

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**BIORREMEDIAÇÃO DE ANTRACENO, FENANTRENO E PIRENO EM UM
ARGISSOLO**

Rodrigo Josemar Seminoti Jacques
(Tese de Doutorado)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**BIORREMEDIAÇÃO DE ANTRACENO, FENANTRENO E PIRENO EM UM
ARGISSOLO**

RODRIGO JOSEMAR SEMINOTI JACQUES
Engenheiro Agrônomo (UFSM)
Mestre em Microbiologia Agrícola (UFV)

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do
Grau de Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil
Setembro de 2005

RODRIGO JOSEMAR SEMINOTI JACQUES
Engenheiro Agrônomo (UFSM)
Mestre em Microbiologia Agrícola (UFV)

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para a obtenção do Grau de

DOUTOR EM CIÊNCIA DO SOLO

Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em:
Pela Banca Examinadora

FLÁVIO ANASTÁCIO DE OLIVEIRA CAMARGO
Orientador – PPG Ciência do Solo/UFRGS

FÁTIMA MENEZES BENTO
Co-orientadora – PPG Ciência do Solo/UFRGS

PEDRO ALBERTO SELBACH
PPG Ciência do Solo/UFRGS

ZAIDA INÊS ANTONIOLLI
Departamento de Solos/UFSM

FLÁVIO CÉSAR ALMEIDA TAVARES
Departamento de Genética/ESALQ-USP

Homologado em:
Por

CIMÉLIO BAYER
Coordenador do Programa de Pós-
Graduação em Ciência do Solo

GILMAR A. B. MARODIN
Diretor da Faculdade de Agronomia

Ao meu pai Joemar (in memoriam)
À minha mãe Neiva e ao meu irmão Bernardo
Á Débora

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho.

Ao meu pai, por tudo e pela presença sempre constante na minha vida.

À minha mãe e ao meu irmão pela compreensão e apoio em todos os momentos.

À Débora, pelo nosso produtivo amor.

Ao Professor Flávio, pela orientação, confiança e amizade.

À Professora Fátima, pela alegre convivência, sugestões e auxílios.

Aos Professores Pedro e Enilson, pelos ensinamentos e sugestões.

Aos grandes amigos do Laboratório de Biorremediação de Solos, Kelly, Alessandro, Daniele, Clarissa, Luís Fernando, Patrícia e ao Seu Valdir, pela produtiva convivência, pelos favores e pelas cervejadas.

Aos colegas do PPG, em especial aos vizinhos do Laboratório de Química e Fertilidade/LAS, pela amizade e auxílios.

Aos amigos do Laboratório de Análises (LAS) pela amizade e pelos favores.

Aos professores do Departamento de Solos, pelos conhecimentos transmitidos.

À Professora Maria do Carmo Ruaro Peralba e a colega Aline pelas análises cromatográficas.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela oportunidade de realização do doutorado.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a concretização deste trabalho.

BIORREMEDIAÇÃO DE ANTRACENO, FENANTRENO E PIRENO EM UM ARGISSOLO¹

Autor: Rodrigo J. S. Jacques
Orientador: Flávio A. de O. Camargo
Co-Orientadora: Fátima M. Bento

RESUMO

O antraceno, o fenantreno e o pireno são hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) que podem ser carcinogênicos e que não são degradados pela maioria dos microrganismos do solo. A biorremediação é uma estratégia para eliminação dos HAPs, que pode demandar a inoculação de microrganismos degradadores e a modificação das condições químicas e físicas do solo. O objetivo do presente estudo foi isolar, identificar e caracterizar microrganismos degradadores e mineralizadores de antraceno, fenantreno e pireno em meio mineral e no solo, assim como avaliar a influência do pH e da disponibilidade de água, N, P, Fe e S na biorremediação de um solo contaminado com antraceno. Seis amostras de solo de *landfarming* foram inoculadas individualmente a um solo contaminado em laboratório com antraceno. Após 176 dias, o solo com maior produção de C-CO₂ foi utilizado para o enriquecimento em meio mineral mais antraceno. Os microrganismos foram isolados e identificados pelo seqüenciamento do gene do RNAr. A capacidade dos microrganismos em degradar os 3 HAPs no meio mineral e no solo foi avaliada por cromatografia gasosa. A mineralização de diferentes concentrações de antraceno, fenantreno e pireno no solo foi avaliada por respirometria, assim como o efeito de diferentes doses de N, P, S e Fe, de diferentes pH e umidades do solo na mineralização do antraceno. Isolou-se do solo de *landfarming* um consórcio microbiano composto por 6 bactérias, identificadas como *Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium* sp., *Gordonia polyisoprenivorans*, *Microbacteriaceae bacterium* e *Naphthalene-utilizing bacterium*, e um fungo, *Fusarium oxysporum*. O consórcio microbiano degradou respectivamente 48, 67 e 22% do antraceno, fenantreno e pireno do meio mineral. No solo o consórcio degradou, em média, mais de 92% e mineralizou mais de 78% das diferentes concentrações destes 3 HAPs em 70 dias. As maiores mineralizações do antraceno ocorreram nos solos com as maiores umidades gravimétricas (12,5%) e pH (7,5). A adição de 100 kg ha⁻¹ ou mais de nitrogênio no solo e a conseqüente redução da relação C:N para valores inferiores a 67:1 diminuíram a mineralização do antraceno no solo. O aumento da disponibilidade do fósforo, do ferro e do enxofre e a presença de amplas relações C:P (1076:1 a 50:1) e C:N:P (1076:16:1 a 50:1,3:1) no solo não influenciaram a mineralização do antraceno. Conclui-se que a seleção e a inoculação ao solo de microrganismos degradadores de HAPs, associado a modificação das condições ambientais, pode conduzir a um eficiente processo de biorremediação, onde a grande maioria dos HAPs é mineralizada em curto período de tempo.

¹ Tese de Doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brasil (172p.) – Setembro 2005. Trabalho realizado com apoio financeiro da CAPES e CNPq.

BIOREMEDIATION OF ANTHRACENE, PHENANTHRENE AND PYRENE IN A PALEUDULT SOIL¹

Author: Rodrigo J. S. Jacques
Advisor: Flávio A. de O. Camargo
Co-Advisor: Fátima M. Bento

ABSTRACT

Anthracene, phenanthrene and pyrene are polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) considered hazardous pollutants due to their toxicity, mutagenicity and carcinogenicity and resistance to natural biodegradation. Inoculation of specific microbial- PAH's degraders and modification of the soil physic and chemical conditions could enhance PAH's removal. This study aimed to isolate and characterize soil microorganisms able to degrade and mineralize anthracene, phenanthrene and pyrene and evaluate the effect of pH and availability of water, nitrogen, phosphorus, iron and sulfur. Six soil samples of a landfarming site were inoculated in soil contaminated with anthracene. After 176 days, the soil sample with the highest C-CO₂ production was used for the enrichment in a mineral medium containing anthracene. Microbial isolates were identified by rRNA gene sequencing and their abilities to degrade the PAH's were evaluated by gas chromatography. Mineralization of the anthracene, phenanthrene and pyrene at different concentrations was tested by respirometric methods, as well the effect N, P, S and Fe, pH and soil humidity on anthracene mineralization. Landfarming soil sample number five was used for enrichment and from this sample were isolated a microbial consortium containing six bacteria identified as *Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium* sp., *Gordonia polyisoprenivorans*, *Microbacteriaceae* bacterium and Naphthalene-utilizing bacterium, and a fungi identified as *Fusarium oxysporum*. The microbial consortium degraded 48,67 of anthracene, and 22% of phenanthrene and pyrene in mineral medium. In the soil, the consortium degraded more than 92% and mineralized more than 78% of different concentrations of these three PAHS during 70 days. The greatest anthracene mineralization occurred in soils that exhibited the greater gravimetric humidity (12,5%) and pH (7,5). The addition of 100 kg ha⁻¹ or more of nitrogen in soil an the reduction of the C:N relation (67:1) conducted to a low anthracene mineralization in soil. The highest relation C:P (1076:1 to 50:1) and C:N:P (1076:16:1) to (50:1,3:1) did not influenced the anthracene mineralization. Concluding, selection and the soil inoculation with PAHs degraders microorganisms and the modification of environmental conditions can conduct to the efficient bioremediation process (mineralization) in short period of time.

¹ Doctoral thesis in Soil Science. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS. Brasil (172p.) – September 2005. Research supported by CAPES and CNPq.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2. CAPÍTULO I - BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.....	06
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	07
2.1.1 Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no ambiente.....	07
2.1.1.1 Caracterização dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.....	07
2.1.1.2 Exposição e toxicidade dos HAPs.....	09
2.1.1.3 Geração, contaminação e legislação dos HAPs.....	10
2.1.2 Biorremediação de HAPs.....	13
2.1.2.1 Estratégias para biorremediação de HAPs no solo.....	13
2.1.2.2 Metabolismo e genética da degradação dos HAPs.....	15
2.1.2.3 Biodisponibilidade e absorção celular dos HAPs.....	22
2.1.2.4 Consórcios microbianos na degradação dos HAPs.....	26
2.1.2.5 Bioaugmentação de microrganismos degradadores de HAPs.....	28
2.1.3 Fatores ambientais que influenciam a biorremediação de HAPs no solo.....	31
2.1.3.1 Água.....	31
2.1.3.2 pH.....	32
2.1.3.3 Nutrientes.....	33
2.1.4 Biodisponibilidade dos HAPs no solo.....	37
2.1.4.1 Sorção dos HAPs na matéria orgânica.....	38

2.1.4.2 Sorção dos HAPs nos minerais.....	40
2.1.4.3 Sorção dos HAPs no solo.....	40
2.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
3. CAPÍTULO II - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICROORGANISMOS DO SOLO DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.....	53
3.1 RESUMO.....	54
3.2 INTRODUÇÃO.....	55
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3.3.1 Coleta do solo.....	58
3.3.2 Seleção da amostra de solo.....	58
3.3.3 Enriquecimento dos microrganismos degradadores de HAPs	60
3.3.4 Isolamento, purificação e armazenamento dos microrganismos degradadores de HAPs.....	61
3.3.5 Concentração do carbono no meio mineral.....	61
3.3.6 Curvas de crescimento e pH no meio mineral.....	62
3.3.7 Identificação do consórcio microbiano.....	62
3.3.8 Degradação de HAPs em meio mineral.....	64
3.3.9 Detecção da produção de biossurfactantes.....	64
3.3.10 Crescimento dos isolados em outros hidrocarbonetos.....	65
3.3.11 Análise estatística.....	65
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.4.1 Seleção da amostra de solo.....	66
3.4.2 Isolamento e identificação dos microrganismos degradadores de HAPs.....	68
3.4.3 Concentração do carbono no meio mineral.....	70
3.4.4 Curvas de crescimento e pH no meio mineral.....	71
3.4.5 Degradação de HAPs em meio mineral.....	74
3.4.6 Detecção da produção de biossurfactantes.....	76
3.4.7 Crescimento dos isolados em outros hidrocarbonetos.....	77
3.5 CONCLUSÕES.....	80
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

4. CAPÍTULO III - BIORREMEDIAÇÃO DE UM SOLO CONTAMINADO COM HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS.....	86
4.1 RESUMO.....	87
4.2 INTRODUÇÃO.....	88
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	90
4.3.1 Solo.....	90
4.3.2 Produção do inóculo.....	90
4.3.3 Análise respirométrica.....	91
4.3.4 Controle.....	91
4.3.5 Esterilização do Solo.....	92
4.3.6 Tipo de Inóculo.....	92
4.3.7 Concentrações de HAPs.....	93
4.3.8 Análise estatística.....	94
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	95
4.4.1 Controle.....	95
4.4.2 Esterilização do Solo.....	97
4.4.3 Tipo de Inóculo.....	99
4.4.4 Concentrações de HAPs.....	101
4.5 CONCLUSÕES.....	110
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
5. CAPÍTULO IV - MINERALIZAÇÃO DO ANTRACENO NO SOLO EM DIFERENTES CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS.....	114
5.1 RESUMO.....	115
5.2 INTRODUÇÃO.....	116
5.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	119
5.3.1 Solo e inóculo.....	119
5.3.2 Condições químicas e físicas.....	121
5.3.3 Análise respirométrica.....	122
5.3.4 Análise estatística.....	123
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	124
5.5 CONCLUSÕES.....	138
5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139

6. CAPÍTULO V - COMPARAÇÃO DE DUAS METODOLOGIAS PARA O ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS NO SOLO.....	142
6.1 RESUMO.....	143
6.2 INTRODUÇÃO.....	144
6.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	147
6.3.1 Coleta do solo.....	147
6.3.2 Isolamento de microrganismos degradadores de antraceno...	147
6.3.3 Identificação dos microrganismos degradadores de antraceno.....	150
6.3.4 Biodegradação e mineralização do antraceno.....	151
6.3.5 Análise estatística.....	152
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	153
6.4.1 Isolamento de microrganismos degradadores de antraceno...	153
6.4.2 Identificação dos microrganismos.....	156
6.4.3 Biodegradação do antraceno em meio mineral.....	158
6.4.4 Mineralização do antraceno no solo.....	159
6.5 CONCLUSÕES.....	163
6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	164
7. CONCLUSÕES GERAIS.....	169
8. APÊNDICE.....	170

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
Análise química do solo Itapoã.	59
Identificação dos microrganismos degradadores de antraceno pelo seqüenciamento do gene do RNAr.	68
Degradação do antraceno, fenantreno e pireno pelo consórcio microbiano por 30 dias em meio mineral com 250 mg L ⁻¹ de um dos HAPs, a 150 rpm, 30°C.	75
Crescimento dos membros do consórcio microbiano em diferentes fontes de C adicionadas individualmente ao meio mineral após incubação por 7 dias a 150 rpm e 30°C.	78
Mineralização das diferentes concentrações dos HAPs, no solo inoculado com o consórcio microbiano ou sem inoculação (SI), ao final dos experimentos respirométricos.	105
Concentrações e porcentagens de degradação do antraceno, fenantreno e pireno no solo após o final dos experimentos respirométricos.	108
Análise química do solo Itapoã.	120
Teor de amônio e nitrato+nitrito, relação C:N e força iônica no solo contaminado com 500 mg kg ⁻¹ antraceno e adicionado de diferentes doses de nitrogênio.	130
Teor de fósforo, relação C:P e C:N:P no solo contaminado com 500 mg kg ⁻¹ antraceno e adicionado de diferentes doses de fósforo.	133

Identificação dos microrganismos degradadores de antraceno pelo seqüenciamento do gene do RNAr.	157
Degradação do antraceno pelos isolados do Consórcio 1 por 48 dias e pelo Consórcio 2 por 30 dias, em meio mineral Tanner com 250 mg L ⁻¹ de antraceno, a 150 rpm e 30°C.	159

RELAÇÃO DAS FIGURAS

	Página
Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.....	08
Mecanismo de ativação metabólica de HAPs e reação com o DNA.	10
Degradação do antraceno por bactérias aeróbias.	16
Degradação do fenantreno por fungos não-lignolíticos.	19
Degradação do fenantreno por fungos lignolíticos.	20
Produção de C-CO ₂ de um solo contaminado com antraceno e inoculado com diferentes amostras de solo provenientes de uma área de descarte de resíduos petroquímicos.	67
pH e contagem das UFC das bactérias e do fungo do consórcio microbiano, crescendo em meio mineral com 250 mg L ⁻¹ de antraceno a 150 rpm e 30°C.	72
Produção de C-CO ₂ de um solo após bioestimulação (Bioest), bioaumentação (Bioaum), contaminação com antraceno (Ant) e acetona (Acet).	96
Produção de C-CO ₂ de um solo contaminado com antraceno após esterilização e a bioaumentação com um consórcio microbiano.	98
Produção de C-CO ₂ de um solo contaminado com antraceno, inoculado com bactérias e fungo separadamente, ou conjuntamente na forma de um consórcio microbiano.	99

Produção de C-CO ₂ de um solo contaminado com diferentes concentrações de antraceno (mg kg ⁻¹ de solo), inoculado com o consórcio microbiano ou sem inoculação (SI).	102
Produção de C-CO ₂ de um solo contaminado com diferentes concentrações de fenantreno (mg kg ⁻¹ de solo), inoculado com o consórcio microbiano ou sem inoculação (SI).	103
Produção de C-CO ₂ de um solo contaminado com diferentes concentrações de pireno (mg kg ⁻¹ de solo), inoculado com o consórcio microbiano ou sem inoculação (SI).	104
Produção de C-CO ₂ de um solo com diferentes umidades gravimétricas (%), contaminado com antraceno e inoculado ou não (SI) com um consórcio microbiano.	125
Produção de C-CO ₂ de um solo com diferentes pH, contaminado com antraceno e inoculado ou não (SI) com um consórcio microbiano.	127
Produção de C-CO ₂ de um solo com diferentes doses de nitrogênio (kg ha ⁻¹), contaminado com antraceno e inoculado com o consórcio microbiano.	129
Produção de C-CO ₂ de um solo com diferentes doses de fósforo (kg ha ⁻¹), contaminado com antraceno e inoculado ou não (SI) com um consórcio microbiano.	132
Produção de C-CO ₂ de um solo com diferentes doses de ferro (kg ha ⁻¹), contaminado com antraceno e inoculado ou não (SI) com um consórcio microbiano.	134
Produção de C-CO ₂ de um solo com diferentes doses de enxofre (kg ha ⁻¹), contaminado com antraceno e inoculado ou não (SI) com um consórcio microbiano.	136
Produção de C-CO ₂ de um solo contaminado com antraceno e inoculado com diferentes amostras de solo provenientes de uma área de descarte de resíduos petroquímicos.	155

Produção de C-CO ₂ de um solo contaminado com 500 mg kg ⁻¹ de antraceno e inoculado com consórcios microbianos.	161
--	-----

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos químicos constituídos unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, arrançados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Devido a possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si há atualmente mais de 100 HAPs reconhecidos pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Os HAPs são lipossolúveis na membrana e prontamente absorvidos no organismo dos humanos via inalação, exposição oral e dermal, com posterior acúmulo no tecido adiposo. O metabolismo dos HAPs gera compostos epóxidos com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele, devido a presença destes compostos.

Os HAPs são gerados naturalmente, e de forma contínua, pela combustão incompleta de resíduos orgânicos, mas a contaminação do solo por estes compostos é um típico efeito da atividade antropogênica relacionada aos processos de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e seus derivados. Assim, devido a estas atividades, o solo recebe quantidades consideráveis dos HAPs, entre eles o antraceno, o fenantreno e o pireno. Devido a complexidade estrutural e a baixíssima solubilidade em água, estes HAPs tornam-se recalcitrantes no solo e permanecem por longos períodos neste ambiente, o que aumenta a possibilidade de exposição de humanos e animais a estes compostos.

Uma estratégia para eliminação dos HAPs dos solos contaminados é através da biorremediação onde os microrganismos que apresentam capacidade

de metabolizar estes compostos irão transformá-los em substâncias inertes, CO₂ e água. Alguns resultados entretanto, têm demonstrado que a biorremediação pode tornar-se excessivamente lenta e não reduzir a concentração de poluentes aos níveis exigidos pela legislação ambiental. Entre os vários fatores responsáveis por estes insucessos, pode-se destacar a inabilidade dos microrganismos em degradar os HAPs, a baixa biodisponibilidade e a limitação de nutrientes à microbiota degradadora.

Para que um microrganismo utilize os HAPs como fonte de C e energia para o seu crescimento, é necessário que este possua as várias enzimas que transformam as complexas moléculas dos HAPs em intermediários das rotas catabólicas. Por isso, a maioria dos microrganismos do solo não possui a capacidade de degradar estes compostos, justificando a necessidade de se isolar e selecionar microrganismos degradadores de HAPs, visando sua utilização na biorremediação de solos contaminados com estes compostos. Desde a década de 50, vários pesquisadores selecionaram bactérias e fungos em culturas puras com capacidade de degradar HAPs, sendo que somente nos últimos anos tem sido dada atenção a obtenção de consórcios microbianos degradadores de HAPs, que comparativamente às culturas puras, tem se mostrado mais efetivos na degradação destes compostos, devido a capacidade de utilizar um maior número de HAPs como fonte de C, pela maior taxa de degradação e principalmente pela maior mineralização destes compostos, o que aumenta a possibilidade de um processo de biorremediação mais efetivo onde os contaminantes têm maiores chances de serem completamente eliminados do ambiente.

No entanto, alguns trabalhos têm demonstrado que a inoculação ao solo dos microrganismos selecionados em laboratório pode resultar em baixas taxas de degradação, o que pode ser conseqüência da incapacidade destes microrganismos em colonizar o solo e degradar os HAPs neste ambiente. A complexidade química, física e biológica do solo pode determinar o declínio da população inoculada, seja pelas relações antagônicas impostas pelas populações autóctones, como predação e competição, seja pelos estresses fisiológicos causados pelos fatores abióticos, como pH, disponibilidade de água e ar, temperatura e, no caso específico dos HAPs, biodisponibilidade de fontes de C e

energia. Assim, a seleção de microrganismos a serem utilizados na biorremediação de solos deve considerar além da habilidade bioquímica, a capacidade de colonização e degradação do contaminante no solo.

A baixa solubilidade em água dos HAPs faz com que apresentem forte tendência de sorção à fase sólida do solo, principalmente à matéria orgânica, o que reduz a sua biodisponibilidade à microbiota degradadora. Para superar esta limitação, os microrganismos têm utilizado mecanismos como a produção e a excreção de biosurfactantes. Estas moléculas apresentam uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica fazendo com que se posicionam preferencialmente nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (como nas interfaces óleo/água ou ar/água). Uma das propriedades destas moléculas é a redução da energia interfacial (tensão interfacial) e da tensão superficial devido a formação de uma camada molecular ordenada na interface. Além disso, promovem a formação de microemulsões, onde os HAPs são incorporados no centro hidrofóbico das micelas e desta forma, podem penetrar numa solução aquosa, aumentando a solubilidade aparente e conseqüentemente, a sua biodisponibilidade aos microrganismos degradadores.

A biorremediação também pode ser limitada se as condições do solo não forem favoráveis a sobrevivência e a atividade dos microrganismos degradadores. A adequada umidade do solo é considerado um fator ambiental importante na biodegradação, pois uma alta atividade microbiana somente ocorrerá se houver disponibilidade de água aos microrganismos. Além disto, o teor de água no solo tem relação direta e inversa com a disponibilidade de oxigênio e conseqüentemente, com a atividade dos microrganismos aeróbios que são os principais responsáveis pela degradação dos HAPs.

O pH do solo afeta diretamente a atividade dos microrganismos através dos efeitos dos íons H^+ na permeabilidade celular e na atividade enzimática, assim como indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes, e na solubilidade do alumínio e dos metais pesados, que podem ser tóxicos aos microrganismos.

Em ambientes naturais, o nutriente que normalmente limita o crescimento microbiano é o C, sendo que os nutrientes inorgânicos estão presentes em

quantidades que normalmente excedem as demandas das comunidades microbianas. No entanto, a presença de elevadas concentrações de HAPs no solo com potencial para serem utilizados como substrato para o crescimento dos microrganismos, pode fazer com que outros nutrientes que não o C se tornem limitantes. A relação C:N:P de 100:10:1 no solo a ser biorremediado tem sido normalmente recomendada. No entanto, as pesquisas que avaliaram os efeitos da adição de N e P ao solo demonstraram resultados muito conflitantes, indicando que esta relação pode não ser a mais adequada.

Outro nutriente que pode influenciar a degradação dos HAPs no solo é a disponibilidade do ferro. Isto porque, este elemento desempenha funções celulares que estão intimamente relacionadas ao metabolismo dos HAPs, como a participação na estrutura das enzimas do sistema multicomponente das dioxigenases e participação como cofator enzimático nas enzimas de fissão. A possível limitação deste elemento aos microrganismos do solo pode ocorrer porque os óxidos de ferro apresentam baixa solubilidade em ambientes aeróbios, sendo que a concentração do ferro na solução dos solos oxidados pode ser menor que 10^{-18} M.

O enxofre é outro elemento que está envolvido no metabolismo microbiano dos HAPs, isto porque é parte integrante do sistema multicomponente das dioxigenases, na forma de complexos ferro-enxofre. No solo, o enxofre encontra-se quase que totalmente associado à biomassa viva ou morta e desta forma, pode não estar prontamente disponível ou não ser quantitativamente suficiente para suportar uma alta demanda pela população degradadora do solo, quando da adição de HAPs ao solo.

Assim, em vista de todos estes fatores que podem influenciar a biorremediação de um solo contaminado com HAPs, esta estratégia deve ser utilizada somente após uma série de avaliações em laboratório, que visam caracterizar as populações degradadoras dos contaminantes e conhecer as demandas desta população no que se refere as condições ambientais do solo a ser biorremediado. O objetivo do presente estudo foi isolar, identificar e caracterizar microrganismos degradadores e mineralizadores de antraceno, fenantreno e pireno em meio mineral e no solo, assim como avaliar a influência do

pH e da disponibilidade de água, do nitrogênio, do fósforo, do ferro e do enxofre, na biorremediação de um solo contaminado com antraceno.

CAPÍTULO I

BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1. OS HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS NO AMBIENTE

2.1.1.1 Caracterização dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos químicos formados natural ou antropogenicamente durante a combustão incompleta de substâncias orgânicas como o carvão mineral e vegetal, óleo cru, gás, madeira, lixo, etc (Prince; Drake, 1999). São compostos constituídos unicamente de átomos de carbono e de hidrogênio, arranjados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Devido a possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si, há atualmente mais de 100 HAPs reconhecidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Dentre estes, somente 18 são considerados em função das informações químico-físicas, toxicológicas, ambientais e industriais existentes. São eles: acenaftaleno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(e)pireleno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)pireleno, benzo(j)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(um,2,3-c,d)pireno, naftaleno e pireno.

O antraceno é um dos poucos HAP produzidos industrialmente. É obtido a partir do carvão, numa fração conhecida como “óleo de antraceno” ou “óleo verde”. O antraceno ($C_{14}H_{10}$), também conhecido como antracina ou paranaftaleno, é formado por três anéis aromáticos, arranjados de forma linear (Figura 1), apresentando massa molecular de 178,2 g e solubilidade em água

de 0,076 mg L⁻¹ (Verschueren, 2001). O antraceno é usado na produção de corantes, de fibras sintéticas e como diluente de preservantes de madeira (Hawley, 1993). Devido a sua menor toxicidade em relação aos demais HAPs, o antraceno tem sido utilizado como modelo para estudos envolvendo a dinâmica destes compostos no ambiente (Weigand et al., 2002).

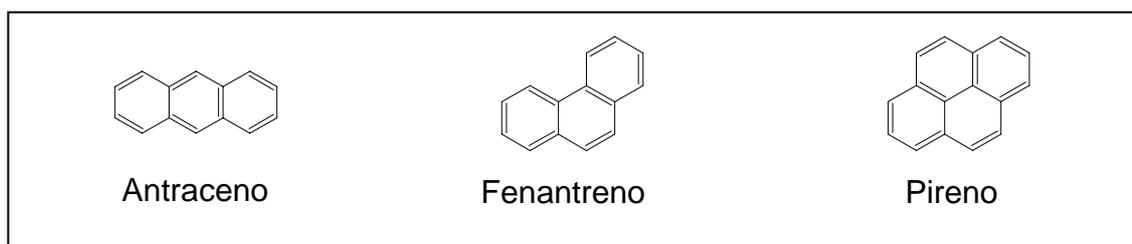


FIGURA 1. Fórmulas estruturais de alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

O fenantreno também é utilizado industrialmente para a produção de corantes e de explosivos. Este composto é um isômero do antraceno (C₁₄H₁₀), com um dos três anéis aromáticos não arranjado linearmente em relação aos demais (Figura 1). Este também é conhecido como fenantrin, apresenta massa molecular de 178,2 g e solubilidade em água de 1,29 mg L⁻¹ (Verschueren, 2001). A escolha deste HAP para o trabalho foi motivada pela avaliação das mudanças no comportamento da biodegradação em relação ao seu isômero antraceno, ao elevado número de trabalhos na literatura e por ser o HAP que se encontra em maior proporção (2,8%) na lodo oleoso produzido no Pólo Petroquímico do Sul em Triunfo/RS, exceção feita ao naftaleno que é um composto muito volátil (Allard et al., 2000; Rangel, 2003).

O pireno é um composto cujo uso nos Estados Unidos não está descrito na literatura, porém somente no ano de 1994 este país importou aproximadamente 55 toneladas da Europa (USDHS, 1995). O pireno (C₁₆H₁₀) é formado de quatro anéis aromáticos agrupados (Figura 1), apresentando massa molecular de 202,3 g e solubilidade em água de 0,135 mg L⁻¹ (Verschueren, 2001). É consenso na literatura, que a biodegradação tem maior eficiência na eliminação de hidrocarbonetos com um, dois ou três anéis aromáticos (HAPs de baixa massa molecular), porém tem sido considerada pouco efetiva com compostos de quatro ou mais anéis aromáticos (HAPs de

alta massa molecular). Desta forma, a escolha do pireno é motivada pela avaliação de uma condição limite para a degradação dos HAP pelos microrganismos do solo.

2.1.1.2 Exposição e toxicidade dos HAPs

A preocupação com a presença de HAPs no ambiente deve-se a possibilidade destes compostos reagirem diretamente ou após transformações metabólicas (ativações) com o DNA, tornando-se mutagênicos e carcinogênicos ao homem e aos animais. Os HAPs e seus derivados estão associados ao aumento de incidência de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele do Homem (Chakradeo et al., 1993).

A exposição de humanos e animais aos HAPs ocorre por inalação, exposição oral ou dérmica. A quantidade absorvida por inalação depende do grau de contaminação atmosférica, que está diretamente relacionado a urbanização, tráfego de veículos e industrialização do local. A absorção dérmica é importante em pessoas que trabalham em atividades relacionadas ao petróleo e a petroquímica. Os alimentos são considerados outra importante fonte de exposição, devido a formação de HAPs durante o cozimento e devido a deposição atmosférica (Netto et al., 2000).

Em vista da característica fortemente apolar, os HAPs são lipossolúveis e prontamente absorvidos no trato intestinal dos mamíferos, com posterior acúmulo no tecido adiposo. O metabolismo dos HAPs ocorre em diferentes tecidos do organismo por várias rotas, em quase todas há formação de compostos epóxidos, com propriedades carcinogênicas e mutagênicas (IPCS, 1998). As monoxigenases dependentes do citocromo P 450 são responsáveis pela oxidação enzimática dos HAPs (Figura 2). Estas agem principalmente sobre a região de elevada densidade eletrônica ou na região angular da molécula do HAP formando óxidos de arenos (epóxidos primários). Estes podem espontaneamente formar fenóis ou, por ação das epóxido hidrolases, produzirem di-hidrodióis, que serão oxidados a quinonas ou podem sofrer nova epoxidação, levando à formação de epóxidos secundários (di-hidrodiolépóxidos). Tanto os epóxidos primários quanto os secundários podem reagir covalentemente com as bases nucleofílicas do DNA, notadamente a

guanina, formando os denominados adutos HAP-DNA, que eventualmente, podem dar início a um processo mutagênico. Reações semelhantes são observadas com outras macromoléculas tais como a albumina e a hemoglobina (Netto et al., 2000).

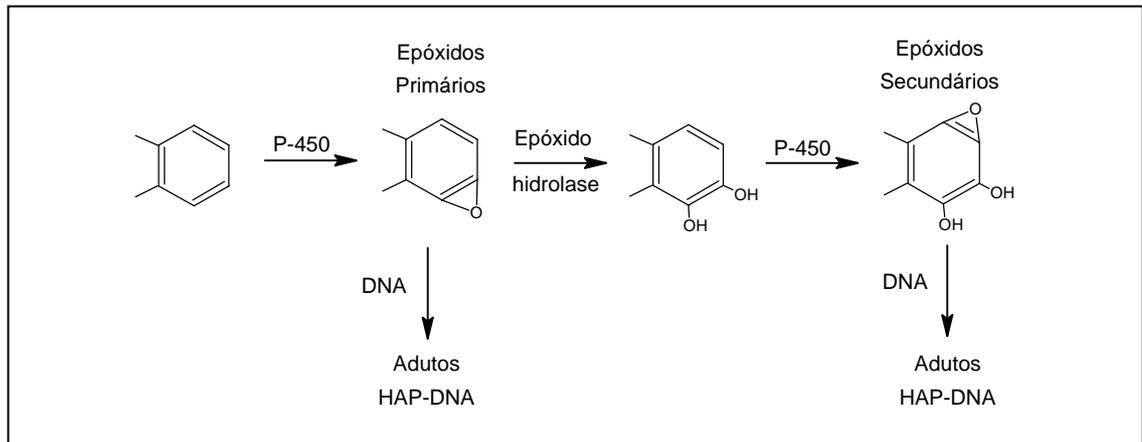


FIGURA 2. Mecanismo de ativação metabólica de HAPs e reação com o DNA (Netto et al., 2000).

Um esquema proposto para carcinogênese por exposição considera as seguintes etapas: exposição ambiental, ativação metabólica, formação de adutos entre o HAP e o DNA, mutação de genes críticos como, por exemplo, o P53 (gene repressor de tumor) e sucessão de mutações em outros genes (White, 1986).

2.1.1.3 Geração, contaminação e legislação dos HAPs

A fonte natural de HAPs é a combustão incompleta de resíduos orgânicos, como carvão vegetal e mineral, madeira e outros. Como fontes antropogênicas podemos destacar a produção industrial de HAPs, a geração de fuligem a partir dos motores de veículos e a cadeia de extração, transporte, refino e transformação do petróleo e seus derivados. Como exemplo desta última fonte, podemos citar o lodo oleoso gerado pelo Pólo Petroquímico do Sul e pela Refinaria Alberto Pasqualini (REFAP – Canoas/RS).

De modo geral, os centros urbanos são os locais com maior potencial de contaminação de HAPs, onde se destacam as oficinas mecânicas, as lavagens

e as garagens de automóveis. Entretanto, os maiores responsáveis pela contaminação do ar, do solo, do subsolo e das águas subterrâneas por hidrocarbonetos são os postos de serviços e combustíveis. A maioria dos tanques subterrâneos de armazenamento de combustíveis é susceptível a corrosão nos primeiros 20 anos após sua instalação. De modo geral, cerca de 50% dos vazamentos ocorrem antes dos 15 anos e grande parte das tubulações apresentam vazamentos antes dos 10 anos (Lima et al., 1998). Deste modo a população urbana, em especial, pode estar exposta a contaminação dos hidrocarbonetos, entre eles os HAPs, não havendo até o momento nenhuma iniciativa visando informar sobre este risco.

O monitoramento de contaminação ambiental por HAPs realizado na Inglaterra indicou valores aproximados de concentração no solo de $0,005 \mu\text{g kg}^{-1}$ em áreas agrícolas, aumentando para $0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$ nas proximidades dos centros urbanos e para $1,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ nas áreas industriais (Jones, 1989). Outra tentativa de quantificar a concentração de HAPs que podem estar presente em diferentes ambientes foi realizada por Angerer et al. (1997), indicando que a concentração no ar pode variar de 1,3 a 500 ng m^{-3} , no solo de $0,8 \text{ ng kg}^{-1}$ a 100 mg kg^{-1} , na água de 2,5 a 500 ng L^{-1} e nos alimentos de 0,1 a 20 ng kg^{-1} .

A legislação existente sobre HAPs está principalmente nos Estados Unidos e na União Européia, havendo entre eles grande diferença nos limites. As concentrações máximas permitidas dizem respeito principalmente ao benzo(a)pireno, que é o HAP cujo metabolismo em mamíferos é mais estudado. Para o ar, a Comissão das Comunidades Europeias (2003) determinou a concentração máxima de $0,001 \mu\text{g m}^{-3}$ de benzo(a)pireno, enquanto a USEPA (Agência Americana de Proteção Ambiental) limita este valor em $100 \mu\text{g m}^{-3}$. Para a água potável, a USEPA estabeleceu o valor máximo de $0,0028 \mu\text{g L}^{-1}$ de HAP e para meios não específicos, estabeleceu as doses diárias de referência para o antraceno ($0,3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), acenafteno ($0,06 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), fluoranteno ($0,04 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), fluoreno ($0,04 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) e pireno ($0,03 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (USDHS, 1995).

Outra legislação reconhecida internacionalmente é a Lista Holandesa de Valores de Qualidade do Solo e da Água Subterrânea, proposta em 1994 pelo governo holandês (CETESB, 2005a). Nela são estipulados três valores de qualidade:

Valor de referência (S): indica um nível de qualidade do solo e da água subterrânea que permite considerá-los “limpos”, considerando-se a sua utilização para qualquer finalidade.

Valor de intervenção (I): indica um nível de qualidade do solo acima do qual existem riscos para a saúde humana e para o ambiente. A ultrapassagem desse valor (média) em um volume de solo de 25 m³ ou em 100 m³ de água subterrânea, indica a necessidade de implementação na área avaliada de ações voltadas para a sua remediação.

Valor de alerta (T): é um valor médio entre os dois primeiros S e I. Este valor indica que já ocorreu uma certa alteração que diminuiu, ainda que pouco, as propriedades funcionais do solo, sendo necessária uma investigação detalhada na área para quantificação dessa alteração.

Nesta legislação, os limites de contaminação de HAPs no solo são determinados somando-se a concentração dos seguintes compostos: naftaleno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(ghi)perilene e indenol(1,2,3cd)pireno. Desta forma, em solos com teor de material orgânica menor que 100 g kg⁻¹, somando as concentrações dos 10 HAPs, o valor de referência é 1,0 mg kg⁻¹, o valor de alerta é 20,5 mg kg⁻¹ e o valor de intervenção é de 40 mg kg⁻¹. Para as águas subterrâneas, os limites de contaminação referem-se individualmente a cada um dos 10 HAPs. Para o antraceno e o fenantreno os valores são iguais, sendo o de referência de 0,02 µg L⁻¹, o de alerta de 2,5 µg L⁻¹ e o de intervenção de 5,0 µg L⁻¹(CETESB, 2005a).

Ao nosso conhecimento, a única legislação brasileira que trata da contaminação por HAPs do solo e das águas subterrâneas é a da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo). Nela, o naftaleno é o único HAP citado, sendo o valor de referência de 0,2 mg kg⁻¹ e o de intervenção de 15 mg kg⁻¹ em solos agrícolas, de 60 mg kg⁻¹ em solos residenciais e de 90 mg kg⁻¹ em solos industriais. Para águas subterrâneas o valor de intervenção para o naftaleno é de 100 µg L⁻¹(CETESB, 2005b).

Em vista da ampla distribuição dos HAPs no ambiente, da possibilidade de ocasionarem cânceres no Homem e dos limites impostos pela legislação de

alguns países, a sua eliminação do ambiente deve ser buscada, visando a redução da exposição e da absorção pelo organismo dos mamíferos.

2.1.2 BIORREMEDIAÇÃO DOS HAPs

2.1.2.1 Estratégias para biorremediação de HAPs no solo

O solo, se adequadamente utilizado, é um meio eficaz para o tratamento de resíduos. Sua complexidade física, química e biológica promove o transporte, a retenção e a transformação dos resíduos em substâncias mais simples, húmus, nutrientes, CO₂ e água, possibilitando desta forma, a reciclagem dos nutrientes e o equilíbrio dos ciclos biogeoquímicos do planeta (Brady; Weil, 2002).

A contagem microbiana de células viáveis em solos férteis varia entre 10⁷ e 10⁸ por grama, sendo as bactérias, o grupo mais numeroso de microrganismos, e os fungos, o grupo com maior biomassa, entre os demais grupos de actinomicetos, algas e protozoários (Sylvia et al., 1999). Estes grupos são reservatórios catalíticos potenciais e quando expostos a determinadas moléculas orgânicas, exibem enriquecimento seletivo de forma a possibilitar a conversão destes em energia e nutrientes e conseqüentemente, a sua degradação. Assim, o solo é um ambiente favorável a biodegradação dos HAPs (Alexander, 1999).

A clivagem dos HAPs é catalisada por complexos enzimáticos conhecidos como oxigenases, que adicionam átomos de oxigênio ao anel aromático, desestabilizando as ligações químicas e permitindo a abertura deste anel. Este será clivado formando intermediários das rotas comuns do metabolismo microbiano, que possibilitarão aos microrganismos utilizar compostos aromáticos como fonte de carbono e energia para o seu crescimento (Caldwell, 2000).

Em vista da capacidade de degradação dos HAPs pelos microrganismos do solo, a biorremediação é uma alternativa para a remoção destes compostos do ambiente. Por definição, a biorremediação é a utilização de processo ou atividade biológica para transformação dos contaminantes em substâncias

inertes (Hollinger et al., 1997). Entre as estratégias usadas para a biorremediação dos HAPs no ambiente, destacam-se a biorremediação passiva, a bioestimulação, a bioaugmentação e o *landfarming*. Na biorremediação passiva ou intrínseca o HAP é biodegradado pelos microrganismos nativos do solo, ao passo que na bioestimulação a microbiota degradadora recebe aporte de nutrientes orgânicos e/ou inorgânicos para estimular o seu crescimento. A bioaugmentação envolve a inoculação de culturas puras e ou de consórcios microbianos, contendo microrganismos pré-selecionados, com alta capacidade de degradação e competição, para degradar compostos específicos (Skipper, 1999).

O *landfarming* caracteriza-se como um sistema de tratamento de resíduos que pode inclusive, utilizar-se das três estratégias de biorremediação acima citadas. Nele, os resíduos são aplicados e incorporados na camada superficial do solo, onde se encontra a maioria da população heterotrófica, que realiza a biodegradação (Boopathy, 2000). A operação do *landfarming* consiste de três etapas: i) aplicação e mistura do resíduo no solo, através das operações com máquinas de preparo; ii) adição de corretivos e nutrientes; iii) revolvimentos periódicos para possibilitar aeração e a mistura das camadas superficiais do solo. Desta forma, busca-se no *landfarming* favorecer ao máximo a atividade da população microbiana degradadora do contaminante.

Em vista de que no *landfarming* normalmente são tratados resíduos que apresentam algum tipo de periculosidade ao Homem e ao ambiente, a área de tratamento destes resíduos é utilizada exclusivamente para este fim, sendo realizada a impermeabilização do solo abaixo da camada arável, bem como a contenção do escoamento superficial, para evitar a dispersão do contaminante no ambiente. O SICECORS (Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos do Pólo Petroquímico do Sul) do Pólo Petroquímico do Sul há 16 anos trata no sistema *landfarming* o lodo oleoso produzido pelas indústrias do Pólo e mais recentemente os resíduos da Refinaria Alberto Pasqualini.

Apesar de que todas as frações dos hidrocarbonetos são passíveis de decomposição microbiana e do relativo baixo custo de operação do *landfarming*, a biodegradação de resíduos neste sistema pode ser um processo lento, e em curto prazo incompleto, com acúmulo dos resíduos mais recalcitrantes no solo quando há reaplicações sucessivas. Pesquisas

realizadas por Mielniczuk (1991) indicaram que a taxa de mineralização do lodo oleoso no solo em condições otimizadas de laboratório é menor que 8% ao ano. Segundo Bewley (1996) para que o *landfarming* seja um processo eficiente de tratamento de resíduos é necessário o atendimento de três condições: i) presença no solo de microrganismos com capacidade de degradar os contaminantes; ii) condições ambientais favoráveis a alta atividade da população microbiana; iii) disponibilidade do contaminante aos microrganismos degradadores. Portanto, é provável que esta baixa porcentagem de mineralização seja consequência do não atendimento de alguma destas condições, o que diante do problema ambiental causado pela geração e estocagem de um resíduo de alta periculosidade, demanda o desenvolvimento de pesquisas que visem tornar o *landfarming* um processo mais eficiente de eliminação dos resíduos petroquímicos.

