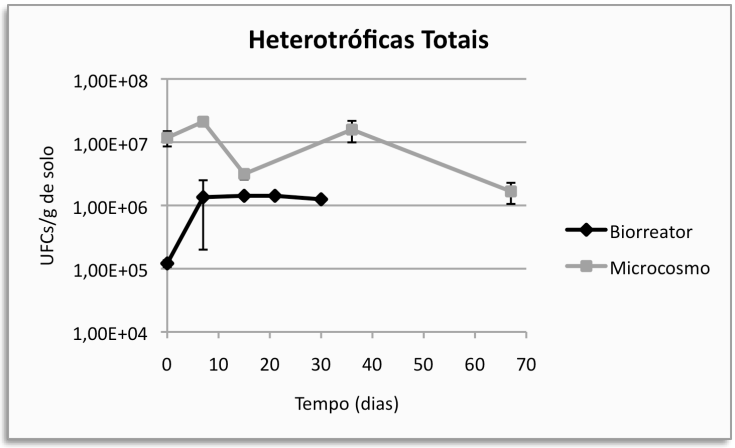

Figura 28. Gráfico com as contagens de heterotróficas totais obtidas no biorreator e nos microcosmos.

5.2.2.2 CONTAGEM DE DEGRADADORAS DE ÓLEO

Os microrganismos degradadores de óleo cru tiveram um comportamento igual até os 15 primeiros dias depois o microcosmo se manteve estável e o biorreator continuou aumentando (Figura 29).

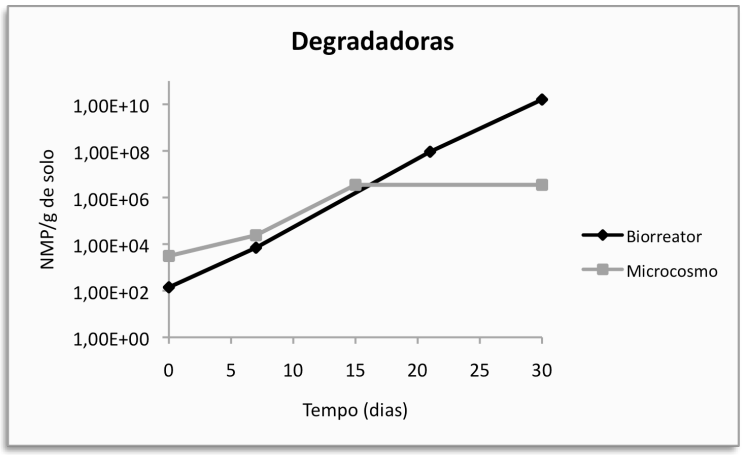

Figura 29. Gráfico comparando as contagens de degradadoras de óleo cru obtidas no biorreator em comparação as obtidas nos microcosmos.

Os resultados de contagens de microrganismos heterotróficos totais obtidos para o biorreator não refletiram os eventos de degradação ocorridos, mostrando a não eficácia eventual das técnicas dependentes de cultivo que avaliam uma parcela muito pequena dos microrganismos do solo.

5.2.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

No trabalho de Rizzo e colaboradores (2010) que usou o mesmo biorreator com mesmo tipo de solo, concentração de óleo e regime de operação. Foram alcançados níveis de degradação de óleo cru de aproximadamente 20 e 35% na melhor condição testada (incluindo bioestímulo com uréia e adição de material estruturante) para o ensaio em microcosmo e biorreator, respectivamente. Neste trabalho também observamos uma melhora no processo de biorremediação, porém esta melhora ocorreu em um aumento da velocidade de remoção do óleo.

No estudo de Alisi e colaboradores (2009) foi desenvolvida uma técnica de bioaumento utilizando microrganismos hidrocarbonoclásticos selecionados pela resistência a metais pesados (chumbo, zinco, cobre, níquel, cobalto, cromo e cádmio), e foi obtida uma eficiência de remoção de 100% para vários compostos orgânicos presentes no diesel (C12 à C20 e fenantreno). Muito desta capacidade de resistência está associada a estruturas celulares que anulam a toxidez do metal, seja por imobilização na sua

superfície da célula ou no meio extracelular através da síntese de moléculas como os polissacarídeos, por exemplo (WANG *et al.*, 2009) .

