



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

SOLANGE PIRES DE ARAÚJO

**PRODUÇÃO DE INÓCULO MICROBIANO, OBTIDO DE
MACRÓFITAS AQUÁTICAS NA AMAZÔNIA, COM POTENCIAL DE
DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO**

**MANAUS-AM
2014**

SOLANGE PIRES DE ARAÚJO

**PRODUÇÃO DE INÓCULO MICROBIANO, OBTIDO DE MACRÓFITAS
AQUÁTICAS NA AMAZÔNIA, COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO
DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO**

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional
de Pós-Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas, como parte
dos requisitos para a obtenção do título de Doutora
em Biotecnologia.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Odair Pereira

CO-ORIENTADORA: Prof^a Dra Ieda Hortêncio Batista

**MANAUS-AM
2014**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A663p	Araujo, Solange Pires de PRODUÇÃO DE INÓCULO MICROBIANO, OBTIDO DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS NA AMAZÔNIA, COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO / Solange Pires de Araujo. 2014 157 f.: il. color; 31 cm. Orientadora: José Odair Pereira Coorientadora: Ieda Hortêncio Batista Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. 1. diversidade microbiana. 2. biodegradação. 3. consórcio microbiano. 4. biodiversidade Amazônica. I. Pereira, José Odair II. Universidade Federal do Amazonas III. Título
-------	---



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

SOLANGE PIRES DE ARAÚJO

**PRODUÇÃO DE INÓCULO MICROBIANO OBTIDO DE MACRÓFITAS
AQUÁTICAS NA AMAZÔNIA COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO
DE HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO**

Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia – Área de concentração: Agroflorestal.

Aprovada pela banca examinadora em 20 de outubro de 2014.

Membros da banca:

Dr. José Odair Pereira (Presidente) _____

Dra Ceci Sales-Campos (INPA) _____

Dra Rosana de Medeiros Sousa Galvão (UFAM) _____

Dra Sandra Patrícia Zanotto (UFAM) _____

Dra Hiléia dos Santos Barroso (UEA) _____

DEDICO...

“A Deus que foi meu refúgio e na sua infinita bondade me concedeu sabedoria, coragem e perseverança para vencer os obstáculos”.

Aos meus pais Iris de Souza Araújo (in memoriam) e Maria das Graças Pires de Araújo, aos meus irmãos pelo carinho e apoio.

A amiga Ieda Hortêncio Batista por todo carinho e motivação a mim dedicado.

Ao meu esposo Aílton Teixeira pelo amor, compreensão e ajuda nos momentos difíceis. Dedico esta importante conquista como reconhecimento e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares pelo apoio durante essa caminhada em especial a minha amada mãe Maria das Graças Araújo, ao meu irmão Clodoaldo Araújo e ao meu esposo Ailton Teixeira, pela compreensão e por sempre acreditarem em meu potencial.

Ao Prof. Dr. José Odair Pereira, por sua confiança, pela amizade, pela orientação, motivação nos momentos difíceis, na orientação do projeto e apoio a mim depositada em todos os momentos.

A professora e amiga de todos os momentos Ieda Hortêncio Batista, por todo conhecimento transmitido, pelo incentivo, carinho e motivação nos momentos difíceis, na orientação do projeto, na orientação dos experimentos de bancada que sempre esteve presente.

A professora Hiléia dos Santos Barroso pela orientação e apoio na realização deste trabalho, que foi importantíssimo sua atenção e motivação nos resultados cromatográficos, obrigada pela paciência, pelo conhecimento e pela amizade.

Ao professor André (CBA) pela importante contribuição na orientação dos dados estatísticos.

A professora Rosana Galvão e ao professor Pedro Queiroz Neto que me receberam no laboratório de genética da UFAM para desenvolver minha pesquisa e por sua atenção e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos.

Aos colegas de laboratório pelos intensos dias de pesquisa de erros e acertos, aos doutorandos Tana, Jucileuza e João Marcelo e aos pibic's Karen, Leidiane, Jéssica, Nivia, Alzira, Janaína e Joaquim que estiveram presente e foram importantes colaboradores na pesquisa. Aos colegas Júlio, Tana e Dina pelo auxílio na identificação molecular. A Alzira, Janaína e ao Joaquim pelos testes cromatográficos. Ao colega Jairo pela visita técnica na Indústria Petroquímica de Manaus – REMAM e no auxílio da coleta das amostras vegetais bem como nas fotos tiradas. Ao colega João Marcelo pelo auxílio na identificação botânica das amostras no Instituto de Pesquisa da Amazônia - INPA.