2.1.2.2 Metabolismo e genética da degradação de HAPs

A degradação dos HAPs no ambiente pode ocorrer abióticamente através de processos químicos e físicos. A interação de moléculas e íons ou a excitação de átomos por efeito da luz e da temperatura conduzem a desestabilização da estrutura das moléculas e ao rompimento das ligações. No entanto, estes processos são lentos, incompletos e podem gerar intermediários mais tóxicos que as moléculas originais. Assim a biodegradação é a principal via de eliminação dos HAPs no solo (Prince e Drake, 1999).

O metabolismo bacteriano dos HAPs já há algum tempo tem sido quimicamente estudado, com a determinação de vários intermediários das rotas de degradação (Evans et al., 1965), porém a identificação dos genes e das enzimas envolvidas necessita ainda de um maior entendimento (Mishra et al., 2001). Alguns estudos no entanto, têm nos possibilitado a identificação de boa parte destas rotas metabólicas, ainda que seja difícil senão impossível, predizer a maneira exata em que um particular composto aromático será catabolizado (Caldwell, 2000).

No metabolismo bacteriano as enzimas de degradação dos HAPs podem ser divididas em dois grupos: as periféricas e as de fissão. As enzimas periféricas têm a função de reconhecer e converter os HAPs em moléculas

degradáveis pelas enzimas de fissão, que farão com que estas moléculas possam entrar nas rotas comuns de geração de energia e de carbono nas células microbianas (Mishra et al., 2001). Para demonstrar as principais transformações pelas quais os HAPs são submetidos após absorção pelas células bacterianas, utilizaremos como exemplo a rota de degradação do antraceno (Figura 3).

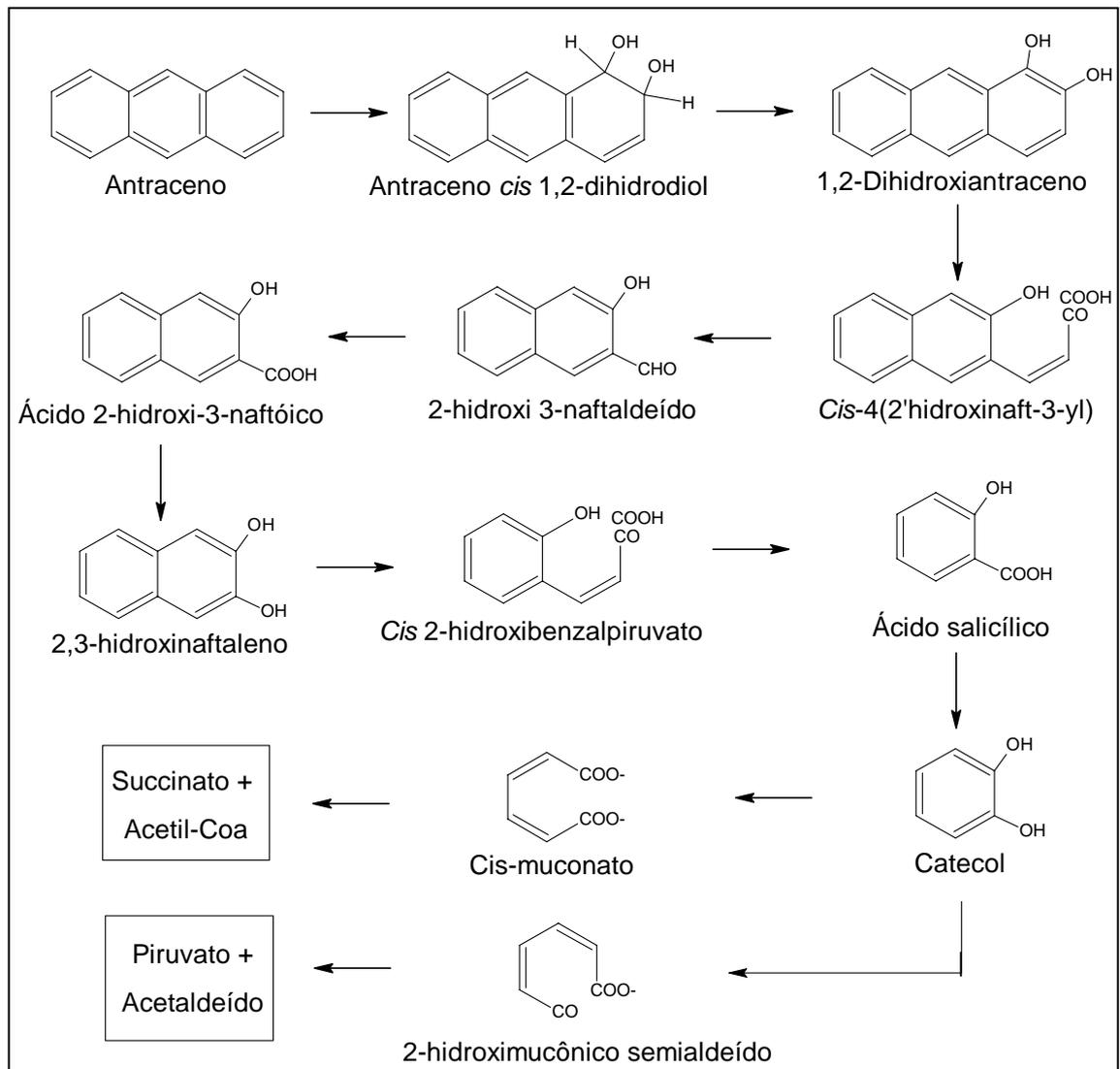


FIGURA 3. Degradação do antraceno por bactérias aeróbias (Evans et al., 1965; Cerniglia, 1984; Caldwell, 2000).

O passo inicial é o reconhecimento e a incorporação de dois átomos de oxigênio na molécula. Isto é realizado por uma enzima dioxigenase, originando um intermediário com duas hidroxilas, denominado antraceno *cis* 1,2-dihidrodiol. Este por sua vez, terá dois átomos de hidrogênio retirados da sua molécula por uma enzima dehalogenase, originando um composto denominado

1,2 dihidroxiantraceno, que será substrato de uma oxidase Fe-dependente que o transformará em um intermediário com dois anéis aromáticos fechados e um aberto, o *cis*-4(2'-hidroxinaft-3-yl). Por ação de uma aldolase, este composto é convertido em piruvato e em uma molécula com dois anéis aromáticos fechados, denominada 2-hidroxi 3-naftaldeído. Ou seja, até este passo da rota de degradação um dos anéis foi aberto e houve a formação de uma molécula de piruvato (Evans et al., 1965).

O 2-hidroxi 3-naftaldeído é convertido por uma desidrogenase em ácido 2-hidroxi-3-naftóico, que pela ação de uma aldolase gera o 2,3 dihidroxinaftaleno. Este último composto será substrato de dioxigenases que o transformarão primeiro em *cis* 2-hidroxibenzalpiruvato e depois, em piruvato e salicilato. A salicilato hidrolase converterá este composto monoaromático em catecol (Cerniglia, 1984). Além do catecol, outros compostos também podem ser considerados intermediários centrais da rota de degradação de hidrocarbonetos aromáticos, é o caso do protocatecol, do gentisato, do homogentisato e do metil-catecol (Caldwell, 2000).

A partir de então, atuam as denominadas enzimas de fissão, que converterão os intermediários centrais em compostos que possam ser utilizados nas rotas do metabolismo primário. As enzimas de fissão podem ser divididas em dois grupos, conforme o local da clivagem no intermediário central: as enzimas intradiol abrem o anel aromático entre os dois átomos de carbono hidroxilados, ou seja, por via orto, originando o *cis*-muconato, que por passos sucessivos será convertido em succinato e acetil-coenzima A. A catecol 1,2-dioxigenase é a enzima que fará a clivagem do anel aromático se o intermediário central for o catecol. As enzimas extradiol fazem a abertura do anel aromático adjacente aos átomos de carbono hidroxilados, ou seja, por via meta, originando o 2-hidroximucônico semialdeído, que por passos sucessivos será transformado em piruvato e acetaldeído. Nesta via, a catecol 1,2-dioxigenase é a enzima que fará a clivagem do anel aromático se o intermediário central for o catecol (Caldwell, 2000).

Devido a este completo aparato enzimático, os HAPs presentes no meio de cultura podem ser mineralizados em elevadas proporções pelas bactérias, exceção feita ao antraceno, que provavelmente devido a sua baixa solubilidade em água, tem sido mineralizado em proporções sempre menores que 20%

(Ahn et al., 1999). Já os trabalhos de Zhang et al. (1997) e de Johnson; Karlson (2004) obtiveram mineralizações próximas a 100% quando o fenantreno foi utilizado como única fonte de carbono pela *Pseudomonas putida* e pela *Sphingobium* sp., respectivamente. Mesmo se tratando de um HAP de alto peso molecular, o pireno foi mineralizado em 60% pela *Mycobacterium* sp. (Cerniglia; Heikamp, 1990). Observa-se que, apesar da complexidade estrutural dos HAPs, as bactérias apresentam capacidade de transformar estes compostos em intermediários das rotas comuns do seu metabolismo, ou seja, utilizam os HAPs como fonte de carbono e energia para o seu crescimento, que em última análise, representa a produção de biomassa. No ambiente edáfico, esta biomassa será posteriormente transformada em CO₂ e H₂O ou será incorporada, na forma de moléculas inertes do ponto de vista toxicológico, ao húmus, representando um processo completo de eliminação dos HAPs do ambiente.

Além das bactérias, os fungos também podem metabolizar os HAPs. São duas as principais rotas descritas na literatura: a primeira está relacionada aos fungos não-lignolíticos e a segunda aos fungos lignolíticos. Para exemplificá-las utilizaremos as rotas de degradação do fenantreno. O metabolismo dos HAPs do *Cunninghamella elegans* é o mais bem estudado entre os fungos não-lignolíticos (Figura 4). Assim como em humanos, o citocromo P450 realiza a monoxigenação inicial do fenantreno em óxidos arenos (epóxidos), que através das enzimas epóxido hidrolases são transformados em *trans*-dihidrodióis, ou um dos anéis pode ser rearranjado não-enzimaticamente a fenol, que pode ser conjugado, originando compostos como o-glicosídeos e o-glicoronídeos. Os *trans*-dihidrodióis são transformados por desidratação em fenantróis, que podem então ser convertidos em 9-fenantril-beta-D-glicopiranosídeo, que até então é acreditado ser um dos produtos final da rota de degradação dos fungos não-lignolíticos (The University of Minnesota, 2005).

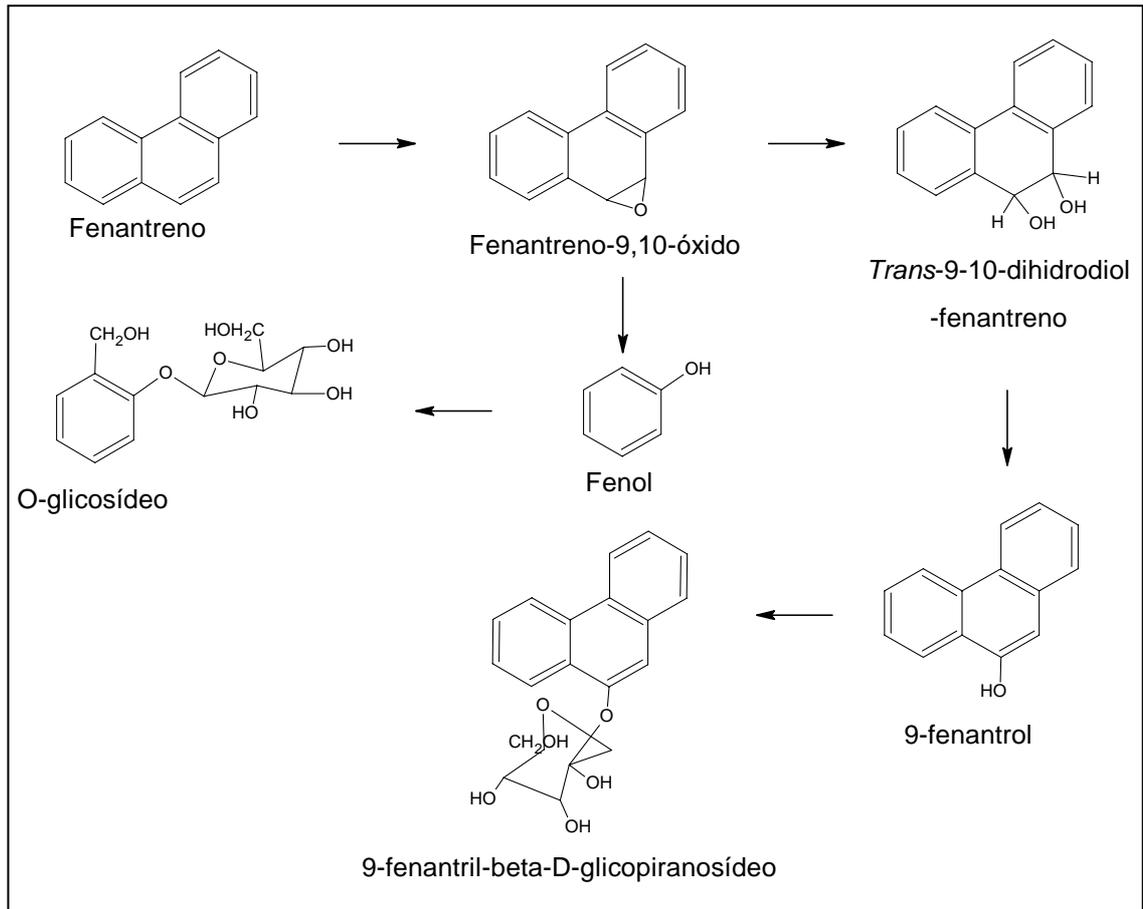


FIGURA 4. Degradação do fenantreno por fungos não-lignolíticos (The University of Minnesota, 2005).

A lignina contém uma variedade de estruturas aromáticas, sendo que os fungos lignolíticos oxidam este polímero extracelularmente pela ação de lignina peroxidases, peroxidases dependentes de Mn e lacases. Estas são enzimas não específicas que podem oxidar HAPs (Johnsen et al., 2005). O *Pleorotus ostreatus* é um fungo lignolítico que tem o metabolismo dos HAPs mais estudado (Figura 5). Ele oxida o fenantreno transformando-o em 9,10-fenantreno-quinona e por clivagem deste anel, em 2,2'-difenato. A partir deste metabólito, pode ser formado 2,2'bifenildimetanol ou CO₂, este último por uma rota bioquímica ainda não elucidada (The University of Minnesota, 2005).

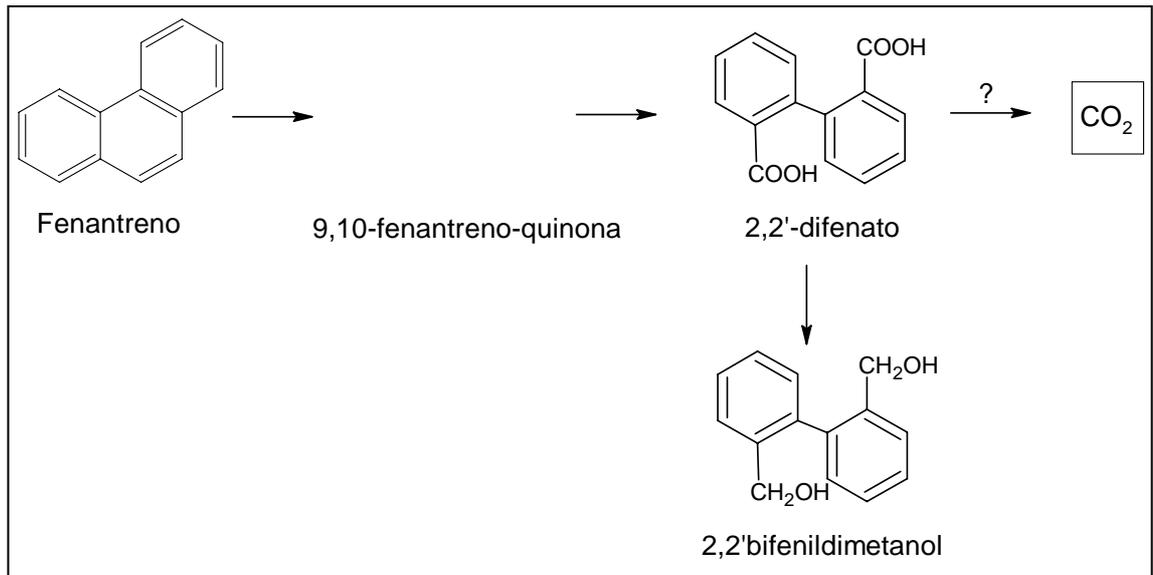


FIGURA 5. Degradação do fenantreno por fungos lignolíticos (The University of Minnesota, 2005).

A mineralização de HAPs pelos fungos é um processo pouco entendido e bastante limitado. Alguns trabalhos têm buscado quantificar o CO_2 produzido quando os fungos crescem utilizando HAPs como única fonte de carbono e energia. Bazalel et al (1996) avaliaram a mineralização do fenantreno e do pireno durante 11 dias pelo fungo *Pleurotus ostreatus*, sendo esta de somente 3,0 e 0,4%, respectivamente. Neste mesmo trabalho, a mineralização do antraceno foi ainda menor, 0,6% em 35 dias de incubação. Após 21 dias de incubação, o fungo *Phanerochaete chrysosporium* mineralizou 7,7% do fenantreno num experimento realizado por Bumpus et al. (1985). Melhores resultados foram obtidos por Hammel et al. (1991) que após 7 dias quantificaram 12% de mineralização do antraceno por *P. chrysosporium*. Assim apesar das várias comprovações da capacidade de degradação dos HAPs pelos fungos (Cerniglia, 1997), as porcentagens de mineralização descritas na literatura são relativamente baixas se comparadas às das bactérias.

Considerando-se que a clivagem inicial do anel aromático é o passo limitante da biodegradação dos HAPs, a produção de intermediários hidroxilados com alta solubilidade em água pelos fungos é um importante passo para acelerar a mineralização destes compostos, uma vez que, possibilita a utilização destes intermediários pelas bactérias heterotróficas, que os transformarão em carbono e energia para o seu crescimento. Além disso, a

formação de intermediários pelos fungos pode ser considerado um processo de detoxificação dos HAPs, pois estes serão posteriormente mineralizados pelas bactérias ou têm sua toxicidade reduzida em relação à molécula inicial (Cerniglia, 1997).

Nas últimas duas décadas, as análises genéticas da degradação dos HAPs por bactérias aeróbias têm se concentrado nos genes catabólicos do naftaleno das espécies de *Pseudomonas*, em especial *P. putida* G7. Apesar de serem denominados genes *nah*, referindo-se ao naftaleno, os isolados que possuem estes genes apresentam a capacidade de degradar outros HAPs, como o antraceno e o pireno (Habe; Omori, 2003). No isolado G7, estes genes estão localizados no plasmídeo NAH7 e estão organizados em três operons: um que codifica a rota superior (enzimas periféricas), outro a rota inferior (enzimas de fissão) e o terceiro codifica a proteína regulatória NahR, que é induzida pelo salicilato e sua expressão permite que os genes *nah* sejam transcritos (Schell, 1985).

Em outros isolados, os genes de degradação dos HAPs foram encontrados tanto no cromossomo como em plasmídeos e mostraram-se muito semelhantes aos genes do NAH7 do isolado G7, apresentando aproximadamente 90% de similaridade nas seqüências gênicas da rota superior. Os genes da rota inferior tiveram suas seqüências completamente determinadas somente para *P. stutzeri* AN10, não possibilitando ainda comparações de similaridade (Habe; Omori, 2003).

Os genes catabólicos do pireno em bactérias aeróbias estão sendo estudados em *Mycobacterium* sp. PYR-1, sendo que já foram obtidas as seqüências dos genes que codificam a dioxigenase inicial e uma desidrogenase (Khan et al., 2001). Ao nosso conhecimento, não há relatos de estudos sobre a genética da degradação de HAPs em fungos, o que provavelmente se deve a que estes microrganismos utilizam mecanismos não específicos para a degradação dos HAPs, que estão relacionados também com a degradação da lignina.

2.1.2.3 Biodisponibilidade e absorção celular dos HAPs

Pouco é conhecido sobre como os HAPs atravessam a membrana das bactérias para entrar no citoplasma, que é o local onde se encontram as enzimas de degradação. Estudos ainda não conclusivos têm indicado para a possibilidade de dois mecanismos: no mecanismo passivo, a absorção se daria por diferença de concentração (difusão) entre o meio intra e extracelular. Para garantir a absorção permanente dos HAPs, as bactérias reordenariam os fosfolipídios da membrana plasmática, criando uma região no interior desta que atuaria como um reservatório de compostos hidrofóbicos (Bugg et al., 2000).

O outro mecanismo seria ativo, na qual os HAPs atravessariam a membrana com gasto de energia da célula, porque a concentração intracelular seria maior que a extracelular (Miyata et al., 2004). Após a realização de experimentos que comprovam a existência dos dois mecanismos, estes últimos autores sugeriram a co-existência dos dois mecanismos. Assim, o transporte passivo ocorreria quando a célula entra em contato com o meio onde se encontram os HAPs, ou seja, quando a concentração interna é baixa e a externa alta, possibilitando o fenômeno da difusão. Após certo período, a concentração intracelular de HAPs se igualaria a extracelular e o transporte ativo passaria a atuar.

Na busca de um melhor entendimento da absorção de HAPs pelas bactérias, os pesquisadores comprovaram a existência de um sistema de efluxo, onde os intermediários da degradação dos HAPs que são tóxicos às células seriam excretados para o meio externo para evitar danos celulares. Estas bombas são enzimas codificadas por genes do cromossomo, o que indica que este sistema de defesa pode ser utilizado em outras condições de estresse, como por exemplo, no efluxo de antibióticos (Bugg et al., 2000). Este sistema de efluxo opera com gasto de energia celular e foi comprovado pela redução da concentração de HAPs no meio externo concomitantemente com o aumento da concentração de intermediários polares (já parcialmente metabolizados). Este sistema de excreção celular pode contribuir para a ocorrência da complementaridade metabólica observada nos consórcios microbianos, onde alguns membros realizam os passos iniciais de oxidação

dos HAPs, enquanto outros degradam os intermediários resultantes desta oxidação.

A baixa solubilidade dos HAPs na água reduz a biodisponibilidade de substrato à microbiota degradadora, constituindo-se em uma limitação a degradação destes compostos no ambiente. Os microrganismos têm buscado superar esta limitação utilizando-se de mecanismos como a produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), a formação de biofilme e a produção de biossurfactantes.

Na microbiologia, as EPS são principalmente estudadas na formação e na adesão de biofilmes microbianos às superfícies. Na degradação de hidrocarbonetos, as EPS podem aumentar a biodisponibilidade destes compostos à comunidade microbiana através do armazenamento de HAPs nos biofilmes (Johnsen et al., 2005). Spath; Wuertz (1998) quantificaram em 80% o conteúdo de benzeno, tolueno e xileno nas EPS do biofilme e somente em 20% nas células microbianas. Dohse; Lion (1994) avaliaram 28 polímeros microbianos e observaram que 24 deles atuaram como sorbentes para o fenantreno. Outro modo de atuação das EPS foi descrito por Pollock (1993), que observou que membros do gênero *Sphingomonas* produziram e excretaram *sphigans*, um grupo de EPS formado por unidades repetidas, que apresentam a capacidade de sorção dos HAPs de modo que permaneceram biodisponíveis. A presença de três *sphigans* no meio de cultura resultou em aumentos médios de 2,2 e 5,1 vezes na solubilidade do fenantreno e do pireno, respectivamente, sem no entanto, resultar em aumento da mineralização do fenantreno (a mineralização do pireno não foi avaliada) (Jonhsen; Karlson, 2004).

Outra estratégia para aumentar a disponibilidade de HAPs para os microrganismos degradadores é através da redução da distância célula-substrato pela formação de biofilmes. As análises em microscópio *laser confocal* revelaram biofilmes de *Mycobacterium* crescendo sobre cristais de antraceno e com conseqüente formação de “crateras” pelo consumo do HAP (Wick et al., 2002). Para isso, o isolado exibiu modificações celulares específicas, como a redução de tamanho e maior hidrofobicidade na superfície, o que resultou em maior capacidade de adesão ao antraceno. Jonhsen; Karlson (2004) avaliaram as estratégias para o aumento da biodisponibilidade

de HAPs em 21 bactérias degradadoras e observaram que a formação de biofilmes foi o mecanismo predominantemente utilizado para superar esta limitação. Outros autores observaram a formação de biofilmes de *Mycobacterium* sobre cristais de antraceno (Wick et al., 2001) e de *Pseudomonas* em cristais de fenantreno (Rodrigues et al., 2003).

Os biossurfactantes também podem aumentar a biodisponibilidade dos HAPs nas soluções aquosas (Cameotra; Bollag, 2003). Estas moléculas apresentam uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica fazendo com que se posicionam preferencialmente nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (como nas interfaces óleo/água ou ar/água). Uma das propriedades destas moléculas é a redução da energia interfacial (tensão interfacial) e da tensão superficial devido a formação de uma camada molecular ordenada na interface. Além disso, promovem a formação de microemulsões, onde os HAPs são incorporados no centro hidrofóbico das micelas e desta forma, podem penetrar numa solução aquosa (Desai; Banat, 1997).

Os surfactantes utilizados na biorremediação podem ser produzidos industrialmente, a partir de derivados do petróleo, ou serem sintetizados biologicamente por microrganismos. A utilização de surfactantes biológicos (biossurfactantes) apresenta vantagens em relação aos industriais, como a menor toxicidade aos microrganismos degradadores, menor recalcitrância no ambiente, maior diversidade de estruturas químicas, atuação em uma gama maior de condições, etc (Christofi; Ivshina, 2002).

Os biossurfactantes são sintetizados nas células microbianas e liberados para o meio, sua porção hidrofílica pode ser constituída de aminoácidos, peptídeos e sacarídeos e a porção hidrofóbica é normalmente formada por ácidos graxos saturados ou insaturados. Um grande número de microrganismos produz biossurfactantes, o que resulta em uma grande diversidade de moléculas. Os biossurfactantes que reduzem a tensão superficial e interfacial no contato água-HAP são os de baixo peso molecular, como glicolipídeos e lipopeptídeos (Ron; Rosenberg, 2001). Os glicolipídeos mais bem estudados são ramnolipídeos produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*, trehalolipídeos produzidos pelo gênero *Rhodococcus* e soforolipídeos produzidos por leveduras do gênero *Turolopsis*. Entre os

lipopeptídeos destacam-se aqueles produzidos pelo gênero *Bacillus*, como a surfactina, um excelente redutor de tensão superficial da água produzido pelo *B. subtilis* (Desai; Banat, 1997).

Os biossurfactantes que formam microemulsões são de alto peso molecular (também denominados de biossurfactantes poliméricos) constituídos de polissacarídeos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas destas moléculas. Os mais bem estudados são os produzidos pelo gênero *Acinetobacter*, que são uma mistura de heteropolissacarídeo e proteínas (Ron; Rosenberg, 2001).

Como exemplo das potencialidades da utilização de biossurfactantes na degradação dos HAPs pode-se citar o trabalho de Zhang et al. (1997) que utilizando um monoramnolipídeo e um diramnolipídeo verificaram que a solubilidade do fenantreno no meio mineral aumentou de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ para 35 mg L^{-1} na presença do monoramnolipídeo e para 13 mg L^{-1} na presença do diramnolipídeo, demonstrando além da capacidade de solubilização, as diferenças determinadas pelas estruturas químicas dos biossurfactantes. Como consequência deste aumento da solubilidade, os autores também observaram um aumento significativo da mineralização do fenantreno no meio de cultura.

Pesquisas realizadas recentemente em nosso laboratório possibilitaram a seleção de um isolado de *Pseudomonas citronellolis* que reduziu a tensão superficial de $69,2 \text{ mN m}^{-1}$ no meio mineral (controle) para 36 mN m^{-1} após o crescimento por 48 dias em antraceno (Jacques et al., 2005). A adição de $0,1 \text{ mM}$ of $\text{Fe-Fe}(\text{NO}_3)_3$ ao meio de cultivo reduziu ainda mais a tensão superficial, atingindo o valor de $26,2 \text{ mN m}^{-1}$ (Santos, 2004). Segundo Cooper e Zaijic (1980) para uma bactéria ser considerada boa produtora de biossurfactantes deve reduzir a tensão superficial para valores inferiores a 40 mN m^{-1} . Assim o isolado de *P. citronellolis* pode ser considerado um bom produtor de biossurfactante, reduzindo a tensão superficial para valores próximos aos 27 mN m^{-1} obtidos pela surfactina do *B.subtilis* (Christofi; Ivshina, 2002).

Outros trabalhos no entanto, têm demonstrado que a produção de biossurfactantes não é uma estratégia utilizada pela maioria dos microrganismos degradadores de HAPs. Das 21 bactérias avaliadas por Jonhsen; Karlson (2004), somente duas produziram biossurfactantes que reduziram a tensão superficial em mais de 18 mN m^{-1} . Além disso, Willumsen;

Karlson (1997) isolaram 57 degradadores de HAPs e produtores de biossurfactantes, mas não encontraram correlação entre a redução da tensão superficial e a mineralização dos HAPs, indicando que este pode não ser um mecanismo essencial para a degradação destes compostos pelos microrganismos (Johnsen et al. 2005).

Ao nosso conhecimento, não há ainda relatos da produção de biossurfactantes por fungos crescendo em HAPs, no entanto *Hormoconis resinae* reduziu a tensão superficial de 72 para 50 mN m⁻¹ após 25 dias crescendo em meio contendo combustível de avião como única fonte de carbono e energia (Muriel et al., 1996). Os agentes emulsificantes produzidos pelos fungos *Curvularia lunata* e *Penicillium citrinum* formaram emulsões no meio de cultura com diversos óleos minerais e vegetais, sendo elas estáveis por um período superior a 20 dias (Paraszkiwicz et al., 2002; Morais et al., 2003). Isto demonstra que a produção de biossurfactantes de baixo e alto peso molecular, visando o aumento da biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos em soluções aquosas, também é uma característica dos fungos.

Em condições de solo, a adição dos surfactantes pode aumentar a concentração dos HAPs na solução, devido ao aumento da solubilidade aparente e da dessorção (Zhang et al., 1997; Cameotra; Bollag, 2003), havendo relatos de melhorias na eficiência da biodegradação de hidrocarbonetos pela adição de biossurfactantes. Jain et al. (1992) observaram aumento da biodegradação do tetradecano, pristano e hexadecano num solo, com a adição de um biossurfactante produzido por uma bactéria do gênero *Pseudomonas*. Em 22 dias, as concentrações do antraceno, fenantreno e pireno foram reduzidas em 90, 85 e 74%, respectivamente, após a adição a este solo de um soforolípídeo, além disso outros 12 HAPs também tiveram suas concentrações grandemente reduzidas neste ensaio (Kosaric, 2001).

2.1.2.4 Consórcios microbianos na degradação dos HAPs

Uma condição ideal de biorremediação seria a mineralização completa dos HAPs que contaminam determinado local. Num ambiente tão complexo como o solo, esta condição nem sempre ocorre, pois há possibilidade de acúmulo de intermediários das rotas de metabolismo (Kazunga; Aitken, 2000).

Uma alternativa para aumentar a mineralização no solo de moléculas tão complexas como os HAPs é a utilização de consórcios microbianos que apresentem complementaridade metabólica e que podem conduzir os HAPs a total mineralização.

Richard; Vogel (1999) estudando um consórcio bacteriano degradador de óleo diesel no solo verificaram que dos sete membros deste consórcio, quatro não utilizavam diretamente o óleo como fonte de carbono e energia, no entanto a presença destes aumentava a produção de CO₂ pelo consumo de intermediários produzidos pelos demais membros.

Há certo consenso na literatura que os fungos têm maiores possibilidades de realizarem a oxidação inicial dos HAPs que as bactérias, isto porque, suas hifas podem alongarem-se na direção destes compostos assim como, suas exoenzimas podem difundir-se no solo e atingir o substrato. Já nas bactérias, as dioxigenases são intracelulares porque requerem o NADH como cofator e desta forma os HAPs devem ser absorvidos intracelularmente (Johnsen et al., 2005), o que em se tratando de compostos de alta sorção no solo, representa uma limitação à biorremediação. Assim, os intermediários oxidados resultantes do metabolismo fúngico dos HAPs são mais biodisponíveis à comunidade microbiana do solo que os próprios HAPs, capacitando os fungos a serem também utilizados na biorremediação de solos contaminados com estes compostos.

Assim como na maioria dos estudos conduzidos com fungos, Kotterman et al. (1998) também verificaram que o *Bjerkandera* sp. BOS55 apresentou alta capacidade de degradar benzo(a)pireno (73%), porém baixa capacidade de mineralização deste HAP (8,5%). A adição do meio, com a cultura do fungo crescida, ao solo resultou em grande aumento da produção de CO₂, indicando que os metabólitos produzidos pelo fungo foram rapidamente mineralizados pela população heterotrófica do solo.

Um extensivo estudo foi conduzido por Boochan et al. (2000) visando avaliar a degradação e a mineralização de HAPs por uma bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, um fungo *Penicillium janthinellum* e pelo consórcio resultante da inoculação conjunta destes dois microrganismos. Em presença de benzo(a)pireno, nenhum dos microrganismos isoladamente cresceu, porém na forma de consórcio houve crescimento de ambos e

degradação de 59% do HAP no meio líquido. No solo, a degradação deste mesmo HAP pela bactéria foi menor que 20%, pelo fungo menor que 40% e pelo consórcio maior que 80%, havendo a possibilidade de aumento desta degradação, uma vez que, após os 100 dias esta ainda não se encontrava estável. A mineralização do benzo(a)pireno em meio líquido foi nula quando culturas puras da bactéria ou do fungo estavam presentes. Quando foram inoculados conjuntamente, a mineralização do HAP foi de 25%. No solo, a mineralização do benzo(a)pireno realizada pelo fungo foi próxima a zero, pela bactéria foi de 20% e pelo consórcio de 40%. Assim, o consórcio incrementou a degradação e a mineralização do HAP, tanto no meio líquido quanto no solo, demonstrando atividades catabólicas complementares entre o fungo e a bactéria. As análises de intermediários do metabolismo por cromatografia líquida de alto desempenho nestes ensaios tenderam a confirmar a hipótese de que o fungo realiza os passos iniciais da oxidação do benzo(a)pireno e libera para o meio extracelular intermediários polares, que são convertidos em CO₂ pela bactéria (Boonchan et al., 2000).

2.1.2.5 Bioaugmentação de microrganismos degradadores de HAPs

A baixa taxa de degradação de um poluente no solo pode ser resultado do reduzido ou do inexistente número de microrganismos com habilidade de degradação do composto (Huesemann et al., 2002). Isto é particularmente importante quando o solo recebe um xenobiótico e não há populações microbianas capazes de degradar eficientemente este composto. Nestes casos, a bioaugmentação é uma prática recomendada (Edgehill et al., 1999).

Há que se considerar no entanto, que as comunidades autóctones do solo têm grande diversidade de espécies e alto grau de estabilidade, estando amplamente adaptadas a este ambiente assim, a inoculação ao solo de microrganismos selecionados em laboratório que apresentam alta capacidade de degradar HAPs pode não ser garantia de sucesso da biorremediação se a população introduzida não conseguir se estabelecer no solo. Segundo Alexander (1999), a eficiência da biorremediação é função da extensão em que a população microbiana degradadora pode manter-se no ecossistema natural.

Vários fatores são sugeridos como causa do declínio da população inoculada no solo, entre eles, o número e o estado fisiológico dos microrganismos inoculados, os fatores bióticos como competição e predação e os fatores abióticos do local (van Veen et al., 1997). A competição ocorre quando as populações usam os mesmos recursos e estes são limitados. Normalmente, as comunidades autóctones do solo têm maior eficiência na obtenção do substrato e na tolerância aos estresses ambientais que a população inoculada (Atlas; Bartha, 1998). A predação é outra interação antagonística comum no solo. Heynen et al. (1988) observaram que a redução da população inoculada de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trivoli* no solo estava associado ao aumento da população dos protozoários.

Os principais fatores abióticos que determinam estresses fisiológicos na população microbiana introduzida são pH, disponibilidade de N, P e outros nutrientes inorgânicos, conteúdo de água, aeração, temperatura e disponibilidade de substratos orgânicos (van Veen et al., 1997).

No caso específico dos HAPs, a disponibilidade de fonte de C e energia pode ser o principal determinante do insucesso da inoculação. Huesemann et al. (2002) quantificaram reduções de 3 e 4 log na população de microrganismos degradadores, após 78 semanas do experimento, sem no entanto, ter ocorrido a redução significativa na concentração do pireleno. Segundo estes autores a baixa disponibilidade dos HAPs no solo pode resultar em insuficientes quantidades de substrato para a manutenção dos microrganismos, havendo com isso o seu declínio. A heterogeneidade de distribuição e a tendência de sorção a fase sólida do solo podem tornar os HAPs inacessíveis principalmente às bactérias, que são imóveis e necessitam absorver os HAPs para metabolizá-los intracelularmente. Já os fungos superam parte desta limitação pela produção de exoenzimas e pela extensão das hifas em direção ao substrato (Bennet et al., 1996).

Por outro lado, a capacidade da população inoculada em degradar HAPs representa uma vantagem competitiva em relação a população nativa do solo, que normalmente não possui as enzimas necessárias para a utilização destes compostos. Por isso, alguns trabalhos têm demonstrado que a bioaugmentação pode ser eficiente para aumentar a remoção dos HAPs do solo. Assim, Allard et al. (2000) demonstraram que a inoculação de bactérias degradadoras de HAPs

no solo resultou na remoção de aproximadamente 50% do fenantreno do solo, enquanto o tratamento sem inoculação, a remoção no mesmo período (40 dias) foi de 35%. Resultados mais significativos foram obtidos por Kästner et al. (1998), onde a inoculação de bactérias degradadoras de HAPs resultou em incrementos de seis e de dez vezes na degradação respectivamente, do pireno e do antraceno no solo, o que possibilitou a remediação em um tempo sete vezes menor quando comparado ao controle não inoculado.

Em condições de campo, foi realizado o tratamento de 400 m³ de resíduo oleoso no solo com a inoculação de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos. Em 16 semanas, a redução da concentração do benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(g,h,i)pireleno e indeno(1,2,3-c,d)pireno foi reduzido em 95, 96, 86, 93, 54 e 32%, respectivamente (Edgehill et al., 1999).

Fungos degradadores de HAPs como *Fusarium* sp. e *Conithyrium* sp. também têm sido inoculados ao solo, resultando respectivamente, em degradações de 16 e 12% do fenantreno e de 22 e 25% do pireno presente no solo após 30 dias da incubação (Potin et al., 2004). O *Pleorotus ostreatus* foi inoculado ao solo contaminado com antraceno e pireno, sendo que após 8 semanas degradou respectivamente, 87 e 93% destes HAPs (Novotný et al., 2004).

Sendo a baixa biodisponibilidade um dos fatores limitantes da bioremediação dos HAPs, tem sido dada atenção a utilização de biossurfactantes para aumentar a degradação destes compostos no solo e desta forma, a bioaugmentação pode ser realizada também com microrganismos produtores de biossurfactantes, como demonstrado por Banat (1995), que inoculou em um solo contaminado com hidrocarbonetos as bactérias *Pseudomonas* ML2 e *Acinotobacter haemoliticus*, ambas reconhecidas produtoras de biossurfactantes, sendo que após dois meses de incubação a redução média da concentração de hidrocarbonetos em relação ao controle foi de 55% no solo inoculado com *A. haemoliticus* e de 41% para o solo inoculado com a *Pseudomonas* ML2. Dean et al. (2001) verificou que a co-inoculação de um isolado produtor de biossurfactante e um degradador de fenantreno aumentou em aproximadamente quatro vezes a mineralização deste composto

no solo, quando comparado ao tratamento onde somente a bactéria degradadora havia sido inoculada.

2.1.3 FATORES AMBIENTAIS QUE INFLUENCIAM A BIODEGRADAÇÃO DE HAPs NO SOLO

Os HAPs são poluentes com potencial para serem transformados em substâncias inertes através da atividade dos microrganismos do solo. No entanto, a biodegradação pode ser dificultada se as condições ambientais não forem favoráveis a sobrevivência e a atividade dos microrganismos degradadores (Turco, 1999). Esta limitação pode ser superada pela modificação de algumas condições do solo como, a disponibilidade de água, de oxigênio, de nutrientes inorgânicos e pH.

2.1.3.1 Água

Dentre todos os fatores supra citados, o conteúdo de água no solo é considerado por Haider (1999) como o mais crítico. Em vista da essencialidade desta substância aos processos biológicos e pela sua elevada participação na composição celular, uma alta atividade microbiana no solo somente poderá ocorrer se houver adequada disponibilidade de água aos microrganismos.

Além disto, o teor de água no solo tem relação inversa com a disponibilidade de oxigênio, uma vez que a água e o ar ocupam o mesmo espaço poroso no solo. Assim, indiretamente, o teor de água no solo influencia quanti-qualitativamente a atividade dos microrganismos por determinar a composição das populações microbianas e o tipo de metabolismo (aeróbio, microaeróbio ou anaeróbio) dominante num determinado local (Alexander, 1999).

Os solos com baixo conteúdo de água disponível reduzem o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos e conseqüentemente, a degradação dos HAPs no solo. Por outro lado os solos saturados são deficientes em oxigênio, uma vez que os macroporos estão cheios de água. Do ponto de vista prático, nenhuma transformação metabólica de compostos petroquímicos ocorre em

ambiente anaeróbio. Além disso, a depleção do ar do solo estimula a população microbiana a utilizar aceptores alternativos como o nitrato e o sulfato, causando transformações muitas vezes indesejáveis nos compostos inorgânicos do solo (Cheng; Mulla, 1999).

Várias pesquisas foram realizadas buscando o equilíbrio entre os conteúdos de água e de ar que possibilitem maximizar a taxa de biodegradação dos poluentes no solo. Segundo Atlas; Bartha (1998) e Alexander (1999) as ótimas condições para a atividade da população microbiana no solo ocorrem entre 50 e 70% da capacidade de campo. Porém, num estudo de Bartha (1986) a biodegradação de hidrocarbonetos no solo foi inibida em 66% da capacidade de campo, sendo que a maior atividade degradativa ocorreu em 100% da capacidade de campo. Mais recentemente, a biodegradação de hidrocarbonetos no solo em diferentes teores de umidade foi avaliada por Atagana et al. (2003), confirmando 60-70% da capacidade de campo como o valor que possibilitou maiores contagens da população microbiana degradadora e onde ocorreu maior degradação dos contaminantes. Já Haider (1999) verificou que a ótima atividade de biodegradação por bactérias e fungos ocorreu nos potenciais de água de $-0,01$ a $-0,05$ MPa, o que corresponde a 40 a 45% da capacidade de campo de um solo argiloso. Abaixo de $-8,0$ MPa a atividade bacteriana foi zero, porém os fungos mantiveram-se ativos até -10 MPa. Para o mesmo autor, em condições de alta disponibilidade de substrato, os solos têm água disponível insuficiente para suportar máxima atividade microbiana.

Assim, em vista da variabilidade das características físicas dos diferentes solos, das diversas populações microbianas que podem atuar na degradação e da variação dos dados observados na literatura justifica-se determinar a umidade que possibilite maior biodegradação de HAPs nas condições dos nossos estudos.

2.1.3.2 pH

O pH do solo afeta a atividade dos microrganismos diretamente, através dos efeitos da concentração dos íons H^+ nas células e indiretamente, através da influência na disponibilidade de nutrientes e de metais pesados no solo.

Cada organismo tem uma faixa de pH onde o crescimento é possível e um pH ótimo bem definido. Fora desta faixa de pH, a permeabilidade celular é bastante afetada e conseqüentemente, a atividade enzimática celular. Isto porque, independente do pH do meio externo, o pH citoplasmático dos microrganismos é 7,0. A manutenção deste valor, ou outro muito próximo a este, se faz necessário pois uma mudança no estado de ionização dos grupos químicos do sítio ativo ou a eliminação de interações iônicas alteram a conformação ativa e a estabilidade das enzimas e, por conseqüência, reduzem drasticamente sua atividade (Lehninger, 1995).