A compreensão da interação dos contaminantes com o ambiente é imprescindível para uma boa avaliação risco. Quanto maior o número de contaminantes envolvidos, maior a complexidade dessas interações e mais difícil se torna a construção da avaliação de risco, assim como a aplicação de um tratamento de descontaminação.

O petróleo por si só já é formado por um grupo muito grande de substâncias que em sua maior parte são tóxicas e recalcitrantes no ambiente. O principal tipo são as substâncias orgânicas, porém as substâncias inorgânicas também estão presentes, sendo que os metais pesados são as que oferecem maior risco ao ambiente. Esses metais não são degradados nem destruídos, se acumulando e ampliando o seu efeito deletério aos processos biológicos do ambiente.

No caso de multicontaminação por petróleo e metais, as formas físico-químicas do metal são diretamente afetadas, o que acarreta na necessidade de remoção primeiramente dos compostos orgânicos para posterior tratamento de remoção do metal.

Ainda há necessidade do desenvolvimento de estudos não só para o maior entendimento das interações dos contaminantes com o ambiente, mas também o desenvolvimento de estratégias que minimizem esses efeitos tóxicos à atividade biológica que é necessária em sua integral complexidade para a manutenção do equilíbrio biológico no solo.

6 CONCLUSÃO

Unindo todas as informações geradas neste trabalho, foi possível concluir:

- que a umidade foi o fator de maior significância nos primeiros 30 dias de tratamento, onde ocorrem os maiores valores de remoção de óleo;
- que o níquel provocou um atraso na degradação dos hidrocarbonetos nos ensaios em microcosmos, nos primeiros 7 dias de tratamento;
- que as características do solo utilizado, assim como sua diversidade microbiana, foram capazes de favorecer uma rápida adaptabilidade dos microrganismos a presença do níquel, atingindo em 30 dias de tratamentos, valores de remoção similares entre as diferentes concentrações do metal testadas;
- que as contagens microbiológicas por métodos dependentes de cultivo, não foram capazes de discriminar os tratamentos tendo os contaminantes usados como parâmetro;
- que as análises microbiológicas independentes de cultivo foram capazes de discriminar os tratamentos usados.
- que a sobreposição dos tratamentos na análise de PCoA teve relação com a influência do óleo na estrutura da comunidade microbiana;
- que foram obtidos níveis de remoção de óleo de aproximadamente 30%, tanto em microcosmo em 15 dias, quanto em biorreator em 7 dias, levando em consideração uma multicontaminação de 5% p/p de óleo cru acrescido de 260 mg/kg de níquel;
- que o estudo em microcosmo foi representativo para posterior ampliação de escala, gerando valores de remoção similares.

7 SUGESTÕES

- Avaliar a influência da temperatura na operação do biorreator;
- Testar com outros metais de interesse que possam estar presentes em sítios contaminados;
- Desenvolver estratégia para diminuição da toxidez do metal como a aplicação de bactérias que produzam substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e que poderão ser usados na adsorção do metal e diminuição de sua toxidez;

8 REFERÊNCIAS

ACCIOLY, A.M.A. & SIQUEIRA, J.O. 2000. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R.F., ALVAREZ, V.H., SCHAEFER, C.E.G.R. (Ed.) Tópicos em ciência do solo. Viçosa: SBCS. 299-352.

ALEF, K. & NANNIPIERI, P. 1995. (Eds.). Methods in applied soil microbiology and biochemistry. San Diego: Academic. 101- 102.

ALEXANDER, M. 1994. Biodegradation and bioremediation. (San Diego, Academic Press Inc).

ALEXANDER M. 1999. Biodegradation and bioremediation. 2nd edn. London: Academic Press.

ALISI, C., MUSELLA, R, TASSO, F, UBALDI, C., MANZO, S., CREMISINI, C. & SPROCATI, A. R. 2009. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance.Science of the Total Environment. 407: 3024–3032.