Ao técnico de laboratório da Universidade do Estado do Amazonas – UEA Emerson Barcelar, que sempre esteve disposto a auxiliar nos materiais.

A amiga Carla Braga pelo incentivo e apoio nessa importante etapa de minha vida, pois sempre acreditou em meu potencial.

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio à pesquisa e auxílio na bolsa de estudo.

A Universidade do Estado do Amazonas – UEA, por ter cedido o Laboratório do Mestrado em Biotecnologia para os testes cromatográficos.

A Universidade Federal do Amazonas – UFAM, pela formação profissional; Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e ao corpo docente, pela oportunidade concedida e conhecimentos adquiridos.

À banca examinadora, pelas importantes contribuições a este trabalho. E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

OBRIGADA!!!

RESUMO

A Amazônia, detentora da maior fauna e flora do mundo apresenta riqueza inigualável de diversidade biológica, entretanto, manter intacta essa megadiversidade requer conhecimentos científicos e tecnológicos. Nesse contexto, situa-se uma importante ferramenta biotecnológica que é a biorremediação de ambientes impactados por hidrocarbonetos de petróleo e derivados. No presente trabalho realizou-se estudo de amostras das comunidades microbianas de fungos e bactérias associadas às macrófitas aquáticas *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms, *Ichnanthus calvescens* Döll e *Cyperus ligularis* L. Essas plantas hospedeiras comuns nas águas do rio Negro foram coletadas em ambientes contaminados por petróleo e derivados na Estação Hidroviária de Manaus. Das espécies vegetais selecionadas foram isoladas 155 linhagens de bactérias, sendo 97 epifíticas e 58 endofíticas e 54 cepas de fungos, sendo 30 epifíticos e 24 endofíticos. Foram empregados meio seletivo para isolamento dos microrganismos tal como meio líquido BH (Bushnell Haas) acrescido de petróleo. O petróleo e o diesel utilizados foram provenientes da Base Petrolífera de Urucu, Amazonas. Os ensaios de biodegradabilidade foram realizados em meio seletivo (BH), com a adição de petróleo como fonte de carbono denominado Meio I. Este ensaio foi repetido com a adição ao meio I do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP), denominado meio II. Após a avaliação dos isolados microbianos foram selecionados 6 bactérias e 7 fungos. A identificação molecular das bactérias foi realizada por meio da região do DNA ribossomal 16S e revelou a presença de *Bacillus pumilus* (Endofítica/epifítica), *Lysinibacillus fusiformes* (Epifítica), *Pseudomonas aeruginosa* (Epifítica) e *Acinetobacter junii* (Epifítica/epifítica). A identificação molecular dos fungos foi realizada por meio da região TS1 e ITS2 e revelou a presença das seguintes espécies: *Curvularia trifolii* (epifítica), *Curvularia clavata* (endofítica/epifítica), *Gibberella intermedia* (epifítica/endofítica), *Phoma herbarum* (epifítica) e *Dothideomycetes* sp (epifítica). Estes microrganismos foram selecionados para composição do consórcio microbianos que foram utilizados em ensaios de biodegradação de hidrocarbonetos. A mensuração das atividades de biodegradação de petróleo e diesel foi estimada por cromatografia e espectrometria de massa. Nos ensaios utilizou-se água do rio Negro com o objetivo de aproximar a pesquisa ao ambiente de estudo. A degradação dos hidrocarbonetos pelos consórcios de fungos e bactérias apresentaram médias significativas (98,7-100%), mas não apresentaram diferenças estatísticas entre a degradação do controle contendo água do rio Negro (97,3%). No experimento com o consórcio misto (F/B), houve diferenças significativas, pois embora o controle contendo água do rio Negro tenha promovido degradação do diesel pela microbiota selvagem (81,7%), esta degradação foi inferior e diferente estatisticamente do consórcio misto (97,5%). Foram realizadas análises de degradação dos compostos naftaleno e fenantreno do óleo diesel pelos consórcios. Observou-se que o composto fenantreno foi o que melhor foi degradado pelo consórcio misto (F/B). Entretanto, o naftaleno foi melhor degradado pelo controle contendo somente água do rio Negro, destacando o potencial dos microrganismos selvagens que merecem atenção nas futuras pesquisas, no isolamento destes em águas do rio Negro. O índice de toxicidade dos extratos microbianos foram avaliados como toxicidade moderada para o consórcio misto (F/B), já para o consórcio de fungos e consórcios de bactérias não apresentou toxicidade. No planejamento experimental com os consórcios, os resultados obtidos demonstraram que consórcios mistos (F/B) apresentaram potencial para uso em futuros processos de biorremediação.