Já indiretamente, o pH do solo afeta a disponibilidade de elementos essenciais a nutrição microbiana, como o fósforo e os micronutrientes. Além disso, a redução do pH aumenta a disponibilidade do alumínio, do manganês e dos metais pesados que podem ser tóxicos aos microrganismos. Mielniczuk (1991) avaliou o efeito do pH 4,6 e 6,8 na mineralização do lodo oleoso no solo durante 272 dias de incubação, encontrado aumento de 66% na produção de C-CO₂ quando da correção do pH. Atagana et al. (2003) observaram que as maiores contagens da população de degradadores e maior degradação dos hidrocarbonetos no solo ocorreu nos pH 6,5 e 7,0. Normalmente, os fungos crescem em pH mais ácidos que as bactérias, o que demanda a determinação do pH de maior atividade do consórcio microbiano, formado por estes dois grupos de microrganismos.

2.1.3.3 Nutrientes

Em ambientes naturais o nutriente que normalmente limita o crescimento microbiano é o carbono, sendo que os nutrientes inorgânicos estão presentes em quantidades que excedem as demandas das comunidades microbianas (Alexander, 1999). A adição de HAPs ao solo com potencial de serem utilizados como substrato para o crescimento dos microrganismos pode fazer com que outros nutrientes que não o carbono se tornem limitantes (Atagana et al., 2003).

O montante de nutrientes inorgânicos necessários para o metabolismo de uma certa quantidade de HAP depende da taxa de crescimento, da composição química celular e do coeficiente de produtividade ($y = g$ biomassa.

g substrato¹) do microrganismo degradador (Vrede et al., 2002). Interpretando-se esta afirmação de outra maneira pode-se concluir que a disponibilidade de nutrientes inorgânicos irá influenciar os parâmetros fisiológicos acima citados. Por isso, a taxa de degradação, a duração da fase de adaptação e a extensão da degradação são afetadas pela disponibilidade de nutrientes inorgânicos (Johnson; Scow, 1997).

O aumento do conteúdo de carbono orgânico resultante da adição de HAPs no solo reduz em termos proporcionais o conteúdo de N, P e outros nutrientes, que devem ser disponibilizados adequadamente visando satisfazer os aspectos assimilatórios do processo de degradação. Adições de adubos, principalmente nitrogenados e fosfatados, têm sido utilizados para o balanço de nutrientes nos solos onde o processo de biodegradação de hidrocarbonetos esteja em curso.

Uma relação C:N:P de 100:10:1 tem sido normalmente utilizada na biodegradação de resíduos (Cheng; Mulla, 1999; Sadowsky; Turco, 1999; Moreira; Siqueira, 2001). Esta relação foi deduzida a partir da composição química média das células bacterianas crescendo em um meio com carbono de fácil assimilação, que é de 50% de C, 14% de N e 3% de P da massa seca. Disto, obtém-se uma relação C:N:P de 50:14:3, expressa em miligramas. Com uma incorporação de 40% de C na biomassa, uma relação teórica seria de 120:14:3 em miligramas, ou 100:10:1 em molar (Leys et al., 2005). No entanto, desde 1979, Dible; Bartha observaram que a maior atividade de biodegradação pode ocorrer em relações distintas a esta, pois a relação C:N:P de 800:13:1 foi a que proporcionou maior degradação de um resíduo oleoso no solo. Zhou; Crawford (1995) obtiveram as maiores degradações da gasolina no solo com relações C:N variando de 18:1 a 50:1. Neste mesmo trabalho a relação C:N de 1,8:1 inibiu a degradação. Atagana et al. (2003) observaram durante 6 semanas que a degradação de hidrocarbonetos foi muito baixa na relação C:N natural do solo de 130:0,08. Nas relações C:N de 25:1, 20:1, 15:1, 10:1 e 5:1, e C:N:P de 10:1:2 as porcentagens de degradação foram próximas, com valor médio de 55%, sendo que a relação 25:1 foi a que proporcionou maior e a relação 5:1 a que proporcionou menor degradação, com 68,7 e 33,0%, respectivamente.

Apesar do nitrogênio ser o nutriente que normalmente mais limita a biodegradação (Liebeg; Cutright, 1999), adições de fósforo também podem trazer benefícios. Mills; Frankenberger (1994) obtiveram aumentos de aproximadamente 50% na mineralização do óleo diesel com a adição de 100 a 500 mg kg⁻¹ de fósforo no solo. A importância do fósforo neste processo também foi demonstrado por Liebeg; Cutright (1999) que encontraram as maiores porcentagens de mineralização de vários HAPs no solo onde o fósforo e não o nitrogênio era o macronutriente predominantemente adicionado. Nas nossas condições, Mielniczuk (1991) avaliou a mineralização do lodo oleoso num solo da Unidade de Mapeamento Bom Retiro em doses de nitrogênio de 0 a 200 kg ha⁻¹ e não observou aumentos significativos da produção de C-CO₂, porém a adição de 50 ou de 100 kg ha⁻¹ de fósforo antecipou a mineralização deste resíduo pela microbiota degradadora, reduzindo o período de adaptação na fase inicial do experimento. Os efeitos da adição de N e P ao solo mostram-se variáveis, o que indica que a relação C:N:P de 100:10:1 pode não ser a mais indicada, o que provavelmente se deve as especificidades de cada ambiente no que se refere a teores de nutrientes no solo, tipo de contaminante e população microbiana envolvida (Leys et al., 2005).

Mielniczuk (1991) avaliou os efeitos do nitrogênio, do fósforo, do pH, da quantidade de glicose e de lodo oleoso adicionado ao solo na mineralização deste resíduo petroquímico, obtendo em condições otimizadas menos de 8% ano⁻¹ de mineralização e concluiu que outros fatores provavelmente sejam mais limitantes à biodegradação de hidrocarbonetos que os acima avaliados.

Um dos fatores ambientais que poderia influenciar a degradação dos HAP no solo é a disponibilidade do ferro. Isto porque, este elemento desempenha funções celulares essenciais que estão intimamente relacionadas ao metabolismo dos HAPs, como a participação na estrutura das enzimas do sistema multicomponente das dioxigenases (periféricas) e participação como cofator enzimático nas enzimas de fissão (Harayama, 1999). Além disso, o ferro desempenha outras importantes funções no metabolismo microbiano, como protetor da célula contra radicais superóxidos, como componente dos citocromos, como cofator ou participante da estrutura de outras enzimas, incluindo algumas do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Wei et al., 2003).

O ferro ocorre nos minerais primários do solo como silicatos ferromagnesianos, na forma de ferro reduzido (Fe^{+2}). O intemperismo destes minerais libera o ferro que, é oxidado e precipitado na forma de óxidos, hidróxidos e oxihidróxidos de Fe^{+3} . Como resultado do processo de intemperismo e de formação do solo, verifica-se a predominância e o aumento da concentração de óxidos de ferro no solo, tais como hematita, goethita, leptocrocita e magnetita (Chesworth, 1991).

A possível limitação de ferro aos microrganismos pode ocorrer porque apesar deste elemento ser um dos metais mais abundantes na Terra, os óxidos de ferro apresentam baixa solubilidade em ambientes aeróbios, sendo que a concentração deste elemento na solução do solo pode ser menor que 10^{-18} M (Andrews et al., 2003). Sob estas condições, o ferro do solo pode não atender a demanda dos microrganismos degradadores de HAPs, sendo que o suprimento de fontes mais solúveis e em concentrações mais adequadas poderia aumentar a taxa de degradação no ambiente.

Dinkla et al. (2001) verificaram que o aumento da disponibilidade do ferro no meio mineral aumentou a degradação do tolueno. Este estímulo provavelmente se deve a que as enzimas envolvidas na degradação dos compostos aromáticos apresentam o ferro como importante componente estrutural e/ou como cofator. Por isso, os mesmos autores verificaram que houve um aumento da demanda por ferro no momento da expressão dos genes que codificam estas enzimas. Em outro estudo o suprimento de ferro em quantidades adequadas aumentou significativamente a atividade das seguintes enzimas de degradação do tolueno: tolueno monooxigenase (56%), benzoato 1,2 dioxigenase (82%), catecol 2,3 dioxigenase (97%) e 2-hidroxiácido semialdeído hidrolase (77%) (Dinkla; Janssen, 2003).

Pesquisas realizadas em nosso laboratório demonstraram que a adição de fontes solúveis de ferro ao meio de cultura (0,1 mM de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) aumentou o crescimento dos três isolados de *Pseudomonas* que utilizavam separadamente vários hidrocarbonetos, além de aumentar em 13% na média, a degradação do antraceno e de estimular a produção de biossurfactantes em um destes isolados. O efeito do ferro na degradação do antraceno no solo foi também avaliado, observando-se que a adição de 50 g kg^{-1} de Fe_2O_3 resultou em pequenos aumentos da mineralização do HAP (Santos, 2004).

O enxofre é outro elemento que está envolvido no metabolismo microbiano dos HAPs, isto porque é parte integrante do sistema multicomponente das dioxigenases, na forma de complexos ferro-enxofre. Além disso, este elemento participa de outras enzimas microbianas (não-heme), faz parte da coenzima A, estabiliza a estrutura terciária das proteínas, através das pontes de bissulfito, sendo essencial para síntese protéica por fazer parte dos aminoácidos cisteína, metionina e homocisteína.

No solo, o enxofre encontra-se quase que totalmente associado à biomassa viva ou morta e desta forma, pode não estar prontamente disponível ou não ser quantitativamente suficiente para suportar uma alta demanda pela população degradadora do solo, quando da adição de HAPs ao solo. Liebeg; Cutright (1999) avaliaram o efeito da adição de diferentes nutrientes na mineralização dos HAPs presentes num solo contaminado e observaram que o maior consumo de O₂ ocorreu quando o enxofre havia sido adicionado em maiores quantidades em relação aos demais nutrientes, inclusive nitrogênio e fósforo.

2.1.4 BIODISPONIBILIDADE DOS HAPs NO SOLO

A presença de populações microbianas aptas a utilizar HAPs e de fatores abióticos adequados a sobrevivência e a atividade desta população pode não garantir a redução da concentração dos poluentes aos níveis exigidos pela legislação ambiental (Huesemann et al., 2002). Pesquisa realizada nas nossas condições demonstrou que a porcentagem dos resíduos petroquímicos que é efetivamente mineralizada pela população microbiana após 200 dias de incubação do solo em condições ambientais otimizadas no laboratório não ultrapassou 6% (Mielniczuk, 1991). A baixa porcentagem de mineralização pode ser conseqüência da limitação de substrato às populações microbianas, devido a sorção dos HAPs à fase sólida do solo (Karimi-Lotfabad et al., 1996).

O termo sorção é definido como o processo em que compostos químicos tornam-se associados a fase sólida. Este processo afeta dramaticamente o destino dos compostos adicionados ao solo. Assim, se um composto encontra-

se dissolvido na solução do solo apresenta maiores possibilidades de sofrer processos como fotooxidação, volatilização, biodegradação, transporte, interação intermolecular, etc, do que se estiver associado à fase sólida, o que de certa forma, representa uma proteção contra estes processos.

A forte tendência de sorção dos HAPs à fase sólida do solo deve-se a sua baixa solubilidade em água. Para a permanência de um composto apolar na fase líquida do solo, é necessário que as moléculas de água rompam as pontes de H que estão estabelecidas com outras moléculas de água. Como esta reorganização tem um custo energético muito elevado, o composto apolar é forçado a deslocar-se na direção dos locais de maior hidrofobicidade, representados no solo pela matéria orgânica (MO) e pela superfície dos minerais (Schwarzenbach et al., 1993).

2.1.4.1 Sorção dos HAPs na matéria orgânica

A MO é a principal matriz hidrofóbica do solo. Isto porque ela é constituída principalmente de átomos de C e de H. Conforme o modelo proposto por Schnitzer; Khan (1978) citado por Camargo et al. (1999), a composição média de uma unidade de ácido húmico e fúlvico, em termos de fórmula química é, respectivamente, $C_{187}H_{186}O_{89}N_9S$ e $C_{135}H_{182}O_{95}N_5S_2$. Isto faz com que as pontes de H estejam limitadas a determinados locais de sua estrutura, além disso, por se encontrar em um meio hidrofílico que é o solo, as moléculas de MO tendem a exporem suas superfícies carregadas para o exterior e formar espaços hidrofóbicos em seu interior, nos quais os compostos apolares podem penetrar e dissolver-se num meio não-aquoso (Schwarzenbach et al., 1993). Como este processo não está limitado a interface, pode ser referido como uma absorção. Assim, o sorbato (composto apolar) está distribuído entre duas soluções - água e MO (sorbente), sendo que a razão de equilíbrio entre as fases pode ser definida pelo K_d :

$$K_d = \frac{C_s}{C_w}, \quad (1)$$

onde C_s é a concentração total do sorbato associada ao sorbente (mol kg^{-1}) e C_w é a concentração total do sorbato na solução (mol L^{-1}).

O C_s pode ser definido como:

$$C_s = C_{om} \times f_{om}, \quad (2)$$

onde C_{om} é a concentração do sorbato associado com a MO (mol kg^{-1} de MO) e f_{om} é a fração do solo que é MO (kg de MO kg^{-1} de solo).

Além do teor, as características específicas da MO de um determinado solo também podem ser importantes na sorção de HAPs. Esta particularidade pode ser avaliada pelo coeficiente de partição K_{om} :

$$K_{om} = \frac{C_{om}}{C_w}, \quad (3)$$

substituindo esta última equação no K_d , temos:

$$K_d = K_{om} \times f_{om} \quad (4)$$

Então, a razão de equilíbrio de um composto apolar entre a fase sólida e a fase líquida do solo (K_d) depende tanto das propriedades deste solo no que diz respeito ao seu conteúdo de MO (f_{om}), quanto das características intrínsecas da MO presente neste solo (K_{om}) (Schwarzenbach et al., 1993).

No que diz respeito ao K_{om} , Lueking et al. (2000) identificaram dois modelos que poderiam determinar diferentes capacidades de sorção de HAPs. A MO oriunda de um húmus do Estado de Michigan (EUA) apresentou capacidade de sorção do fenantreno 2,5 vezes menor que um xisto oriundo do Canadá. Segundo estes autores, os solos que sofreram significantes alterações diagenéticas (conjunto de fenômenos físicos e químicos que atuam sobre os sedimentos após sua deposição, como por exemplo, compactação, cimentação, etc.) apresentam MO dominada por moléculas fisicamente condensadas e quimicamente reduzidas. Estes solos exibem sorção dos HAPs não linear, lenta e somente parcialmente reversível, o que resulta em elevada capacidade de sorção quando o conteúdo de C orgânico é normalizado. Por outro lado, solos que sofreram pouca ou nenhuma alteração diagenética apresentam MO dominada por moléculas fisicamente mais amorfas e quimicamente mais oxidadas. Estes solos exibem sorção próximo a linear, rápida e reversível, além de apresentarem menor capacidade de sorção dos HAPs quando o conteúdo de C orgânico é normalizado.

Desconsiderando-se os casos em que ocorrem alterações diagenéticas, tem-se observado que a MO dos solos agrícolas apresenta valores de K_{om} muito semelhantes para um mesmo composto químico. Assim, Schwarzenbach

et al. (1993) determinaram o K_{om} do pireno em 14 solos e verificaram que os valores foram muito próximos. Resultados semelhantes também foram obtidos pelos mesmos autores para o diclorobenzeno e para o dibenzotiofeno. Destes estudos depreende-se que o conteúdo de MO é a característica que mais influencia na partição do HAP entre a fase sólida e líquida do solo. Vários autores demonstraram relações lineares positivas entre o conteúdo de C orgânico do solo e a capacidade de sorção de HAPs (Carmichael et al., 1997; Totsche et al., 1997; Cornelissen et al., 1998; Nam et al., 1998; Lueking et al., 2000).

2.1.4.2 Sorção dos HAPs nos minerais

As superfícies do tipo M-OH, presentes nos minerais sem cargas, não formam pontes de H com a água e são hidrofóbicas, sendo que nelas pode ocorrer a sorção de compostos apolares (Laird; Sawhney, 2002). Saada et al. (1995) demonstraram que 75% da superfície da caulinita é hidrofóbica, o que resultou em sorção de hidrocarbonetos duas vezes maior que a illita, que apresenta 60% da sua superfície hidrofóbica. Murphy et al. (1990) procederam a eliminação da MO associada a caulinita e a hematita do solo e observaram que a caulinita apresentou capacidade de sorção do antraceno três vezes maior que a hematita, o que segundo os autores deveu-se a maior hidrofobicidade da sua superfície.

Este tipo de sorção assume maior importância nos solos com conteúdos de MO iguais ou menores que 4 g kg^{-1} , onde as superfícies hidrofóbicas estão pouco ou nada cobertas pela MO. Já em solos com conteúdos de MO mais elevados, a principal matriz hidrofóbica do solo é a MO, que apresenta capacidade de sorção de hidrocarbonetos muitas vezes maior que aquela apresentada pelas superfícies minerais (Murphy et al., 1990).

2.1.4.3 Sorção dos HAPs no solo

A composição da fase sólida do solo determina a sua capacidade de sorção de HAPs. Assim, é de se esperar que solos com diferentes conteúdos de MO e composições mineralógicas apresentem diferentes capacidades de sorção e de disponibilização estes compostos aos microrganismos

degradadores do solo. Neste contexto, Nam et al. (1998) avaliaram a mineralização do antraceno em seis solos com diferentes conteúdos de C orgânico, demonstrando que houve maior sorção deste HAP e conseqüentemente menor mineralização, nos solos com conteúdo de carbono orgânico maior que 20 g kg^{-1} . A dessorção e a mineralização do fenantreno em dois solos foram correlacionadas por Carmichael et al. (1997). Os autores observaram que no solo com maior conteúdo de C orgânico, a dessorção do fenantreno foi menor, o que resultou em menor taxa de mineralização deste composto.

Apesar de teoricamente contraditória, em alguns trabalhos o conteúdo de C orgânico não tem apresentado relação com a sorção ou mineralização dos HAPs no solo. Karimi-Lotfabad et al (1996) avaliaram a sorção do antraceno em três solos e observaram que nos menores conteúdos de C orgânico houveram as maiores sorções deste HAP. Num trabalho com 16 solos, Chung; Alexander (1998) não observaram relação entre a sorção ou a mineralização do fenantreno e alguma das características destes solos, porém quando o conteúdo de C orgânico era maior do que 10 g kg^{-1} havia maior sorção e menor mineralização do fenantreno. Estes resultados indicam que a sorção dos HAPs no solo é uma característica de fundamental importância por influenciar a biodisponibilidade destes compostos a microbiota degradadora e conseqüentemente, o sucesso da biorremediação.

2.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, Y. et al. Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from contaminated soils. **Biodegradation**, Dordrecht, v.10, n.2, p.149-157, 1999.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1999. 453p.
- ALLARD, A.S. et al. The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.46, n.1, p.43-49, 2000.
- ANDREWS, S.C. et al. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam v.27, n.2-3, p.215-237, 2003.
- ANGERER J. et al. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a graphite-electrode producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene and monohydroxylated metabolites of phenanthrene. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, New York, v.69, n.5, p.323-331, 1997.
- ANH, Y. et al. Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from contaminated soils. **Biodegradation**, Dordrecht, v.10, n.2, p.149-157, 1999.
- ATAGANA, H.I. et al. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. **Biodegradation**, Dordrecht, v.14, n.4, p.297-307, 2003.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. 4th ed. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1998. 694p.
- BANAT, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil-recovery and oil pollution remediation-a review. **Bioresource Technology**, Dallas, v.51, n.1, p.1-12, 1995.

- BARTHA, R. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. **Microbial Ecology**, New York, v.12, n.1, p.155-172, 1986.
- BAZALEL, L. et al. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n.1, p.292-295, 1996.
- BENNETT, J. W. et al. Use of fungi in biodegradation. In: HURST, J. et al. **Manual of Environmental Microbiology**. Washington: ASM, 1996. p.758-765.
- BEWLEY, R.J.F. Field implementation of in situ bioremediation: Key physicochemical and biological factors. In: STOTZKY, G. et al. **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.473-542.
- BOONCHAN, S. et al. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.3, p.1007-1019, 2000.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, Chicago, v.74, n.1, p.63-67, 2000.
- BRADY, N.C.; WEIL, R.R. The soils around us. In: BRADY, N.C.; WEIL, R.R. **The nature and properties of soils**. 13th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002. p.1-29.
- BUGG, T. et al. Uptake and active efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.12, p.5387-5392, 2000.
- BUMPUS, J.A. et al. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white-rot fungus. **Science**, Washington, v.228, n.4706, p.1434-1436, 1985.
- CALDWELL, D.R. **Microbial physiology and metabolism**. 2nd ed. Belmont: Star, 2000. 403p.
- CAMARGO, F.A.O. et al. Macromoléculas e substâncias húmicas. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O (ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo**. Porto Alegre: Gênese, 1999. p.27-40.
- CAMEOTRA, S.; BOLLAG, J.M. Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Philadelphia, v.30, n.2, p.111-126, 2003.

- CARMICHAEL, L.M. et al. Desorption and mineralization kinetics of phenanthrene and chrysene in contaminated soils. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.31, n.1, p.126-132, 1997.
- CERNIGLIA, C. E.; HEITKAMP, M. A. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium*. **Methods in Enzymology**, San Diego, v.188, n.2, p.148-153,1990.
- CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology; Biotechnology**, Hampshire, v.19, n. 5-6, p.324–333, 1997.
- CERNIGLIA, C.E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.30, n.1, p.31-71, 1984.
- CETESB. **Lista holandesa de valores de qualidade do solo e da água subterrânea – valores STI.** Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/anexos/download/6530.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2005a.
- CETESB. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo.** Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp>. Acesso em: 20 jul. 2005b.
- CHAKRADEO, P. P. et al. Effect of benzo(a)pireno and methyl(acetoxymethyl)nitrosamine on thymidine uptake and induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human fetal esophageal cells in culture. **Cellular Biology International**, Amsterdam, v.17, n.7, p.671-676, 1993.
- CHENG, H.H.; MULLA, D.J.. The soil environment. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed.) **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.1-13.
- CHESWORTH, W. Geochemistry of micronutrients. In: MORTVEDT, J.J. et al (Ed.). **Micronutrients in agriculture**. 2nd ed. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1991. p.1-30.
- CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, Bradford, v.93, n.6, p.915–929, 2002.

- CHUNG, N.; ALEXANDER, M. Differences in sequestration and bioavailability of organic compounds aged in dissimilar soils. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.32, n.7, p.855-860, 1998.
- COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS. **Proposta de directiva do parlamento europeu e do conselho relativa ao arsênio, ao cádmio, ao mercúrio, ao níquel e aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no ar ambiente**. Lisboa, 2003. 423p.
- COOPER, D.G. et al. Surface active compounds from microorganisms. **Applied Microbiology**, Washington, v.26, n.2, p.229-253, 1980.
- CORNELISSEN, G. et al. Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.32, n.7, p.966-970, 1998.
- DEAN, S.M. et al. Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.30, n.4, p.1126-1133, 2001.
- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, n.1, p.47-64, 1997.
- DIBBLE, J.T.; BARTHA, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, n.4, p.729-739, 1979.
- DINKLA, I.J.T. et al. Effects of iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the TOL (pWWO) plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.8, p.3406-3412, 2001.
- DINKLA, I.J.T.; JANSSEN, D.B. Simultaneous growth on citrate reduces the effects of iron limitation during toluene degradation in *Pseudomonas*. **Microbial Ecology**, New York, v.45, n.1, p.97-107, 2003.
- DOHSE, D.M.; LION L.W. Effect of microbial polymers on the sorption and transport of phenanthrene in a low-carbon sand. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.28, n.4, p.541-548, 1994.
- EDGEHILL, R.U. et al. Bioremediation by inoculation with microorganisms. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed.) **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.290-314.

- EVANS, W.C. et al. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads-rings-fission mechanism. **Biochemical Journal**, London, v.95, n.3, p.819-831, 1965.
- HABE, H.; OMORI, T. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.67, n.2, p.225-243, 2003.
- HAIDER, K. Microbe-soil-organic contaminant interactions. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed.) **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.33-51.
- HAMMEL, K.E. et al. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons and dibenzo[p]dioxins by *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biological Chemistry**, Stanford, v.261, n.36, p.16948-16952, 1986.
- HARAYAMA, K. et al. Bacterial aromatic ring cleavage enzymes are classified into different gene families. **Journal Biological Chemistry**, Stanford, v.264, n.26, p.15328-15333, 1989.
- HAWLEY, G.G. **The condensed chemical dictionary**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993. 563p.
- HEYNEN, C.E. et al. Dynamics of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into soil: the effect of bentonite clay on predation by protozoa. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.20, n.4, p.483-488, 1988.
- HOLLIGER, C. et al. Contaminated environment in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.20, n.4, p.517-523, 1997.
- HUESEMANN, M.H. et al. Microbial factors rather than bioavailability limit the rate and extent of PAH biodegradation in aged crude oil contaminated model soils. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.6, n.4, p.321-336, 2002.
- INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS): **Environmental Criteria 202**. Selected non-heterocyclic PAHs. Geneva, World Health Organization, 1998.
- JACQUES, R.J.S. et al. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, 2005. (aceito para publicação).

- JAIN, D.K. et al. Effect of addition of *Pseudomonas aeruginosa* UG2 inocula or biosurfactants on biodegradation of selected hydrocarbons in soil. **Journal of Industrial Microbiology**, London, v.10, n.2, p.87-93, 1992.
- JOHNSEN, A. R. et al. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, Oxford, v.133, n.1, p.71-84, 2005.
- JOHNSEN, A.R.; KARLSON, U. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.63, n.3, p.452-459, 2004.
- JOHNSON, C.R.; SCOW, K.M. Effect of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils. **Biodegradation**, Dordrecht, v.10, n.1, p.43-50, 1999.
- JONES, K.C. Organic contaminants in Welsh Soils: polynuclear aromatic hydrocarbons. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.13, n.5, p.540-550, 1989.
- KARIMI-LOTFABAD, S. et al. Reactions of polynuclear aromatic hydrocarbons on soil. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.30, n.4, p.1145-1151, 1996.
- KASTNER, M. et al. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.1, p.359-362, 1998.
- KAZUNGA, C.; AITKEN, M.D. Products from incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.5, p.1917-1922, 2000.
- KHAN, A.A. et al. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.8, p.3377-3585, 2001.
- KOSARIC, N. Biosurfactants for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v.39, n.4, p.295-304, 2001.
- KOTTERMAN, M.J.J. et al. Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. and indigenous microflora. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.8, p.2853-2858, 1998.

LAIRD, D.A.; SAWHNEY, B.L. Reactions of pesticides with soil minerals. In: DIXON, J.B. et al. (Ed.) **Soil mineralogy with environmental applications**. Madison: SSSA, 2002. p.766-794.

LEHNINGER, A.L. et al. **Principles of biochemistry**. 2nd ed. New York: Worth Publishers, 1995. 839p.

LEYS, N.M. et al. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.66, n.6, p.726–736, 2005.

LIEBEG, E.W.; CUTRIGHT, T.J. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.44, n.1, p.55-64, 1999.

LIMA, C.B.S. et al. Efluentes: a qualidade da água comprometida. In: MENEGAT, R. et al. (Ed.) **Atlas ambiental de Porto Alegre**. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 1998. p.157-158.

LUEKING, A.D. et al. Relationship of soil organic matter characteristics to organic contaminant sequestration and bioavailability. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.29, n.1, p.317-323, 2000.

MIELNICZUK, C. **A população microbiana e a degradação de resíduo petroquímico no solo**. 1991. 134 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

MILLS, S.A.; FRANKENBERG, W.T. Evaluation of phosphorus sources promoting bioremediation of diesel fuel soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.53, n.2, p.280-284, 1994.

MISHRA, V. et al. Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v.27, n.2, p.133-166, 2001.

MIYATA, N. et al. Saturable, energy-dependent uptake of phenanthrene in aqueous phase by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-135. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.1, p.363-369, 2004.

- MORAIS, M.M.C. et al. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. **World Journal of Microbiology; Biotechnology**, Dordrecht, v.19, n.2, p.191-194, 2003.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626p.
- MURIEL, J.M. et al. Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. **Biotechnology Letters**, London, v.18, n.3, p.235-240, 1996.
- MURPHY, E.M. et al. Influence of mineral-bound humic substances on the sorption of hydrophobic organic compounds. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.24, n.10, p. 1507-1516, 1990.
- NAM, K. et al. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.32, n.23, p. 3785-3788, 1998.
- NATALIE, M. et al. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.66, n.6, p.726-736, 2005.
- NETTO A.D.P. et al. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and their nitrated derivatives (NHPAS): a review of methodology. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.6, p.765-773, 2000.
- NOVOTNY´, C. et al. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology; Biochemistry**, Oxford, v.36, n.10, p.1545-1551, 2004.
- PARASZKIEWICZ, K. et al. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.92, n.3, p.287-294, 2002.
- POLLOCK, T.J. Gellan-related polysaccharides and the genus *Sphingomonas*. **Journal of General Microbiology**, Berks, v.139, n.8, p.1939-1955, 1993.
- POTIN, O. et al. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Oxford, v.54, n.1, p.45-52, 2004.

- PRINCE, R.C.; DRAKE, E.N. Transformation and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed.) **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.89-110.
- RANGEL, C. M. P. **Comunicação pessoal**. Triunfo/RS, 2003.
- RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.44, n.2-3, p.93-100, 1999.
- RODRIGUES, A.C. et al. Three-dimensional distribution of GFP-labeled *Pseudomonas putida* during biofilm formation on solid PAHs assessed by confocal laser scanning microscopy. **Water Science and Technology**, London, v.47, n.5, p.139-142, 2003.
- RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, Bedford, v.3, n.4, p.229-236, 2001.
- SAADA, A. et al. Comparison of the hydrophilicity/hydrophobicity of illites and kaolinites. **Journal of Colloid and Interface Science**, Providence, v.174, n.1, p.185-190, 1995.
- SADOWSKY, M.J.; TURCO, D. Enhancing indigenous microorganisms to bioremediate contaminated soils. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed.) **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.274-288.
- SANTOS, E.C. **Biodegradação do antraceno estimulada por ferro**. 2004. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- SCHELL, M. A. Transcriptional control of the *nah* and *sal* hydrocarbon-degradation operons by the *nahR* gene-product. **Gene**, Amsterdam, v.36, n.3, p.301-309, 1985.
- SCHWARZENBACH, R.P. **Environmental organic chemistry**. New York: John Wiley; Sons, 1993. 681p.
- SPATH, R.; WUERTZ S. Sorption properties of biofilms. **Water Science**, Oxford, v.37, n. 3-4, p.207-210, 1998.
- SKIPPER, H.D. Bioremediation of contaminated soils. In : SYLVIA, D. M. et al. (Ed.) **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, 1999. p.469-481.

- THE UNIVERSITY OF MINNESOTA, Minnesota, 2005.
- Biocatalysis/Biodegradation Database:** Microbial biocatalytic reactions and biodegradation pathways primarily for xenobiotic, chemical compounds. Disponível em: <http://umbbd.ahc.umn.edu/pha2/pha2_image_map.html>. Acesso: em 25 mai. 2005.
- TOTSCHKE, K.U. et al. Dissolved organic matter-enhanced retention of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil miscible displacement experiments. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.26, n.4, p.1090-1100, 1997.
- TURCO, R.F. Soil microorganisms and their requirements. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed.) **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.15-32.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES - USDHS. **Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons**. Washington, 1995.
- VAN VEEN, J.A. et al. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, n.2, p.121-135, 1997.
- VERSCHUEREN, K. **Handbook of environmental data of organic chemicals**. 4th ed. Chichester, England: Wiley, 2001. 2416p.
- VREDE, K. et al. Elemental composition (C, N, P) and cell volume of exponentially growing and nutrient-limited bacterioplankton. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.6, p.2965-2971, 2002.
- WEI, Y.H. et al. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Washington, v.96, n.2, p.174-178, 2003.
- WEIGAND, H. et al. Fate of anthracene in contaminated soil: transport and biochemical transformation under unsaturated flow conditions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v.53, n.1, p.71-81, 2002.
- WHITE, K.L. An overview of immunotoxicology and carcinogenic polycyclic aromatic-hydrocarbons in the environmental. **Journal of Environmental Science and Health**, New York, v.4, n.2, p.163-202, 1986.
- WICK L.Y. et al. Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.58, n.5, p.378-385, 2002.

WICK, L.Y. et al. Kinetics of mass transfer-limited bacterial growth on solid PAHs. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.35, n.2, p.354-361, 2001.

WILLUMSEN, P.A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, Dordrecht, v.7, n.5, p.415-423, 1997.

ZHANG, Y. M. et al. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.31, n.8, p.2211-2217, 1997.

ZHOU, E.; CRAWFORD, R.L. Effects of oxygen, nitrogen and temperature on gasoline biodegradation in soil. **Biodegradation**, Dordrecht, v.6, n.2, p.127-140, 1995.

CAPÍTULO II

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS DO SOLO DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

3.1 RESUMO

O antraceno, o fenantreno e o pireno são hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) com propriedades mutagênicas e carcinogênicas, que podem contaminar o solo, uma vez que devido a complexidade estrutural de suas moléculas e a baixa solubilidade em água, não são degradados pela maioria dos microrganismos do solo. A biorremediação é uma estratégia para eliminação dos HAPs do ambiente, onde os microrganismos selecionados irão transformá-los em substâncias inertes, CO₂ e água. O objetivo deste estudo foi isolar, identificar e caracterizar microrganismos degradadores de antraceno, fenantreno e pireno, visando sua utilização na biorremediação de HAPs no solo. Um grama de cada uma das 6 amostras de solo coletadas em uma área de *landfarming* foi adicionado a frascos respirométricos contendo solo contaminado em laboratório com 250 mg kg⁻¹ de antraceno. Após 176 dias, o solo com maior produção de C-CO₂ foi utilizado no enriquecimento dos microrganismos degradadores de antraceno no meio mineral. Os microrganismos foram isolados após 3 transferências com intervalos semanais e identificados pelo seqüenciamento do gene do RNAr. A capacidade de degradar os 3 HAPs em meio mineral foi avaliado por cromatografia gasosa e a versatilidade metabólica dos microrganismos foi avaliada através do crescimento em 18 fontes de C. Do solo do *landfarming* isolou-se um consórcio microbiano composto por 6 bactérias, identificadas como *Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium* sp., *Gordonia polyisoprenivorans*, *Microbacteriaceae bacterium* e *Naphthalene-utilizing bacterium*, e um fungo, *Fusarium oxysporum*. O consórcio microbiano degradou respectivamente 48, 67 e 22% do antraceno, fenantreno e pireno do meio mineral após 30 dias de incubação e cresceu na presença de todas as fontes de C avaliadas. Este consórcio microbiano apresenta potencial para ser utilizado na biorremediação de solos contaminados com HAPs.

3.2 INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos químicos constituídos unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, arranjados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Devido a possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si há atualmente mais de 100 HAPs reconhecidos pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Os HAPs são lipossolúveis na membrana e prontamente absorvidos no intestino dos mamíferos via inalação, exposição oral e dermal, com posterior acúmulo no tecido adiposo. O metabolismo dos HAPs no organismo humano gera compostos epóxidos com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele, devido a presença destes compostos (Netto et al., 2000).

Os HAPs são gerados natural ou antropogenicamente durante a combustão incompleta de substâncias orgânicas como o carvão mineral, óleo cru, gás, madeira, lixo e outros. Os resíduos gerados pelas refinarias e indústrias petroquímicas também apresentam em sua composição uma grande variedade de HAPs, entre os quais, o antraceno, o fenantreno e o pireno. A liberação indiscriminada destes resíduos no ambiente pode provocar contaminação dos recursos naturais, uma vez que, devido a complexidade estrutural e a baixíssima solubilidade em água, os HAPs não são degradados pela maioria dos microrganismos do solo, o que aumenta sua permanência no ambiente e a possibilidade de exposição de humanos e animais a estes compostos.

Uma estratégia para eliminação dos HAPs dos ambientes contaminados é através da biorremediação onde os microrganismos que apresentam capacidade de metabolizar estes compostos irão transformá-los em

substâncias inertes, CO₂ e água. Alguns resultados entretanto, têm demonstrado que a biorremediação pode tornar-se excessivamente lenta e não reduzir a concentração de poluentes aos níveis exigidos pela legislação ambiental (Huesemann et al., 2002; Johnsen et al., 2005). Entre os vários fatores responsáveis por estes insucessos, pode-se destacar a inabilidade dos microrganismos em degradar os HAPs, a baixa biodisponibilidade e a limitação de nutrientes a microbiota degradadora (Boopathy, 2000).

Desde a década de 50, vários trabalhos buscaram selecionar microrganismos em culturas puras com capacidade de degradar HAPs, sendo isoladas bactérias pertencentes principalmente aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, entre outros (Cerniglia, 1984; Zhang et al., 2004), e vários fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Cândida*, *Penicillium*, *Pleorotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera* e *Chrysosporium*, e outros (Cerniglia, 1997). Somente nos últimos anos tem sido dada atenção ao isolamento de consórcios microbianos degradadores de HAPs, que comparativamente às culturas puras, tem se mostrado mais efetivos na degradação destes compostos, devido a capacidade de utilizar um maior número de HAPs como fonte de C, pela maior taxa de degradação e principalmente pela maior mineralização destes compostos, o que aumenta a possibilidade de um processo de biorremediação mais efetivo onde os contaminantes têm maiores chances de serem completamente eliminados do ambiente (Boonchan et al., 2000; Ghazalli et al., 2004).

A biodisponibilidade de um composto no ambiente é determinada pela taxa de transferência de massa do substrato às células microbianas em relação a atividade catabólica intrínseca (Johnsen et al., 2005). Os microrganismos degradadores podem aumentar a biodisponibilidade de HAPs pela excreção de biossurfactantes, que são moléculas que apresentam uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica. Estas moléculas reduzem a tensão superficial e interfacial do meio de crescimento, além de exibirem emulsificação de compostos hidrofóbicos e formarem emulsões estáveis, aumentando a solubilidade dos HAPs e conseqüentemente sua disponibilidade no ambiente (Cameotra; Bollag, 2003). O objetivo deste estudo foi isolar, caracterizar e identificar um consórcio

microbiano degradador de antraceno, fenantreno e pireno, visando a seleção de microrganismos para serem utilizados na biorremediação de solos contaminados com HAPs.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Coleta de solo

As amostras de solo utilizadas para o isolamento de microrganismos degradadores de HAPs foram coletadas no *landfarming* do SICECORS (Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos do Pólo Petroquímico do Sul), onde desde 1989 é tratado o lodo oleoso produzido pelas indústrias deste Pólo, localizado em Triunfo/RS, e mais recentemente os resíduos petroquímicos gerados pela Refinaria Alberto Pasqualini, localizada em Canoas/RS. Este *landfarming* é dividido em 12 células, que são áreas de 30 m x 100 m onde os resíduos são adicionados. Selecionaram-se 3 células que haviam recebido resíduos mais recentemente e coletou-se as amostras de solo na profundidade de 0 a 30 cm, em 2 locais escolhidos aleatoriamente no interior de cada célula, resultando em seis amostras, que foram trazidas para o Laboratório de Biorremediação de Solos do Departamento de Solos/UFRGS em caixas de isopor e armazenadas a 4°C.

3.3.2 Seleção da amostra de solo

Em vista da ausência de informações prévias sobre a atividade dos microrganismos heterotróficos nas células do *landfarming* e como forma de aumentar a possibilidade de obtenção de microrganismos degradadores de HAPs optou-se por selecionar, através de um experimento respirométrico, entre as 6 amostras de solo a que apresentasse a maior atividade de mineralização dos HAPs, para ser utilizada nos experimentos posteriores. Um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico arênico da Unidade de Mapeamento Itapoã foi coletado em uma área agrícola sem histórico de recebimento de nenhum tipo

de resíduo. A análise química deste solo realizada no Laboratório de Análises/UFRGS é apresentada na Tabela 1. Este solo foi trazido para o laboratório, seco e peneirado em malha de 2 mm. Para elevar o pH a 6,5 adicionou-se CaCO_3 e MgCO_3 na proporção 3:1, na forma de reagente comercial, incubando-se o solo úmido por 60 dias. Posteriormente, este solo foi contaminado em laboratório com 250 mg kg^{-1} de antraceno. Para isto, preparou-se uma solução concentrada de antraceno dissolvido em acetona, sendo que 3 mL foram adicionados a 50 g de solo no interior de frascos respirométricos de 1,5 L. Estes frascos foram colocados em estufa por 3 horas a 50°C para evaporação da acetona. Após adicionou-se mais 49 g de solo, procedendo-se uma intensa mistura. Devido a baixa fertilidade natural, adicionou-se o equivalente a 100 kg ha^{-1} de N e 50 kg ha^{-1} de P, na forma de solução de NH_4NO_3 e KH_2PO_4 .

TABELA 1. Análise química do solo Itapoã.

Atributo	Valores	Interpretação ¹
Argila (g kg^{-1})	90,0	Classe 4
pH (H_2O)	4,7	Muito baixo
Índice SMP	6,9	-
P (mg dm^{-3})	4,1	Muito baixo
K (mg dm^{-3})	20,0	Baixo
MO (g kg^{-1})	9,0	Baixo
Al trocável ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	0,2	-
Ca trocável ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	0,4	Baixo
Mg trocável ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	0,2	Baixo
S (mg dm^{-3})	3,4	Médio
Fe (g dm^{-3})	0,2	-
Al+H ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	1,6	-
$\text{CTC}_{\text{PH } 7,0}$ ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	2,2	Baixo
Saturação de bases (%)	29,0	Muito baixo
Saturação de Al (%)	8,9	Baixo

¹ Conforme Comissão... (2004).

Após o solo estar corrigido, contaminado com antraceno e fertilizado, em cada frasco respirométrico adicionou-se 1,0 g de uma das amostras de solo do *landfarming*, visando inocular uma população de microrganismos degradadores de HAPs. O tratamento controle não recebeu solo do *landfarming*, sendo utilizado nos frascos respirométricos 100 g de solo Itapoã. Os frascos foram equipados com aparato de captura de CO₂, composto por um copo plástico de 50 mL com 20 mL de NaOH 0,25 M, fechados hermeticamente e incubados em duplicata, a temperatura ambiente no laboratório. Durante um período de 176 dias, semanalmente os frascos eram abertos, a solução de NaOH recebia um mL de BaCl₂ 1 M e era titulada com HCl 0,5 M, utilizando fenolftaleína como indicador. A solução do HCl 0,5 M foi padronizada com tris, conforme Tedesco et al. (1995). Uma amostra com umidade igual ao solo dos frascos respirométricos foi utilizada para determinação da umidade gravimétrica, sendo a produção de C-CO₂ expressa em mg por kg de solo seco.

A produção de C-CO₂ foi quantificada através da fórmula de Stotzky (1965):

$$\text{C-CO}_2 \text{ (mg kg}^{-1} \text{ de solo)} = (B-T) \times \text{eq} \times M \times 10$$

onde B é o volume (em mL) da solução de HCl gasto para titular a prova em branco (frasco respirométrico sem solo); T é o volume (em mL) da solução de HCl gasto para titular os tratamentos; eq é o equivalente-grama do C, que é 6; M é a molaridade da solução padronizada de HCl e 10 é o fator de conversão para kilograma de solo.