AL-SALEH, E. & OBUEKWE, C. 2005. Inhibition of hydrocarbon bioremediation by lead in a crude oil-contaminated soil. U.S. Patent 1. International Biodeterioration & Biodegradation 56:1-7.

AMOR, L.;KENNES, C. & VEIGA, M.C. 2001. Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals. Bioresource Technology, v. 78, p.181-185.

AN, H.R., MAINELIS, G., & WHITE, L. 2006. Development and calibration of real-time PCR for quantification of airborne microorganisms in air samples. Atmospheric Environment 40: 7924-7939.

ATLAS, R. M. 1991. Microbial hydrocarbon degradation - bioremediation of oil-spills. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 52:149-156.

BALIEIRO, F.C., CHAER, G.M., REIS, L.L., FRANCO, N.O. & FRANCO, A.A. 2005. Qualidade do solo em áreas degradadas. XXX Congresso Brasileiro de Ciências do Solo. Trabalho completo em anais de congresso. Recife – PE.

BEIJERINCK, M. 1913. De infusies en de ontdekking der bacterien, jaarboek van de koninkijke akademie v. Wetenschappen. (Amsterdam, Muller).

BOON, N., WINDT, W., VERSTRAETE, W. & TOP, E.M. 2002. Evaluation of nested PCR-DGGE (desnaturing gradient gel eletrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different waste-water treatment plants. FEMS Microbiol. Ecol. 39:101-12.

BUCKLEY, D. H., HUANGYUTITHAM, V., NELSON, T. A., RUMBERGER, A. & THIES, J. E. 2006. Diversity of planctomycetes in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity Applied and Environmental Microbiology, 72:4522-4531.

CETESB. Manual de gerenciamento de águas contaminadas, seção 6530. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/anexos/download/6530.pdf > Acesso em 29 de jun.2010.

CHANDER, K. & BROOKES, P.C. 1991. Is the hydrogenase assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils. Soil Biology and Biochemistry 23, 909–915.

CHO, J. C. & TIEDJE, J. M. 2000. Biogeography and degree of endemicity of fluorescent pseudomonas strains in soil. Applied and Environmental Microbiology, 66:5448-5456.

CLARKE, K.R. 1993. Nonparametric Multivariate Analyses of Changes in Community Structure. Australian Journal of Ecology 18: 117-143.

COLEMAN, D.C., DIGHTON, J., RITZ, K. & GILLER, K.E. 1994. Perspectives on the compositional and functional analysis of soil communities. In: RITZ, K., DIGHTON, J., GILLER,K.E. (Eds), Beyond the biomass. Wiley-Sayce, New York, 261-271.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N^0 420, de 28 de dezembro de 2009.

CORRÊA, O.L.S. 2003. Petróleo: noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia. Rio de janeiro: Ed. Interciência.

COYNE, M.S. 1999. Soil microbiology – exploratory approach. London: Delman.

CRUMP, B. C., ADAMS, H. E., HOBBIE, J. E. & KLING, G. W. 2007. Biogeography of bacterioplankton in lakes and streams of an arctic tundra catchment. Ecology, 88:1365-1378.

CRUMP, B. C., HOPKINSON, C. S., SOGIN, M. L. & HOBBIE, J. E. 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: Combined influences of bacterial growth and residence time. Applied and Environmental Microbiology, 70:1494-1505.

CUNHA, C.D. 2004. Avaliação de diferentes tecnologias de biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente. 176p. Tese (Doutorado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil).

CUNHA, C. D. & LEITE, S. G. F. 2000. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. Brazilian Journal of Microbiology, 31:45-49.

CURTISS, T.P., SLOAN, W.T. & SCANNELL, J.W. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (16): 10234-36.

DA SILVA, K.R.A., SALLES, J.F., SELDIN, L. & VAN ELSAS, J.D. 2003. Application of a novel Paenibacillus- specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of Paenibacillus spp. in the maize rhizosphere. J. Microbiol. Methods. 54:213-31.