Palavras-chave: diversidade microbiana, biodegradação, consórcio microbiano, biodiversidade Amazônica.

ABSTRACT

The Amazon, which owns the largest fauna and flora in the world presents unparalleled wealth of biological diversity, however, keep intact this megadiversity requires scientific and technological knowledge. In this context, there is an important biotechnological tool that is the bioremediation of impacted environments with petroleum hydrocarbons and derivatives. In the present study samples of microbial communities of fungi and bacteria associated with aquatic macrophytes *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Ichnanthus calvescens* Döll and *Cyperus ligularis* L., were researched. These host plants common at Rio Negro were collected in contaminated environments by oil and oil products at Waterway Station from Manaus. From the species selected, 155 bacterial strains were isolated, being 97 epiphytic and 58 endophytic, and 54 fungi strains, being 30 epiphytic and 24 endophytic. Selective media were used for isolation of microorganisms such as BH liquid medium (Bushnell Haas) plus oil. The oil and diesel used are from the Base Oil Urucu, Amazonas. The biodegradability tests were performed on selective medium (BH), with the addition of oil as the carbon source known as Medium I. This test was repeated with the addition to the medium I the redox indicator 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP), called medium II. After the evaluation of microbial isolates were selected 6 bacteria and 7 fungi. Molecular identification of bacteria was performed by the 16S ribosomal DNA region and revealed the presence of *Bacillus pumilus* (endophytic / epiphytic), *Lysinibacillus fusiform* (epiphytic), *Pseudomonas aeruginosa* (epiphytic) and *Acinetobacter junii* (epiphytic/epiphytic). For molecular identification of fungi was performed by the ITS1 and ITS2 region and revealed the presence of *Curvularia trifolii* (epiphytic), *Curvularia clavata* (endophytic / epiphytic), *Gibberella intermedia* (epiphytic/endophytic), *Phoma herbarum* (epiphytic) and *Dothideomycetes* sp (epiphytic). These microorganisms were selected for composition of microbial consortium that were used for hydrocarbon biodegradation tests. The measurement of biodegradation of oil and diesel activities was estimated by chromatography and mass spectrometry. In tests we used water of Rio Negro with the aim of approaching research the environment that are being studied. Degradation of hydrocarbons by consortia of fungi and bacteria had significant average values (98.7 to 100%), but did not show any statistical difference between the degradation of the control containing water of the Rio Negro (97.3%). In the experiment with the mixed consortium (FB), there were significant differences, because although the control containing water of the Rio Negro has promoted degradation of diesel by wild microbiota (81.7%), this degradation was lower and statistically different from the mixed consortium (97,5%). Analysis were carried out for degradation of the compounds naphthalene and phenanthrene of diesel by consortia. It was observed that phenanthrene was the best that has been degraded by the mixed consortium (F / B), however the naphthalene was better degraded by the control containing only water from the Rio Negro, highlighting the potential of wild microorganisms that deserve attention in future research, the isolation of these ones in waters from Rio Negro. In the experimental design with the consortia, the results showed that mixed consortia (FB) have potential for use in future bioremediation.