3.3.3 Enriquecimento dos microrganismos degradadores de HAPs

Do frasco com maior produção de C-CO₂ foi retirado um grama de solo e adicionado em um frasco de erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio mineral Tanner e 250 mg L⁻¹ de antraceno como única fonte de C e energia. Todos os ensaios utilizaram o meio mineral Tanner com a seguinte composição, em g L⁻¹: CaCl₂ 2H₂O, 0,04; KH₂PO₄, 0,1; NaCl, 0,8; NH₄Cl, 1,0; MgSO₄ 7H₂O, 0,2 e KCl, 0,1. Os micronutrientes foram adicionados na concentração, em mg L⁻¹: CoCl₂ 6H₂O, 0,1; MnCl₂ 4H₂O, 0,425; ZnCl₂, 0,05; CuSO₄ 5H₂O, 0,015; NiCl₂ 6H₂O, 0,01; Na₂MoO₄ 2H₂O, 0,01; Na₂SeO₄, 0,01 e Fe(NO₃)₃, 12,1, conforme modificação de Santos (2004). O meio foi ajustado

para pH 7,0, adicionado de antraceno e autoclavado a 121°C por 20 minutos. Os frascos com o meio mais o solo foram incubados a 150 rpm e 30°C. A cada 7 dias, uma alíquota de 1 mL da cultura crescida era transferida para outro frasco contendo o mesmo meio estéril e incubado nas mesmas condições.

3.3.4 Isolamento, purificação e armazenamento dos microrganismos degradadores de HAPs

Após 3 transferências, a cultura crescida foi diluída em solução salina (NaCl 0,85%) e plaqueada em meio ágar nutritivo (extrato de carne 3 g, peptona 5 g, ágar 15 g, água destilada 1 L, pH 7,0) contendo 250 mg L⁻¹ de antraceno, sendo as placas incubadas por 72 horas a 30°C. As colônias de bactérias crescidas nas placas que apresentaram diferenças visuais tais como: aspecto, tamanho, coloração, forma e borda da colônia, foram estriadas no mesmo meio até purificação dos isolados e armazenadas sob refrigeração a 4°C. A colônia de fungo foi repicada até purificação em meio ágar malte (extrato de malte 30 g, peptona 5 g, ágar 15 g, água destilada 1 L, pH 5,4) contendo 250 mg L⁻¹ de antraceno e armazenada no mesmo meio, sob refrigeração a 4°C. Deste procedimento isolou-se um consórcio microbiano composto por 6 bactérias e um fungo.

3.3.5 Concentração do carbono no meio mineral

Em vista de que em vários ensaios posteriores seria utilizado o meio mineral Tanner, realizou-se a quantificação da concentração de C orgânico dissolvido presente neste meio, como forma de se evitar que outras fontes de C, que não os HAPs, pudessem ser adicionadas por algum dos reagentes inorgânicos. Assim, utilizou-se o Analisador de Carbono Orgânico Total (TOC-V CSH, Shimadzu, Japão) para determinar a concentração de C orgânico dissolvido na água destilada (controle negativo), no meio mineral, no meio mineral mais 250 mg L⁻¹ de antraceno e no meio mineral mais 590 mg L⁻¹ de glicose (controle positivo), que equivale a mesma quantidade de C adicionada pelo antraceno (236 mg L⁻¹ de C).

Conforme dados da literatura, são muito variáveis as concentrações de HAPs no meio mineral utilizadas por outros autores. Assim, para determinar a concentração que seria utilizada nos ensaios realizou-se um teste onde o consórcio microbiano foi inoculado em frascos de erlenmeyer contendo 100 mL de meio mineral e as concentrações de antraceno de 0; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 mg L⁻¹. Nestes meios, foram adicionados ainda 50 mg L⁻¹ de TTC (cloreto de trifeniltetrazólio). Os frascos foram incubados em duplicata a 150 rpm e 30°C e, após 30 dias, a redução do TTC a TPF (trifenil formazan) foi avaliada visualmente, como indicativo da atividade metabólica dos microrganismos em cada uma das concentrações (Alef, 1995).

3.3.6 Curvas de crescimento e pH no meio mineral

O crescimento dos isolados bacterianos e do fungo no meio mineral contendo 250 mg L⁻¹ de antraceno foi avaliado durante 36 dias. Para isto, inoculou-se o consórcio microbiano em frascos contendo 100 mL de meio mineral mais 250 mg L⁻¹ de antraceno, que foram incubados em duplicata a 150 rpm e 30°C. Neste período eram realizadas contagens do número de unidades formadoras de colônia (UFC) mediante diluição das culturas crescidas em solução salina e plaqueamento em meio ágar nutritivo e ágar malte, sendo as placas incubadas por 72 horas a 30°C para posterior contagem. Semanalmente também era medido o pH do meio mineral com a cultura em crescimento.

3.3.7 Identificação do consórcio microbiano

Para a caracterização inicial dos isolados bacterianos a morfologia celular foi avaliada por coloração de Gram. Para identificação realizou-se o seqüenciamento do gene do rRNA 16S, conforme descrito por Camargo et al (2003). As bactérias foram crescidas em meio caldo nutriente, sendo as células coletadas por centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos. O DNA foi extraído de acordo com o método de Asubel et al. (1997). As células foram suspensas em numa solução tampão TE, SDS (10%) e proteinase K, e incubadas por uma hora a 37°C. Uma mistura de NaCl (5 M) e CTAB/NaCl (4,1 g de NaCl e 10 g

de brometo de N-cetil-N.N.N.-trimetilamônio) em 100 mL de água destilada pré-aquecida) foi adicionada, incubando-se por 10 minutos a 65°C. A solução foi extraída com 780 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24/1), centrifugada por 5 minutos, sendo a fase aquosa novamente extraída com igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1). Após centrifugação de 5 minutos, o DNA presente na fase aquosa foi precipitado com 0,6 volume de isopropanol e o precipitado foi lavado com etanol 70%. O pellet de DNA foi seco usando um concentrador e ressuspendido em água livre de nuclease. *Primers* universais bacterianos correspondendo as posições 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 519R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3') da *E.coli* foram usadas para amplificação do gene do rRNA 16S por PCR. A mistura de PCR (Cat. Nº M7502, Promega, Madison, Wisconsin) foi usada de acordo com instruções do fabricante. O DNA foi amplificado usando PCR com 35 ciclos (desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, demais desnaturações de 95°C por um minuto, anelamento a 55°C por um minuto, extensão a 72°C por um minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos). Os amplicons foram analisados em gel de agarose 2% e purificados usando o kit de extração de gel QIAEX II (QIAGEN, Valência, Califórnia), de acordo com instruções do fabricante. Brevemente, um pedaço do gel foi suspenso em tampão QXI, foi adicionado a suspensão QIAEX II, seguido de mistura em vortex. A suspensão foi incubada a 50°C por 10 minutos, centrifugada por 30 segundos e o pellet foi lavado duas vezes com tampão QXI e uma vez com tampão PE. Após secagem ao ar por 15 minutos, o DNA foi eluído com água livre de nuclease. O seqüenciamento do DNA foi realizado usando um kit terminador BigDye (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) e um analisador genético Applied Biosystems ABI 3100. O DNA do fungo foi extraído conforme Schabereiter-Gurtner et al (2001). A região do gene do RNAr ITS1-5,8S-ITS2 foi amplificada, utilizando os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). Os amplicons foram purificados e submetidos diretamente ao seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey). A homologia das seqüências bacterianas e fúngicas foi obtida através do MEGABLAST (Altschul et al., 1997).

3.3.8 Degradação de HAPs em meio mineral

A capacidade do consórcio microbiano em degradar HAPs foi avaliada através de cromatografia gasosa. Para isto, este consórcio foi inoculado em 50 mL de meio mineral, mais 250 mg L⁻¹ de antraceno ou de fenantreno ou de pireno e incubados com três repetições a 30°C por 30 dias. Ao final do período, cada frasco contendo a cultura crescida foi acidificado a pH 2,0, seguindo-se de três extrações com 20 mL de diclorometano (EM Science, pureza>99,8%), em funil de separação. Para retirar o excesso de água após as extrações, utilizou-se sulfato de sódio anidro (Shuttleworth; Cerniglia, 1996). O material extraído foi quantificado em um cromatógrafo gasoso (Agilent, Palo Alto, Califórnia - modelo 6890) com detector seletivo de massa (modelo 5973), equipado com coluna capilar DB5 (5% fenil metil polisiloxano - 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm). O injetor e a linha de transferência operaram a 290°C. O programa de temperatura do forno foi: 40°C por um minuto, seguido de aumento de 6°C por minuto até 220°C, mantendo isotérmica por um minuto e aquecimento de 15°C min⁻¹ até 300°C. Um alíquota de 0,2 µL foi injetado com uma razão de *split* de 1:50. O detector seletivo de massa operou em modo *scan*.

3.3.9 Detecção da produção de biossurfactantes

A detecção da produção de biossurfactantes pelo fungo em separado ou pelo consórcio foi realizada pela medida do índice de emulsificação e da tensão superficial no meio de cultura. Para isto o consórcio foi inoculado em 50 mL de meio mineral mais 250 mg L⁻¹ de antraceno e incubado com duas repetições a 30°C por 30 dias. Semanalmente coletava-se amostras do meio de cultura para as duas avaliações. A tensão superficial foi avaliada na ausência de células microbianas, removidas através de centrifugação de 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. A avaliação do índice de emulsificação foi realizado na ausência e na presença das células microbianas. Para isto, 2 mL do meio de cultura foram misturados a 2 mL de óleo diesel em um tubo de ensaio com fundo chato (100 mm x 15 mm), sendo a mistura agitada em vortex por dois minutos e os frascos deixados em repouso por 24 horas, procedendo-se então a avaliação do volume emulsificado de óleo diesel. O índice de emulsificação é obtido pela

medição da coluna emulsificada de óleo diesel dividido pela altura total e multiplicado por 100. As medidas de tensão superficial foram realizadas após permanência das amostras por uma hora a 25°C, em um tensiômetro digital (Gibertini, Milão, Itália), utilizando o método da placa de Wilhelmy e como referências para a calibração do aparelho água destilada (69 mN m⁻¹) e etanol (24 mN m⁻¹).

3.3.10 Crescimento dos isolados em outros hidrocarbonetos

O consórcio microbiano bem como seus membros de forma individual foram avaliados quanto a capacidade de crescimento em HAPs (pireno, antraceno, fenantreno e naftaleno), em hidrocarbonetos monoaromáticos (benzeno, etil-benzeno, tolueno e xileno), em hidrocarbonetos alifáticos (1-deceno, 1-octeno e hexano), em misturas de hidrocarbonetos (gasolina e óleo diesel), em intermediários do metabolismo dos HAPs (catecol, ácido gentísico, ácido salicílico e ácido dihidroxibenzoico) e no etanol. Todos os substratos foram adicionados ao meio mineral de modo a fornecerem a mesma quantidade de C (236 mg L⁻¹) que é fornecida por 250 mg L⁻¹ de antraceno, à exceção da gasolina e do óleo diesel, que foram adicionados ao meio mineral na quantidade de 1% (v/v). Os membros do consórcio microbiano foram individualmente inoculados, sendo os frascos incubados com duas repetições, sob agitação de 150 rpm, durante um período de 5 dias. Após, uma alíquota de um mL das culturas crescidas era diluída em solução salina, plaqueada em meio ágar nutritivo ou meio ágar malte, e incubada a 30°C por 72 horas, quando então verificada a presença de UFC nas placas.

3.3.11 Análise estatística

O erro padrão foi calculado pela fórmula $\sqrt{\frac{\sum_{s=1}^m \sum_{i=1}^n y_{is}^2}{(n_y - 1)(n_y)}}$ onde, s = número

da série; i = número do ponto na série s; m = número de séries para o ponto y no gráfico; n = número de pontos em cada série; y_{is} = valor de dados da série s e ponto i; e n_y = número total de valores de dados em todas as séries.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Seleção da amostra de solo

Visando selecionar a amostra de solo do *landfarming* com maior atividade de mineralização de hidrocarbonetos, realizou-se um experimento respirométrico onde as amostras foram utilizadas como inóculo para a introdução de uma população degradadora em um solo contaminado artificialmente no laboratório. Independentemente do local de coleta da amostra, a inoculação de uma população de microrganismos degradadores via solo de *landfarming* resultou em aumento da produção de C-CO₂ se comparado ao controle (Figura 1). Isto indica que durante os 16 anos em que os resíduos petroquímicos foram tratados neste local houve um enriquecimento dos microrganismos do solo no sentido de selecionar populações degradadoras de hidrocarbonetos.

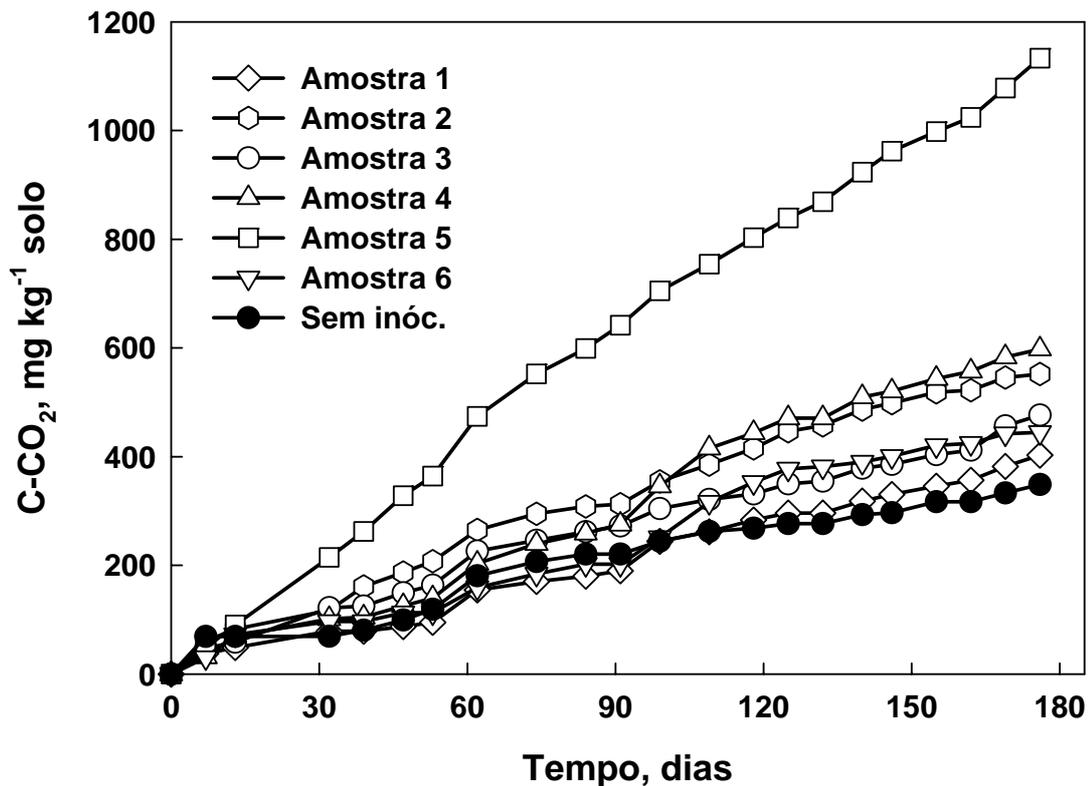


FIGURA 1. Produção de C-CO₂ de um solo contaminado com antraceno e inoculado com diferentes amostras de solo provenientes de uma área de descarte de resíduos petroquímicos.

A maior produção de C-CO₂ foi observada quando o solo foi inoculado com a amostra 5, sendo esta produção 90% maior que aquela do solo inoculado com a amostra 4, que apresentou a segunda maior produção, e 281% maior que a produção de C-CO₂ do solo inoculado com a amostra 1, que apresentou a menor produção entre os solos inoculados. Estas diferenças provavelmente se devem a heterogeneidade das atividades de mineralização de HAPs pelas populações presentes nas amostras de solo, o que por sua vez, refletem o histórico de manejo do *landfarming*, no que se refere a composição química, taxa e época de aplicação dos resíduos, adições de nutrientes inorgânicos, irrigações, revolvimentos do solo e outros. Com base nestes resultados, selecionou-se a amostra 5 para ser utilizada no isolamento dos microrganismos degradadores de HAPs.

3.4.2 Isolamento e identificação dos microrganismos degradadores de HAPs

A amostra 5 do solo do *landfarming* foi inoculada ao meio mineral mais antraceno e após 3 transferências foram isolados 7 microrganismos, sendo 6 bactérias e um fungo. As bactérias foram analisadas em microscópio ótico, sendo 4 Gram positivas e 2 Gram negativas, 5 apresentaram a forma de bastonetes e um de cocos. O fungo formou colônia filamentosa de coloração branca em meio ágar malte.

A análise da seqüência do gene do RNAr 16S indicou que o primeiro isolado pertence ao gênero *Mycobacterium* (Tabela 2). Este gênero tem sido extensivamente utilizado nos estudos de biodegradação de HAPs (Wick et al., 2002; Miyata et al., 2004; Leys et al., 2005; Mutnuri et al., 2005). Segundo Johnsen et al. (2005) a degradação dos HAPs no solo é dominada por alguns poucos gêneros, entre os quais o *Mycobacterium*. A espécie identificada como geneticamente mais próxima deste isolado foi a *M. fortuitum*, que tem sido estudada como degradadora de hidrocarbonetos alifáticos dos polímeros da borracha (Berekaa et al., 2000; Linos et al., 2000).

TABELA 2. Identificação dos microrganismos degradadores de antraceno pelo seqüenciamento do gene do RNAr.

Comparação da seqüência do RNAr 16S e ITS			
Isolado	Isolado ou espécie mais próxima	Número de acesso	Similaridade (%)
1	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	AY513242	97
2	<i>Bacillus cereus</i>	AJ586344	96
3	<i>Microbacterium sp.</i>	AB114267	96
4	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	AY278367	98
5	<i>Microbacteriaceae bacterium</i>	AY673335	99
6	<i>Naphthalene-utilizing bacterium</i>	AF531474	98
7	<i>Fusarium oxysporum</i>	X78260	100

A espécie identificada como geneticamente mais próxima do segundo isolado foi *Bacillus cereus*, que também tem sido citada nos estudos de

degradação de hidrocarbonetos alifáticos (Cybulski et al., 2003) e de aromáticos policíclicos (Kazunga; Aitken, 2000). Segundo Chaillan et al. (2004) tem sido creditado ao gênero *Bacillus* a capacidade de degradar hidrocarbonetos, no entanto em condições de cuidadoso controle do desaparecimento de substrato do meio de cultura, tem se verificado que tratam-se de degradadores secundários, que utilizam os metabólitos produzidos pelos degradadores primários de hidrocarbonetos. Esta pode ser considerada uma evidência da complementaridade metabólica entre os microrganismos isolados.

O terceiro isolado foi identificado como pertencente ao gênero *Microbacterium*. Gauthier et al. (2003), Cavalca et al. (2004) e Zhang et al. (2004) isolaram bactérias degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos pertencentes a este gênero. O envolvimento das bactérias do *Microbacterium* com a degradação de hidrocarbonetos pode ser demonstrada pelas novas espécies identificadas, denominadas de *M. oleivorans* e *M. hydrocarbon oxydans* (Schippers et al., 2005).

Gordonia polyisoprenivorans foi identificada como a espécie mais próxima do quarto isolado. Segundo Linos et al. (1999) esta bactéria foi inicialmente isolada de polímeros de borracha de pneus e por isso identificada com este nome. Trata-se de um actinomiceto que forma hifas, que ao se romperem resultam em células com forma de bastonetes ou cocos. Quando da análise inicial em microscópio ótico observou-se a forma de bastonete. Vários estudos tem relatado a utilização desta espécie na degradação hidrocarbonetos alifáticos (Linos et al., 2000), petróleo (Chaillan et al., 2004) e HAPs (Mutnuri et al., 2005).

O quinto isolado foi identificado apenas ao nível de família, apresentando similaridade de 99% com o isolado Ellin 7169, obtido de um solo agrícola por Davis et al. (2005) e que pertence a família *Microbacteriaceae*.

O último isolado bacteriano apresentou similaridade de 98% com uma bactéria que foi isolada de um local utilizado na estocagem de carvão mineral e que cresceu em meio mineral utilizando o naftaleno como única fonte de carbono e energia (Dore et al., 2003). Segundo estes autores, a análise do gene do RNAr 16S indicou que a bactéria apresenta similaridade de 98,5% com a espécie *Clavibacter xyli*.

O fungo foi identificado como pertencente a espécie *Fusarium oxysporum*, que tem sido isolada dos solos contaminados por hidrocarbonetos, sendo suas habilidades de degradação de HAPs demonstradas com o pireno (Cerniglia, 1997) e benzo(a)pireno (Verdin et al., 2004, 2005).

3.4.3 Concentração do carbono no meio mineral

Em vista da necessidade de se utilizar o meio mineral livre de qualquer fonte alternativa de C, avaliou-se a concentração de C dissolvido neste meio. A água destilada apresentou $0,868 \text{ mg L}^{-1}$ de C orgânico dissolvido. A adição de macro e micronutrientes inorgânicos a esta água destilada aumentou a concentração de C dissolvido, sendo que o meio mineral apresentou concentração de $3,883 \text{ mg L}^{-1}$. Apesar do aumento de mais de 4 vezes, há que se considerar que a concentração de C na água destilada foi muito baixa e que o valor observado no meio mineral é, em termos absolutos, também muito baixo, se comparado aos meios de cultura normalmente utilizados, que apresentar mais de 5000 mg L^{-1} de C orgânico dissolvido.

Observou-se grande diferença na concentração de C orgânico dissolvido entre o meio mineral contendo antraceno ($33,410 \text{ mg L}^{-1}$) e glicose ($240,100 \text{ mg L}^{-1}$). Conforme esperado, a totalidade da glicose adicionada ao meio foi solubilizada, enquanto muito pouco do antraceno tornou-se solúvel e conseqüentemente disponível à absorção celular. Mesmo assim, a concentração de C orgânico dissolvido no meio com antraceno foi superestimada, uma vez que a solubilidade predita na literatura é de somente $0,076 \text{ mg L}^{-1}$. Em condições normais de temperatura e pressão, o antraceno, o fenantreno e o pireno encontram-se na forma de cristais, que ao serem adicionados a uma solução aquosa como o meio mineral, formam uma camada superficial de cristais, sem ocorrer sua entrada no meio aquoso. Esta superestimação provavelmente se deve a presença de microcristais de antraceno no meio mineral que foram quantificados, sem no entanto, estarem dissolvidos. De qualquer forma, estes resultados demonstram que o meio mineral não se encontrava contaminado com outras fontes de C e que a solubilidade do antraceno no meio aquoso é baixa, sendo este um dos principais fatores que limitam a absorção celular, além de representar uma

dificuldade aos procedimentos microbiológicos e analíticos pela presença de uma fonte de C não solúvel no meio de cultura.

A atividade metabólica geral dos microrganismos pode ser avaliada pela intensidade das reações de óxi-redução, que são responsáveis pela transferência de energia nas rotas catabólicas e anabólicas. O TTC é um aceptor de elétrons artificial que quando presente no meio de cultura pode ser reduzido a TPF por várias enzimas de óxi-redução, sendo esta redução indicada pelo aparecimento de cor rósea no meio de cultura (Alef, 1995). Esta técnica foi utilizada para a determinação da concentração de antraceno que iríamos utilizar nos experimentos subseqüentes, em vista que os valores obtidos na literatura eram muito variáveis.

Entre as concentrações avaliadas, a presença de coloração rósea tornou-se evidente na presença de 125, 250 e 500 mg L⁻¹ de antraceno (dados não apresentados). Na concentração de 62,5 mg L⁻¹ a coloração rósea foi pouco evidenciada, sendo que nas concentrações de 0 e 31,25 mg L⁻¹ não houve aparecimento de coloração. Estes resultados estão de acordo com observações teóricas e práticas de Wick et al. (2001) que realizaram um experimento adicionando diferentes concentrações de antraceno no meio mineral onde crescia a *Mycobacterium* sp. LB501T e, ao mesmo tempo, por meio de modelos matemáticos, descreveram teoricamente o comportamento observado no experimento. Os autores demonstraram que quanto maior a concentração de antraceno no meio de cultura, maior será o coeficiente de transferência de massa da fase sólida para a líquida (dissolução), maior o fornecimento de antraceno para as células e maior a taxa de crescimento. Para os ensaios posteriores, optou-se por utilizar a concentração de 250 mg L⁻¹ de antraceno, que foi a concentração intermediária entre as que possibilitaram maior atividade metabólica do consórcio microbiano.

3.4.4 Curvas de crescimento e pH no meio mineral

A curva de crescimento do consórcio microbiano foi obtida realizando-se diluições e contagens das colônias dos isolados bacterianos e do fungo em placas de petri. Optou-se por avaliar o crescimento fúngico por UFC ao invés do aumento de massa celular devido a presença dos cristais de antraceno no

meio mineral que poderiam ser quantificados conjuntamente com a biomassa, resultando em superestimativa do crescimento e introduzindo erro experimental entre as pesagens. Na Figura 2 são apresentadas a contagem das UFC do consórcio microbiano em meio ágar nutriente (bactérias) e em meio ágar malte (fungo), bem como o pH do meio de cultura ao longo de 36 dias.

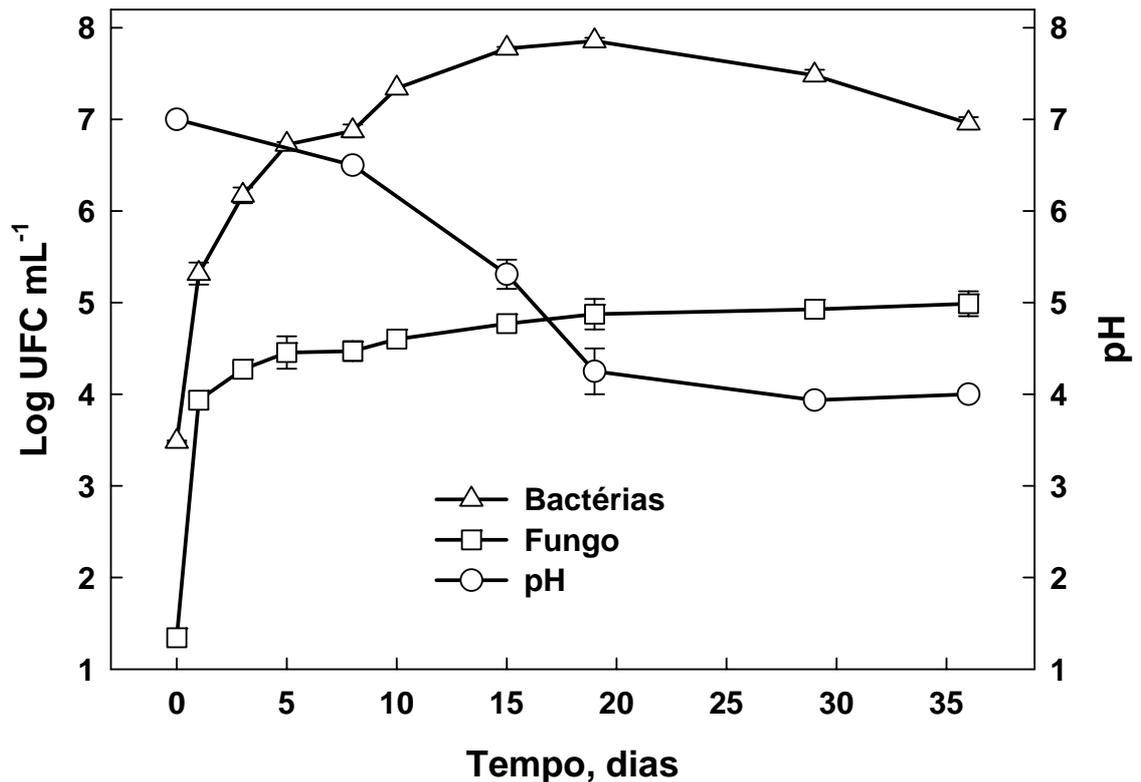


FIGURA 2. pH e contagem das UFC das bactérias e do fungo do consórcio microbiano, crescendo em meio mineral com 250 mg L⁻¹ de antraceno a 150 rpm e 30°C (dados são médias de duas repetições; barras representam o erro padrão).

A população de bactérias foi maior que a do fungo durante todo o experimento, sendo que o pH apresentou tendência de redução durante o período avaliado. A curva de crescimento das bactérias, até o 19º dia, e do fungo, até o final do experimento, apresentaram comportamento típico de microrganismos que crescem sob agitação, utilizando como fonte de C e energia unicamente cristais de HAPs, em quantidade que excede sua solubilidade no meio mineral (Jonhsen et al., 2005). Do início do experimento até o 5º dia para as bactérias e, no primeiro dia para o fungo, observou-se a

fase exponencial de crescimento, que foi sustentada pela concentração do antraceno dissolvida no meio mineral que estava no, ou próximo do, seu máximo. Assim a quantidade de antraceno solúvel no meio foi maior que a demanda pela biomassa, que ainda era pequena, fazendo com que os microrganismos crescessem em sua máxima taxa, ou seja, o limitante nesta fase foi somente o metabolismo celular e não a biodisponibilidade.

Com o aumento da biomassa, a demanda de antraceno excedeu a sua taxa de dissolução, a concentração de antraceno solúvel no meio caiu e o crescimento exponencial cessou. Assim do final da fase exponencial até o 19º dia estabeleceu-se uma fase de crescimento pseudolinear para bactérias e fungos, onde o crescimento da biomassa foi limitado pela taxa quase constante de dissolução dos cristais de antraceno. A taxa de crescimento diminuiu, mas a biomassa continuou aumentando. Com a redução da concentração de antraceno no meio mineral, a taxa de dissolução reduziu ainda mais, sendo que o substrato disponível foi suficiente somente para a manutenção da biomassa viva, não havendo mais crescimento, iniciando-se assim a fase pseudo-estacionária, que normalmente é bastante longa e onde os microrganismos não tem substrato suficiente para permitir o aumento da sua população, porém não há morte, pois ocorre fornecimento contínuo de antraceno para a fase aquosa.

No experimento, a fase pseudo-estacionária parece ter ocorrido somente para os fungos, pois à partir do 19º dia observou-se um decréscimo do número de células bacterianas. As medidas do pH desde o início do experimento revelaram tendência de acidificação do meio, sendo que entre o 8º e 19º dias houve redução de mais de duas unidades de pH. Este comportamento provavelmente se deveu ao acúmulo de H^+ ou de outros metabólitos ácidos no meio de cultura, resultantes da atividade microbiana. Em vista da incapacidade dos fungos mineralizarem grandes porcentagens dos HAPs, outros pesquisadores têm demonstrado, com auxílio da cromatografia, a presença destes intermediários no meio de cultura (Kotterman et al., 1998; Boonchan et al., 2000). Assim, sendo este um consórcio composto de fungos e bactérias, é de se esperar que haja realmente a excreção de metabólitos parcialmente metabolizados por alguns isolados, que poderão ser utilizados como fonte de C e energia por outros isolados, indicando a presença de uma das principais características dos consórcios que é a complementaridade metabólica.

Interessantemente, o pH manteve-se muito próximo a 7,00 quando o fungo foi inoculado isoladamente no mesmo meio por um período de 39 dias, nas mesmas condições (dados não apresentados), indicando que esta produção de metabólitos ácidos não esteve associada ao fungo ou se esteve, só ocorreu na presença dos demais membros do consórcio. Esta redução de pH foi bastante intensa até o 19º dia, quando o pH do meio de cultura atingiu o valor de 4,25, coincidindo com o início da redução da população de bactérias, fato que não ocorreu com o fungo, que apresentou crescimento característico de microrganismos em meio mineral contendo HAPs. Provavelmente, devido a preferência das bactérias em crescerem em pH mais próximos da neutralidade, esta intensa redução do pH deve ter ocasionado efeitos danosos à fisiologia celular e conseqüentemente, levado a morte das bactérias. Há ainda que se considerar que o meio mineral utilizado não apresenta forte poder de tamponamento do pH, o que provavelmente se deve a baixa concentração de fosfato ($0,1 \text{ g L}^{-1}$). Caso fosse utilizado outros meios minerais com maiores quantidades de fosfatos as reduções de pH provavelmente seriam menores.

3.4.5 Degradação de HAPs em meio mineral

A comprovação da capacidade do consórcio em degradar HAPs foi avaliada por cromatografia gasosa após 30 dias de incubação em meio mineral mais 250 mg L^{-1} de antraceno (Tabela 3). O consórcio microbiano foi capaz de degradar antraceno, fenantreno e pireno do meio mineral. A maior degradação ocorreu com o fenantreno, provavelmente devido a maior solubilidade deste HAP em relação aos demais. O antraceno apesar de ter menor solubilidade que o pireno, apresenta estrutura química com 3 anéis aromáticos, que pode ter determinado maior degradação que o pireno, que apresenta 4 anéis aromáticos, sendo este considerado um HAP de alta massa molecular e portanto, de mais difícil degradação.

TABELA 3. Degradação do antraceno, fenantreno e pireno pelo consórcio microbiano por 30 dias em meio mineral com 250 mg L⁻¹ de um dos HAPs, a 150 rpm, 30°C (dados são médias de três repetições ± erro padrão).

HAP	Degradação (%)	Taxa de degradação (mg L ⁻¹ dia ⁻¹)
Antraceno	47,90 ± 4,65	3,77 ± 0,35
Fenantreno	66,90 ± 3,22	5,29 ± 0,29
Pireno	21,75 ± 3,10	1,75 ± 0,23

Apesar de todos os procedimentos microbiológicos anteriores a cromatografia utilizarem o antraceno como única fonte de C e energia, o consórcio apresentou capacidade de degradar o fenantreno e o pireno, demonstrando que estes procedimentos não resultaram na perda da capacidade de degradação de outros HAPs. Conforme demonstrado por Habe; Omori (2003), as seqüências dos genes *nah* apresentam-se conservadas em bactérias aeróbias e codificam as enzimas que normalmente conferem aos isolados a capacidade de degradar outros HAPs. Assim como nos nossos resultados, outros autores também isolaram bactérias utilizando um determinado HAP como fonte de C, sendo que posteriormente os isolados apresentaram a capacidade de degradar outros HAPs (Kastner et al., 1994; Aislabie et al., 2000; Zhang et al., 2004). As análises genéticas das enzimas de degradação de HAPs em fungos são praticamente inexistentes na literatura.

Os dados de literatura que tratam da degradação de HAPs por consórcios microbianos são relativamente novos. Boonchan et al. (2000) observaram degradações próximas a 100% quando um consórcio composto pela bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* e pelo fungo *Penicillium janthinellum* cresceu por 30 dias em meio mineral com 250 mg L⁻¹ de pireno. Trabalhos com culturas puras são mais freqüentemente encontrados na literatura, como os de Liu et al. (2004) que estudaram a degradação do fenantreno e do pireno por um isolado de *Sphingomonas*, sendo estas respectivamente de 60 e 40% após 5 dias de incubação com 2000 mg L⁻¹ de fenantreno ou 100 mg L⁻¹ de pireno. Porcentagens de degradação próximas a 100% foram observadas por Zhang et al. (2004) quando um isolado de *Paracoccus* cresceu em meio mineral com 100 mg L⁻¹ de fenantreno ou de pireno.

Relatos de pesquisas sobre as porcentagens de degradação do antraceno são relativamente escassos, provavelmente devido a sua baixíssima solubilidade (menor entre os HAPs de 3 anéis e que a do pireno) (Verschueren, 2001) e conseqüente reduzida taxa de degradação. Entretanto, pesquisas realizadas em nosso laboratório quantificaram em 63% a degradação média de 250 mg L⁻¹ de antraceno em meio mineral, após 48 dias de crescimento, em separado, de 3 isolados de *Pseudomonas* (Jacques et al., 2005). Zhang et al. (2004), sem mencionarem as porcentagens de degradação, relataram que as taxas de degradação em meio mineral contendo 100 mg L⁻¹ de antraceno ou fenantreno ou pireno foram respectivamente de 0,500; 0,333 e 0,083 mg L⁻¹ dia⁻¹, sendo estes valores inferiores aos apresentados na Tabela 3.

3.4.6 Detecção da produção de biossurfactantes

A detecção da produção de biossurfactantes pelo fungo e pelo consórcio durante o crescimento em meio mineral e antraceno, foi realizada semanalmente por 42 dias. Durante este período a tensão superficial do meio inoculado com o fungo não apresentou decréscimo de seu valor inicial, mantendo-se próxima de 67 mN m⁻¹, em todas as avaliações, não diferindo do meio estéril (67 mN m⁻¹) e da água destilada (68 mN m⁻¹). Ao final do experimento, a tensão superficial do meio inoculado com o consórcio foi, em média, de 62,7 mN m⁻¹. Estes resultados indicam que a produção de biossurfactantes de baixo peso molecular não foi a estratégia preferencialmente utilizada para aumentar a biodisponibilidade de HAPs no meio mineral. Pesquisas realizadas recentemente em nosso laboratório possibilitaram a seleção de um isolado de *Pseudomonas citronellolis* que reduziu a tensão superficial de 69,2 para 36 mN m⁻¹ após o crescimento de 48 dias no meio mineral com antraceno (Jacques et al., 2005). Segundo Maier (2003) um eficiente biossurfactante pode reduzir a tensão superficial entre a água pura e o ar de 73 para 30 mN m⁻¹.

O índice de emulsificação também foi avaliado semanalmente durante os 42 dias, não sendo observada a formação de emulsões no meio inoculado com o fungo. Na presença do consórcio houve, aos 42 dias, o surgimento de emulsão no meio mineral, com ou sem as células microbianas, indicando a

produção e excreção para o meio extracelular de biossurfactantes de alto peso molecular. Esta emulsão esteve localizada na interface óleo/meio, mas preferencialmente posicionada no meio mineral, sugerindo a presença de um biossurfactante com afinidade pela fase hidrofílica.

A redução observada de $10,5 \text{ mN m}^{-1}$ por uma das repetições do consórcio e o surgimento de emulsão aos 42 dias remetem a necessidade de novos estudos com maior período de avaliação. Conforme demonstrado por Johnsen; Karlson (2004), os microrganismos podem utilizar-se de outras estratégias para aumentar a disponibilidade de HAPs no meio aquoso, como a formação de biofilmes na superfície dos cristais de HAP, que também será objeto de novos estudos, cujas avaliações serão realizadas através de microscopia eletrônica de varredura.

3.4.7 Crescimento dos isolados em outros hidrocarbonetos

As contaminações ambientais por hidrocarbonetos normalmente ocorrem na forma de misturas, sendo que a capacidade dos microrganismos degradadores utilizarem diferentes compostos é uma das características que deve ser avaliadas visando a seleção de microrganismos para a biorremediação de ambientes contaminados com HAPs. O perfil de utilização de 18 fontes de C pelos membros do consórcio microbiano é apresentado na Tabela 4. O consórcio apresentou grande versatilidade metabólica, uma vez que cresceu em todas as fontes avaliadas. Individualmente, os isolados bacterianos 2, 4, 5 e o fungo apresentaram maior versatilidade metabólica pois cresceram em 14 ou mais fontes de C. Os isolados bacterianos 1, 3 e 6 cresceram em 11 ou 12 fontes.

TABELA 4. Crescimento dos membros do consórcio microbiano em diferentes fontes de C adicionadas individualmente ao meio mineral após incubação por 7 dias a 150 rpm e 30°C.

Fonte de C	Isolados bacterianos						Fungo	Consórcio
	1	2	3	4	5	6		
Pireno	+	+	+	+	+	+	+	+
Antraceno	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenantreno	+	+	+	+	+	+	+	+
Naftaleno	+	+	-	-	-	+	+	+
Catecol	+	-	-	+	-	-	+	+
Ac. Gentíssico	+	+	+	+	+	+	+	+
Ác. Salicílico	-	-	-	-	+	-	-	+
Ác. Dihidroxibenzóico	-	-	-	-	-	+	+	+
Benzeno	-	+	+	+	+	-	+	+
Etil-benzeno	-	+	+	+	+	-	+	+
Tolueno	+	+	-	+	+	+	+	+
Xileno	-	+	+	+	+	-	+	+
1-Deceno	+	+	+	+	+	+	+	+
1- Octeno	+	+	+	+	+	+	+	+
Hexano	-	+	+	-	-	-	+	+
Etanol	+	+	+	+	+	+	+	+
Gasolina	+	+	-	+	+	+	+	+
Óleo diesel	-	+	+	+	+	+	+	+

O pireno, o fenantreno e o antraceno foram utilizados por todos os membros do consórcio, provavelmente em função do enriquecimento ter selecionado microrganismos degradadores de HAPs. Apesar do naftaleno apresentar somente 2 anéis aromáticos, não foi degradado por 3 membros do consórcio. Este comportamento foi também relatado por Zhang et al. (2004), onde um isolado de *Paracoccus* degradou o antraceno, o fenantreno e o pireno, mas não o naftaleno.

Houveram grandes diferenças no perfil de degradação dos intermediários das rotas de degradação dos HAPs. O ácido gentíssico foi utilizado como fonte de C por todos os membros do consórcio, indicando que

este pode ser o principal intermediário central das rotas de degradação dos HAPs por estas bactérias. Já o catecol que também é um intermediário central foi degradado por somente 3 membros do consórcio.

Os hidrocarbonetos monoaromáticos apresentaram perfil de utilização de fontes de C muito semelhantes, sendo que os isolados 2, 4, 5 e o fungo cresceram na presença dos 4 compostos. Apesar da estrutura mais simples que os HAPs, o benzeno, o etil-benzeno e o xileno não foram degradados pelos isolados 1 e 6. Aislabe et al. (2000) observaram que isolados bacterianos degradadores de HAPs não cresceram na presença de nenhum hidrocarboneto monoaromático.

Os membros do consórcio microbiano demonstraram diferentes capacidades de utilização dos hidrocarbonetos alifáticos. As cadeias mais longas foram utilizadas por todos os isolados enquanto que, na presença do hexano houve crescimento de somente 3 membros do consórcio, corroborando os resultados de Kastner et al. (1994) que também observaram que bactérias degradadoras de HAPs não cresceram na presença do hexano.

O etanol foi utilizado por todos os membros do consórcio provavelmente em função da sua alta solubilidade e estrutura química simples. A gasolina e o óleo diesel foram utilizados como fonte de C por 6 membros do consórcio. Por se tratarem de misturas complexas de hidrocarbonetos, abrangendo desde cadeias alifáticas simples até hidrocarbonetos aromáticos, é provável que os isolados apresentem a capacidade de utilizar algumas destas frações.

Pela análise da Tabela 4 fica evidenciado que a utilização de um substrato não pode ser previsto somente considerando-se sua estrutura química, pois muitos compostos de maior complexidade estrutural podem ser utilizados como fonte de C pelo microrganismo, em detrimento a outros compostos relativamente mais simples. Assim, o perfil de utilização de substrato de um determinado microrganismo também pode ser influenciado pelas suas características genéticas e pelos procedimentos microbiológicos anteriores, como por exemplo, a fonte de C utilizada no enriquecimento.

3.5 CONCLUSÕES

1) A amostra 5 do solo do *landfarming* apresenta população microbiana com a maior atividade de mineralização do antraceno no solo, sendo isolado e identificado um consórcio microbiano, composto por 6 bactérias e um fungo, capaz de crescer em meio mineral contendo antraceno como única fonte de C e energia;

2) Os isolados bacterianos e o fungo apresentam comportamento típico quando crescem em meio mineral contendo antraceno, sendo que o pH deste meio apresenta forte redução de seu valor, o que coincide com a diminuição do número de bactérias que nele cresciam;

3) O consórcio microbiano degrada quantidades significativas de antraceno, fenantreno e pireno presentes no meio mineral;

4) O consórcio microbiano apresenta grande versatilidade metabólica, crescendo em todos os substratos avaliados, sendo que os isolados bacterianos *Bacillus cereus*, *Gordonia polyisoprenivorans* e *Microbacteriaceae bacterium* e o *Fusarium oxysporum* crescem em um maior número de substratos que os demais isolados.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AISLABIE, J. et al. Aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from soil near Scott Base, Antarctica. **Polar Biology**, New York, v.23, n.3, p.183-188, 2000.
- ALEF, K. Estimation of microbial activities. In: ALEF, K. et al. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1995. p.193-270.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nuclei Acids Research**, Oxford, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- ASUBEL, F.M. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley and Sons, 1997. p.781.
- BEREKAA, M.M.; STEINBÜCHEL, A. Microbial degradation of the multiply branched alkane 2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane (squalene) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisbonense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n.10, p.4462-4467, 2000.
- BOONCHAN, S. et al. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.3, p.1007-1019, 2000.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, Chicago, v.74, n.1, p.63-67, 2000.
- CAMARGO, F.A.O. et al. *In vitro* reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 39 stimulated by Cu⁺⁺. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.62, n.5-6, p.569-573, 2003.
- CAMEOTRA, S.; BOLLAG, J.M. Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Philadelphia, v.30, n.2, p.111-126, 2003.