DERMONT, G., BERGERON,M., MERCIER, G. & RICHER-LAFLÈCHE, M. 2008. Metal-contaminated soils: remediation practices and treatment tecnologies. Pratice periodical of hazardous, toxic, and radioactive waste management, v.12, p.188-209.

DOBLER, R., SANER, M. & BACHOFEN, R. 2000. Population changes of soil microbial communities induced by hidrocarbon and heavy metal contamination. Bioremediation Journal, v.4, p.41-56.

ESCHER, B., BEHRA, R. EGGEN, R. & FENT, K. 1997. Molecular mechanisms in ecotoxicology: an interplay between environmental chemistry and biology. Chinia 51, 477-488.

EVANS, F.F., SELDIN, L., SEBASTIAN, G.V., KJELLEBERG, S., HOLMSTRON, C. & ROSANDO, A.S. 2004. Influence of petroleum contamination and bioestimulation treatment on the diversity of Pseudomonas spp., in soil microcosms as evaluated by 16S rRna based PCR and DGGE. Letters in Applied Microbiology, 38: 93-98,.

FRANCO, N.O., CARMO, F.L., PEIXOTO, R.S. & ROSADO, A.S. 2006. Métodos moleculares para análise de comunidades microbianas em ambientes aquáticos: I. Extração de DNA. Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia. 35(1): 4-9.

FRANCO, N.O., CUNHA, C.D. & ROSADO, A.S. 2006. Métodos moleculares para análise de comunidades microbianas em ambientes aquáticos: II.DGGE. Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia. 35(3): 67-71.

FRANCO, N.O., TAKETANI, R.G. & ROSADO, A.S. 2006. Métodos moleculares para análise de comunidades microbianas em ambientes aquáticos: II.PCR. Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia. 35(2): 56-59.

FURUKAWA, K., NODA, N., TSUNEDA, S., SAITO, T., ITAYAMA, T. & INAMORI, Y. 2006. Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase a gene. Journal of Bioscience and Bioengineering 102: 90-96.

GADD, G.M. & WHITE, C 1993. Microbial treatment of metal pollution – a working biotechnology? TIBTECH, 11: 353-359.

GALVEZ-CLOUTIER, R. & DUBE, J. S. 2002. "Impact of residual NAPL on water flow and heavy metal transfer in a multimodal grain size soil under saturation conditions: Implications for contaminant mobility." *ASTM Special Technical Publication*, West Conshohocken, Pa. 126–137.

GARBEVA, P., VAN VEEN, J. A. & VAN ELSAS, J. D. 2003. Assessment of the diversity, and antagonism towards Rhizoctonia solani AG3, of Pseudomonas species in soil from different agricultural regimes. FEMS Microbiology Ecology 47(1):51-64.

GARBEVA, P, VAN VENN, J.A. & VAN ELSAS, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppres- siveness. Annu Rev Phytopatol 42:243–270.

GELSOMINO, A, KEIJZER-WOLTERS, A., CACCO, G. & VAN ELSAS, J.D. 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel eletrophoresis. J. Microbiol. Methods. 38:1-15.

GOMES, N.C.M., BORGES, L.R., PARANHOS R., PINTO, F.N., MENDONÇA-HAGLER, L.C.S. & SMALLA, K. 2008. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. FEMS Microbiology Ecology. 66(1):96 – 109.

GOMES, N.C.M., HEUER, H., SCHONFELD, J., COSTA, R., MENDONCA-HAGLER, L. & SMALLA, K. 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (Zea mays) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel eletrophoresis. Plant Soil 232:167-80.

GYAMFI, S., PFEIFER, U., STIERSCHNEIDER, M. & SESSITCH, A. 2002. Effects of transgenic glucosinate- tolerant oilseed rape (Brassica napus) and the associated herbicide application on eubacterial and Pseudomonas communities in the rhizosphere. FEMS Microbiol. Ecol. 41:181- 90.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T. & RYAN, P.D. 2001. Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica 4: 9.