Keywords: microbial diversity, biodegradation, microbial consortium, Amazon biodiversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura e nomenclatura dos 16 HPA parentais prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Americana (USEPA), sendo os mais frequentemente reportados pela literatura (SCHIRMER et al., 1998)	29
Figura 2: Distribuição percentual das reservas provadas de petróleo, segundo unidades da Federação – 31/12/2011.....	33
Figura 3: Fórmulas estruturais de alguns Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPAs)	47
Figura 4: Formas de vida das macrófitas aquáticas: 1- Anfíbia, 2 - Emergente, 3 - Flutuante fixa, 4 - Flutuante livre, 5 - Submersa fixa, 6 - Submersa livre, 7 - Epífita.....	55
Figura 5: Fluxograma das etapas desenvolvidas no estudo	64
Figura 6: Localização da área de coleta no rio Negro em Manaus/AM.....	65
Figura 7: Amostra das macrofitas aquáticas: (A) <i>Eichornia crassipes</i> (Mart.) Solms (Pontederiaceae) (B) <i>Ichnanthus calvescens</i> Döll (Poaceae) e (C) <i>Cyperus ligularis</i> L. (Cyperaceae).....	66
Figura 8: Etapas do Isolamento dos microrganismos epifíticos. (A) Fragmentos friccionados com o auxílio de um cotonete (swab esterilizado). (B) Estriados nas placas de Petri, contendo meio seletivo (BH).....	67
Figura 9: Etapas do isolamento de microrganismos endofíticos. (A) descontaminação superficial das plantas hospedeiras. (B) Material foi cortado em fragmentos de 5 a 7 mm com o auxílio de um furador de papel estéril. (C) Os fragmentos foram dispostos em placas de Petri com meio seletivo.....	68

Figura 10: Purificação de bactérias.....	69
Figura 11: Purificação de fungos através de repique sucessivos. (A) Verso e (B) anverso de um fungo crescido por 10 dias.....	70
Figura 12: Ensaio de biodegradabilidade. (A) Bactéria individualmente + meio seletivo BH (Bushhnell Haas) + petróleo. (B) Controle: meio seletivo BH (Bushhnell Haas) + petróleo.....	71
Figura 13: Ensaio de biodegradabilidade. (A) Fungos individualmente + meio seletivo BH (Bushhnell Haas) + petróleo. (B) Controle: meio seletivo BH (Bushhnell Haas) + petróleo.	72
Figura 14: Reação redox realizada pelo indicador DCPIP.....	73
Figura 15: Ensaio de biodegradação com bactérias. (A) Bactérias com 24 horas de crescimento. (B) Crescimento celular bacteriano por 5 horas. (C), (D) e (E) Em cada tudo de ensaio esterilizado, acrescentou-se 3 mL de meio BH (Bushnell-Hass) acrescido do indicador, 40 µL de petróleo, e 50 µL do caldo bacteriano. Os tubos foram mantidos sob agitação em incubadora a 240 rpm em temperatura ambiente (27±2°C).....	74
Figura 16: Ensaio de biodegradação com fungos. (A) Fungos com 10 dias de crescimento. (B) Inóculos patronizados de fungos. (C), (D) e (E) Em cada tudo de ensaio esterilizado, acrescentou-se 3 mL de meio BH (Bushnell-Hass) acrescido do indicador, 40 µL de petróleo, e 1 inóculo funcigo. Os tubos foram mantidos sob agitação em incubadora a 240 rpm em temperatura ambiente (27±2°C).....	75
Figura 17: Coleta da água no rio Negro nas mediações da área da praia do Tupé.....	85
Figura 18: Produção de Consórcio: (A) Consórcio de bactérias, composto por seis bactérias + água do rio Negro + diesel. (B) Controle: água do rio Negro + diesel. (C) Controle: meio seletivo BH (Bushhnell Haas) + diesel.....	86
Figura 19: Produção de Consórcio: (A) Consórcio de fungos composto por sete fungos + água do rio Negro + diesel. (B) Controle: água do rio Negro + diesel. (C) Controle: meio seletivo BH (Bushhnell Haas) + diesel.	87
Figura 20: Produção de Consórcio: (A) Consórcio misto: composto por sete fungos e seis bactérias + água do rio Negro + diesel. (B) Controle: água do rio Negro + diesel.....	88
Figura 21: Processo de extração com o sistema Ultra- turrax, adaptado de Passarini (2011)	90