- CAVALCA, L. et al. Intrinsic bioremediability of na aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.64, n.4, p.576-587, 2004.
- CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology; Biotechnology**, Hampshire, v.19, n.5-6, p.324–333, 1997.
- CERNIGLIA, C.E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.30, p.31-71, 1984.
- CHAILLAN, F. et al. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v.155, n.7, p.587-595, 2004.
- COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO. **Manual de adubação e de calagem**. Porto Alegre: NRS-SBCS, 2004. 394p.
- CYBULSKI, Z. et al. The influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by *Pseudomonadaceae* and *Bacillacea* strains. **Spill Science; Technology Bulletin**, Oxford, v.8, n.5-6, p.503-507, 2003.
- DAVIS, K.E.R. et al. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.2, p.826-834, 2005.
- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, n.1, p.47-64, 1997.
- DORE, S.Y. Naphtalene-utilizing and mercury-resistant bacteria isolated from an acidic environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.63, n.1, p.194-199, 2003.
- GAUTHIER, E. et al. Initial characterization of new bacteria degrading high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from a 2-year enrichment in a two-liquid-phase culture system. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.94, n.2, p.301-311, 2003.
- GHAZALI, F.M. et al. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Londres, v.54, n.1, p.61-67, 2004.

- HABE, H.; OMORI, T. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.67, n.2, p.225-243, 2003.
- HUESEMANN, M.H. et al. Microbial factors rather than bioavailability limit the rate and extent of PAH biodegradation in aged crude oil contaminated model soils. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.6, n.4, p.321-336, 2002.
- JACQUES, R.J.S. et al. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a Petrochemical Sludge Landfarming. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 2005. (aceito para publicação).
- JOHNSEN, A. R. et al. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, Oxford, v.133, n.1, p.71-84, 2005.
- JOHNSEN, A.R.; KARLSON, U. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.63, n.3, p.452-459, 2004.
- KASTNER, M. et al. Enumeration and characterization of the soil microflora from hucrcarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.41, n.2, p.267-273, 1994.
- KAZUNGA, C.; AITKEN, M.D. Products from incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bactéria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.5, p.1917-1922, 2000.
- KOTTERMAN, M.J.J. et al. Scuccessive mineralization and detoxification of benzo[a]pireno by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. and indigenous microflora. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.8, p.2853-2858, 1998.
- LEYS, N.M. et al. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.66, n.6, p.726–736, 2005.
- LINOS, A. et al. Biodegradation of cis-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.4, p.1639-1645, 2000.

- LINOS, A. et al. Biodegradation of *cis*-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n.4, p.1639-1645, 2000.
- LINOS, A. et al. *Gordonia polyisoprenivorans* sp nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 49, n.4, p.1785-1791, 1999.
- LIU, Y. et al. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Sphingomonas* sp. strain ZL5. **Biodegradation**, Dordrecht, v.15, n.2, p.205-212, 2004.
- MAIER, R. Biosurfactants: Evolution and Diversity in Bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.52, n.1, p.101-121. 2003.
- MIYATA, N. et al. Saturable, energy-dependent uptake of phenanthrene in aqueous phase by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-153. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.1, p.363-369, 2004.
- MUTNURI, S. et al. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.67, n.4, p.569-576, 2005.
- NETTO A.D.P. et al. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and their nitrated derivatives (NHPAS): a review of methodology. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.6, p.765-773, 2000.
- SANTOS, E.C. **Biodegradação do antraceno estimulada por ferro**. 2004. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- SCHIPPERS, A. et al. *Microbacterium oleivorans* sp nov and *Microbacterium hydrocarbon oxydans* sp nov., novel crude-oil-degrading gram-positive bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v.55, n.2, p.655-660, 2005.
- SHUTTLEWORTH, K.L.; CERNIGLIA, C.E. Practical methods for the isolation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrading microorganisms and biodegradation intermediates. In: HURST, J. et al. (ed.) **Manual of environmental microbiology**. Washington: ASM, 1996. p.766-775.
- STOTZKY, G. Microbial Respiration. In: BLACK, C. A. (ed.). **Methods in soil analysis**. Madison: SSSA, 1965. p.1550-1572.

- TEDESCO, M.J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174p.
- VERDIN, A. et al. Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.53, n.1, p.65-70, 2004.
- VERDIN, A. et al. Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, on the intracellular protein composition of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.55, n.3, p.171-174, 2005.
- VERSCHUEREN, K. **Handbook of environmental data of organic chemicals**. 4th ed. Chichester, England: Wiley, 2001. 2416p.
- WICK L.Y. et al. Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.58, n.5, p.378-385, 2002.
- WICK, L.Y. et al. Kinetics of mass transfer-limited bacterial growth on solid PAHs. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.35, n.2, p.354-361, 2001.
- ZHANG, H. et al. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.65, n.1, p.124-131, 2004.

CAPÍTULO III

BIORREMEDIAÇÃO DE UM SOLO CONTAMINADO COM HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

4.1 RESUMO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos carcinogênicos e mutagênicos que, devido a atividades naturais ou antropogênicas, podem contaminar o solo e permanecer por longos períodos neste ambiente, se as populações autóctones do solo não possuem a capacidade de degradá-los. Nestes casos, a inoculação do solo com microrganismos degradadores dos HAPs é uma prática recomendada. O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de um consórcio microbiano isolado de um solo de *landfarming* (composto por 6 bactérias e um fungo) em degradar e mineralizar diferentes concentrações do antraceno, do fenantreno ou do pireno presentes no solo. Os microrganismos do consórcio foram inoculados a um solo arenoso contaminado em laboratório com as concentrações de 0, 250, 500 e 1000 mg kg⁻¹ de antraceno, ou fenantreno, ou pireno. A mineralização destes HAPs foi avaliada por respirometria e a degradação por cromatografia gasosa. A microbiota autóctone do solo em estudo apresentou nula ou baixa capacidade de mineralização destes HAPs. Os isolados bacterianos e o fungo, membros do consórcio microbiano, se inoculados separadamente ao solo, apresentaram baixas porcentagens de mineralização do antraceno quando comparado a inoculação conjunta na forma de consórcio. O consórcio microbiano degradou em média, 99, 99 e 96%, respectivamente das diferentes concentrações de antraceno, fenantreno e pireno presentes no solo, em 70 dias. Este consórcio mineralizou, neste mesmo período de tempo, 78% em média, das diferentes concentrações dos 3 HAPs no solo, resultando em grande aumento da mineralização se comparada a microbiota autóctone do solo. Comprova-se a capacidade do consórcio microbiano em biorremediar o solo contaminado, de forma a eliminar os HAPs em curto período de tempo.

4.2 INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos químicos constituídos unicamente de átomos de C e H, arranjados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Estes compostos são lipossolúveis e prontamente absorvidos pelo organismo dos mamíferos, cujo metabolismo gera compostos com propriedades mutagênicas e carcinogênicas ao Homem e aos animais (Netto et al., 2000). Os HAPs são gerados naturalmente pela combustão incompleta de resíduos orgânicos, mas a contaminação do solo por estes compostos é um efeito típico da atividade antropogênica, em especial a industrial. Um monitoramento realizado na Inglaterra indicou valores aproximados de concentração no solo de $0,005 \mu\text{g kg}^{-1}$ em áreas agrícolas, aumentando para $0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$ nas proximidades dos centros urbanos e para $1,8 \mu\text{g kg}^{-1}$ nas áreas industriais (Jones, 1989). Entre as causas da contaminação do solo por estes compostos, podem-se destacar os resíduos gerados pelas refinarias, postos de combustíveis e indústrias petroquímicas, que apresentam em sua composição uma complexa mistura de HAPs, entre eles o antraceno, o fenantreno e o pireno.

Assim, devido as atividades naturais ou antropogênicas, o solo pode receber quantidades consideráveis de HAPs, que permanecem por longos períodos neste ambiente, se as populações autóctones do solo não possuírem a capacidade de degradação destes compostos. Nestes casos, a inoculação do solo com microrganismos reconhecidamente degradadores dos HAPs, ou seja, a bioaugmentação, é uma prática recomendada (Edgehill et al., 1999). Kästner et al. (1998) inocularam bactérias degradadoras num solo contaminado com HAPs e observaram incrementos de seis e de dez vezes na degradação do pireno e do antraceno, respectivamente, o que possibilitou a remediação em um tempo sete vezes menor quando comparado ao controle não inoculado.

Por outro lado, a falta de atenção com os princípios da degradação de HAPs no solo tem conduzido a bioaugmentação a vários insucessos (Johnsen et al., 2005). A complexidade química, física e biológica do solo pode determinar o declínio da população inoculada, seja pelas relações antagonísticas impostas pelas populações autóctones, como predação e competição, seja pelos estresses fisiológicos causados pelos fatores abióticos, como pH, disponibilidade de água e ar, temperatura e, no caso específico dos HAPs, biodisponibilidade de fontes de C e energia (van Veen et al., 1997). Segundo Alexander (1999), a eficiência da biorremediação é função da extensão em que a população microbiana degradadora pode manter-se no ecossistema natural.

Por todos estes motivos, a introdução de uma população de microrganismos degradadores no ambiente contaminado deve ser precedida de uma série de avaliações em laboratório, entre as quais destaca-se a caracterização microbiana e os experimentos em microcosmos (Sabaté et al., 2004). A caracterização do consórcio microbiano já foi objeto do estudo anterior, sendo o objetivo do presente estudo avaliar em microcosmos a capacidade deste consórcio em degradar e mineralizar diferentes concentrações do antraceno, do fenantreno ou do pireno presentes no solo.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Solo

O solo utilizado em todos os experimentos, pertence a Unidade de Mapeamento Itapoã (Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico arênico) e foi coletado em uma área agrícola, sem histórico de recebimento de nenhum tipo de resíduo. Este solo foi trazido para o laboratório, seco e peneirado em malha de 2 mm. Para elevar o pH a 6,5, adicionou-se CaCO_3 e MgCO_3 na proporção 3:1, na forma de reagente comercial, incubando-se o solo úmido por 60 dias. Posteriormente, este solo foi contaminado com a concentração desejada de cada HAP. Para isto, preparou-se uma solução concentrada de HAP dissolvido em acetona ($8,333 \text{ mg mL}^{-1}$), que foi adicionada a 50 g de solo no interior de frascos respirométricos. Estes frascos foram colocados em estufa por 3 horas a 50°C para evaporação da acetona. Após adicionou-se mais 50 g de solo, procedendo-se uma intensa mistura. Devido a baixa fertilidade natural, o solo foi adubado com o equivalente a 100 kg ha^{-1} de N, 50 kg ha^{-1} de P e 56 kg ha^{-1} de Fe, na forma de solução de NH_4NO_3 , KH_2PO_4 e $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$. Além disso, 0,5 mL da solução de micronutrientes do meio mineral Tanner foram adicionadas às 100 g de solo.

4.3.2 Produção do inóculo

Após o solo estar corrigido, contaminado com o HAP e fertilizado, foi adicionado 2 mL de uma suspensão de células do consórcio microbiano, de forma a introduzir uma população de $2,0 \times 10^8 \text{ UFC g}^{-1}$ de solo (Kastner et al., 1998). Para obtenção desta suspensão de células, 100 μL de uma cultura do consórcio microbiano que havia crescido em meio mineral mais 250 mg L^{-1} de HAP foi inoculada em ágar nutriente contendo 250 mg L^{-1} do HAP e incubada a

30°C por 72 horas. Após o crescimento das colônias, foi adicionado sobre o meio 5 mL de água estéril e com o auxílio de uma alça de Drigalsky, as colônias foram coletadas para tubos e a suspensão foi centrifugada a 10000 rpm, por 8 minutos a 15°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido numa quantidade previamente calculada de água estéril, sendo então a suspensão adicionada ao solo no interior dos frascos respirométricos. O HAP (antraceno, fenantreno ou pireno) utilizado na produção do inóculo foi o mesmo que seria posteriormente degradado no solo pelo consórcio.

4.3.3 Análise respirométrica

Os frascos respirométricos (1,5 L) com o solo já inoculado foram equipados com aparato de captura de CO₂, composto por um copo plástico de 50 mL com 20 mL de NaOH 0,25 M, fechados hermeticamente e incubados a temperatura ambiente no laboratório. Semanalmente os frascos foram abertos, a solução de NaOH recebeu um mL de BaCl₂ 1 M e foi titulada com HCl 0,5 M, utilizando fenoftaleína como indicador. A solução do HCl 0,5 M foi padronizada com tris, conforme Tedesco et al. (1995). Uma amostra com umidade igual ao solo dos frascos respirométricos foi utilizada para determinação da umidade gravimétrica, sendo a produção de C-CO₂ expressa em kg de solo seco.

A produção de C-CO₂ foi quantificada através da fórmula de Stotzky (1965):

$$\text{C-CO}_2 \text{ (mg kg}^{-1} \text{ de solo)} = (\text{B-T}) \times \text{eq} \times \text{M} \times 10$$

onde, B é o volume (em mL) da solução de HCl gasto para titular a prova em branco (frasco respirométrico sem solo); T é o volume (em mL) da solução de HCl gasto para titular os tratamentos; eq é o equivalente-grama do C, que é 6; M é a molaridade da solução padronizada de HCl e 10 é o fator de conversão para kilograma de solo.

4.3.4 Controle

O efeito da adição do antraceno, da acetona e do consórcio microbiano na produção de C-CO₂ do solo foi avaliado por um experimento com 4 tratamentos: 1) solo fertilizado, inoculado com o consórcio e contaminado com

1000 mg kg⁻¹ de antraceno (Bioest+Bioaum+Ant); 2) solo fertilizado, inoculado com o consórcio e contaminado somente com a mesma quantidade de acetona do tratamento anterior (sem antraceno) (Bioest+Bioaum+Acet); 3) solo fertilizado e contaminado com antraceno (Bioest+Ant) e 4) solo fertilizado (Bioest). Os frascos foram incubados em duplicata durante 60 dias.

4.3.5 Esterilização do Solo

Para avaliar o efeito na produção de C-CO₂ da esterilização do solo anteriormente a adição do consórcio realizou-se um experimento com 4 tratamentos: 1) solo estéril adicionado de antraceno e nutrientes (Estéril); 2) solo estéril adicionado de antraceno, nutrientes e do consórcio (Estéril+consórcio); 3) solo não-estéril adicionado de antraceno e nutrientes (Não-estéril) e 4) solo não-estéril adicionado de antraceno, nutrientes e do consórcio (Não-estéril+consórcio). O solo foi autoclavado no interior de béqueres de 1 L durante 20 minutos a 121°C, sendo a morte dos microrganismos confirmada por plaqueamento em meio ágar nutritivo e ágar malte. Este solo estéril foi adicionado aos frascos respirométricos, previamente esterilizados com álcool 70% em câmara de fluxo, e fertilizado com soluções estéreis de nutrientes. Posteriormente, foi contaminado com antraceno (250 mg kg⁻¹), inoculado com o consórcio e incubado em duplicata durante 37 dias.

4.3.6 Tipo de Inóculo

A contribuição dos isolados bacterianos, do fungo e de ambos conjuntamente (consórcio) para a mineralização do antraceno no solo foi avaliado em um experimento com 4 tratamentos. O solo foi contaminado com 500 mg kg⁻¹ e adicionado de nutrientes, sendo os tratamentos compostos de diferentes inóculos: 1) isolados bacterianos; 2) fungo; 3) consórcio microbiano (isolados bacterianos + fungo) e 4) sem inóculo. Os frascos respirométricos foram incubados com 4 repetições por 43 dias.

A quantidade de células dos 3 inóculos adicionada ao solo foi de 52 microgramas de massa seca por grama solo, que equivale a 2,0 x 10⁸ UFC g⁻¹ de solo, que foi o inóculo padrão utilizado nos experimentos anteriores. Assim,

inoculou-se ao solo a suspensão de bactérias ou do fungo ou do consórcio, de modo a introduzir a mesma quantidade de massa seca de células. Os procedimentos para produção e adição ao solo do inóculo foram iguais aos descritos no item Produção do inóculo.

4.3.7 Concentrações de HAPs

Visando avaliar a capacidade de degradação e de mineralização de diferentes concentrações de HAPs pelo consórcio microbiano, e compará-la a da microbiota nativa do solo, realizaram-se 3 experimentos, um para cada HAP, utilizando-se dos mesmos 5 tratamentos. Em quatro destes tratamentos, o solo recebeu nutrientes, o consórcio e uma das seguintes concentrações do HAP: 0, 250, 500 e 1000 mg kg⁻¹ de solo. No quinto tratamento, o solo recebeu somente nutrientes e 1000 mg kg⁻¹ do HAP, ou seja, sem inoculação (SI) do consórcio. Os frascos foram incubados em duplicata por um período de 60 dias para o antraceno, 56 dias para o fenantreno e 70 dias para o pireno.

Após o término destes 3 experimentos, quantificou-se a concentração remanescente dos HAPs no solo, através da extração por solvente orgânico e análise cromatográfica. Para isto, o solo dos frascos respirométricos foi seco em capela de exaustão por 3 horas, moído em gral e armazenado a -15°C. Na extração foram utilizadas 30 g de solo de cada um dos tratamentos, que foram colocados no sistema extrator Soxhlet por 15 horas, utilizando hexano (Merck, pureza ≥ 99,8%) como solvente. O material extraído foi concentrado em rota-vapor e o enxofre que por ventura pudesse estar presente na amostra foi removido passando por uma coluna de cobre ativado. Posteriormente, o extrato livre de enxofre foi submetido a cromatografia líquida preparativa, em coluna de sílica, de modo a obter frações puras de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. As frações obtidas foram inicialmente concentradas em rota-vapor seguido de leve fluxo de N₂ até quase a secura. As frações concentradas foram armazenadas a 4°C até a análise cromatográfica.

Para isto, utilizou-se um cromatógrafo gasoso (Agilent, Palo Alto, Califórnia - modelo 6890) com detector seletivo de massa (modelo 5973), equipado com coluna capilar DB5 (5% fenil metil polisiloxano - 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm). O injetor e a linha de transferência operaram a 290°C. O programa

de temperatura do forno foi: 40°C por um minuto, seguido de aumento de 6°C por minuto até 220°C, mantendo isotérmica por um minuto e aquecimento de 15°C min⁻¹ até 300°C. Um alíquota de 0,2 µL foi injetado com uma razão de *split* de 1:50. O detector seletivo de massa operou em modo *scan*. Como padrão interno, utilizou-se fenantreno deuterado, que foi adicionado às amostras anteriormente a injeção no cromatógrafo.

4.3.8 Análise estatística

O erro padrão foi calculado pela fórmula $\sqrt{\frac{\sum_{s=1}^m \sum_{i=1}^n y_{is}^2}{(n_y - 1)(n_y)}}$ onde, *s* = número

da série; *i* = número do ponto na série *s*; *m* = número de séries para o ponto *y* no gráfico; *n* = número de pontos em cada série; *y_{is}* = valor de dados da série *s* e ponto *i*; e *n_y* = número total de valores de dados em todas as séries.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Controle

Este experimento teve como objetivo avaliar a capacidade do consórcio microbiano em mineralizar o antraceno no solo e de confirmar que o C-CO₂ quantificado provinha da mineralização deste composto no solo. O efeito da inoculação do consórcio microbiano no solo pode ser verificado ao compararmos as produções de C-CO₂ dos tratamentos Bioest+Bioaum+Ant e Bioest+Ant (Figura 1). Quando o solo recebeu somente antraceno e nutrientes a produção de C-CO₂ foi de 140 mg kg⁻¹ de solo, sendo que com a inoculação do consórcio houve aumento de 686% nesta produção, demonstrando que o consórcio selecionado apresentou elevada capacidade de mineralizar o antraceno do solo. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura trata da degradação e não da mineralização do antraceno no solo, quantificando o desaparecimento do substrato através de cromatografia. Kastner et al. (1998) verificaram que a introdução ao solo de bactérias degradadoras de HAPs eliminou em 30 dias as 25 mg kg⁻¹ de antraceno no solo, com uma taxa de degradação 10 vezes maior e em tempo 7 vezes menor que a microbiota autóctone do solo.

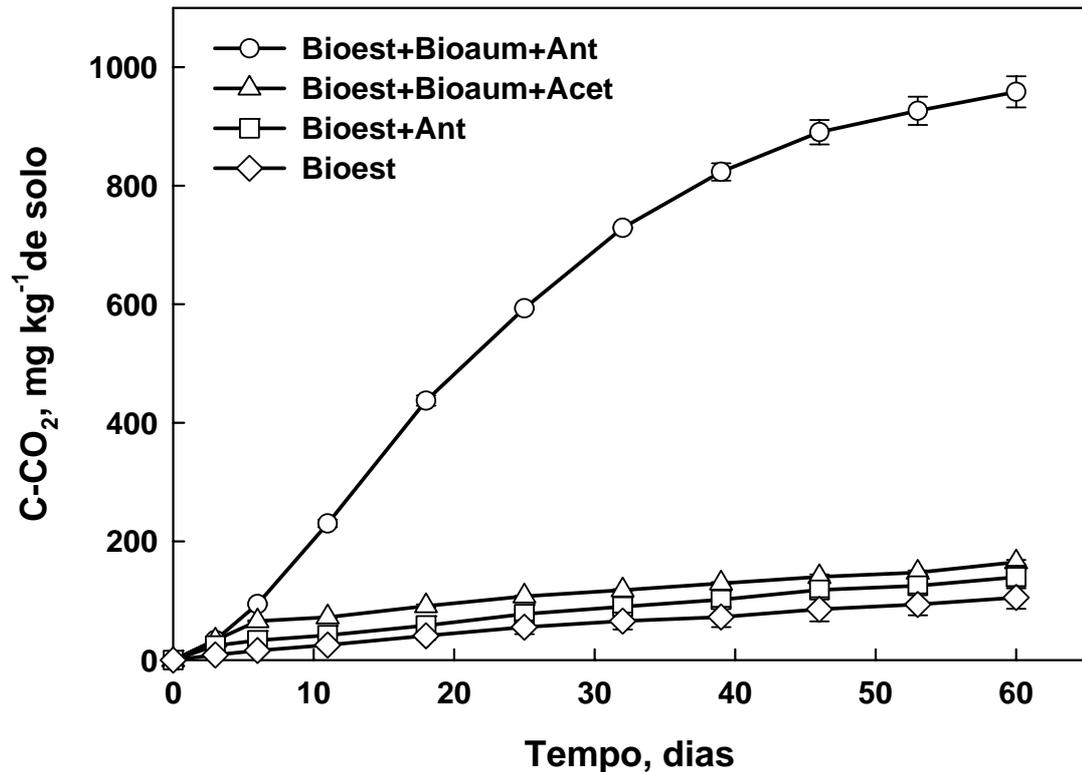


FIGURA 1. Produção de C-CO₂ de um solo após bioestimulação (Bioest), bioaugmentação (Bioaum), contaminação com antraceno (Ant) e acetona (Acet) (dados são médias de duas repetições; barras representam o erro padrão).

Em todos os experimentos, o solo foi contaminado através de uma solução de antraceno dissolvido em acetona, que posteriormente era deixada evaporar em estufa. A possibilidade da acetona não ser totalmente evaporada e contribuir para a produção de C-CO₂ foi eliminada ao compararmos as curvas dos tratamentos Bioest+Bioaum+Ant e Bioest+Bioaum+Acet, onde o solo recebeu exatamente a mesma quantidade de acetona, diferindo somente na presença do antraceno. A produção do C-CO₂ no solo que recebeu somente a acetona foi de 165 mg kg⁻¹, sendo esta 5,8 vezes menor que a apresentada pelo solo que recebeu também o antraceno. Além disto, a produção de C-CO₂ entre os tratamentos Bioest+Bioaum+Acet e Bioest, onde o solo recebeu somente nutrientes, foi muito semelhante, indicando que o procedimento de evaporação da acetona removeu do solo a grande maioria deste solvente e que a quantidade remanescente no solo foi insuficiente para produzir quantidades significativas de C-CO₂.

A incapacidade dos microrganismos autóctones do solo em mineralizar o antraceno pode ser comprovada ao compararmos os tratamentos Bioest+Ant e Bioest, onde as produções de C-CO₂ foram muito próximas, 140 e 106 mg kg⁻¹ respectivamente. Ou seja, a presença de 1000 mg kg⁻¹ de antraceno no solo resultou em aumento de somente 34 mg kg⁻¹ de C-CO₂, o que representa que os microrganismos autóctones mineralizaram somente 3,42% do antraceno adicionado ao solo. Este comportamento provavelmente se deve a que o solo utilizado no experimento foi coletado em área agrícola e não apresentava histórico de recebimento de resíduos. Assim, é provável que a microbiota autóctone não estivesse adaptada para a utilização de HAPs, não apresentando as enzimas necessárias para transformar estes compostos em intermediários das rotas comuns de geração e energia do metabolismo microbiano. Em casos como este, a bioaugmentação é uma técnica a ser utilizada visando a biorremediação do solo contaminado.

4.4.2 Esterilização do Solo

O efeito da esterilização do solo na produção de C-CO₂ foi avaliado durante 37 dias (Figura 2). A baixa mineralização observada no tratamento Não-estéril indica que a microbiota nativa do solo mineralizou uma quantidade tão pequena de C-CO₂ que não diferiu do tratamento Estéril, onde não haviam microrganismos no solo. Com a inoculação do consórcio microbiano verifica-se um grande aumento da mineralização, sendo esta maior no solo Estéril que no solo Não-estéril. Este comportamento indica que o consórcio se estabeleceu de modo mais efetivo no solo estéril, o que resultou em maior consumo de antraceno e conseqüentemente maior produção de C-CO₂. A esterilização interfere na colonização do solo pelas populações alóctones principalmente por eliminar os fatores bióticos como predação e competição, que são impostas pelas populações autóctones na tentativa de eliminar a população introduzida e restabelecer o equilíbrio original do ambiente (Atlas; Bartha, 1998).

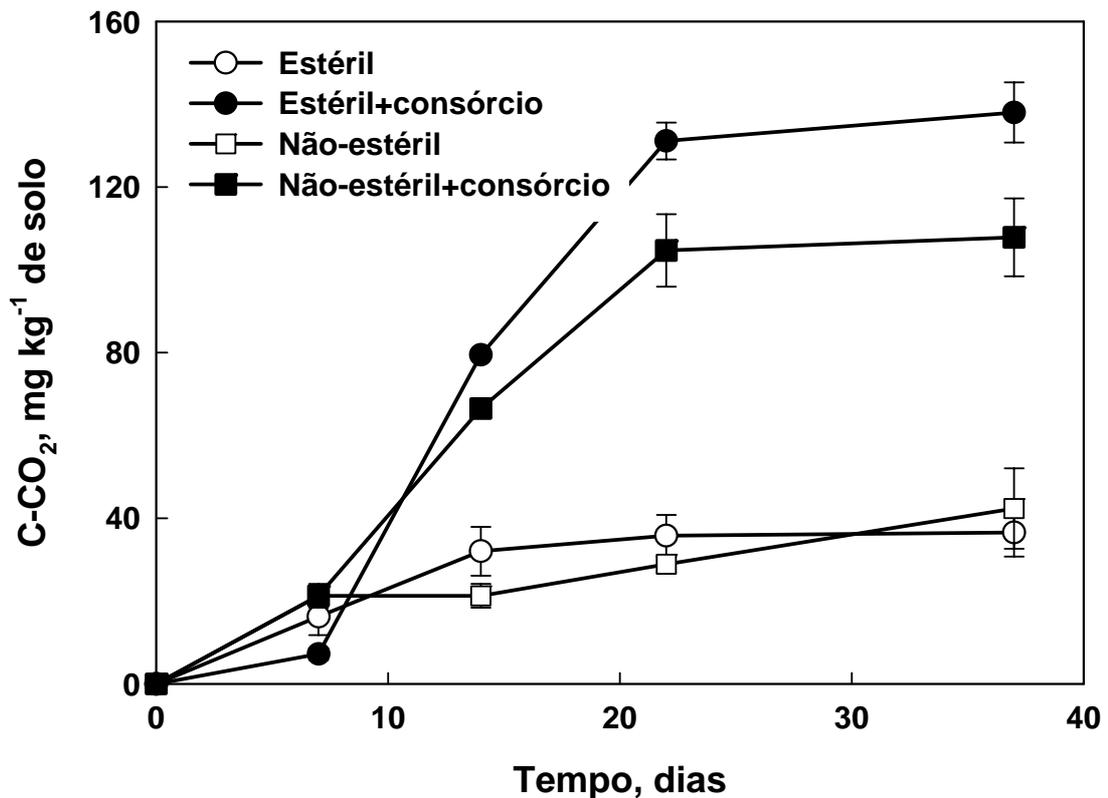


FIGURA 2. Produção de C-CO₂ de um solo contaminado com antraceno após esterilização e a bioaumentação com um consórcio microbiano (dados são médias de duas repetições; barras representam o erro padrão).

A sobrevivência das populações inoculadas no solo é um pré-requisito para a atividade de degradação do contaminante. Por isso alguns autores utilizaram a esterilização do solo como forma de promover um satisfatório estabelecimento da população inoculada e conseqüentemente, observaram maiores taxas de degradação do contaminante, se comparado ao solo não esterilizado (Goldstein et al., 1985; Liu et al., 1990; Kastner et al., 1998).

No experimento realizado, a produção de C-CO₂ no solo estéril inoculado com o consórcio foi maior que no solo não-estéril também inoculado, indicando que há um efeito inibitório à população inoculada pelas populações autóctones do solo. No entanto, esta diferença foi de somente 22% e diante das possíveis alterações dos fatores abióticos do solo devido a autoclavagem (por exemplo, o aumento da concentração de manganês), os demais experimentos foram realizados com o solo não-estéril, buscando avaliar a eficiência do consórcio na presença das populações autóctones, que são

também parte integrante do ambiente a ser biorremediado e cujo nicho ecológico não deve ser ignorado.

4.4.3 Tipo de Inóculo

A contribuição dos isolados bacterianos, do fungo e do consórcio formado pela inoculação de ambos (bactérias + fungo) para a mineralização do antraceno no solo foi avaliada em um experimento respirométrico (Figura 3).

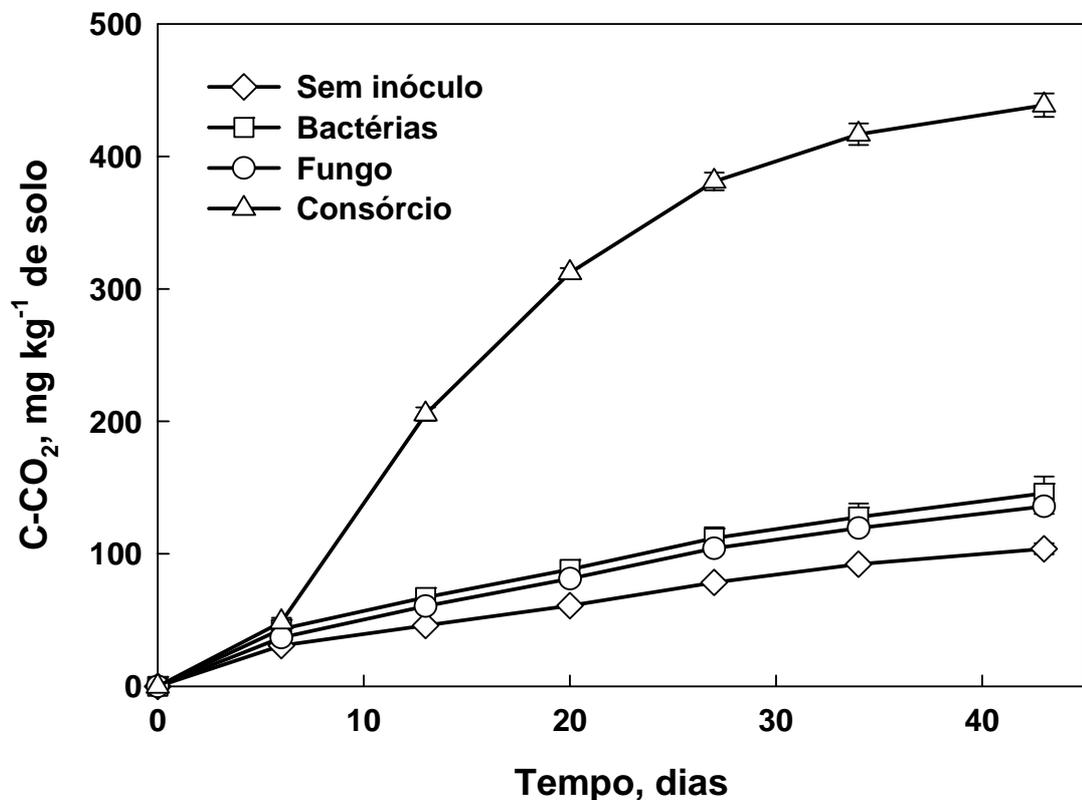


FIGURA 3. Produção de C-CO₂ de um solo contaminado com antraceno, inoculado com bactérias e fungo separadamente, ou conjuntamente na forma de um consórcio microbiano (dados são médias de quatro repetições; barras representam o erro padrão).

O fungo mineralizou somente 4% do antraceno adicionado ao solo, o que representa 15 vezes menos que o consórcio. Esta baixa capacidade dos fungos em mineralizarem HAPs verificada neste experimento está de acordo com os dados da literatura. Bazalel et al (1996) avaliaram em meio de cultura a

mineralização do fenantreno e do pireno durante 11 dias pelo fungo *Pleorotus ostreatus*, sendo esta de somente 3,0 e 0,4%, respectivamente. Neste mesmo trabalho, a mineralização do antraceno foi ainda menor, 0,6% em 35 dias de incubação. No solo, a mineralização de 50 mg kg⁻¹ do benzo(a)pireno realizada pelo fungo *Penicillium janthinellum* foi próxima a zero, após 55 dias de incubação.

A produção de C-CO₂ pelos isolados bacterianos também foi baixa, não diferindo daquela obtida pelo fungo. As porcentagens de mineralização do antraceno no solo normalmente tem sido baixas. Grosser et al. (1995) observaram que a mineralização após 64 dias de incubação deste HAP no solo foi de 10%. Em igual período de tempo, Santos (2004) quantificou em menos de 2% a mineralização de 250 mg kg⁻¹ de antraceno no solo. Estes resultados indicam que apesar das bactérias apresentarem rotas metabólicas que as possibilitam transformar o antraceno em CO₂, as baixas taxas de mineralização observadas no solo (e também no meio mineral) podem estar relacionadas a baixa solubilidade deste HAP em água e a conseqüente limitação à absorção pelas células bacterianas. Weigand et al. (2002) estudando o balanço de C em solo contaminado com antraceno observou que somente 6% deste HAP foi metabolizado, sendo que a metade deste valor foi transformado a CO₂ e a outra metade permaneceu no solo na forma de intermediários do metabolismo. O autor concluiu que baixa biodisponibilidade é o principal limitante para a mineralização do antraceno no solo.

Os resultados do experimento não confirmam a hipótese de que a biodisponibilidade limita a mineralização do antraceno pois, a inoculação ao solo do consórcio microbiano resultou em produção de C-CO₂ aproximadamente 312% maior que a média da produção observada quando o fungo ou os isolados bacterianos foram inoculados separadamente, demonstrando que a baixa mineralização não estava associado a biodisponibilidade do antraceno, mas sim a limitada capacidade metabólica das bactérias e do fungo em mineralizarem o antraceno separadamente.

Este grande aumento da mineralização pelo consórcio pode estar relacionado a presença de complementaridade metabólica entre seus membros. Entre os poucos estudos relatados na literatura que utilizaram consórcios microbianos para a degradação de HAPs pode se destacar o de

Boonchan et al. (2000) que avaliou a mineralização de 50 mg kg^{-1} do benzo(a)pireno no solo pela bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, sendo esta de 20% após 100 dias. A mineralização pelo fungo *Penicillium janthinellum* neste mesmo solo por igual período de tempo foi nula. Já a inoculação destes microrganismos na forma de consórcio resultou em mineralização superior a 40%. As análises dos intermediários do metabolismo por cromatografia nestes ensaios tenderam a confirmar a hipótese de complementaridade metabólica, onde o fungo metaboliza os passos iniciais da oxidação do benzo(a)pireno e libera para o meio extracelular intermediários polares, que são convertidos em CO_2 pela bactéria (Boonchan et al., 2000). Kotterman et al. (1998) verificaram que o fungo *Bjerkandera* sp. BOS55 apresentou baixa capacidade de mineralização do benzo(a)pireno, porém a adição ao solo do meio mineral na qual o fungo crescia resultou em grande aumento da produção de CO_2 , indicando que os metabólitos produzidos pelo fungo foram rapidamente mineralizados pela população heterotrófica do solo. Assim, os resultados deste trabalho também indicam para a presença de complementaridade metabólica entre os membros do consórcio microbiano, cuja inoculação ao solo resultou em grande aumento da produção de C- CO_2 se comparado a inoculação em separado do fungo e das bactérias.

4.4.4 Concentrações de HAPs

A capacidade do consórcio microbiano em biorremediar o solo contaminado com diferentes concentrações de HAPs foi avaliado através de 3 experimentos respirométricos. Observa-se nas Figuras 4, 5 e 6 que quanto maior a concentração do HAP maior foi a produção de C- CO_2 , à exceção do tratamento sem inóculo, indicando que o C- CO_2 originou-se da mineralização do HAP pelo consórcio microbiano.

A fase de adaptação dos microrganismos inoculados para o início da produção de C- CO_2 foi praticamente inexistente para o antraceno, sendo de 7 dias para o fenantreno e de 14 dias para o pireno, o que indica que apesar do inóculo ter sido produzido no meio mineral com o mesmo HAP que seria degradado no solo, o processo de enriquecimento pode ter selecionado os microrganismos que utilizam mais facilmente o antraceno em relação aos

demais HAPs. O pireno apresentou a maior fase de adaptação provavelmente por apresentar maior complexidade estrutural, sendo reconhecido na literatura como de mais difícil degradação quando comparado aos HAPs de 3 anéis aromáticos (Martens et al., 1999; Kanaly et al., 2000; Potin et al., 2004).

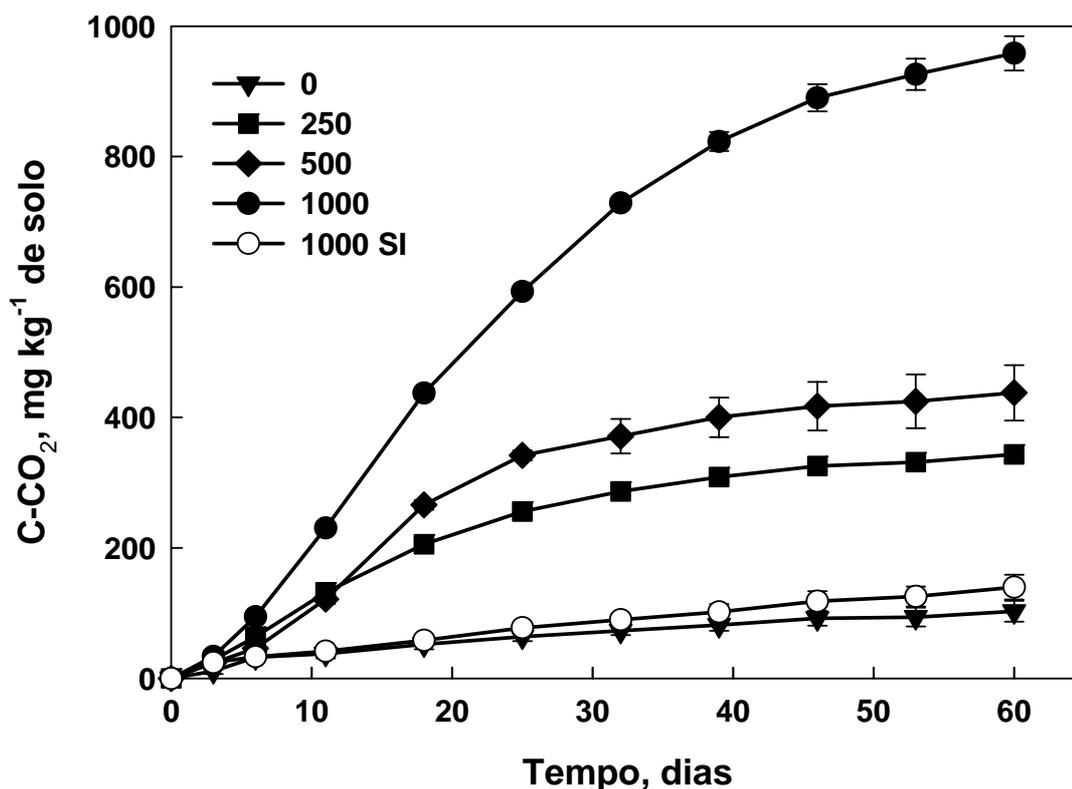


FIGURA 4. Produção de C-CO₂ de um solo contaminado com diferentes concentrações de antraceno (mg kg⁻¹ de solo), inoculado com o consórcio microbiano ou sem inoculação (SI) (dados são médias de duas repetições; barras representam o erro padrão).

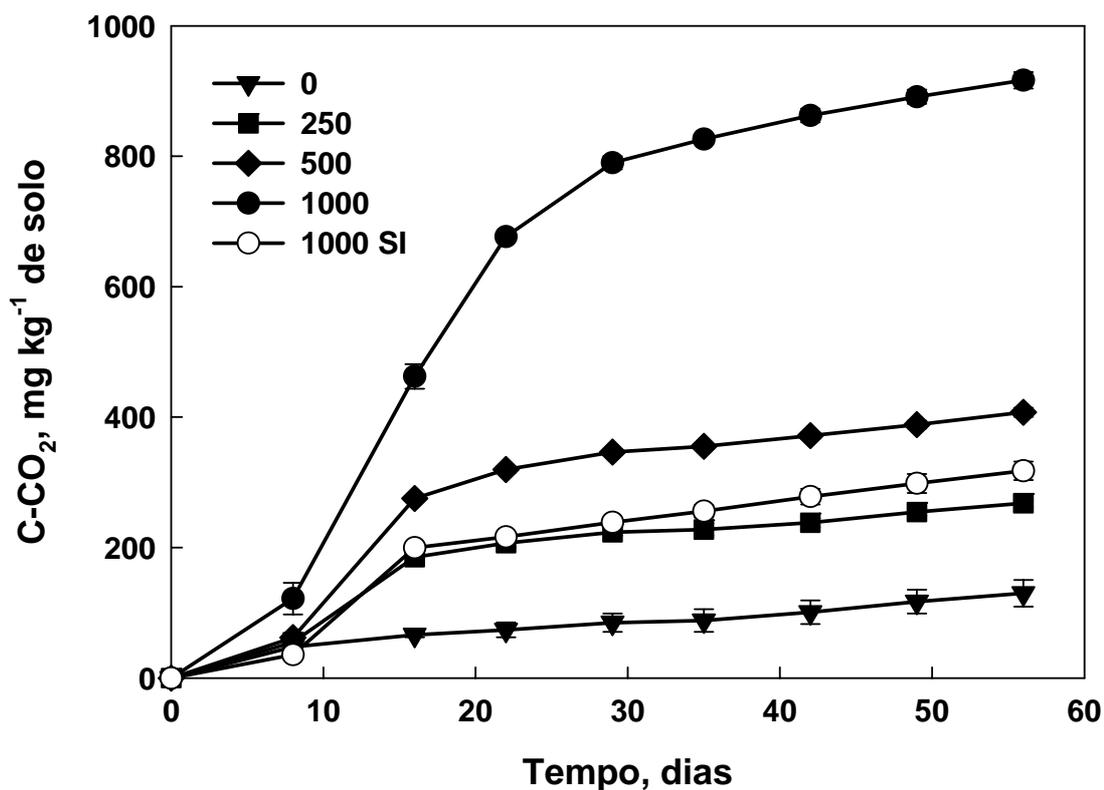


FIGURA 5. Produção de C-CO₂ de um solo contaminado com diferentes concentrações de fenantreno (mg kg⁻¹ de solo), inoculado com o consórcio microbiano ou sem inoculação (SI) (dados são médias de duas repetições; barras representam o erro padrão).