HEAD, L.M., SAUNDERS, J.R. & PICKUP, R.W. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. Microbial ecology. 35: 1-21.

HENCKEL, T., FRIEDRICH, M. & CONRAD, R. 1999. Molecular analyses of the methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S rRNA, particulate methane monooxigenase, and methanol dehydrogenase. Appl. Environ. Microbiol. 65:1980- 90.

HEUER, H. KRSEK, M., BAKER, P., SMALLA, K. & WELLINGTON, E.M.H. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of gene encoding 16S rDNA and gel-eletrophoretic separation in denaturing gradient. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3233-41.

HILL, E. C. 1984. Biodegradation of petroleum products. in: Atlas, R. M. Petroleum microbiology. (McMillan Publishing Co, New York) 579-612.

HOOPER, D. U., CHAPIN, F. S., EWEL, J. J., HECTOR, A., INCHAUSTI, P., LAVOREL, S., LAWTON, J. H., LODGE, M D., LOREAU, M., NAEEM, S., SCHMID, B., SETÄLÄ, H., SYMSTAD, A. J., VANDERMEER, J. & WARDLE, D. A. 2005. Effects of biodiversity on

ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. Ecological Monographs. 75(1):3-35.

IRHA N., SLET, J. & PETERSELL, V.. 2003. Effect of heavy metals and PAH on soil assessed via dehydrogenase assay. U.S. Patent 8. Environment international 28:779-82.

JACKSON, L.E., CALDERON, F.J., STEENWERTH, K.L., SCOW, K.M. & ROLSTON, D.E. 2003. Response of soil microbial processes and community structure to tillage events and implications for soil quality. Geoderma, 114: 305-317.

JANSSEN, P.H., YATES, P.S., GRINTON, B.E., TAYLOR, P.M. & SAIT, M. 2002. Improved Culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria and Verrucomicrobia. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2391-96.

KELLY, J.J. & TATE, R.L., 1998. Use of BIOLOG for the analysis of microbial communities from zinc contaminated soils. Journal of Environmental Quality 27, 600–608.

KELLY, J.J., HAGGBLOM, M. & TATE, R.L. 1999. Effects of the land application of sewage sludge on soil heavy metal concentrations and soil microbial communities. Soil Biology and Biochemistry 31, 1467–1470.

KENNEDY A.C. & SMITH K.L. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. Plant and soil, 170: 75-86.

KNOX, E.G. & GILMAN, E.A. 1997. Hazard proximities of childhood cancers in Great Britain from 1953–80. Journal of Epidemiology Community. H. 51, 151–159.

KORDA, A., SANTAS, P., TENENTE, A. & SANTAS, R. 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: Sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. Applied Microbiology and Biotechnology. 48:677-686.

KOVALICK, W. 1991. Perspectives on risks of soil pollution and experience with innovative remediation technologies strategies 2000. Proc. World. Congr. Chem. Eng 4th. 282–295.

KOWALCHUK, G. A., NAOUMENKO, Z. S., DERIKZ, P. J. L., FEL- SKE, A., STEPHEN, J. R., & ARKHIPCHENKO 1999. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the B subdivision of the class Proteobacteria in compost and composted materials. Appl. Environ. Microbial., 65, 396-403.

KOZDRÓJ, J. & VAN ELSAS, J.D. 2001. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. Journal of Microbiological Methods. 43: 197-212.

LOVELL, C.R., FRIEZ, M.J., LONGSHORE, J.W. & BAGWELL, C.E. 2001. Recovery and phylogenetic analysis of nif sequences from diazotrophic bacteria associated with dead aboveground biomass of Spartina alterniflora. Appl. Environ. Microbiol. 67:5308-14.

LIU, W.T., MARSH, T.L., CHENG, H. & FORNEY, L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by terminal restriction fragment length polymorphism of genes encoding 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4516-22.

MAILA M., & CLOETE, T. 2005. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants—perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. U.S. Patent 1. International Biodeterioration & Biodegradation 55:1-8.

MALISZEWSKA-KORDYBACH B. & SMRECZAK, B.. 2003. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. U.S. Patent 8. Environment international 28:719-28.