Figura 22: Rampa analítica da variação de temperatura utilizada nas análises das amostras, dos ensaios de biodegradação de HPA, por Cromatografia Gasosa.....	91
Figura 23: Curva de calibração do Naftaleno baseado em diferentes concentrações.....	94
Figura 24: Curva de calibração do 2-metil naftaleno baseado em diferentes concentrações.....	94
Figura 25: Curva de calibração de 1-metil naftaleno baseado em diferentes concentrações.	94
Figura 26: Curva de calibração de alquil-naftaleno baseado em diferentes concentrações.....	94
Figura 27: Curva de calibração do e alquil-naftaleno baseado em diferentes concentrações.....	94
Figura 28: Etapas do ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i> . (A) Consorcio de microrganismos com 15 dias de incubação. (B) Extratos filtrados em millipore 0,25µm. (C) <i>Artemia salina</i> com 28 horas de incubação. (D) Multipoços com as concentrações dos extratos e 10 <i>Artemias salina</i> em cada poço.....	99
Figura 29: Ensaio de biodegradação. As bactérias (A) com seis dias de incubação e fungos com dez dias de incubação (B) quando comparados ao controle do experimento, apresentam degradação, pois aparentemente consomem o petróleo presente e turvam o meio seletivo.	104
Figura 30: Ensaio de biodegradabilidade. (A) Bactérias e (B) Fungos utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) nos tempos de 24 a 48 horas de incubação para confirmação de potenciais degradadores de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com a mudança da coloração do azul para o incolor.....	105
Figura 31: Perfil eletroforético em gel de agarose indicando a banda de DNA genômico de -bactérias endofíticas e epifíticas isoladas das plantas hospedeiras em estudo. 1) B41, 2) -, 3)-, 4) B102, 5) B121, 6) B123, 7) B132 e 8) B139.....	108
Figura 32: Amplificação da região gênica rRNA 16S. 1) B41 diluído 1/5; 2) -; 3) B102; 4) B121; 5) B123; 6) B132; 7) B139; 8) B67 não diluído; 9) B67 diluído 1/5, 10) diluído 1/10.....	109
Figura 33: Gel de extração do DNA da massa micelial das amostras dos fungos filamentosos isolados de macrófitas aquáticas da Amazônia. Os poços são identificados a seguir: 1: marcador molecular; 2 e 3: amostra F17; 4 e 5: amostra F24; 6 e 7: F5; 8 e 9: amostra F53; 10 e 11: amostra F31; 12 e 13: amostra F36; 14 e 15: - e 16 e 17: amostra 14.....	115

Figura 34: Amplificação da região ITS do rDNA dos isolados em gel de agarose 0,8%, corado com 0,5 ug/mL de brometo de etídio. Pente superior. Os poços são identificados a seguir: 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb da fermentas; 2-9: Amostra de 1 a 4-10 controle negativo; Pente inferior. Os poços são identificados a seguir: 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb da fermentas; 12 a 19: Amostra 5 a 8.....	116
Figura 35: Cromatograma obtido por CG-EM de 30 µL/mL de petróleo (gráfico na cor rosa) e 30 µL/mL de óleo diesel (gráfico na cor preto) na concentração de 1mL, proveniente da Base Petrolífera de Urucu, Amazonas, Brasil, para obtenção de HPAs existentes no petróleo e óleo diesel.....	120
Figura 36: Espectro das amostras do controle com meio seletivo (BH) + diesel (40 mL) e (80 mL) para constatação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes, após 15 dias de incubação. Os picos estão assinalados conforme número de identificação na tabela 18.....	122
Figura 37: Espectro das amostras do controle com água do rio Negro + diesel (40mL) para constatação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes, após 15 dias de incubação. Os picos estão assinalados conforme número de identificação na tabela 18.....	122
Figura 38: Espectro das amostras do consórcio de bactérias + água do rio Negro + diesel (40mL) após 15 dias de incubação. Os picos cromatográficos estão assinalados conforme número de identificação na tabela 18.....	123
Figura 39: Espectro das amostras do consórcio de fungos + água do rio Negro + diesel (40mL) após 15 dias de incubação. Os picos cromatográficos estão assinalados conforme número de identificação na tabela 18.....	123
Figura 40: Espectro das amostras do controle com água do rio Negro + diesel (80mL) para constatação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes, após 15 dias de incubação. Os picos estão assinalados conforme número de identificação na tabela 18.....	123
Figura 41: Espectro das amostras do consórcio misto (F/B) + água do rio Negro + diesel (80mL) para constatação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes, após 15 dias de incubação. Os picos estão assinalados conforme número de identificação na tabela 18.....	124
Figura 42: Porcentagem de HPAs nos controles dos ensaios com água do rio Negro e dos consórcios microbianos dos experimentos 1, 2 e 3.....	125
Figura 43: Porcentagem do composto naftaleno nos controles, dos ensaios com água do Rio Negro e dos consórcios microbianos dos experimentos 1, 2 e 3.....	130