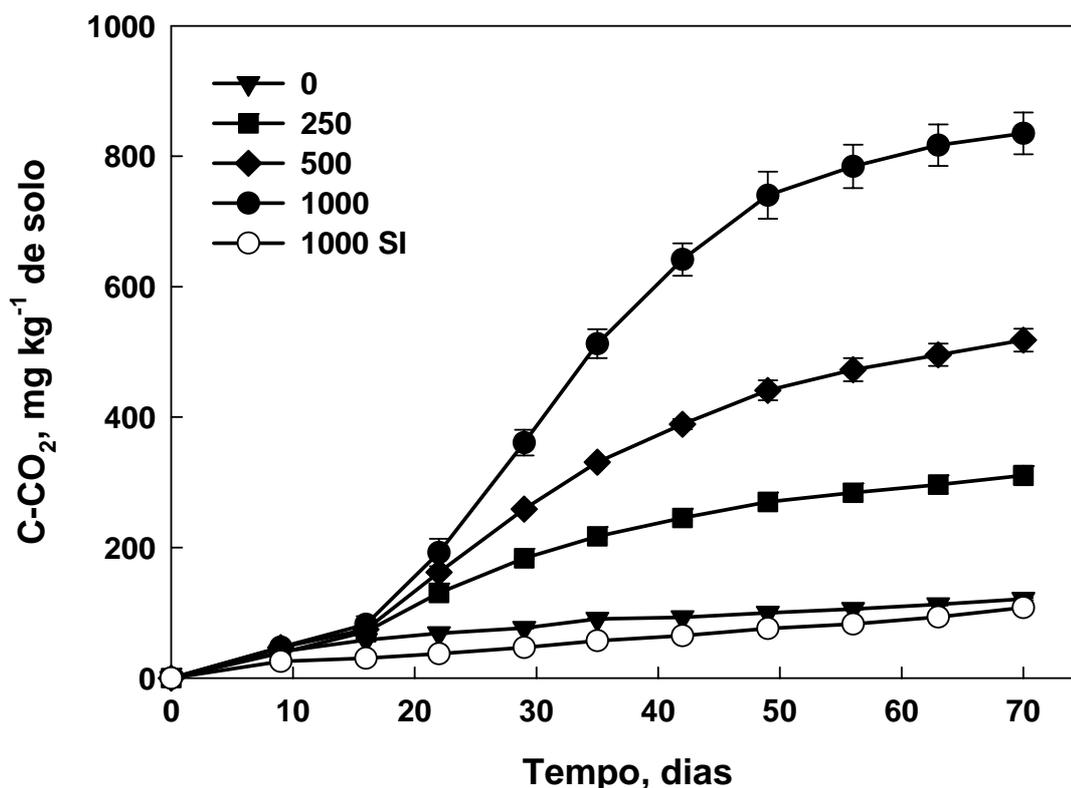


FIGURA 6. Produção de C-CO₂ de um solo contaminado com diferentes concentrações de pireno (mg kg⁻¹ de solo), inoculado com o consórcio microbiano ou sem inoculação (SI) (dados são médias de duas repetições; barras representam o erro padrão).

O consórcio microbiano mineralizou elevadas porcentagens dos 3 HAPs (Tabela 1) em períodos de tempos relativamente curtos, se comparado a outros experimentos. Kastner et al. (1998) observaram que a degradação de 25 mg kg⁻¹ de antraceno no solo havia sido completada aos 65 dias. A mineralização de 10 mg kg⁻¹ de fenantreno no solo foi estabilizada aos 100 dias após o início do experimento (Nam et al., 1998) e a degradação de 100 mg kg⁻¹ do pireno no solo ainda não se encontrava completamente estabilizada após 90 dias de incubação (Ravelet et al., 2001). Houve também um efeito da concentração de HAP no solo, sendo que quanto menor esta concentração mais rapidamente a produção de C-CO₂ foi estabilizada. Pode-se observar que a redução da taxa de mineralização na concentração de 250 mg kg⁻¹ ocorreu próximo aos 30 dias para o antraceno e o pireno, sendo que para o fenantreno, o tempo de estabilização foi ainda menor, próximo dos 15 dias. Quando o solo encontrava-

se com 1000 mg kg^{-1} a mineralização foi estabilizada ao final do período de experimento, à exceção somente do fenantreno que a partir dos 30 dias não apresentou produções significativas de C-CO₂, indicando que apesar deste HAP ter apresentado uma fase de adaptação de 7 dias, superior a do antraceno, as taxas iniciais de mineralização foram elevadas.

TABELA 1. Mineralização das diferentes concentrações dos HAPs, no solo inoculado com o consórcio microbiano ou sem inoculação (SI), ao final dos experimentos respirométricos (dados são médias de três repetições \pm erro padrão).

Concentração (mg kg^{-1})	Porcentagem de Mineralização		
	Antraceno	Fenantreno	Pireno
0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
250	100,00 \pm 0,00	58,81 \pm 2,57	80,32 \pm 6,34
500	70,97 \pm 8,99	58,80 \pm 1,49	84,09 \pm 3,69
1000	90,63 \pm 2,79	83,33 \pm 1,34	75,69 \pm 3,39
1000 SI	3,91 \pm 2,00	19,89 \pm 1,51	0,00 \pm 0,00

Na presença de 250 mg kg^{-1} de antraceno a mineralização foi de 100%. Este elevado valor pode indicar que em vista da estabilização da produção do C-CO₂ aos 30 dias, pode ter ocorrido até o final do experimento, a morte e a mineralização da biomassa formada a partir da utilização deste substrato, resultando nesta elevada porcentagem. Estudos da mineralização do antraceno no solo são relativamente raros, entretanto trabalhos com o fenantreno têm também apresentado altas porcentagens de produção de C-CO₂. Ortiz et al. (2003) quantificaram em 87% a mineralização de 1000 mg kg^{-1} do fenantreno no solo após 8 dias de incubação.

Para o antraceno, a concentração de 500 mg kg^{-1} teve a menor porcentagem de mineralização, porém apresentou o maior erro padrão, indicando que esta baixa produção de C-CO₂ pode estar associado a diferenças no valor quantificado entre as repetições. Na concentração de 1000 mg kg^{-1} houve mineralização de 90,63% do antraceno, o que demonstra que o consórcio microbiano apresentou elevada atividade de mineralização, pois metabolizou altas quantidades de HAPs em um período de tempo

relativamente curto. Se comparada a presença e a ausência do consórcio microbiano na concentração de 1000 mg kg^{-1} , verifica-se que a inoculação de microrganismos com reconhecida capacidade de degradação do antraceno aumentou em 2317% a produção de C-CO₂ em 60 dias, o que se mantida as taxas de mineralização, representa uma redução de 367 dias no tempo de biorremediação deste solo.

Apesar da mineralização do fenantreno ter sido estabilizada em menor período de tempo que a dos demais HAPs e da eliminação deste HAP do solo ao final do experimento, a mineralização média na presença do consórcio foi a mais baixa, de 67% (Tabela 1), conseqüência da baixa produção de C-CO₂ nas concentrações de 250 e 500 mg kg^{-1} . Assim, a rápida estabilização da mineralização do fenantreno nestas concentrações deve-se principalmente a baixa porcentagem do HAP que foi mineralizada em comparação ao antraceno e ao pireno. Concomitantemente a isto, observa-se que na concentração de 1000 mg kg^{-1} a microbiota autóctone do solo mineralizou aproximadamente 20% do fenantreno, sendo esta produção muito superior aquela observada para os demais HAPs. Além disso, a mineralização do fenantreno pela microbiota autóctone não foi resultado de um processo adaptativo, pois a partir do 7º dia já se observa-se uma alta taxa de mineralização, indicando que este composto foi mais facilmente reconhecido e degradado pelas enzimas dos microrganismos autóctones do solo. Este comportamento pode ser conseqüência da maior solubilidade em água e conseqüentemente da maior biodisponibilidade do fenantreno no solo.

Assim, esta capacidade de metabolização do fenantreno pela microbiota nativa do solo pode ter estabelecido com o consórcio microbiano maior competição pela utilização de fontes de C e energia no solo, ou seja, parte deste HAP pode ter sido utilizado pelo consórcio e parte pelos microrganismos autóctones do solo, sendo que estes podem apresentar menor capacidade de transformar o fenantreno em CO₂ que a população inoculada, resultando em acúmulo de intermediários do metabolismo no solo, reduzindo assim as porcentagens de mineralização. A menor capacidade de mineralização da microbiota autóctone em relação ao consórcio microbiano pode ser comprovado ao compararmos a produção de C-CO₂ no solo contaminado com 1000 mg kg^{-1} , onde a presença dos microrganismos inoculados aumentou em

419% a mineralização do fenantreno. O decréscimo da concentração de fenantreno e o acúmulo de metabólitos resultantes da degradação pela microbiota do solo foi reportado por Andersson et al. (2003), que num estudo de 12 semanas verificou o acúmulo de 9-fluorenona e benz(a)antraceno-7,12-diona no solo, ambos identificados como metabólitos fúngicos.

O pireno também foi eliminado do solo na quase totalidade, sendo mineralizado pelo consórcio microbiano numa alta porcentagem, média de 80%, indicando que apesar de se tratar de um HAP de alto peso molecular, os microrganismos do consórcio mineralizaram altas quantidades, independentemente da concentração adicionada ao solo. A dificuldade em degradar este HAP pode ser verificada pela incapacidade da microbiota autóctone do solo em mineralizar este composto.

Os resultados da cromatografia gasosa mostram que ao final dos experimentos respirométricos as quantidades remanescentes dos HAPs no solo foram muito baixas (Tabela 2). Para o antraceno e o fenantreno observa-se que independentemente das concentrações, o consórcio microbiano degradou mais de 99% das quantidades inicialmente adicionadas ao solo. O pireno apresentou as maiores quantidades remanescentes no solo ao final do experimento respirométrico, principalmente nas concentrações de 250 e 1000 mg kg⁻¹. Entretanto, ao convertermos estas quantidades para porcentagens, verificamos que a exemplo do antraceno e do fenantreno, o pireno também foi eficientemente degradado no solo pelo consórcio microbiano, resultando em degradações maiores que 92%. Além disso, há que se considerar que o pireno é de mais difícil degradação se comparado ao antraceno e ao fenantreno, por apresentar 4 anéis aromáticos na sua fórmula estrutural, demonstrando que o consórcio microbiano degradou eficientemente altas concentrações dos 3 HAPs no solo, resultando na rápida eliminação dos contaminantes do ambiente. Outros autores também observaram altas taxas de biodegradação destes HAPs no solo. Kastner; Mahro (1996) verificaram que as 100 mg kg⁻¹ do antraceno e do pireno do solo foram degradadas após 50 dias de incubação. O pireno, na concentração de 250 mg kg⁻¹, também foi eficientemente degradado após 30 dias da inoculação ao solo da bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* (Boonchan et al., 2000).

TABELA 2. Concentrações e porcentagens de degradação do antraceno, fenantreno e pireno no solo após o final dos experimentos respirométricos.

Concentração (mg kg ⁻¹)	Antraceno		Fenantreno		Pireno	
	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	%
0	0	0	0	0	0	0
250	0,85	99,66	1,69	99,32	19,63	92,15
500	3,35	99,33	1,44	99,71	2,91	99,42
1000	6,46	99,36	3,10	99,69	37,26	96,27

Ao nosso conhecimento a única legislação brasileira que trata da contaminação de HAPs no solo é a da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo), ainda assim, há limites definidos somente para o naftaleno, que é um composto de 2 anéis aromáticos que apresenta solubilidade em água (31,7 mg L⁻¹) e volatilidade relativamente altas, o que resulta em uma dinâmica no solo diferente daquela observada para os demais HAPs de 3 ou mais anéis aromáticos (Allard et al., 2000; Verschueren, 2001). Assim, considerando-se a Lista Holandesa de Valores de Qualidade do Solo e da Água Subterrânea (CETESB, 2005), observa-se que o solo deste experimento apresentou concentrações iniciais muita acima dos valores de intervenção estipulados por esta legislação, que é de 40 mg kg⁻¹, indicando que o solo apresentava-se altamente contaminado. Mesmo assim, o consórcio microbiano reduziu em curto período de tempo as concentrações do antraceno, do fenantreno e do pireno, na concentração de 500 mg kg⁻¹, para valores próximos ao de referência, que é de 1,0 mg kg⁻¹, e bem abaixo do valor de alerta que é de 20,5 mg kg⁻¹, indicando que o processo de biorremediação foi eficiente, principalmente se considerarmos as altas concentrações iniciais de HAPs presentes no solo.

A eficiência dos microrganismos heterotróficos do solo em utilizarem um determinado substrato para a produção de material celular é dependente das populações microbianas predominantemente envolvidas com a degradação, da quantidade e qualidade deste substrato, no que se refere a sua recalcitrância. Um valor médio que freqüentemente é utilizado na literatura é de que 35% do C metabolizado é utilizado nas rotas anabólicas para a produção de biomassa e que 65% é utilizado para a produção de energia, sendo transformado em CO₂

(Sylvia et al., 2000). As porcentagens de mineralização dos 3 HAPs são apresentadas na Tabela 1. Na presença do consórcio microbiano a mineralização média do antraceno foi de 87%, do fenantreno de 67% e do pireno de 80%. Assim, considerando-se o desaparecimento quase que total dos HAPs no solo e estas elevadas porcentagens de mineralização, poder-se-ia supor que a diferença entre o C adicionado e o quantificado na forma de CO₂ encontra-se na biomassa microbiana, indicando que a inoculação ao solo do consórcio microbiano proporcionou um processo de biorremediação efetivo e rápido.

Nestes 3 experimentos, foi comprovada a capacidade do consórcio selecionado em biorremediar o solo contaminado, não-estéril, com diferentes concentrações de antraceno, fenantreno e pireno, e em curto período de tempo, evidenciando que no caso de uma contaminação acidental de HAPs neste solo, a bioaugmentação seria uma prática a ser considerada para aumentar as taxas de mineralização, promovendo um processo de biorremediação seguro, onde haveria a eliminação da grande maioria dos contaminantes e em curto período de tempo.

4.5 CONCLUSÕES

1) A microbiota autóctone do solo Itapuã apresenta nula ou baixa capacidade de mineralização do antraceno, do fenantreno e do pireno presente no solo;

2) Os isolados bacterianos e o fungo, membros do consórcio microbiano, se inoculados separadamente ao solo, apresentam baixas porcentagens de mineralização do antraceno quando comparado a inoculação conjunta na forma de consórcio;

3) O consórcio microbiano mineraliza altas porcentagens das diferentes concentrações de antraceno, fenantreno e pireno presentes no solo, o que resulta em grande aumento da mineralização se comparada a microbiota autóctone do solo;

4) O consórcio microbiano degrada a quase totalidade das diferentes concentrações de antraceno, fenantreno e pireno presentes no solo e em curto período de tempo;

5) No caso da contaminação do solo Itapuã por antraceno ou fenantreno ou pireno, a bioaugmentação é uma prática recomendada para aumentar as taxas de mineralização e promover um processo de biorremediação completo e rápido.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLARD, A.S. et al. The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.46, n.1, p.43-49, 2000.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1999. 453p.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology**: fundamentals and applications. 4th ed. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 1998. 694p.
- BAZALEL, L. et al. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n.1, p.292-295, 1996.
- BOONCHAN, S. et al. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.3, p.1007-1019, 2000.
- CETESB. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/relacao_areas.asp>. Acesso em: 20 jul. 2005.
- EDGEHILL, R.U. et al. Bioremediation by inoculation with microorganisms. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed.) **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.290-314.
- GOLDSTEIN, R.J. et al. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.50, n.4, p.997-983, 1985.

- GROSSER, R.J. et al. Mineralization of polycyclic and N-heterocyclic aromatic-compounds in hydrocarbon-contaminated soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 14, n.3, p.375-382, 1995.
- JONES, K.C. Organic contaminants in Welsh Soils: polynuclear aromatic hydrocarbons. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.13, n.5, p.540-550, 1989.
- KANALY, R.A. et al. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.182, n.8, p.2059-2067, 2000.
- KASTNER, M. et al. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.1, p.359-362, 1998.
- KASTER, M.; MAHRO, B. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.44, n.5, p.668-675, 1996.
- KOTTERMAN, M.J.J. et al. Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pireno by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. and indigenous microflora. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.8, p.2853-2858, 1998.
- LIU, S.Y. et al. Transformation of metachlor in soil inoculated with *Streptomyces* sp. **Biodegradation**, Dordrecht, v.1, n.1, p.9-17, 1990.
- MARTENS, R. et al. Mineralization of ¹⁴C-labelled highly-condensed polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by *Pleurotus* sp. Florida. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.31, n.13, p.1893-1899, 1999.
- NAM, K. et al. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.32, n.23, p.3785-3788, 1998.
- NETTO A.D.P. et al. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and their nitrated derivatives (NHPAS): a review of methodology. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.6, p.765-773, 2000.
- POTIN, O. et al. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil.

International Biodeterioration and Biodegradation, Oxford, v.54, n.1, p.45-52, 2004.

RAVELET, C. et al. Pyrene degradation by two fungi in a freshwater sediment and evaluation of fungal biomass by ergosterol content. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.56, n.5-6, p.803-808, 2001.

SABATÉ, J. et al. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Londres, v.54, n.1, p.19-25, 2004.

SANTOS, E.C. **Biodegradação do antraceno estimulada por ferro**. 2004. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

STOTZKY, G. Microbial Respiration. In: Black, C. A. (ed.). **Methods in soil analysis**. Madison: SSSA. 1965. p.1550-1572.

SYLVIA, D. M. et al. **Principles and applications of soil microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 550p.

TEDESCO, M.J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS. 1995. 174p.

VAN VEEN, J.A. et al. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, n.2, p.121-135, 1997.

VERSCHUEREN, K. **Handbook of environmental data of organic chemicals**. 4th ed. Chichester, England: Wiley, 2001. 2416p.

WEIGAND, H. et al. Fate of anthracene in contaminated soil: transport and biochemical transformation under unsaturated flow conditions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v.53, n.1, p.71-81, 2002.

CAPÍTULO IV

MINERALIZAÇÃO DO ANTRACENO NO SOLO EM DIFERENTES CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS

5.1 RESUMO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) podem ser eliminados do ambiente através da biorremediação, cuja eficiência é limitada se as condições do solo não forem favoráveis a sobrevivência e a atividade dos microrganismos degradadores destes contaminantes. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do pH, da disponibilidade de água, de nitrogênio, de fósforo, de ferro e de enxofre, na biorremediação de um solo contaminado com antraceno. Avaliou-se o efeito de doses (kg ha^{-1}) de nitrogênio (0, 50, 100, 200 e 400), de fósforo (0, 50, 100 e 200), de ferro (0, 15, 30 e 60) e de enxofre (0, 10, 20, 40), além de diferentes pH (4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0) e umidades gravimétricas (1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5%) na mineralização do antraceno no solo, que foi quantificada por respirometria. Para isto, inoculou-se um consórcio microbiano comprovadamente degradador deste HAP em um solo arenoso contaminado em laboratório com 500 mg kg^{-1} de antraceno. As maiores mineralizações do antraceno ocorreram nos solos com as maiores umidades gravimétricas e pH avaliados. A adição de 100 kg ha^{-1} ou mais de nitrogênio no solo e a conseqüente redução da relação C:N para valores inferiores a 67:1 diminuíram a mineralização do antraceno. O aumento da disponibilidade do fósforo, do ferro e do enxofre e a presença de amplas relações C:P (1076:1 a 50:1) e C:N:P (1076:16:1 a 50:1,3:1) no solo não influenciaram a mineralização do antraceno. Na presença de microrganismos degradadores, a bioestimulação teve efeitos positivos na biorremediação de solos contaminados com antraceno, mas deve ser recomendada somente após a avaliação específica da necessidade de adição de cada um dos nutrientes e corretivos.

5.2 INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos com reconhecidas propriedades mutagênicas e carcinogênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele, devido a presença destes compostos (Netto et al., 2000). A contaminação do solo pelos HAPs pode ocorrer em derrames e vazamentos acidentais do petróleo e seus derivados, pela adição proposital visando o tratamento de resíduos gerados por refinarias, postos de combustíveis e indústrias petroquímicas, em centros urbanos devido a geração de fuligem pelos motores veiculares e em áreas industriais com atividades relacionadas a petroquímica.

Em vista da complexidade estrutural destes HAPs, da sua baixa solubilidade em água e forte tendência de sorção à fase sólida do solo, estes compostos não são degradados pela maioria dos microrganismos, o que aumenta sua permanência no ambiente e a possibilidade de exposição dos Homens e animais. Uma alternativa para eliminação dos HAPs do solo é através da biorremediação, onde os microrganismos degradadores irão transformá-los em substâncias inertes, CO₂ e água.

A biorremediação pode ser limitada se as condições do solo não forem favoráveis a sobrevivência e a atividade dos microrganismos degradadores. A adequada disponibilidade de água no solo é considerado por Haider (1999) o fator ambiental mais crítico para a biodegradação, pois uma alta atividade microbiana somente ocorrerá se houver grande disponibilidade de água aos microrganismos. Além disto, o teor de água no solo tem relação direta e inversa com a disponibilidade de oxigênio e conseqüentemente, com a atividade dos microrganismos aeróbicos que são os principais responsáveis pela degradação dos HAPs.

O pH do solo afeta diretamente a atividade dos microrganismos através dos efeitos dos íons H^+ na permeabilidade celular e na atividade enzimática, assim como indiretamente pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes, e na solubilidade do alumínio e dos metais pesados, que podem ser tóxicos aos microrganismos. Em vista de que os fungos crescem em pH mais ácidos que as bactérias, a inoculação ao solo de um consórcio composto por estes dois grupos de microrganismos demanda a determinação do pH ótimo de atividade de degradação.

Em ambientes naturais, o nutriente que normalmente limita o crescimento microbiano é o C, sendo que os nutrientes inorgânicos estão presentes em quantidades que normalmente excedem as demandas das comunidades microbianas (Alexander, 1999). No entanto, a presença de elevadas concentrações de HAPs no solo com potencial para serem utilizados como substrato para o crescimento dos microrganismos pode fazer com que outros nutrientes que não o C se tornem limitantes. Uma relação C:N:P de 100:10:1 tem sido normalmente recomendada no solo a ser biorremediado (Cheng; Mulla, 1999; Sadowsky; Turco, 1999). No entanto, várias pesquisas que avaliaram os efeitos da adição de N e P ao solo demonstraram resultados muito conflitantes, indicando que esta relação pode não ser a mais adequada (Dible; Bartha, 1979; Zhou; Crawford, 1995; Atagana et al., 2003; Leys et al., 2005).

Outro nutriente que pode influenciar a degradação dos HAPs no solo é a disponibilidade do ferro. Isto porque, este elemento desempenha funções celulares que estão intimamente relacionadas ao metabolismo dos HAPs, como a participação na estrutura das enzimas do sistema multicomponente das dioxigenases e participação como cofator enzimático nas enzimas de fissão (Harayama, 1999). A possível limitação deste elemento aos microrganismos pode ocorrer porque os óxidos de ferro apresentam baixa solubilidade em ambientes aeróbicos, sendo que a concentração do ferro na solução do solo pode ser menor que 10^{-18} M (Andrews et al., 2003). A adição de fontes solúveis de ferro ao meio de cultura (0,1 mM de $Fe(NO_3)_3$) aumentou o crescimento dos três isolados de *Pseudomonas* que utilizavam separadamente vários hidrocarbonetos, além de aumentar em 13%, na média, a degradação do antraceno e de estimular a produção de biossurfactantes em um destes

isolados. Além disso, a mineralização do antraceno no solo foi aumentada com a adição de 50 g kg^{-1} de Fe_2O_3 (Santos, 2004).

O enxofre é outro elemento que está envolvido no metabolismo microbiano dos HAPs, isto porque é parte integrante do sistema multicomponente das dioxigenases, na forma de complexos ferro-enxofre. No solo, o enxofre encontra-se quase que totalmente associado à biomassa viva ou morta e desta forma, pode não estar prontamente disponível ou não ser quantitativamente suficiente para suportar uma alta demanda pela população degradadora do solo, quando da adição de HAPs ao solo. Liebeg; Cutright (1999) observaram maior mineralização dos HAPs no solo quando o enxofre havia sido adicionado em maiores quantidades em relação aos demais nutrientes.

O antraceno é um HAP que devido a sua menor toxicidade em relação aos demais tem sido utilizado como modelo nos estudos da dinâmica destes compostos no ambiente (Weigand et al., 2002). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do pH e da disponibilidade de água, de nitrogênio, de fósforo, de ferro e de enxofre na biorremediação de um solo contaminado com do antraceno.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Solo e inóculo

O solo utilizado em todos os experimentos, pertence a Unidade de Mapeamento Itapoã (Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico arênico) e foi coletado em uma área agrícola, sem histórico de recebimento de nenhum tipo de resíduo. A análise química deste solo é apresentada na Tabela 1. No laboratório, o solo foi seco e peneirado em malha de 2 mm. Para elevar o pH a 6,5, adicionou-se CaCO_3 e MgCO_3 na proporção 3:1, na forma de reagente comercial, incubando-se o solo úmido por 60 dias. Posteriormente, este solo foi contaminado em laboratório com 500 mg kg^{-1} de antraceno. Para isto, preparou-se uma solução concentrada deste HAP dissolvido em acetona ($8,333 \text{ mg mL}^{-1}$), que foi adicionada a 50 g de solo no interior de frascos respirométricos. Estes frascos foram colocados em estufa por 3 horas a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ para evaporação da acetona. Após adicionou-se mais 50 g de solo, procedendo-se uma intensa mistura. Devido a baixa fertilidade natural, 0,5 mL da solução de micronutrientes do meio mineral Tanner foram adicionadas às 100 g de solo. As adições de N, P, Fe e S foram realizadas de acordo com cada experimento.

TABELA 1. Análise química do solo Itapoã.

Atributo	Valores	Interpretação ¹
Argila (g kg ⁻¹)	90,0	Classe 4
pH (H ₂ O)	4,7	Muito baixo
Índice SMP	6,9	-
P (mg dm ⁻³)	3,3	Muito baixo
K (mg dm ⁻³)	20,0	Baixo
MO (g kg ⁻¹)	9,0	Baixo
Al trocável (cmol _c dm ⁻³)	0,2	-
Ca trocável (cmol _c dm ⁻³)	0,4	Baixo
Mg trocável (cmol _c dm ⁻³)	0,2	Baixo
S (mg dm ⁻³)	3,4	Médio
Fe (g dm ⁻³)	0,2	-
Al+H (cmol _c dm ⁻³)	1,6	-
CTC _{pH 7,0} (cmol _c dm ⁻³)	2,2	Baixo
Saturação de bases (%)	29,0	Muito baixo
Saturação de Al (%)	8,9	Baixo

¹ Conforme Comissão... (2004).

Após o solo estar corrigido, contaminado com antraceno e fertilizado, foi inoculado com um consórcio microbiano que em ensaios anteriores apresentou a capacidade de degradar e mineralizar este HAP no solo. Este consórcio é composto por 6 bactérias, identificadas como *Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium* sp., *Gordonia polyisoprenivorans*, *Microbacteriaceae bacterium* e *Naphthalene-utilizing bacterium*, e um fungo, *Fusarium oxysporum*. Adicionou-se 2 mL de uma suspensão de células do consórcio, de forma a introduzir uma população de $2,0 \times 10^8$ UFC g⁻¹ de solo (Kastner et al., 1998). Para obtenção desta suspensão de células, 100 µL de uma cultura do consórcio microbiano que havia crescido em meio mineral mais 250 mg kg⁻¹ de antraceno foi inoculada em ágar nutriente contendo 250 mg L⁻¹ deste HAP e incubada a 30 °C por 72 horas. Após o crescimento das colônias, foi adicionado sobre o meio 5 mL de água estéril e como o auxílio de uma alça de Drigalsky, as colônias foram coletadas para tubos e a suspensão foi centrifugada a 10000 rpm, por 8 minutos a 15 °C. Descartava-se o

sobrenadante e ressuspendia-se o pellet numa quantidade previamente calculada de água estéril, sendo então a suspensão adicionada ao solo no interior dos frascos respirométricos.

5.3.2 Condições químicas e físicas

O efeito da umidade do solo na mineralização do antraceno foi avaliado em um experimento com 7 tratamentos, que corresponderam as seguintes umidades gravimétricas (Ug%): 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 10,0 sem inoculação (SI) do consórcio microbiano. O solo foi fertilizado com o equivalente a 100 kg ha⁻¹ de N, 50 kg ha⁻¹ de P e 56 kg ha⁻¹ de Fe, na forma de solução de NH₄NO₃, KH₂PO₄ e Fe(NO₃)₃. Os frascos foram incubados com 4 repetições durante 54 dias. Semanalmente, por ocasião da titulação do C-CO₂, os frascos foram pesados e água destilada estéril era adicionada de forma a manter a umidade constante.

A mineralização do antraceno no solo com diferentes pH foi avaliado em um experimento respirométrico com 8 tratamentos, que corresponderam aos seguintes pH: 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 6,5 sem inoculação (SI) do consórcio microbiano. Para obtenção destes pH, o solo recebeu diferentes quantidades de CaCO₃ e MgCO₃ na proporção 3:1, na forma de reagente comercial e foi incubado úmido por 60 dias. O solo foi fertilizado com o equivalente a 100 kg ha⁻¹ de N, 50 kg ha⁻¹ de P e 56 kg ha⁻¹ de Fe, na forma de solução de NH₄NO₃, KH₂PO₄ e Fe(NO₃)₃. Os frascos foram incubados com 3 repetições durante 56 dias.

O efeito do N na mineralização do antraceno no solo foi avaliado em um experimento com 5 tratamentos, que equivaleram as doses de 0, 50, 100, 200 e 400 kg ha⁻¹. O N foi adicionado ao solo na forma de uma solução de NH₄NO₃. O solo foi ainda fertilizado com 50 kg ha⁻¹ de P e 56 kg ha⁻¹ de Fe, na forma de solução de KH₂PO₄ e FeSO₄ 7H₂O. Os frascos foram incubados com 4 repetições durante 62 dias. O N mineral do solo (NH₄⁺ e NO₃⁻ + NO₂⁻) foi determinado em cada uma das doses adicionadas pelo método de micro-Kjeldahl conforme Tedesco et al. (1995). O C orgânico do solo foi quantificado no Analisador de Carbono Orgânico Total (TOC-V CSH, Shimadzu, Japão). A força iônica foi calculada a partir da equação descrita em Sparks (1995):

$$FI = 0,0127CE \quad (1)$$

onde FI é a força iônica (M) e CE é a condutividade elétrica ($dS\ m^{-1}$), determinada diretamente no solo pelo método do extrato de saturação na relação 1:5, conforme Tedesco et al. (1995).

A mineralização do antraceno no solo com diferentes teores de P foi avaliado em um experimento respirométrico com 5 tratamentos, que corresponderam as doses, em $kg\ ha^{-1}$, de 0, 50, 100, 200 e 50 sem inoculação (SI) do consórcio microbiano. O P foi adicionado ao solo na forma de uma solução de KH_2PO_4 . O solo foi ainda fertilizado com $50\ kg\ ha^{-1}$ de N e $56\ kg\ ha^{-1}$ de Fe, na forma de solução de NH_4NO_3 , e $FeSO_4\ 7H_2O$. Os frascos foram incubados com 4 repetições durante 34 dias. O P extraível presente no solo de cada um dos tratamentos foi determinado pelo método Mehlich-1, conforme Tedesco et al. (1995).

O efeito do Fe na mineralização do antraceno no solo foi avaliado em um experimento com 5 tratamentos, que equivaleram as doses, em $kg\ ha^{-1}$, de 0, 15, 30, 60 e 60 sem inoculação (SI) do consórcio microbiano. O Fe foi adicionado ao solo na forma de uma solução de $FeSO_4\ 7H_2O$. O solo foi ainda fertilizado com $50\ kg\ ha^{-1}$ de N e $50\ kg\ ha^{-1}$ de P, na forma de solução de NH_4NO_3 e KH_2PO_4 . Os frascos foram incubados com 4 repetições durante 50 dias. Em cada um dos tratamentos, o Fe amorfo do solo foi determinado conforme Tedesco et al. (1995).

A mineralização do antraceno no solo com diferentes teores de S foi avaliado em um experimento respirométrico com 5 tratamentos, que corresponderam as doses, em $kg\ ha^{-1}$, de 0, 10, 20, 40 e 20 sem inoculação (SI) do consórcio microbiano. O S foi adicionado ao solo na forma de uma solução de K_2SO_4 . O solo foi ainda fertilizado com $50\ kg\ ha^{-1}$ de N, $50\ kg\ ha^{-1}$ de P e $56\ kg\ ha^{-1}$ de Fe, na forma de solução de NH_4NO_3 , KH_2PO_4 e $Fe(NO_3)_3$. Os frascos foram incubados com 4 repetições durante 48 dias. O S do solo de cada um dos tratamentos foi determinado conforme Tedesco et al. (1995).

5.3.3 Análise respirométrica

Os frascos respirométricos (1,5 L) com o solo já inoculado foram equipados com aparato de captura de CO_2 , composto por um frasco de 50 mL

com 20 mL de NaOH 0,25 M, fechados hermeticamente e incubados a temperatura ambiente no Laboratório. Semanalmente os frascos foram abertos, a solução de NaOH recebia um mL de BaCl₂ 1 M e foi titulada com HCl 0,5 M, utilizando fenoftaleína como indicador. A solução do HCl 0,5 M foi padronizada com tris, conforme Tedesco et al. (1995). Uma amostra com umidade igual ao solo dos frascos respirométricos foi utilizada para determinação da umidade gravimétrica, sendo a produção de C-CO₂ expressa em kg de solo seco.

A produção de C-CO₂ foi quantificada através da fórmula de Stotzky (1965):

$$\text{C-CO}_2 \text{ (mg kg}^{-1} \text{ de solo)} = (\text{B-T}) \times \text{eq} \times \text{M} \times 10 \quad (2)$$

onde B é o volume (em mL) da solução de HCl gasto para titular a prova em branco (frasco respirométrico sem solo); T é o volume (em mL) da solução de HCl gasto para titular os tratamentos; eq é o equivalente-grama do C, que é 6; M é a molaridade da solução padronizada de HCl e 10 é o fator de conversão para kilograma de solo.

5.3.4 Análise estatística

O erro padrão foi calculado pela fórmula $\sqrt{\frac{\sum_{s=1}^m \sum_{i=1}^n y_{is}^2}{(n_y - 1)(n_y)}}$ onde, s = número

da série; i = número do ponto na série s; m = número de séries para o ponto y no gráfico; n = número de pontos em cada série; y_{is} = valor de dados da série s e ponto i; e n_y = número total de valores de dados em todas as séries.

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito da umidade gravimétrica do solo (U_g) na mineralização do antraceno no solo é apresentado na Figura 1. Observa-se que quanto maior a umidade maior a produção de $C-CO_2$, o que confirma a afirmação de Haider (1999) segundo a qual em condições de alta disponibilidade de substrato, os solos têm água disponível insuficiente para suportar alta atividade microbiana. Neste caso, em vista do experimento ter sido conduzido em laboratório e do fornecimento de condições adequadas aos microrganismos no que se refere a nutrientes inorgânicos, temperatura, disponibilidade de fonte de C e outros, a umidade do solo mostrou-se como um fator limitante para a atividade de mineralização do antraceno pelo consórcio microbiano, obtendo-se uma relação linear positiva (R^2 de 0,85 com significância de 1% de probabilidade) entre U_g e porcentagem de mineralização no solo inoculado.

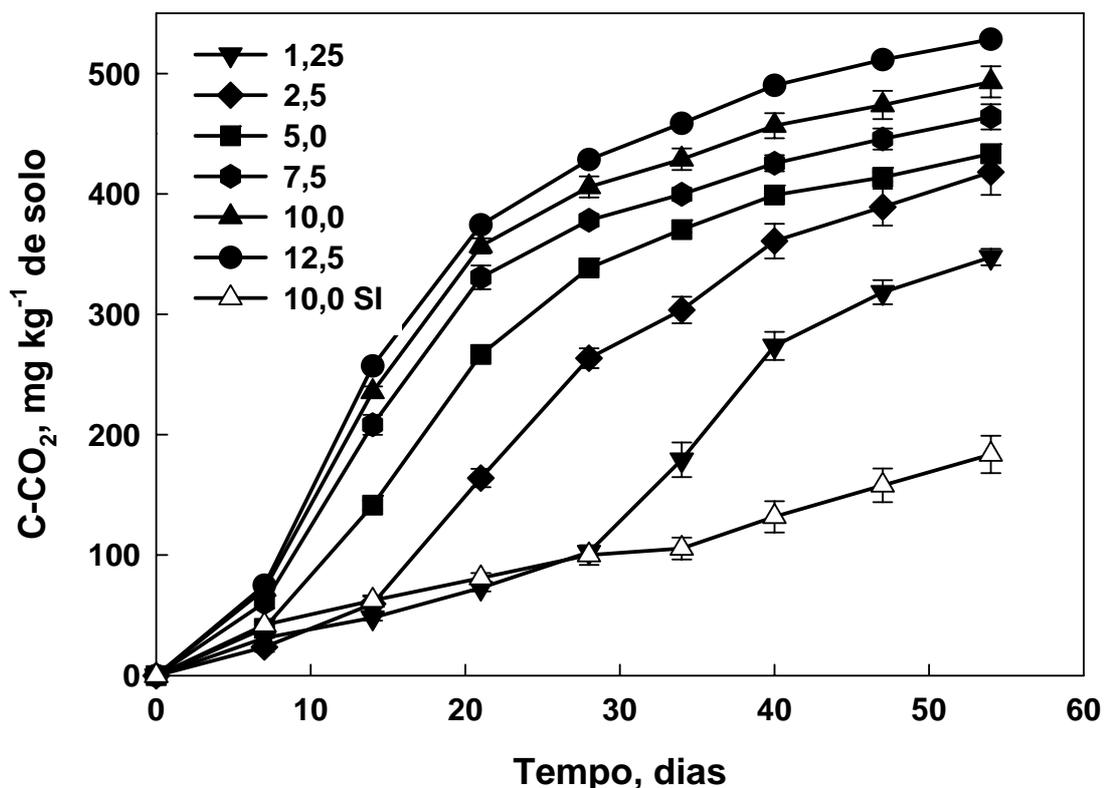


FIGURA 1. Produção de C-CO₂ de um solo com diferentes umidades gravimétricas (%), contaminado com antraceno e inoculado ou não (SI) com um consórcio microbiano (dados são médias de quatro repetições; barras representam o erro padrão).

A menor mineralização do antraceno no solo com as menores Ug pode estar relacionada ao prolongamento da fase de adaptação no início do experimento. Para as Ug de 1,25 e 2,5% o início da produção de C-CO₂ ocorreu respectivamente, aos 28 e 14 dias, enquanto que para os demais tratamentos inoculados, a fase de adaptação teve duração de somente 7 dias. Observa-se desta maneira que a fase de adaptação do consórcio microbiano no solo foi tanto maior quanto menor a disponibilidade de água. No entanto, há que se destacar que mesmo nas menores Ug o consórcio buscou a adaptação e iniciou a produção de C-CO₂, mineralizando o antraceno em porcentagens bem maiores que as da microbiota autóctone do solo em condições de alta disponibilidade de água, demonstrando desta forma uma característica importante a ser considerada na seleção dos microrganismos a ser utilizados

na bioaumentação, que é a capacidade de superar as limitações impostas pelo ambiente a ser biorremediado.

Com as umidades utilizadas neste experimento, não foi possível verificar a redução na produção de C-CO₂ pelo excesso de água no solo, que afetaria a disponibilidade de oxigênio para os microrganismos aeróbicos degradadores do antraceno. No tratamento com umidade de 12,5% o solo se encontrava visualmente saturado de água, o que indicava uma condição de anaerobiose. No entanto, devido provavelmente ao tipo de solo (arenoso), a quantidade de solo utilizada nos frascos respirométricos (100 g) e a destruição dos agregados pelos procedimentos anteriores ao início do experimento, esta alta quantidade de água não impediu o fluxo de oxigênio, o que possibilitou nas maiores Ug a ocorrência simultânea de alta disponibilidade de água e de ar, o que resultou em maior atividade de mineralização do antraceno. Bartha (1986) também verificou que a biodegradação de hidrocarbonetos no solo foi inibida em 66% da capacidade de campo, sendo que a maior atividade degradativa ocorreu em 100% da capacidade de campo.

Há ainda que se considerar que a maior produção de C-CO₂ nos tratamentos com maior umidade pode ser em parte conseqüência da maior biodisponibilidade do antraceno. Nos solos com maior conteúdo de água, grande parte das superfícies dos minerais e das moléculas de matéria orgânica estão formando pontes de H com a água, o que impede a sorção dos HAPs e conseqüentemente aumenta a biodisponibilidade destes compostos. Karimi-Lotfabad et al. (1996) demonstraram que quanto maior a umidade do solo maior foi a recuperação de antraceno do solo por solventes orgânicos, o que segundo os autores se deveu a menor sorção na fase sólida. Assim, a maior produção de C-CO₂ nos solos com maiores umidades pode ser devido a ocorrência conjunta de alta disponibilidade de água, de oxigênio e de antraceno para o consórcio microbiano.

A mineralização do antraceno pelo consórcio microbiano no solo com diferentes pH é apresentado na Figura 2. Observa-se que quanto maior o pH, maior foi a produção de C-CO₂, indicando ser este um fator ambiental a ser considerado na biorremediação do solo, apesar dos poucos estudos na literatura especializada. No pH natural do solo Itapoã (4,5) houve total inibição da mineralização do antraceno, mesmo sendo o solo fertilizado com N, P, K, S

e micronutrientes, e inoculado por um consórcio microbiano que apresenta alta capacidade de mineralizar este composto. No caso de uma contaminação por HAPs neste solo, a bioestimulação visando a correção do pH seria uma prática recomendada, que no entanto, deveria ser complementada pela bioaumentação, pois somente a elevação do pH a 6,5 não resultou em aumento significativo da mineralização do antraceno, conforme demonstrado pelo tratamento 6,5 SI. Isto demonstra que a mineralização do antraceno no solo deveu-se a presença do consórcio microbiano e que a atividade deste esteve intimamente relacionada ao pH do solo, havendo uma relação linear positiva (R^2 de 0,86 com significância de 1% de probabilidade) entre pH e porcentagem de mineralização no solo inoculado.