MARTINY, J. B. H., BOHANNAN, B. J. M., BROWN, J. H., COLWELL, R. K., FUHRMAN, J. A., GREEN, J. L., HORNER-DEVINE, M. C., KANE, M., KRUMINS, J. A., KUSKE, C. R., MORIN, P. J., NAEEM, S., OVREAS, L., REYSENBACH, A. L., SMITH, V. H. & STALEY, J.

T. 2006. Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map. Nature Reviews Microbiology, 4:102-112.

MASSOL-DEYA, A.A., ODELSON, D.A., HICKEY, R.F. & TIEDJE, J.M. 1995. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal RNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). In: Molecular Microbial Ecology Manual. AKKERMANS, A.D.L., VAN ELSAS,J.D., DE BRUIJN, F.J. Dordrecht: Kluwer.

McCAIG, A.E., GLOVER, L.A. & PROSSER, J.J. 2001. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel eletrophoresis banding patterns. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4554-59.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. 2002. Microbiologia e bioquîmica do solo. Editora: UFLA. Lavras.

MUHLING, M., WOOLVEN-ALLEN, J., MURRELL, J.C. & JOINT, I. 2008. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. ISME J 2: 379-392.

MULLIGAN, C.N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environmental Pollution. 133:183-198.

MUYZER, G., de WAAL, E.C. & UITERLINDEN, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel eletrphoresis analysis of polimerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700.

MUYZER, G. & SMALLA, K. 1998. Application of denaturing gradient gel eletrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel eletrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Van Leeuwenhoek. 73: 127-41.

NADAL, M., SCHUHMACHER, M. & DOMINGO, J.L. 2007. Levels of metal, PCBs, PCNs and PAHs in soil of a highly industrialized chemical/petrochemical area: Temporal trend. Chemosphere, v.66, p.267-276.

NASCIMENTO, A.R., ARARUNA, J. & ZIOLLI, R.L. 2003. Otimização e avaliação do desempenho de um método de determinação de TPH (*Total Petroleum Hydrocarbons*) em areia por detecção no infravermelho. In: METROLOGIA-2003-Metrologia para a Vida. Sociedade Brasileira de Metrologia (SBM). Recife. Pernambuco.

NORIYUKI, I., SUNAIRI, M., URAI, M., ITOH, C., ANZAI, H. M. & NAKAJIMA, S. 2002. Harayama, Extracellular polysaccharides of Rhodococcus rhodochrous S-2 stimulate the degradation of components in crude oil by indigenous marine bacteria, Applied Environmental Microbiology. 68:2337–2343.

OBLINGER, J.L. & KOBURGER, J.A. 1975. "Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique." J. Milk Food Technol. 38(9), 540–545.

OLINE, D. K. 2006. Phylogenetic comparisons of bacterial communities from serpentine and nonserpentine soils. Applied and Environmental Microbiology, 72:6965-6971.

POMMIER, T., CANBACK, B., RIEMANN, L., BOSTROM, K. H., SIMU, K., LUNDBERG, P., TUNLID, A. & HAGSTROM, A. 2007. Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. Molecular Ecology, 16:867-880.

POPP, N., SCHLÖMANN, M. & MAU, M. 2006. Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils. Microbiology 152:3291-3304.

POWELL, S.M., FERGUSON, S.H., BOWMAN, J.P., & SNAPE, I. 2006. Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. Microbial Ecology 52: 523-532.

RANJARD, L., POLY, F., LATA, J.C., MOUGEL, C., THIOULOUSE, J. & NAZARET, S. 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprinting: biological and methodological variability. Appl. Environ. Microbiol. 67:4479-87.

RIZZO, A.C.L. 2008. Desenvolvimento de biorreator não convencional para o tratamento de solos contaminados por petróleo. 188p. Tese (Doutorado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil).