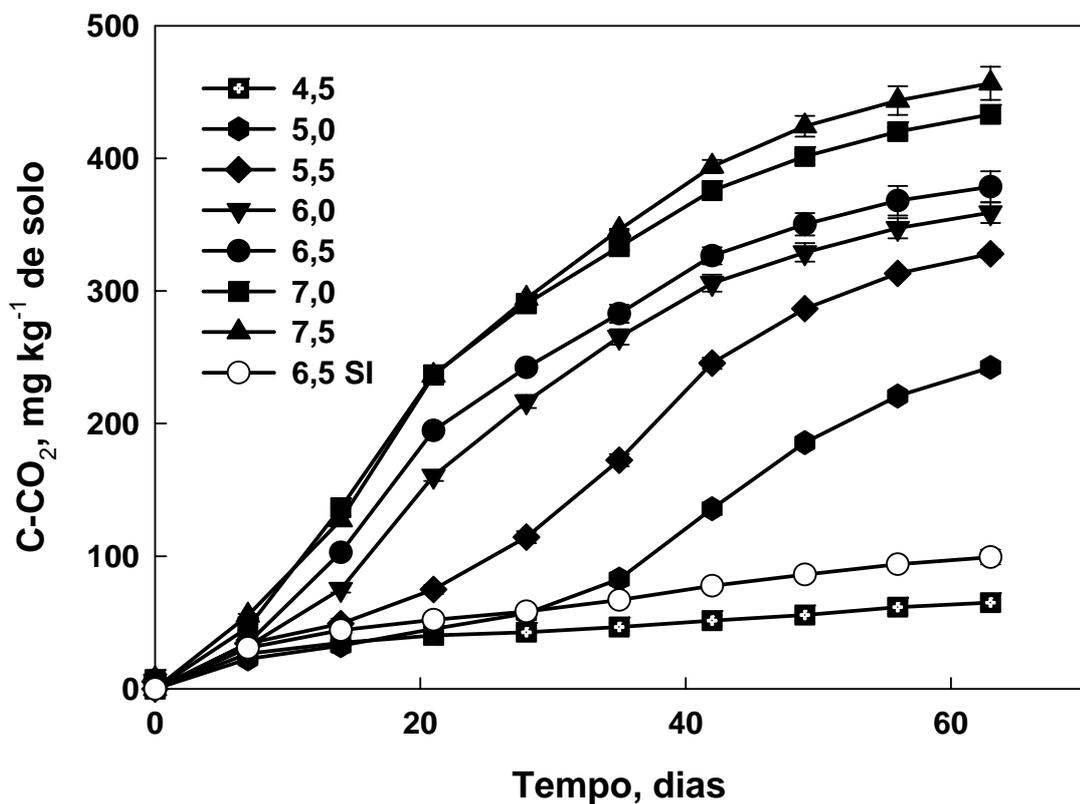


FIGURA 2. Produção de C-CO₂ de um solo com diferentes pH, contaminado com antraceno e inoculado ou não (SI) com um consórcio microbiano (dados são médias de três repetições; barras representam o erro padrão).

Assim como nos tratamentos com menor umidade do solo, quando o pH encontrava-se em 5,0 e 5,5 o consórcio microbiano apresentou maior fase de

adaptação, iniciando a produção de C-CO₂ aos 28 e aos 14 dias, respectivamente, demonstrando novamente a capacidade do consórcio microbiano em adaptar-se a uma condição ambiental adversa e promover a degradação do contaminante.

Os efeitos do pH no metabolismo celular podem ser diretos, devido a atividade do H⁺ na permeabilidade celular e atividade enzimática, ou indiretamente pela influência na disponibilidade de macronutrientes, micronutrientes e nos metais pesados do solo. As maiores produções de C-CO₂ nos tratamentos com pH 7,0 e 7,5, indicam que a atividade metabólica do consórcio é sensível ao H⁺ da solução do solo e que a redução da disponibilidade dos micronutrientes Mn, Fe, B, Zn e Cu com o aumento do pH do solo não influenciou a absorção destes pelas células dos microrganismos, o que em parte pode ser devido a adição ao solo da solução de micronutrientes. Além disso, a maior mineralização nos pH 7,0 e 7,5 pode ser consequência do enriquecimento assim como dos demais procedimentos microbiológicos que utilizaram meios de cultura com pH 7,0, de forma a selecionar um consórcio microbiano neutrofílico.

Ao final do experimento avaliou-se novamente o pH do solo. Nos tratamentos 5,5; 6,0; 6,5 e 7,0 houveram reduções de $0,7 \pm 0,1$ unidades de pH em relação ao valor observado no início do experimento. Este comportamento indica que a alta atividade de mineralização do antraceno verificada nestes tratamentos foi acompanhada da produção e excreção de H⁺ ou outros metabólitos ácidos pela microbiota degradadora, resultando na redução significativa do pH do solo, se considerado o curto período de 63 dias. Por se tratar de um solo arenoso e com baixo teor de matéria orgânica, o solo Itapoã apresenta baixa capacidade de tamponamento do pH, demandando pequenas quantidades de calcário para a correção da acidez e por outro lado, permitindo esta redução do valor do pH. Se um processo de biorremediação estivesse em curso neste solo, o pH deveria ser monitorado com frequência, e se necessário, adições de pequenas quantidades de calcário deveriam ser feitas, visando manter o pH próximo da neutralidade, condição que proporciona maior atividade de mineralização do antraceno pelo consórcio microbiano.

O efeito do N do solo na mineralização do antraceno é apresentado na Figura 3. Verifica-se que com o aumento da dose de N houve tendência de

redução da mineralização deste HAP. Após 60 dias, as maiores produções de C-CO₂ foram quantificadas nos tratamentos de 0 e 50 kg ha⁻¹. A adição de 100 ou 200 kg ha⁻¹ reduziu esta produção em 11% e em 26% na dose de 400 kg ha⁻¹, respectivamente. Este comportamento provavelmente se deve as altas quantidades de N mineral, principalmente NO₃⁻ + NO₂⁻, presentes no solo no início do experimento, conforme demonstrado pelo tratamento que não recebeu N (Tabela 2), conseqüência da mineralização da matéria orgânica durante os procedimentos de preparo do solo e incubação para correção do pH.

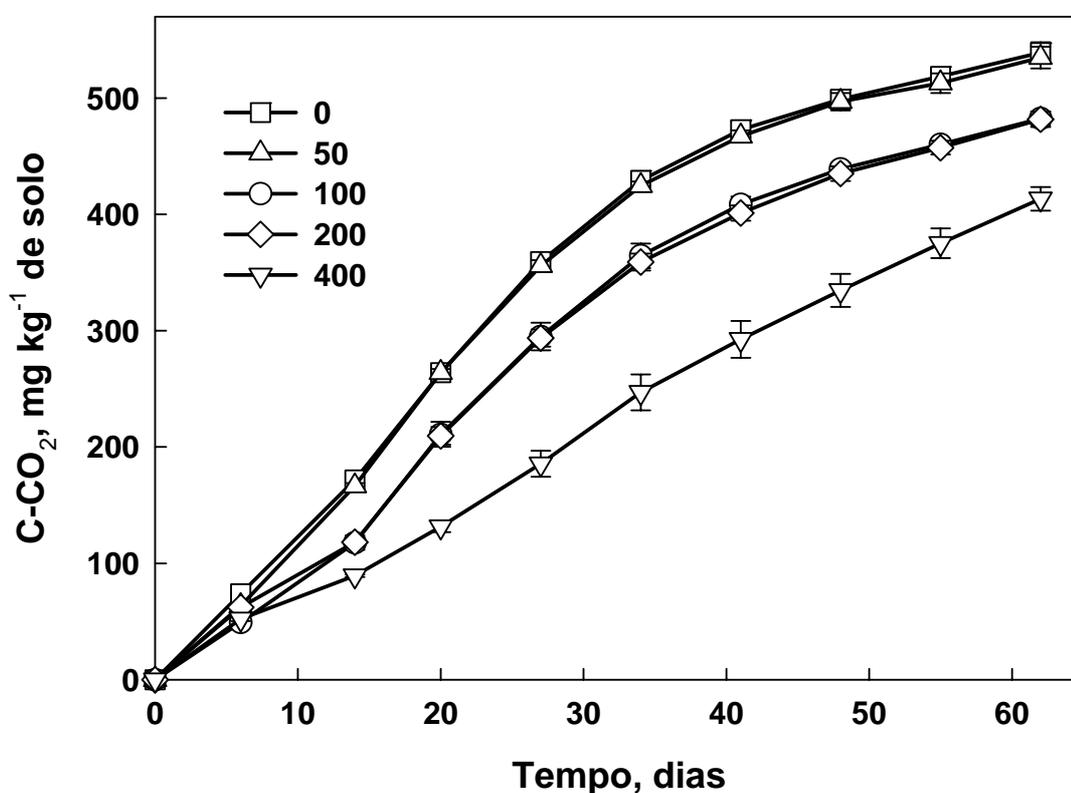


FIGURA 3. Produção de C-CO₂ de um solo com diferentes doses de nitrogênio (kg ha⁻¹), contaminado com antraceno e inoculado com o consórcio microbiano (dados são médias de quatro repetições; barras representam o erro padrão).

A inibição da degradação de HAPs pelo aumento da disponibilidade de N no solo foi também reportado por outros autores. A inibição da degradação do fenantreno em 2 solos pela adição de N foi observado por Johnson; Scow (1999). Segundo estes autores, a adição de nutrientes inorgânicos pode inibir

a atividade dos microrganismos do solo, que estão adaptados as condições oligotróficas deste ambiente. O aumento de 1000 vezes do nitrato do solo de um biorreator líquido eliminou completamente a degradação do antraceno por *Mycobacterium*, que segundo Lyes et al. (2005) deveu-se ao incremento da força iônica da solução, que atingiu o elevado valor de 0,250. Em vista disto, foi determinada a força iônica no solo Itapoã (Tabela 2). Observou-se que o aumento da dose de N resultou em incremento da força iônica do solo, porém os valores foram muito inferiores ao nível inibitório acima citado e semelhantes aos determinados por Lyes et al. (2005) em outros solos, indicando que a força iônica do solo Itapoã não foi responsável pela inibição da mineralização do antraceno.

TABELA 2. Teor de amônio e nitrato+nitrito, relação C:N e força iônica no solo contaminado com 500 mg kg⁻¹ antraceno e adicionado de diferentes doses de nitrogênio (dados são médias de duas repetições).

Doses (kg ha⁻¹)	NH₄⁺ (mg kg⁻¹)	NO₃⁻+NO₂⁻ (mg kg⁻¹)	C:N (mg)	Força Iônica (M)
0	0,0	48,2	92:1 ¹	0,0018
50	7,5	58,5	67:1	0,0021
100	17,4	66,7	52:1	0,0025
200	33,5	83,0	38:1	0,0030
400	57,0	107,5	27:1	0,0043

¹ Teor de C orgânico no solo de 4410 mg kg⁻¹.

Na Tabela 2, observa-se a tendência de inibição da nitrificação devido ao aumento da dose de N adicionada ao solo, com incrementos relativamente maiores do amônio se comparado ao N mineral. Na dose zero, todo o N mineral do solo encontrava-se na forma de NO₃⁻+NO₂⁻. Na dose de 50 kg ha⁻¹, o NH₄⁺ representava menos de 13% do N mineral do solo, enquanto que na dose de 400 kg ha⁻¹ esta proporção aumentou para 53%. Carmichael; Pfaender (1997) observaram que as adições de N reduziram de 50 a 90% a mineralização do pireno em 4 solos, sendo este comportamento observado somente quando o NH₄⁺ e não o NO₃⁻ era a fonte de N utilizada. Assim, a possibilidade de inibição da atividade de degradação do antraceno pelo NH₄⁺

do solo pode ter ocorrido, em vista da elevada quantidade de amônio nas maiores doses de N avaliadas.

As relações C:N, em mg, resultantes da adição das 5 doses de N no solo são apresentadas na Tabela 2. Verifica-se que todas foram superiores a relação normalmente recomendada na literatura para a biodegradação de resíduos no solo, que é de 10:1 em molar ou 8,6:1 em mg, havendo inclusive a redução da produção de C-CO₂ a medida que as relações C:N do solo se aproximavam daquela recomendada pela literatura. Para as condições deste experimento, uma relação C:N do solo próxima a 67:1 foi o limite a partir do qual adições de N resultaram em menores mineralizações do antraceno. Atagana et al. (2003) também observaram que quanto menor a relação C:N do solo, menor foi a degradação de vários HAPs no solo. Segundo estes autores, a maior degradação foi obtida na maior relação avaliada, que foi de 25:1, sendo que na menor relação C:N, 5:1, a degradação foi menor que aquela observada no solo natural, onde esta relação foi de 1625:1. A inibição da degradação dos HAPs no solo nas menores relações C:N foi relacionada toxicidade do N a população dos microrganismos degradadores do solo uma vez que, na relação C:N de 5:1 observou-se as menores contagens.

Desta forma, observa-se que a mineralização de uma alta porcentagem de antraceno no solo e em curto período de tempo não demandou a adição de N visando a redução da relação C:N, o que indica que a adição de fertilizantes ao solo a ser biorremediado deve ser precedido de estudos visando determinar as reais necessidades da bioestimulação.

O efeito de diferentes doses de P na mineralização do antraceno no solo é apresentado na Figura 4. Apesar de que a adição de P resultou em aumentos progressivos da produção de C-CO₂, a diferença entre a dose 0 e a 200 kg ha⁻¹ foi de somente 5%, indicando que a disponibilidade do P não foi limitante à mineralização do antraceno, uma vez que o consórcio microbiano mineralizou altas porcentagens deste HAP (em média 77%) no curto período de tempo de 34 dias. Atagana et al. (2003) não observaram aumentos da degradação de vários HAPs no solo pela adição de P. Carmichael; Pfaender (1997) também não verificaram incrementos na mineralização do pireno pela adição de P em 3 solos.

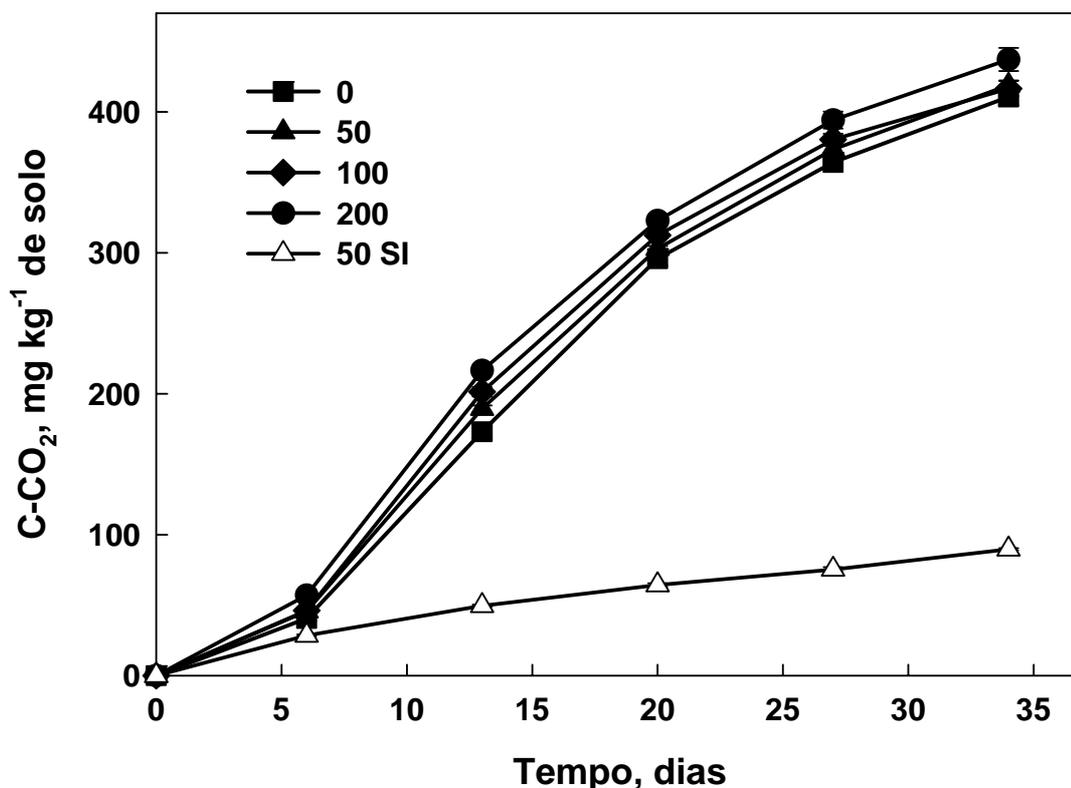


FIGURA 4. Produção de C-CO₂ de um solo com diferentes doses de fósforo (kg ha⁻¹), contaminado com antraceno e inoculado ou não (SI) com um consórcio microbiano (dados são médias de quatro repetições; barras representam o erro padrão).

As relações C:P dos 5 tratamentos são apresentadas na Tabela 3. O consórcio microbiano mineralizou o antraceno em porcentagens muito semelhantes, mesmo estando submetido a relações C:P muito diferentes, o que indica, ao contrário do N, a ausência de qualquer efeito de limitação ou toxicidade no solo pelas doses de P avaliadas. No tratamento sem adição de P, a relação C:P foi 27 vezes superior a normalmente recomendada na literatura, que é de 40:1 em mg, sem no entanto haver redução da produção do C-CO₂.

As relações C:N:P da Tabela 3 apresentam grandes amplitudes, sem no entanto influenciarem a produção de C-CO₂ (Figura 4). Resultados semelhantes foram obtidos por Lyes et al. (2005) que observaram que os microrganismos degradadores de HAPs podem crescer em condições de baixa disponibilidade de nutrientes inorgânicos e em relações C:N:P que variaram de

120:3:3 até 120:130:14. Isto demonstra que independentemente das relações C:N:P do solo, os microrganismos irão metabolizar os contaminantes, bastando para isto que haja nutrientes inorgânicos em quantidades suficientes para suprirem suas demandas e insuficientes para causarem efeitos tóxicos.

TABELA 3. Teor de fósforo, relação C:P e C:N:P no solo contaminado com 500 mg kg⁻¹ antraceno e adicionado de diferentes doses de fósforo (dados são médias de três repetições).

Doses (kg ha⁻¹)	Teor (mg dm⁻³)	C:P (mg)	C:N:P (mg)
0	4,1	1076:1 ¹	1076:16:1
50	21,8	220:1	220:3:1
100	42,1	105:1	105:1,5:1
200	88,0	50:1	50:1,3:1

¹ Teor de C orgânico no solo de 4410 mg kg⁻¹.

A falta de resposta ao incremento da disponibilidade de P neste solo que apresenta teor natural muito baixo pode ser explicado da seguinte forma: a contaminação com 500 mg kg⁻¹ de antraceno adiciona ao solo 472 mg kg⁻¹ de C ao solo, sendo que na média dos 4 tratamentos inoculados, 331 mg kg⁻¹ de C foram transformados em CO₂ e por diferença, 141 mg kg⁻¹ de C foram incorporados na biomassa. Assumindo-se que o P representa 3% da massa seca da célula microbiana, houve a incorporação na biomassa de somente 4,23 mg kg⁻¹ de P, sendo que o teor natural de P neste solo é de 4,1 mg dm⁻³. Assim, a demanda de P pelos microrganismos foi tão baixa que mesmo neste solo não houve a necessidade da adição de P.

Estes resultados indicam que a bioestimulação com P deve ser recomendada somente após criteriosa avaliação de forma a evitar a adição desnecessária de nutrientes que resultam em aumentos de custo e impactos ambientais ainda maiores no local a ser biorremediado.

A produção de C-CO₂ de um solo contaminado com antraceno onde foi adicionado de diferentes doses de Fe é apresentada na Figura 5. Observa-se que a adição do Fe nas doses avaliadas não resultou em aumentos da mineralização do antraceno pelo consórcio microbiano, indicando que não

houve limitação deste elemento uma vez que foram mineralizadas elevadas porcentagens do antraceno em curto período de tempo. No solo Itapoã, o teor natural de Fe amorfo foi quantificado em $0,2 \text{ g dm}^{-3}$, sendo que a adição de 15 kg ha^{-1} não aumentou este valor. Porém com a adição de 30 e 60 kg ha^{-1} a quantidade de ferro amorfo foi elevado para $0,3 \text{ g dm}^{-3}$, indicando que houve aumento da disponibilidade do ferro no solo.

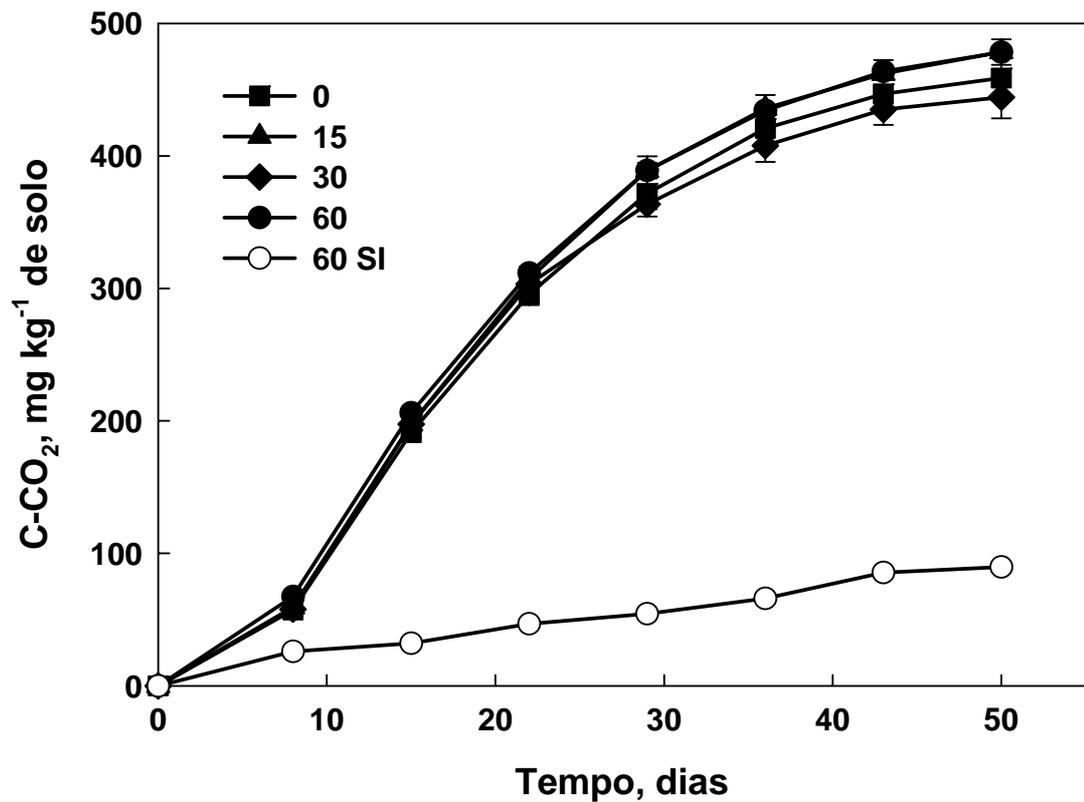


FIGURA 5. Produção de C-CO₂ de um solo com diferentes doses de ferro (kg ha^{-1}), contaminado com antraceno e inoculado ou não (SI) com um consórcio microbiano (dados são médias de quatro repetições; barras representam o erro padrão).

O ferro desempenha funções celulares que estão intimamente relacionadas ao metabolismo dos HAP, como a participação na estrutura das enzimas do sistema multicomponente das dioxigenases, como cofator enzimático nas enzimas de fissão e protegendo a célula contra radicais superóxidos resultantes do metabolismo oxidativo (Harayama, 1999). Dinkla et al. (2001) observaram que a adição de Fe ao meio de cultura aumentou o

crescimento de dois isolados de *Pseudomonas* e a degradação do tolueno. A demanda de ferro destes isolados foi aumentada em 4,5 vezes quando cresciam no tolueno se comparado ao crescimento em citrato. Assim a mineralização de altas quantidades de antraceno em curto período de tempo poderia demandar maiores quantidades de Fe solúvel que aquelas disponibilizadas por um solo com baixo teor de argila, como o Itapoã. No entanto, a ausência de resposta a adição do ferro pode ser devido a baixa demanda em termos quantitativos, uma vez que este elemento representa somente 0,2% da massa seca da célula bacteriana (Neidhardt et al., 1990). Além disso, em vista da baixa disponibilidade do ferro nos ambientes aeróbios, os microrganismos desenvolveram mecanismos de grande capacidade de estocagem deste elemento através das proteínas ferritina, bacterioferritina e Dps. Cada proteína do tipo ferritina ou bacterioferritina pode acomodar de 2000 a 3000 átomos de ferro no interior das células enquanto as proteínas do tipo Dps têm capacidade de estocagem de aproximadamente 500 átomos de ferro (Andrews et al., 2003). Assim, a possível ausência de resposta ao ferro também pode estar relacionado ao consórcio microbiano ter sido cultivado em meio mineral com alta disponibilidade de ferro, possibilitando a estocagem intracelular deste elemento, de forma a não haver deficiências deste elemento, principalmente no início do experimento.

O efeito de diferentes doses de S na mineralização do antraceno no solo é apresentado na Figura 6. Observa-se que não houve incremento da produção de C-CO₂ com o incremento da disponibilidade do S no solo. A maior mineralização observada no final do experimento pela dose 10 kg ha⁻¹ provavelmente se deve a variação entre repetições, conforme indicado pelo erro padrão. Assim, o teor natural de S do solo Itapoã, de 3,4 mg dm⁻³, considerado médio para a nutrição de plantas, foi suficiente para suprir a demanda da microbiota degradadora. As adições de 10, 20 e 40 kg ha⁻¹ incrementaram o teor de S no solo para 10,0; 13,1 e 32,8 mg dm⁻³, respectivamente.

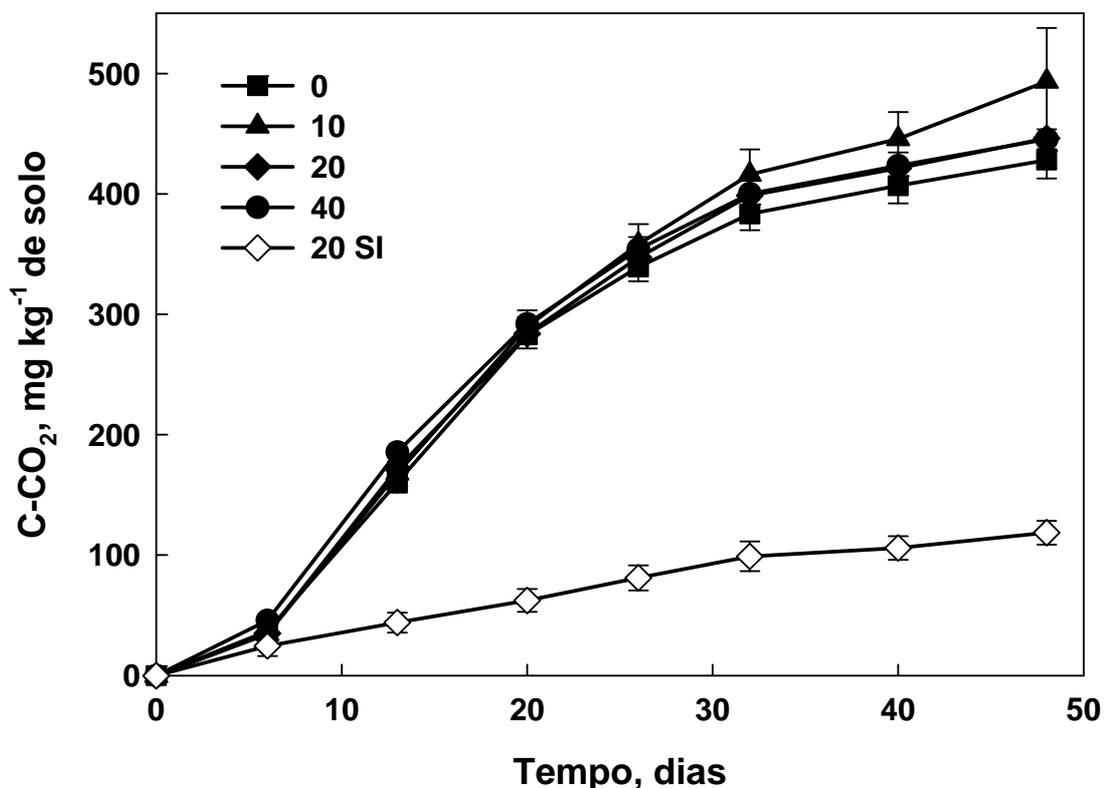


FIGURA 6. Produção de C-CO₂ de um solo com diferentes doses de enxofre (kg ha⁻¹), contaminado com antraceno e inoculado ou não (SI) com um consórcio microbiano (dados são médias de quatro repetições; barras representam o erro padrão).

Entre os nutrientes inorgânicos o enxofre é o quarto mais absorvido, com participação de 1% na composição química celular bacteriana (Neidhardt et al., 1990). Mesmo assim, não houve resposta a adição do S, o que pode estar relacionado a mineralização da matéria orgânica. Durante os procedimentos de preparo do solo, este foi incubado para correção do pH por longos períodos e, em condições de adequada umidade para a atividade microbiana, o que resultou na mineralização de aproximadamente 25% da matéria orgânica (dados não mostrados) e conseqüentemente no aumento do S inorgânico no solo.

Este aumento da disponibilidade do S, assim como do N e do P pela mineralização da matéria orgânica e também pela correção do pH do solo pode justificar a ausência de resposta a adição destes nutrientes ao solo. No entanto

há que se considerar que em condições de campo a alteração da estrutura do solo a ser biorremediado seria comparativamente menor que aquela observada em laboratório, resultando em menor mineralização da matéria orgânica e em menor aumento dos teores de nutrientes inorgânicos, que além disso, estariam sujeito a lixiviação no perfil (principalmente NO_3^- e SO_4^-), reduzindo desta forma a sua disponibilidade aos microrganismos degradadores. Nas condições de campo, o monitoramento dos teores de nutrientes disponíveis no solo é ferramenta fundamental para subsidiar decisões acerca da necessidade de se utilizar a bioestimulação com nutrientes inorgânicos. Por outro lado, o aumento da disponibilidade do N, S e P de forma isolada não foi suficiente para promover uma alta atividade de mineralização do antraceno. Conforme demonstrado na Figura 1, a maior produção de C-CO_2 pelo consórcio microbiano esteve intimamente dependente da correção do pH do solo, apresentando uma relação linear positiva entre mineralização do antraceno e pH, com R^2 de 0,86. Naquele experimento, todos os solos foram submetidos aos mesmos procedimentos, havendo portanto aumentos semelhantes na disponibilidade de nutrientes inorgânicos pela mineralização da matéria orgânica, no entanto o aumento da produção do C-CO_2 foi devido somente a elevação do pH do solo.

5.5 CONCLUSÕES

1) As maiores mineralizações do antraceno ocorrem nos solos com as maiores umidades gravimétricas e pH avaliados;

3) O aumento do nitrogênio mineral e a conseqüente redução da relação C:N do solo tendem a diminuir a mineralização do antraceno;

4) O aumento das disponibilidades do fósforo, do ferro e do enxofre no solo não influenciam a mineralização do antraceno;

5) As relações C:P e C:N:P do solo avaliadas apresentam grandes amplitudes sem no entanto, influenciarem a mineralização do antraceno no solo;

6) Na presença de microrganismos degradadores, a bioestimulação mostra efeitos positivos na biorremediação de solos contaminados com antraceno, mas deve ser recomendada somente após a avaliação específica da necessidade de adição de cada um dos nutrientes e corretivos.

5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1999. 453p.
- ANDREWS, S.C. et al. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.27, n.2-3, p.215-237, 2003.
- ATAGANA, H.I. et al. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. **Biodegradation**, Dordrecht, v.14, n.4, p.297-307, 2003.
- BARTHA, R. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. **Microbial Ecology**, New York, v.12, n.1, p.155-172, 1986.
- CARMICHAEL, L.M.; PFAENDER, F.K. The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. **Biodegradation**, Dordrecht, v.8, n.1, p.1-13, 1997.
- CHENG, H.H.; MULLA, D.J. The soil environment. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed.) **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.1-13.
- DIBBLE, J.T.; BARTHA, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, n.4, p.729-739, 1979.
- DINKLA, I.J.T. et al. Effects of iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the TOL (pWWO) plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.8, p.3406-3412, 2001.
- HAIDER, K. Microbe-soil-organic contaminant interactions. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed.) **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.33-51.

- HARAYAMA, K. et al. Bacterial aromatic ring cleavage enzymes are classified into different gene families. **Journal Biological Chemistry**, Stanford, v.264, n.26, p.15328-15333, 1999.
- JOHNSON, C.R.; SCOW, K.M. Effect of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils. **Biodegradation**, Dordrecht, v.10, n.1, p.43-50, 1999.
- KARIMI-LOTFABAD, S. et al. Reactions of polynuclear aromatic hydrocarbons on soil. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.30, n.4, p.1145-1151, 1996
- KASTNER, M. et al. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.1, p.359-362, 1998.
- LEYS, N.M. et al. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.66, n.6, p.726–736, 2005.
- LIEBEG, E.W.; CUTRIGHT, T.J. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Londres, v.44, n.1, p.55-64, 1999.
- NEIDHARDT, I.C. et al. **Physiology of the bacterial cell**. Sinauer: Massachusetts, 1990. 506 p.
- NETTO A.D.P. et al. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and their nitrated derivatives (NHPAS): a review of methodology. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.6, p.765-773, 2000.
- SADOWSKY, M.J.; TURCO, D. Enhancing indigenous microorganisms to bioremediate contaminated soils. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed.) **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.274-288.
- SANTOS, E.C. **Biodegradação do antraceno estimulada por ferro**. 2004. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

SPARKS, D.L. **Environmental soil chemistry**. San Diego: Academic Press, 1995. 267p.

STOTZKY, G. Microbial Respiration. In: Black, C. A. (ed.). **Methods in soil analysis**. Madison: SSSA, 1965. p.1550-1572.

TEDESCO, M.J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS. 1995. 174p.

WEIGAND, H. et al. Fate of anthracene in contaminated soil: transport and biochemical transformation under unsaturated flow conditions. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v.53, n.1, p.71-81, 2002.

ZHOU, E.; CRAWFORD, R.L. Effects of oxygen, nitrogen and temperature on gasoline biodegradation in soil. **Biodegradation**, Dordrecht, v.6, n.2, p.127-140, 1995.

CAPÍTULO V

COMPARAÇÃO DE DUAS METODOLOGIAS PARA O ISOLAMENTO DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS NO SOLO

6.1 RESUMO

Os HAPs (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) são compostos químicos com propriedades mutagênicas e carcinogênicas que contaminam o ar, a água e o solo, sendo a biorremediação uma estratégia que pode ser utilizada para sua eliminação do ambiente. No entanto, a inoculação do solo com microrganismos degradadores de HAPs selecionados em laboratório têm resultado em insucessos. O objetivo deste estudo foi comparar a metodologia clássica de isolamento de microrganismos degradadores de HAPs com uma nova metodologia, que visa aumentar a possibilidade de isolamento de microrganismos com habilidades de mineralizar os HAPs no solo. Na metodologia 1 (clássica) o solo do *landfarming* foi adicionado ao meio mineral contendo o HAP (antraceno). Após 64 dias e 8 transferências, os microrganismos foram isolados e selecionados através de curvas de crescimento. Na metodologia 2, as amostras de solo do *landfarming* foram inoculadas a um solo contaminado artificialmente em laboratório com antraceno e a amostra com maior produção de C-CO₂ foi utilizada para o enriquecimento. Os microrganismos foram isolados após 21 dias e 3 transferências. A identificação dos microrganismos obtidos pelas duas metodologias foi realizada pelo seqüenciamento do gene do RNAr. A capacidade de degradar o antraceno em meio mineral foi avaliada por cromatografia gasosa. Para avaliação da capacidade de mineralização do antraceno no solo realizou-se um ensaio respirométrico, onde os microrganismos foram inoculados ao solo como consórcio 1 (microrganismos isolados pela metodologia 1) e consórcio 2 (microrganismos isolados pela metodologia 2). Através da metodologia 1 isolou-se e selecionou-se 3 bactérias, que degradaram em média 51% do antraceno do meio mineral. Através da metodologia 2 isolou-se 6 bactérias e um fungo que degradaram em média 48% do antraceno do meio mineral. O consórcio 2 mineralizou 84% do antraceno do solo, enquanto que o consórcio 1 mineralizou somente 8% deste HAP, sendo este valor muito próximo do observado pela microbiota autóctone (solo sem inóculo). A metodologia 2 mostrou-se mais eficiente que a metodologia 1 no isolamento de microrganismos com capacidade de mineralizar o antraceno no solo.

6.2 INTRODUÇÃO

A introdução no ambiente dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) ocorre naturalmente, e de forma contínua, pela combustão incompleta de resíduos orgânicos, ou antropogenicamente de várias maneiras, entre as quais destacam-se os processos de extração, transporte, refino, transformação e utilização do petróleo e seus derivados (Cameotra; Bollag, 2003). Desta forma, os HAPs contaminam o ar, a água e o solo, podendo ser absorvidos pelos mamíferos através da inalação, exposição oral ou dérmica. No organismo humano, estes compostos são metabolizados, gerando compostos epóxidos que podem causar mutações e cânceres (Netto et al., 2000).

Uma estratégia para eliminação dos HAPs do ambiente é através da biorremediação, onde os microrganismos degradadores irão transformar estes compostos em substâncias inertes, CO₂ e água. Para que um microrganismo utilize os HAPs como fonte de C e energia para o seu crescimento é necessário que ele possua as várias enzimas que transformam as complexas moléculas dos HAPs em intermediários das rotas catabólicas. Por isso, a maioria dos microrganismos do solo não possui a capacidade de degradar estes compostos (Alexander, 1999), justificando a necessidade de se isolar e selecionar microrganismos degradadores de HAPs, visando sua utilização na biorremediação de solos contaminados com estes compostos.

Desde a década de 50, vários pesquisadores buscaram selecionar microrganismos em culturas puras com capacidade de degradar HAPs, sendo isoladas e identificadas inúmeras bactérias e fungos, conforme demonstrado nas revisões de Cerniglia (1997), Kanaly et al. (2000) e Johnsen et al. (2005). Somente nos últimos anos tem sido dada atenção ao isolamento de consórcios microbianos degradadores de HAPs, que comparativamente às culturas puras, tem se mostrado mais efetivos na degradação destes compostos, devido a

capacidade de utilizar um maior número de HAPs, pela maior taxa de degradação e principalmente pela maior porcentagem mineralização destes compostos (Boonchan et al., 2000; Ghazalli et al., 2004). No entanto, trabalhos têm demonstrado que a inoculação ao solo dos microrganismos selecionados pode resultar em baixas taxas de degradação, tornando a biorremediação um processo lento e podendo não reduzir a concentração dos contaminantes aos níveis exigidos pela legislação ambiental (Huesemann et al., 2002). Este comportamento pode estar relacionado a incapacidade dos microrganismos selecionados em colonizar o solo e degradar os HAPs neste ambiente. Segundo Johnsen et al. (2005) estes insucessos são consequência da utilização da habilidade bioquímica no meio mineral como único critério de seleção dos microrganismos degradadores de HAPs.

A eficiência da biorremediação é função da extensão em que a população microbiana degradadora pode manter-se no ecossistema natural (Alexander 1999). Se a baixa solubilidade em água dos HAPs já dificulta a absorção destes compostos em meio líquido, no solo esta limitação é magnificada, em vista das menores concentrações dos HAPs, da heterogeneidade de distribuição destes compostos nos poros do solo e da sorção nas superfícies dos argilominerais e na matéria orgânica. Além disso, ao ser inoculado ao solo, os microrganismos selecionados tem que superar relações antagônicas, como a predação, impostas pelas populações autóctones, que estão amplamente adaptadas a este ambiente e normalmente apresentam maior capacidade de competição e tolerância aos estresses ambientais, causados pelas alterações de temperatura, de pH, de disponibilidade de água e de oxigênio e outros (van Veen et al., 1997).

Por outro lado, a capacidade da população inoculada em degradar os HAPs representa uma vantagem competitiva em relação a população nativa do solo, que normalmente não possui as enzimas necessárias para a utilização destes compostos. Por isso, trabalhos têm demonstrado que a bioaugmentação pode ser eficiente para aumentar a remoção dos HAPs do solo. Kästner et al. (1998) inoculou bactérias degradadoras num solo contaminado com HAPs observando incrementos de seis e de dez vezes na degradação do pireno e do antraceno, respectivamente. Fungos degradadores de HAPs como *Pleorotus ostreatus* também têm sido inoculados ao solo, resultando, respectivamente,

em degradações de 87 e 93 % do antraceno e do pireno presente no solo após 8 semanas de incubação (Potin et al., 2004).

Assim, a seleção de microrganismos a serem utilizados na biorremediação de solos deve considerar além da habilidade bioquímica, a capacidade de colonização e degradação do contaminante no solo. O objetivo deste estudo foi comparar a metodologia clássica de isolamento de microrganismos degradadores de HAPs com uma nova metodologia, que visa aumentar a possibilidade de isolamento de microrganismos com habilidades de mineralizar os HAPs no solo.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1. Coleta do solo

Para o isolamento dos microrganismos degradadores de HAPs utilizou-se como inóculo as amostras de solo coletadas no *landfarming* do SICECORS (Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos do Pólo Petroquímico do Sul), onde desde 1989 é tratado o lodo oleoso produzido pelas indústrias do Pólo e mais recentemente os resíduos petroquímicos gerados pela Refinaria Alberto Pasqualini. Este *landfarming* é dividido em 12 células, que são áreas de 30 m x 100 m onde os resíduos são adicionados. Selecionaram-se 3 células que haviam recebido resíduos mais recentemente e coletou-se as amostras de solo na profundidade de 0 a 30 cm, em 2 locais escolhidos aleatoriamente no interior de cada célula, resultando em seis amostras, que foram trazidas para o laboratório em caixas de isopor e armazenadas a 4°C.

6.3.2 Isolamento dos microrganismos degradadores de antraceno

Na metodologia 1, foi utilizada um grama de cada uma das 6 amostras de solo, que foram individualmente adicionadas a frascos de erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio mineral e 250 mg L⁻¹ de antraceno como única fonte de carbono e energia. Todos os ensaios utilizaram o meio mineral Tanner com a seguinte composição, em g L⁻¹: CaCl₂ 2H₂O, 0,04; KH₂PO₄, 0,1; NaCl, 0,8; NH₄Cl, 1,0; MgSO₄ 7H₂O, 0,2; KCl, 0,1. Os micronutrientes foram adicionados na concentração, em mg L⁻¹: CoCl₂ 6H₂O, 0,1; MnCl₂ 4H₂O, 0,425; ZnCl₂, 0,05; CuSO₄ 5H₂O, 0,015; NiCl₂ 6H₂O, 0,01; Na₂MoO₄ 2H₂O, 0,01; Na₂SeO₄, 0,01. O pH foi ajustado para 7,0 e o meio foi autoclavado por 20 minutos a 121°C. Os frascos foram incubados a 150 rpm e 30°C. A cada 8 dias,

uma alíquota de 1 mL da cultura crescida era transferida para outro frasco contendo o mesmo meio estéril e incubado nas mesmas condições. Após 8 transferências, 1 mL de cada erlenmeyer foi diluído em solução salina e plaqueado em meio agar nutritivo (extrato de carne 3 g, peptona 5 g, ágar 15 g, água destilada 1 L, pH 7,0), sendo as placas incubadas por 24 horas a 30°C. As colônias crescidas nas placas que apresentavam diferenças morfológicas foram estriadas no mesmo meio até purificação dos isolados. Para selecionar os mais eficientes foram confeccionadas curvas de crescimento com cada isolado individualmente e analisada a cinética de crescimento, pela estimação da taxa de crescimento, do tempo de geração e do número de gerações. Para isto, cada isolado foi inoculado individualmente em frascos contendo 50 mL de meio mineral mais 250 mg L⁻¹ e incubado em 150 rpm e 30°C por 96 horas. A cada 12 horas, uma alíquota de 1 mL das culturas crescidas era diluída em solução salina, plaqueada em meio agar nutritivo e incubada a 30°C por 24 horas, quando então era realizada a contagem das UFC mL⁻¹.

Na metodologia 2, realizou-se inicialmente um ensaio respirométrico visando selecionar uma entre as 6 amostras de solo do *landfarming* que apresentasse a maior atividade de mineralização do antraceno, para posteriormente ser utilizada no isolamento dos microrganismos degradadores deste HAP. Um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico arênico da Unidade de Mapeamento Itapoã foi coletado em uma área agrícola sem histórico de recebimento de nenhum tipo de resíduo. Este solo foi trazido para o laboratório, seco e peneirado em malha de 2 mm. Para elevar o pH a 6,5 adicionou-se CaCO₃ e MgCO₃ na proporção 3:1, na forma de reagente comercial, incubando-se o solo úmido por 60 dias. Posteriormente, este solo foi contaminado com 250 mg kg⁻¹ de antraceno. Para isto, preparou-se uma solução concentrada de antraceno dissolvido em acetona, sendo que 3 mL foram adicionados a 50 g de solo no interior de frascos respirométricos de 1,5 L. Estes frascos foram colocados em estufa por 3 horas a 50°C para evaporação da acetona. Após adicionou-se mais 49 g de solo, procedendo-se uma intensa mistura. Devido a baixa fertilidade natural, adicionou-se o equivalente a 100 kg ha⁻¹ de N e 50 kg ha⁻¹ de P, na forma de solução de NH₄NO₃ e KH₂PO₄.

Após o solo estar corrigido, contaminado com antraceno e fertilizado, em cada frasco respirométrico adicionou-se 1 g de uma das amostras de solo do *landfarming*, visando inocular uma população de microrganismos degradadores de HAPs. Os frascos foram equipados com aparato de captura de CO₂, composto por um copo plástico de 50 mL com 20 mL de NaOH 0,25 M, fechados hermeticamente e incubados em duplicata a temperatura ambiente no laboratório. Durante um período de 176 dias, semanalmente os frascos eram abertos, a solução de NaOH recebia um mL de BaCl₂ 1 M e era titulada com HCl 0,5 M, utilizando fenolftaleína como indicador. A solução do HCl 0,5 M foi padronizada com tris, conforme Tedesco et al. (1995). Uma amostra com umidade igual ao solo dos frascos respirométricos foi utilizada para determinação da umidade gravimétrica, sendo a produção de C-CO₂ expressa em kg de solo seco.

A produção de C-CO₂ foi quantificada através da fórmula de Stotzky (1965):

$$\text{C-CO}_2 \text{ (mg kg}^{-1} \text{ de solo)} = (\text{B-T}) \times \text{eq} \times \text{M} \times 10$$

onde, B é o volume (em mL) da solução de HCl gasto para titular a prova em branco (frasco respirométrico sem solo); T é o volume (em mL) da solução de HCl gasto para titular os tratamentos; eq é o equivalente-grama do C, que é 6; M é a molaridade da solução padronizada de HCl e 10 é o fator de conversão para kilograma de solo.

Do frasco com maior produção de C-CO₂ foi retirado um grama de solo e adicionado a um erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio mineral Tanner e 250 mg L⁻¹ de antraceno como única fonte de C e energia, que foram incubados a 150 rpm e 30°C. A cada 7 dias, uma alíquota de 1 mL da cultura crescida foi transferida para outro frasco contendo o mesmo meio estéril e incubado nas mesmas condições. Após 3 transferências, a cultura crescida foi diluída em solução salina (NaCl 0,85 %) e plaqueada em meio ágar nutritivo contendo 250 mg L⁻¹ de antraceno, sendo as placas incubadas por 72 horas a 30°C. As colônias bacterianas crescidas nas placas foram estriadas no mesmo meio até purificação dos isolados e armazenadas sob refrigeração a 4 °C. A colônia de fungo foi repicada até purificação em meio ágar malte (extrato de malte 30 g, peptona 5 g, ágar 15 g, água destilada 1 L, pH 5,4) contendo 250 mg L⁻¹ de antraceno e armazenada no mesmo meio, sob refrigeração a 4 °C.

6.3.3 Identificação dos microrganismos degradadores de antraceno

Para a caracterização inicial das bactérias avaliou-se a morfologia celular através da coloração de Gram. Para identificação realizou-se o seqüenciamento do gene do rRNA 16S, conforme descrito por Camargo et al (2003). As bactérias foram crescidas em meio caldo nutriente, sendo as células coletadas por centrifugação a 10000 rpm por 5 minutos. O DNA foi extraído de acordo com o método de Asubel et al. (1997). As células foram suspensas em numa solução tampão TE, SDS (10 %) e proteinase K, e incubadas por uma hora a 37°C. Uma mistura de NaCl (5 M) e CTAB/NaCl (4,1 g de NaCl e 10 g de brometo de N-cetil-N.N.N.-trimetilamônio) em 100 mL de água destilada pré-aquecida) foi adicionada, incubando-se por 10 minutos a 65°C. A solução foi extraída com 780 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24/1), centrifugada por 5 minutos, sendo a fase aquosa novamente extraída com igual volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1). Após centrifugação de 5 minutos, o DNA presente na fase aquosa foi precipitado com 0,6 volume de isopropanol e o precipitado foi lavado com etanol 70 %. O pellet de DNA foi seco usando um concentrador e ressuspenso em água livre de nuclease. *Primers* universais bacterianos correspondendo as posições 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 519R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3') da *E.coli* foram usadas para amplificação do gene do rRNA 16S por PCR. A mistura de PCR (Cat. Nº M7502, Promega, Madison, Wisconsin) foi usada de acordo com instruções do fabricante. O DNA foi amplificado usando PCR com 35 ciclos (desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, demais desnaturações de 95°C por um minuto, anelamento a 55°C por um minuto, extensão a 72°C por um minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos). Os amplicons foram analisados em gel de agarose 2 % e purificados usando o kit de extração de gel QIAEX II (QIAGEN, Valência, Califórnia), de acordo com instruções do fabricante. Brevemente, um pedaço do gel foi suspenso em tampão QXI, foi adicionado a suspensão QIAEX II, seguido de mistura em vortex. A suspensão foi incubada a 50°C por 10 minutos, centrifugada por 30 segundos e o pellet foi lavado duas vezes com tampão QXI e uma vez com tampão PE. Após secagem ao ar por 15 minutos, o DNA foi eluído com água livre de nuclease.

O seqüenciamento do DNA foi realizado usando um kit terminador BigDye (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia) e um analisador genético Applied Biosystems ABI 3100. A homologia das seqüências foi obtida através do MEGABLAST (Altschul et al., 1997). O DNA do fungo foi extraído conforme Schabereiter-Gurtner et al (2001). A região do gene do RNAr ITS1-5,8S-ITS2 foi amplificada, utilizando os *primers* ITS1 e ITS4. Os amplicons foram purificados e submetidos diretamente ao seqüenciador automático MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey). A homologia das seqüências bacterianas e fúngicas foi obtida através do MEGABLAST (Altschul et al., 1997).

6.3.4 Biodegradação e mineralização do antraceno

A capacidade dos microrganismos selecionados em degradar o antraceno foi avaliada através de cromatografia gasosa. Para isto, os isolados obtidos pela metodologia 1 foram inoculados isoladamente, enquanto que os microrganismos obtidos na Metodologia 2 foram inoculados conjuntamente na forma de consórcio, em 50 mL de meio mineral com pH 7,0, mais 250 mg L⁻¹ de antraceno e incubados com três repetições a 30°C. Ao final do período, cada frasco contendo a cultura crescida foi acidificado a pH 2,0, seguindo-se de três extrações com 20 mL de diclorometano (EM Science[®], pureza>99,8%), em funil de separação. Para retirar o excesso de água após as extrações, utilizou-se sulfato de sódio anidro (Shuttleworth; Cerniglia, 1996). O volume do material extraído foi quantificado e uma alíquota de 0,5 mL foi colocado em vials. A este volume foi adicionado fenantreno deuterado na concentração equivalente a 250 mg L⁻¹. Utilizou-se um cromatógrafo gasoso (Agilent[®], Modelo 6890, USA) equipado com coluna 5% fenil metil polisiloxano e detector de massas, no qual foi injetado 0,2 µL das amostras, com uma razão de split de 1:50, com injetor automático. A temperatura do forno foi de para 40°C por um minuto, seguido de 6°C min⁻¹ até 220°C, mantendo isotérmica por um minuto e aquecimento de 15°C min⁻¹ até 300°C.

A capacidade dos microrganismos selecionados em mineralizar o antraceno no solo foi avaliado através de respirometria. Após o solo estar com pH corrigido, contaminado com 500 mg kg⁻¹ de antraceno e fertilizado,

conforme descrito no item 6.3.2, foi adicionado 2 mL de uma suspensão de células dos microrganismos selecionados, de forma a introduzir uma população de $2,0 \times 10^8$ UFC g^{-1} de solo (Kastner et al., 1998). Para obtenção desta suspensão de células, 100 μ L das culturas puras de cada um dos microrganismos obtidos pela metodologia 1, que haviam crescido em meio mineral mais 250 mg L^{-1} de antraceno, foi inoculada em ágar nutriente contendo 250 mg L^{-1} deste HAP e incubada a 30°C por 72 horas. Após o crescimento das colônias, foi adicionado sobre o meio 5 mL de água estéril e com o auxílio de uma alça de Drigalsky, as colônias foram coletadas para frascos de centrífuga, de modo que os 3 isolados apresentassem igual número de UFC na suspensão de células, originando desta forma o Consórcio 1. Para obtenção da suspensão de células dos microrganismos obtidos pela metodologia 2 foi utilizado uma cultura que já havia crescido na forma de consórcio em meio mineral mais 250 mg L^{-1} de antraceno. 100 μ L desta cultura foi inoculada em placas de ágar nutriente contendo 250 mg L^{-1} deste HAP, que foram incubadas a 30°C por 72 horas. Assim, os microrganismos cresceram conjuntamente sobre o meio sólido e foram coletados para tubos de centrífuga conforme descrito acima, originando desta forma o consórcio 2. As suspensões foram centrifugadas a 10000 rpm, por 8 minutos a 15°C e os sobrenadantes foram descartados. Ressuspendia-se os pellets numa quantidade previamente calculada de água estéril, sendo então a suspensão adicionada ao solo no interior dos frascos respirométricos (1,5 L), que foram equipados com aparato de captura de CO_2 e incubados, com 2 repetições, a temperatura ambiente no Laboratório. A cada 7 dias, o C- CO_2 foi quantificado conforme descrito anteriormente.

6.3.5 Análise estatística

O erro padrão foi calculado pela fórmula $\sqrt{\frac{\sum_{s=1}^m \sum_{i=1}^n y_{is}^2}{(n_y - 1)(n_y)}}$ onde, s = número

da série; i = número do ponto na série s ; m = número de séries para o ponto y no gráfico; n = número de pontos em cada série; y_{is} = valor de dados da série s e ponto i ; e n_y = número total de valores de dados em todas as séries.

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1 Isolamento de microrganismos degradadores de antraceno

Na metodologia 1, o enriquecimento foi realizado mediante a inoculação em separado das 6 amostras de solo do *landfarming* em diferentes frascos. Após 8 transferências, as 6 culturas crescidas foram diluídas e plaqueadas, sendo purificadas as colônias que apresentaram diferenças morfológicas, obtendo-se 26 bactérias originadas de diferentes amostras de solo, que cresceram em meio mineral utilizando o antraceno como única fonte de C e energia. Vinte e três bactérias apresentaram forma de bastonete, sendo 18 Gram negativos e 5 Gram positivos. Os outros 3 isolados apresentaram a forma de cocos, sendo 2 Gram negativos e um Gram positivo. Uma nova seleção foi realizada entre os isolados obtidos. Para isto, inoculou-se separadamente os isolados em meio mineral mais antraceno, de forma a obter curvas de crescimento individuais, que permitiram cálculo de parâmetros cinéticos. Partindo-se de inóculos aproximadamente de 2,0 Log UFC mL⁻¹, somente três isolados entre os 26, atingiram número de células acima de 12 Log UFC mL⁻¹ no final do experimento e por conseqüência, apresentarem maior taxa específica de crescimento, maior número de gerações e menor tempo de geração, sendo selecionados para os ensaios posteriores e quando agrupados constituíram o consórcio 1. Os resultados do isolamento dos microrganismos utilizando-se a metodologia 1 estão também apresentados em Jacques et al. (2005).

Em vista dos relatos da literatura acerca dos insucessos da bioaumentação com microrganismos degradadores de HAPs obtidos pela metodologia clássica de enriquecimento (metodologia 1), propôs-se modificações que visaram aumentar a possibilidade de obtenção de

microrganismos com capacidade de degradação de HAPs no solo. Assim, na metodologia 2, introduziu-se uma etapa anterior ao enriquecimento onde, através de um ensaio respirométrico, buscou-se avaliar a atividade metabólica das populações microbianas das diferentes amostras do solo utilizado como inóculo e ao mesmo tempo, objetivou-se promover um “enriquecimento no solo”, onde em condições adequadas de disponibilidade de água, de nutrientes inorgânicos, de pH, de temperatura, etc, as populações degradadoras pudessem expressar seu potencial genético, crescendo e colonizando o solo, de forma que fosse utilizado no enriquecimento em meio mineral uma amostra de solo que apresentasse comprovadamente alta atividade de mineralização dos HAPs no solo.

Com este objetivo, realizou-se o ensaio respirométrico, cujos resultados são apresentados na Figura 1. Independentemente do local de coleta da amostra, a inoculação de uma população de microrganismos degradadores via solo de *landfarming* resultou em aumento da produção de C-CO₂ se comparado ao controle. Isto indica que durante os 16 anos em que os resíduos petroquímicos foram tratados neste local houve um enriquecimento dos microrganismos do solo no sentido de selecionar populações degradadoras de hidrocarbonetos. A amostra 5 apresentou produção de C-CO₂ muito maior que as demais, indicando possuir uma população microbiana mais adaptada a degradação de HAPs no solo. Por isso, o solo do frasco respirométricos inoculado com a amostra 5 foi utilizado para o enriquecimento em meio mineral mais antraceno, visando a obtenção dos microrganismos degradadores de HAPs.

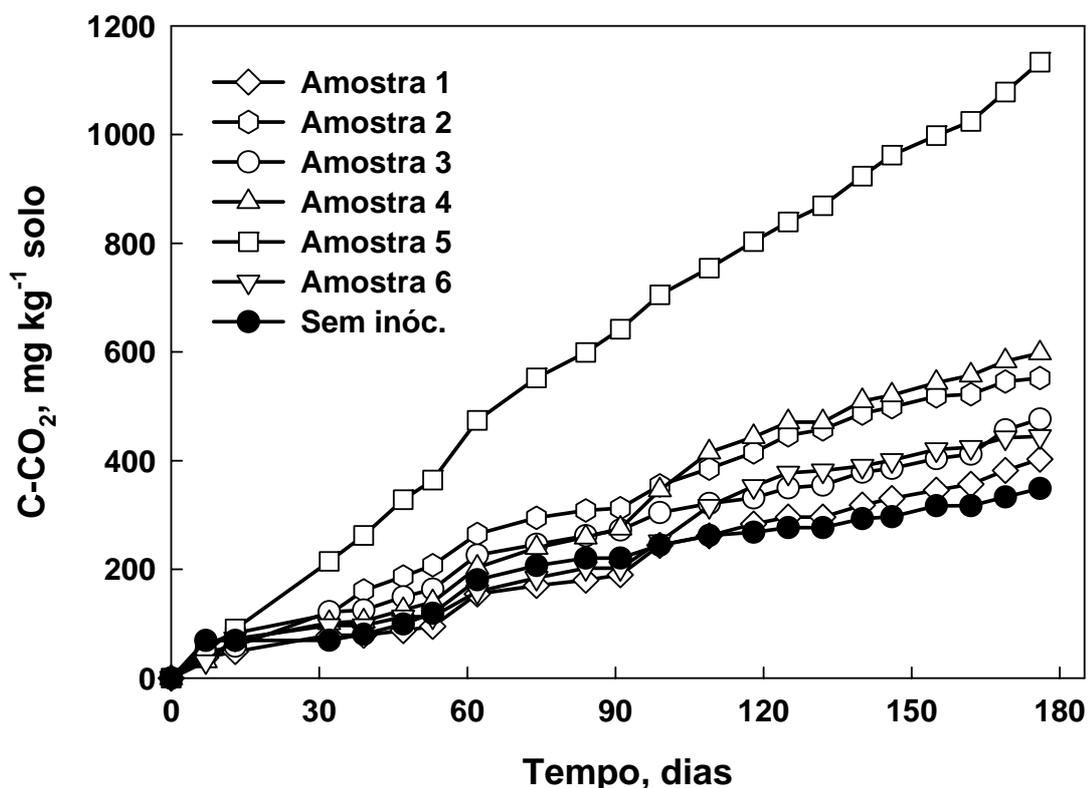


Figura 1. Produção de C-CO₂ de um solo contaminado com antraceno e inoculado com diferentes amostras de solo provenientes de uma área de descarte de resíduos petroquímicos.

O enriquecimento em meio mineral teve duração de 3 semanas, período relativamente curto se comparado aos trabalhos normalmente relatados na literatura, que duram de 6 a 12 semanas (Richard; Vogel, 1999; Grosser et al., 2000). Esta redução de tempo teve por objetivo evitar que os microrganismos que estavam crescendo no meio mineral mais antraceno alterassem suas características genéticas, fisiológicas e morfológicas, que podem determinar a perda da capacidade de colonização e degradação do antraceno no solo. Segundo Conseron; Lappin-Scott (1995) citados por Jonhsen et al. (2005) as condições de cultivo em laboratório exercem forte pressão de seleção no genoma dos microrganismos que eventualmente pode produzir falhas nas estruturas superficiais de adesão e proteção celular que impedem a sobrevivência no ambiente natural.

Após 3 transferências, os procedimentos de isolamento e purificação foram realizados utilizando-se o meio ágar nutritivo ou ágar malte com 250 mg

L⁻¹ de antraceno. O uso do HAP junto ao meio sólido (Kiyohara et al., 1982) fez com que o cultivo dos microrganismos ocorresse sempre na presença do HAP, exercendo uma pressão de seleção, que reduz a possibilidade de perda dos plasmídeos que codificam as enzimas de degradação. Do enriquecimento, obteve-se 7 microrganismos, sendo 6 bactérias e um fungo. As bactérias foram analisadas em microscópio ótico, sendo 4 Gram positivas e 2 Gram negativas, 5 apresentaram a forma de bastonetes e um de cocos. O fungo formou colônia filamentosa de coloração branca em meio ágar malte. Estes isolados foram agrupados, originando o consórcio 2.

6.4.2 Identificação dos microrganismos degradadores de antraceno

Os três isolados do consórcio 1 foram identificados como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (Tabela 1). Este gênero é o mais bem estudado entre os degradadores de HAP, além de inúmeros relatos envolvendo a degradação de outros poluentes orgânicos (Zhang et al., 2004). Da mesma forma, vários pesquisadores têm isolado bactérias da espécie *P. aeruginosa* que degradam HAP (Yuste et al., 2000; Hwang; Cutright, 2002; Garcia-Junco et al., 2003; Straube et al., 2003).

Apesar do menor número de relatos, a espécie *P. citronellolis* também apresenta capacidade de degradar compostos orgânicos recalcitrantes, como o poli(cis-1,4 isopreno), que é um polímero natural presente no látex produzido pela *Hevea brasiliensis* (Bode et al., 2000). Bhattacharia et al. (2003) isolaram 150 bactérias degradadoras de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos de diversos solos contaminados da Índia, sendo *P. citronellolis* a espécie dominante com 29 isolados.

TABELA 1. Identificação dos microrganismos degradadores de antraceno pelo seqüenciamento do gene do RNAr.

Consórcio	Comparação da seqüência do RNAr 16S ou da região ITS		
	Isolado ou espécie mais próxima	Número de acesso	Similaridade (%)
1	<i>Pseudomonas citronellolis</i>	AY499121	96
	<i>Pseudomonas aerigonosa</i>	AY162139	100
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AY631241	84
2	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	AY513242	97
	<i>Bacillus cereus</i>	AJ586344	96
	<i>Microbacterium sp.</i>	AB114267	96
	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	AY278367	98
	<i>Microbacteriaceae bacterium</i>	AY673335	99
	<i>Naphthalene-utilizing bacterium</i>	AF531474	98
	<i>Fusarium oxysporum</i>	X78260	100

Os isolados do consórcio 2 foram identificados como pertencentes a diversos gêneros, nenhum no entanto, pertencente ao gênero *Pseudomonas* (Tabela 1). A análise da seqüência do gene do RNAr 16S indicou que o primeiro isolado pertence ao gênero *Mycobacterium* (Tabela 3). Este gênero tem sido extensivamente utilizado nos estudos de biodegradação de HAPs (Wick et al., 2002; Miyata et al., 2004; Leys et al., 2005; Mutnuri et al., 2005). A espécie identificada como geneticamente mais próxima deste isolado foi a *M. fortuitum*, que tem sido estudada como degradadora de hidrocarbonetos alifáticos dos polímeros da borracha (Berekaa; Steinbüchel, 2000; Linos et al., 2000).

A espécie identificada como geneticamente mais próxima do segundo isolado foi *Bacillus cereus*, que também tem sido citada nos estudos de degradação de hidrocarbonetos alifáticos (Cybulski et al., 2003) e de aromáticos policíclicos (Kazunga; Aitken, 2000). Segundo Chaillan et al. (2004) tem sido creditado ao gênero *Bacillus* a capacidade de degradar hidrocarbonetos, no entanto em condições de cuidadoso controle do desaparecimento de substrato do meio de cultura, tem se verificado que tratam-se de degradadores secundários, que utilizam os metabólitos

produzidos pelos degradadores primários de hidrocarbonetos. Esta pode ser considerada uma evidência da complementaridade metabólica entre os microrganismos isolados.

O terceiro isolado foi identificado como pertencente ao gênero *Microbacterium*. Gauthier et al. (2003), Cavalca et al. (2004) e Zhang et al. (2004) isolaram bactérias degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos pertencentes a este gênero. *Gordonia polyisoprenivorans* foi identificada como a espécie mais próxima do quarto isolado. Segundo Linos et al. (1999) este actinomiceto foi inicialmente isolado de polímeros de borracha de pneus. Vários estudos têm relatado a utilização desta espécie na degradação hidrocarbonetos alifáticos (Linos et al., 2000), petróleo (Chaillan et al., 2004) e HAPs (Mutnuri et al., 2005). O sexto isolado foi identificado apenas ao nível de família, apresentando similaridade de 99% com o isolado Ellin 7169, obtido de um solo agrícola por Davis et al. (2005) e que pertence a família *Microbacteriaceae*. O último isolado bacteriano apresentou similaridade de 98% com uma bactéria que foi isolada de um local utilizado na estocagem de carvão mineral e que cresceu em meio mineral utilizando o naftaleno como única fonte de carbono e energia (Dore et al., 2003). Segundo estes autores, a análise do gene do RNAr 16S indicou que a bactéria apresenta similaridade de 98,5% com a espécie *Clavibacter xyli*.

O fungo foi identificado como pertencente a espécie *Fusarium oxysporum*, que tem sido isolada dos solos contaminados por hidrocarbonetos, sendo suas habilidades de degradação de HAPs demonstradas com o pireno (Cerniglia, 1997) e benzo(a)pireno (Verdin et al., 2004, 2005).

6.4.3 Biodegradação do antraceno em meio mineral

Apesar da elevada porcentagem de degradação de um dos isolados de *Pseudomonas*, a degradação média destes 3 isolados foi de 50,9%, muito semelhante a aquela observada pelo consórcio 2 (Tabela 2). No entanto, em vista do maior tempo de incubação dos isolados de *Pseudomonas*, a taxa de degradação foi, em média, 28% menor que a do consórcio 2, confirmando as observações de que normalmente os consórcios microbianos apresentam maior taxa de degradação que as culturas puras. Boonchan et al. (2000)

observou que a degradação de 50 mg kg⁻¹ de benzo(a)pireno no período de 55 dias foi de 10% pela bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* e de 16% pelo fungo *Penicillium janthinellum*. A inoculação destes dois microrganismos na forma de consórcio aumentou a degradação deste HAP para 27%, que segundo os autores deveu-se a presença da complementaridade metabólica entre os membros do consórcio. Zhang et al. (2004), sem mencionar as porcentagens de degradação, relataram que a taxa de degradação de 100 mg L⁻¹ de antraceno em meio mineral por um isolado de *Paracoccus* foi de 0,5 mg L⁻¹ dia⁻¹, valor bem menor que os apresentados na Tabela 2.

TABELA 2. Degradação do antraceno pelos isolados de *Pseudomonas* (Consórcio 1) por 48 dias e pelo Consórcio 2 por 30 dias, em meio mineral Tanner com 250 mg L⁻¹ de antraceno, a 150 rpm e 30°C (dados são médias de três repetições; ± erro padrão).

Isolados / Consórcio	Degradação (%)	Taxa de degradação (mg L⁻¹ dia⁻¹)
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	56,5 ± 1,3	3,20 ± 0,13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71,1 ± 2,6	3,90 ± 0,09
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24,4 ± 1,4	1,72 ± 0,06
Consórcio 2	47,9 ± 4,7	3,77 ± 0,35

De qualquer modo, os resultados apresentados na Tabela 2 confirmam que a metodologia 1 foi eficiente para o isolamento de microrganismos degradadores de HAPs em meio mineral e por isso é amplamente utilizada nas pesquisas com estes compostos. A metodologia 2, apesar do menor tempo de enriquecimento em meio mineral, também possibilitou a obtenção de microrganismos com capacidade de degradação de HAPs, sendo esta semelhante a degradação observada pelos microrganismos obtidos pela metodologia 1.

6.4.4 Mineralização do antraceno no solo

A capacidade dos microrganismos selecionados em mineralizar o antraceno no solo foi avaliada através de um experimento respirométrico

(Figura 2). Os isolados de *Pseudomonas* obtidos pela metodologia 1 foram inoculados no solo conjuntamente, e em igual número de UFC, formando o consórcio 1. O consórcio 2 foi formado pelos microrganismos obtidos pela metodologia 2. Observa-se que a microbiota autóctone do solo apresentou reduzida produção de C-CO₂, mesmo o solo estando contaminado com uma concentração alta de antraceno, o que pressupõe que a biodisponibilidade do substrato não foi uma limitação a degradação do contaminante. No solo inoculado com o consórcio 2 houve mineralização de aproximadamente 84% do antraceno, enquanto que no solo inoculado com o consórcio 1 esta mineralização foi de somente 8%, sendo muito próxima daquela verificada pela microbiota autóctone do solo. Isto demonstra que os isolados obtidos pela metodologia 1, apesar de degradarem o antraceno no meio mineral em porcentagens semelhantes ao consórcio 2, foram praticamente incapazes de mineralizar este HAP no solo. Por outro lado, os microrganismos obtidos pela metodologia 2 foram capazes de degradar o antraceno no meio mineral e mineralizar este HAP no solo, demonstrando que esta metodologia pode ter amenizado as alterações genéticas, fisiológicas e morfológicas dos microrganismos do inóculo, que reduziram a capacidade do consórcio 1 em degradar os contaminantes no solo.

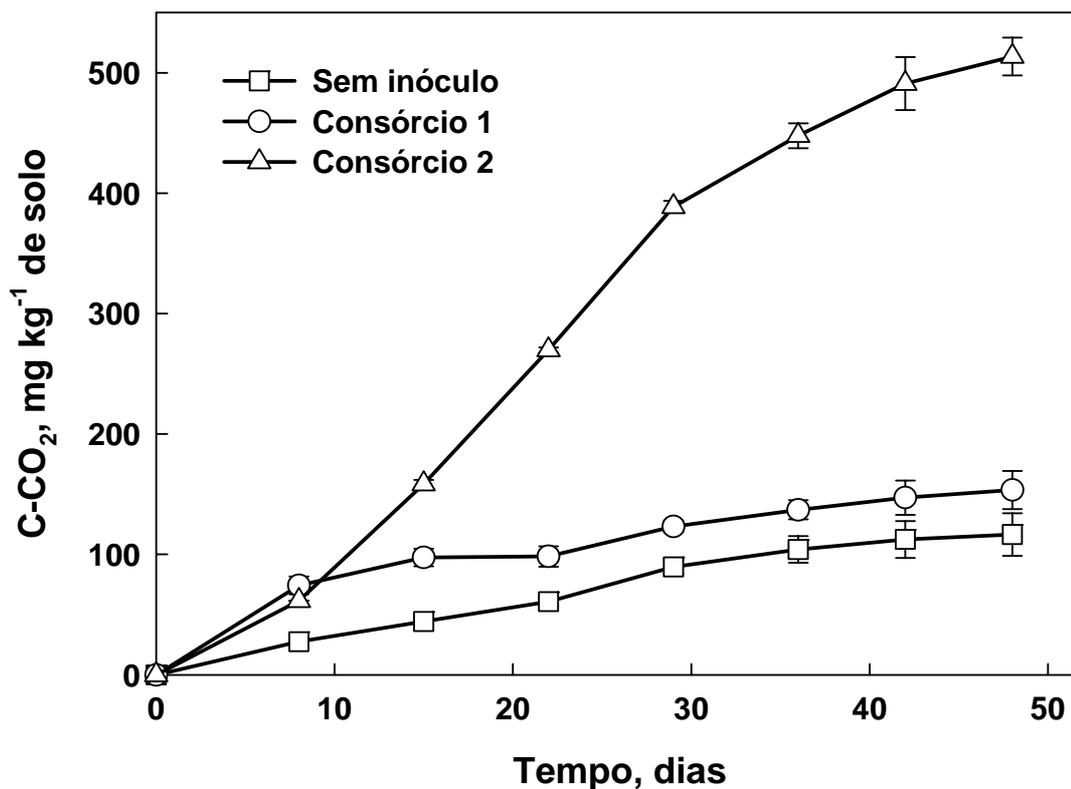


FIGURA 2. Produção de C-CO₂ de um solo contaminado com 500 mg kg⁻¹ de antraceno e inoculado com consórcios microbianos (dados são médias de duas repetições; barras representam o erro padrão).

A diferença na habilidade de mineralização do antraceno pelos microrganismos das metodologias 1 e 2 pode ser devido a vários fatores. Na metodologia 1, não tem-se informações acerca da atividade dos microrganismos degradadores nos locais de coleta do solo. Já na metodologia 2, o ensaio respirométrico nos fornece um indicativo da atividade da população degradadora e ao mesmo tempo, possibilita o período de “enriquecimento no solo”, onde as populações degradadoras têm condições químicas e físicas mais adequadas para o seu crescimento e degradação dos HAPs.

Se fosse necessário, o período de tempo destinado ao experimento respirométrico poderia ter sido menor, uma vez que a maior atividade de mineralização da amostra 5 pode ser verificada aos 30 dias após o início do experimento (Figura 1). Além disso, a redução do número de transferências durante o enriquecimento em meio mineral pode compensar, pelo menos em parte, o período de tempo destinado ao ensaio respirométrico.

A opção pela redução do período de enriquecimento não comprometeu o enriquecimento das populações degradadoras, pois possibilitou o isolamento de microrganismos comprovadamente degradadores de antraceno e pode ter reduzido as alterações genéticas, fisiológicas e morfológicas impostas pelo cultivo *in vitro*, mantendo os microrganismos adaptados a degradação no solo.

Em vista da complexidade estrutural dos HAPs, creditar as culturas puras a tarefa de, isoladamente, mineralizar estes compostos no solo pode resultar em insucessos. Assim também, a formação de consórcios pela simples mistura de microrganismos isolados de diferentes locais pode não resultar no somatório de capacidades degradativas, em vista da possibilidade ocorrência de relações antagonísticas entre os microrganismos e da sobreposição de nichos na degradação dos HAPs. É provável que o isolamento de consórcios microbianos obtidos em um mesmo local pode mais facilmente resultar em complementaridade metabólica, o que aumenta a possibilidade de eliminação completa dos HAPs do ambiente e a ocorrência de um efetivo processo de biorremediação.

Por fim há que perceber que tem-se utilizado unicamente a biodegradação em meio mineral como forma de selecionar microrganismos para a degradação ou mineralização dos HAPs no solo. A utilização da metodologia 2 é uma tentativa de aproximar o método de isolamento do objetivo almejado.

6.5 CONCLUSÕES

1) Os microrganismos obtidos pela metodologia clássica degradam eficientemente os HAPs no meio mineral, porém mineralizam baixíssimas porcentagens do antraceno do solo;

2) A metodologia proposta no trabalho possibilita a obtenção de microrganismos com capacidades de degradação de HAPs em meio mineral semelhantes aos obtidos pela metodologia clássica;

3) Os microrganismos obtidos pela metodologia proposta mineralizam a grande maioria do antraceno presente no solo e em curto período de tempo, demonstrando que esta metodologia foi mais eficiente no isolamento de microrganismos com habilidade de mineralizar HAPs no solo.

6.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1999. 453p.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nuclei Acids Research**, Oxford, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.
- ASUBEL, F.M. et al. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley and Sons, 1997. p.781.
- BEREKAA, M.M.; STEINBÜCHEL, A. Microbial degradation of the multiply branched alkane 2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane (squalene) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisbonense*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n.10, p.4462-4467, 2000.
- BHATTACHARYA, D. et al. Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas citronellolis* strains isolated from oily sludge-contaminated sites. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.69, n.3, p.1435-1441, 2003.
- BODE, H.B., et al. Physiological and chemical investigations into microbial degradation of synthetic poly(*cis*-1,4-isoprene). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.9, p. 3680–3685, 2000.
- BOONCHAN, S. et al. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.3, p.1007-1019, 2000.
- CAMARGO, F.A.O. et al. *In vitro* reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 39 stimulated by Cu⁺⁺. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.62, n.5-6, p.569-573, 2003.

- CAMEOTRA, S.; BOLLAG, J.M. Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Philadelphia, v.30, n.2, p.111-126, 2003.
- CAVALCA, L. et al. Intrinsic bioremediability of na aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.64, n.4, p.576-587, 2004.
- CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology; Biotechnology**, Hampshire, v.19, n.5-6, p.324–333, 1997.
- CHAILLAN, F. et al. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v.155, n.7, p.587-595, 2004.
- CYBULSKI, Z. et al. The influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by *Pseudomonadaceae* and *Bacillacea* strains. **Spill Science; Technology Bulletin**, Oxford, v.8, n.5-6, p.503-507, 2003.
- DAVIS, K.E.R. et al. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.2, p.826-834, 2005.
- DORE, S.Y. Naphtalene-utilizing and mercury-resistant bacteria isolated from an acidic environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.63, n.1, p.194-199, 2003.
- GARCIA-JUNCO, M., et al. Biosurfactant and biodegradation-enhanced partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from nonaqueous-phase liquids. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.37, n.13, p. 2988-2996, 2003.
- GAUTHIER, E. et al. Initial characterization of new bacteria degrading high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from a 2-year enrichment in a two-liquid-phase culture system. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.94, n.2, p.301-311, 2003.
- GHAZALI, F.M. et al. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.54, n.1, p.61-67, 2004.

GROSSER, R.J. et al. Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: different enrichment conditions influence bioavailability and selection of phenanthrene-degrading isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.7, p.2695-2702, 2000.

HUESEMANN, M.H. et al. Microbial factors rather than bioavailability limit the rate and extent of PAH biodegradation in aged crude oil contaminated model soils. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v.6, n.4, p.321-336, 2002.

HWANG, S.; CUTRIGHT T.J. Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. **Chemosphere**, Oxford, v.47, n.9, p. 891–899, 2002.

JACQUES, R.J.S. et al. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming. **International Biodegradation and Biodeterioration**, London, 2005. (aceito para publicação).

JOHNSEN, A.R. et al. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, Oxford, v.133, n.1, p.71-84, 2005.

KANALY, R.A. et al. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.182, n.8, p.2059-2067, 2000.

KASTNER, M. et al. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.1, p.359-362, 1998.

KAZUNGA, C.; AITKEN, M.D. Products from incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.5, p.1917-1922, 2000.

KIYOHARA, H. et al. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.43, n.2, p.454-457, 1982.

LEYS, N.M. et al. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.66, n.6, p.726–736, 2005.

- LINOS, A. et al. Biodegradation of *cis*-1,4-polyisoprene rubbers by distinct actinomycetes: microbial strategies and detailed surface analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n.4, p.1639-1645, 2000.
- LINOS, A. et al. *Gordonia polyisoprenivorans* sp nov., a rubber-degrading actinomycete isolated from an automobile tyre. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berks, v. 49, n.4, p.1785-1791, 1999.
- MIYATA, N. et al. Saturable, energy-dependent uptake of phenanthrene in aqueous phase by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-153. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.1, p.363-369, 2004.
- MUTNURI, S. et al. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.67, n.4, p.569-576, 2005.
- NEIDHARDT, I.C. et al. **Physiology of the bacterial cell**. Sinauer: Massachussets, 1990. 506 p.
- NETTO A.D.P. et al. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and their nitrated derivatives (NHPAS): a review of methodology. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.6, p.765-773, 2000.
- POTIN, O. et al. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.54, n.1, p.45-52, 2004.
- RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.44, n.2-3, p.93-100, 1999.
- SCHIPPERS, A. et al. *Microbacterium oleivorans* sp nov and *Microbacterium hydrocarbon oxydans* sp nov., novel crude-oil-degrading gram-positive bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v.55, n.2, p.655-660, 2005.
- SHUTTLEWORTH, K.L.; CERNIGLIA, C. Practical methods fore the isolation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrading microorganisms and biodegradation intermediates. In: HURST, J. (ed.) et al. **Manual of environmental microbiology**. Washington: ASM, 1996. p.766-775.
- STOTZKY, G. Microbial Respiration. In: Black, C. A. (ed.). **Methods in soil analisys**. Madison: SSSA. 1965. p.1550-1572.

- STRAUBE W.L. et al. Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. **Acta Biotechnologica**, Weinheim v.23, n.2-3, p.179-196, 2003.
- TEDESCO, M.J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174p.
- VAN VEEN, J.A. et al. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, n.2, p.121-135, 1997.
- VERDIN, A. et al. Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.53, n.1, p.65-70, 2004.
- VERDIN, A. et al. Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, on the intracellular protein composition of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v.55, n.3, p.171-174, 2005.
- WICK, L.Y. et al. Kinetics of mass transfer-limited bacterial growth on solid PAHs. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.35, n.2, p.354-361, 2001.
- WICK L.Y. et al. Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, v.58, n.5, p.378-385, 2002.
- YUSTE, L. et al. Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.32, n.1, p.69-75, 2000.
- ZHANG, H. et al. Isolation and characterization of novel bacteria degrading polycyclic aromatic hydrocarbons from polluted Greek soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.65, n.1, p.124-131, 2004.

7. CONCLUSÕES GERAIS

A partir de amostras de solo de *landfarming* foi isolado e identificado um consórcio microbiano, composto por seis bactérias e um fungo, que degrada eficientemente o antraceno, o fenantreno e o pireno no meio mineral e apresenta grande versatilidade metabólica ao utilizar vários hidrocarbonetos ou intermediários do metabolismo destes compostos como única fonte de carbono e energia para o seu crescimento. Este consórcio microbiano foi obtido através de uma nova metodologia de enriquecimento, que foi utilizada visando reduzir as alterações celulares impostas pelo cultivo em meio líquido e manter as características genéticas, fisiológicas e morfológicas dos microrganismos adaptadas a degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) no solo. O consórcio microbiano degrada e mineraliza altas porcentagens das diferentes concentrações de antraceno, fenantreno e pireno presentes no solo, o que resulta em grande aumento da mineralização se comparado a microbiota autóctone do solo. Se inoculado separadamente ao solo, as bactérias e o fungo apresentam baixas porcentagens de mineralização do antraceno quando comparado a inoculação conjunta na forma de consórcio. A mineralização por este consórcio microbiano do antraceno no solo demanda condições de alta umidade e pH próximo da neutralidade. O aumento do nitrogênio mineral e a conseqüente redução da relação C:N do solo tendem a diminuir a mineralização do antraceno. O aumento da disponibilidade de fósforo, ferro e enxofre, e a presença de amplas relações C:P e C:N:P no solo não influenciam a mineralização do antraceno. Comprova-se que a seleção e a inoculação ao solo de microrganismos degradadores de HAPs, associado a modificação de condições ambientais deste solo pode conduzir a um eficiente processo de biorremediação, onde a maioria dos HAPs é mineralizado em curto período de tempo.

8. APÊNDICE

Sequências do gene do RNAr utilizadas para a identificação dos isolados:

Isolado 1

TCATGGCTCAGGACGAACGCGGGCTGCTTAACACATCAAGTCGAACGGAA
AGGCCCTTCGGGGTACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTG
ATCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGAAANTGGGTCTAATACCGAAT
ATGACCACATGCTTCATGGTGTGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTGTGGGAT
GGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCG
ACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGA
TACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG
GGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGACGGGATGATCGGCCTTCG
GGTTGTAAACCTCTTTCAATAGGAACGAAGCGCAAGTGATCGTAC

Isolado 2

GATGAACGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAAGGATTAAGAG
CTTGCTCTTATGAAGTGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTC
CCATAAGATGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGATAACATTTT
GAACCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGG
ACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGNAACGGCTCACCAAGGCACGA
TGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGCCACACTGGGACTGAGACACGN
CCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA
GTCTGACGGAGCAACCGCCGCGTGAGTGANAAGGCTTTCGGGTTCGTAAAA
CTCTGTTGTTAGGGAAGAACCAAGTGACTAGTTGAATAAGCTGGCACCTGA
GCGG

Isolado 3

TTTTAGAGTTTGGTCATGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGTTAACACATC
 AAGTCGAACGATAATCCAGCTTGCTGGGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGA
 TAACACGTGAGCAACCTGCCCTGGACTNTGGGATAAGCGCTGGAAACGGT
 GTCTAATACNNGGATATGAGCTTTCACCGCATGGTGGGGGTTGGAAAGATTT
 TTCGGTTCAGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATGG
 CTTACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACA
 CTGGGANTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
 TATTGCACAATGGGCGGAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATG
 ACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGCAGGGAAGAAGCGTGAGTGAC
 GTAC

Isolado 4

GTCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGTTAACACATCAAGTCGAACG
 GAAAGGCCCTGCTTGCAGGGTGCTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAC
 GTGGGTGATCTGCCCTGACTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAA
 TACCGGATATGACCAAGGATTGCATGGTTNTTGGTGGAAAGCTTTTGCGGT
 TGGGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTAC
 CAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
 ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
 CACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGATCGG
 CCTTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCCAGGGACGAAGCGCAGTGACCGT
 ACCTGCGAAAAG

Isolado 5

ATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACG
 ATGAACCTGGAGCTTGCTCTAGGGAATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACA
 CGTGAGTAACCTGCCCTTGACTCTGGGATAACCTCCGGAAACGGAAGCTA
 ATACCGGATATGACGCACGGAGGCATCTCCTGTGCGTGGAAGAAGTTCG
 GTCAAGGATGGACTCGCGGCCTATCAGGTAGTTGGTGAGGTAACGGCCCA
 CCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGG
 GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
 GCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAATCGCCGCGTGAGGGATGACG
 GCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGTA
 CCCTGCG

Isolado 6

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGA
TGAACCTGGAGCTTGCTCTAGGGAATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACAC
GTGAGTAACCTGCCCTTGACTCTGGGATAACCTCCGGAAACGGAAGCTAA
TACCGGATATGACGCACGGAGGCATCTCCTGTGCGTGGAAGAATTTTCGG
TCAAGGATGGACTCGCGGCCTATCAGGTAGTTGGTGAGGTAACGGCCCAC
CAAGCCTACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGG
ACTGATACACGGCCCAGACTCTTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC
ACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAATCCCGCGTGAGGGACGACGGCC
TTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCAAAGTGTCGTACTIONGCG
AAA

Isolado 7

TCCAACCGTGTGATTACCATTGTAGCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCG
GTAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCTAAACTCTGTTTCTATATG
TAACTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTC
TTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGC
CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGC
ACAGCTTGGTGTTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCTCAAATTGATTGG
CGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTTACTGGT
AATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCG
GATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGAG
GAC