RIZZO, A.C.L., SANTOS, R.M., SANTOS R.L.C., SORIANO, A.U., CUNHA, C.D., ROSADO, A.S., SOBRAL, L.G.S. & LEITE, S.G.F. 2010. Petroleum-contaminated soil remediation in a new solid phase bioreactor. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. *In press.*

RON, E.Z. 2000. Microbial life on petroleum. In Journey to Diverse Microbial Worlds. Edited by Seckback J. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 303-305.

RON, E. & ROSENBERG, E.. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. U.S. Patent 3. Current opinion in biotechnology. Elsevier 13:249–252.

ROSADO A.S., DUARTE G.F., SELDIN L. & van ELSAS J.D. 1997. Molecular microbial ecology: a minireview. Revista de Microbiologia 28: 135-147.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SCHMALENBERGER, A & TEBBE, C.C. 2002. Bacterial community composition in the rhizosphere of transgenic, herbicide-resistant maize (Zea mays) and comparison to its non-transgenic cultivar Bosphore. FEMS Microbiol. Ecol. 40: 29-37.

SHEN G., LU, Y., ZHOU, Q. & HONG, J. 2005. Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme. U.S. Patent 8. Chemosphere 61:1175-82.

SINGH, P. & CAMEOTRA, S.S. 2004. Biochemical and biophysical research communications. 319: 291-297.

STOCK, N.E. & EGGLETON, P. 1992. Invertebrates as determinants and indicators of soil quality. American Journal of Alternative Agriculture. 7: 38-47.

TIEDJE, J.M., CHO, J.C., MURRAY, A., TREVES, D., XIA, B. & ZHOU, J. 2001. Soil teeming with life: new frontiers from soil science. In Sustainable Management of Soil Organic Matter, ed. Rees, R.M., Ball, B., Watson, C., Campbell, pp. 393-412. Wallingford, UK: CAB Int.

TELHADO, M.C.S.C.L. 2009. Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo. 124p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Brasil).

TESTA, S.M. 1997. The reuse and recycling of contaminated soil. Boca Raton (FL): Lewis.

TODD, R.S., ANDREA, M.C. & MAIER, R.M. 2000. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation, Applied Environmental Microbiology. 66:4585–4588.

TRINDADE, P.V.O. Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação noprocesso de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo. Dissertação de mestrado. Rio de Janeiro, UFRJ/Escola de Química, 2002. 127p.

URURAHY, A.F.P. Biodegradação de resíduo oleoso proveniente de refinaria de petróleo, 344p, 1998. Tese DSc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil,1998.

USEPA. 1996 . “Cleaning up the nation’s waste sites: Markets and technology trends, 1996 Ed.” *EPA 542-R-96-005*, Office of Solid Waste and Emergency Response,

Washington, D.C.

USEPA 2004. "Cleaning up the nation's waste sites: Markets and technology trends, 4th Ed." *EPA 542-R-04-015*, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, D.C.

VAN ELSAS, J.D., DUARTE, G.E., ROSADO, A.S. & SMALLA, K. 1998. Microbiological and molecular methods for monitoring microbial inoculants and their effects in the environment. Journal of Microbiological Methods. 32: 133-154.

VAN ELSAS, J.D. & SMALLA, K. 1997. Methods for sampling soil microbes. In: HHURST, C.J., KNUDSEN, G.R., MCINERNEY, M.J., STETZENBACH, L.D. & WALTER, M.V. (Eds), Manual of environmental microbiology. ASM Press, Washington, D.C.. 383-391.

VAN HAMME, J.D., SINGH, A. & WARD, O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiol Molecul Biol Rev. 67:503–49.

WANG X., ZHAO, C., ZHAO, P., DOU, P., DING, Y. & XU, P. 2009. Gellan gel beads containing magnetic nanoparticles: an effective biosorbent for the removal of heavy metals from aqueous system. U.S. Patent 7. Bioresource technology. Elsevier Ltd 100:2301-4.

WATANABE, K. & HAMAMURA, N. 2003. Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. Current Opinion in Biotechnology, 14:289-295.

ZHANG, T. & FANG, H. H. P. 2006. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. Applied Microbiology and Biotechnology, v.70, n.3, Apr, p.281-289.