Figura 44: Porcentagem do composto fenantreno nos controles, dos ensaios com água do rio Regro e dos consórcios microbianos dos experimentos 1, 2 e 3..... 131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição elementar média do óleo cru	26
Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos HPAs	28
Tabela 03: Meio de cultura Desidratado: AGAR BUSHHNEILL HAAS acrescido de petróleo – BH	66
Tabela 4: Protocolo da reação de amplificação do PCR para fungos, distinguindo somente o tipo de <i>primers</i> específicos	81
Tabela 5: Protocolo da reação para a limpeza da reação por meio das enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina de Camarão	82
Tabela 6: Especificações e produção de consórcios microbianos através da técnica de bioaumento	84
Tabela 7: 18 HPAs constituintes da mistura de padrões utilizados para identificar e quantificar os HPAs, e seu respectivo íon molecular	92
Tabela 8: Ensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i> em concentrações de 1,56 a 50%	98
Tabela 9: Classificação da toxicidade de extratos de acordo com a mortalidade das larvas <i>Artemia salina</i>	99
Tabela 10: Classificação da toxicidade de extratos vegetais de acordo com a CL₅₀ em larvas <i>Artemia salina</i>	100
Tabela 11: Isolamento de bactérias epifíticas e endofíticas a partir das espécies vegetais <i>Eichornia crassipes</i> (Mart.) Solms <i>Ichnanthus calvenscens</i> Döll (Poaceae) e <i>Cyperus ligularis</i> L. (Cyperaceae)	101
Tabela 12: Isolamento de fungos epifíticos e endofíticos a partir das espécies vegetais <i>Eichornia crassipes</i> (Mart.) Solms <i>Ichnanthus calvenscens</i> Döll (Poaceae) e <i>Cyperus ligularis</i> L. (Cyperaceae)	102

Tabela 13: Microrganismos, fungos e bactérias, selecionados por apresentarem atividade como degradadores de hidrocarbonetos de petróleo	103
Tabela 14: Características morfológicas de culturas de bactérias endofíticas e epifíticas isoladas das plantas hospedeiras.....	107
Tabela 15: Identificação molecular das bactérias endofíticas e epifíticas obtidas das plantas hospedeiras <i>Eichornia crassipes</i> (Mart.) Solms <i>Ichnanthus calvenscens</i> Döll (Poaceae) e <i>Cyperus ligularis</i> L. (Cyperaceae)	110
Tabela 16: Características morfológicas de linhagens de fungos isolados de macrófitas aquáticas <i>Eichornia crassipes</i> (Mart.) Solms <i>Ichnanthus calvenscens</i> Döll (Poaceae) e <i>Cyperus ligularis</i> L. (Cyperaceae)	114
Tabela 17: Análises das sequências obtidas dos fungos isolados de macrófitas aquáticas, número de nucleotídeos semelhante ao mesmo número de nucleotídeos dos isolados correspondentes armazenados no banco de dados (NCBI), <i>e-value</i> , <i>query cover</i> e a porcentagem de similaridade de cada fungo avaliado	117
Tabela 18: Compostos identificados através da CG-EM, assinalados na figura 28, de acordo com suas respectivas características cromatográficas	121
Tabela 19: Somatória das concentrações dos HPAs totais (Σ HPA), média das réplicas dos Σ HPAs, porcentagem de biodegradação dos HPAs e desvio padrão dos Σ HPAs dos consórcios de fungos, consórcios de bactérias e consórcios (misto F/B)	124
Tabela 20: Somatória das concentrações do composto naftaleno, média das réplicas, porcentagem de biodegradação e desvio padrão dos consórcios de fungos, consórcios de bactérias e consórcios (misto F/B)	129
Tabela 21: Somatória das concentrações do composto fenantreno, média das réplicas, porcentagem de biodegradação e desvio padrão do consórcio de fungos, consórcio de bactérias e consórcio (misto F/B)	131
Tabela 22: Quadro de análise de variância do experimento na degradação do diesel Tabela 13: Teste Tukey ($p < 0,01$) para comparação de medias de degradação (%) entre os consórcios (F = fungos; B = bactérias e BF = bactérias x fungos)	134
Tabela 23: Teste Tukey ($p < 0,01$) para comparação de medias de	

degradação (%) entre os consórcios (F = fungos; B = bactérias e BF = bactérias x fungos)	134
Tabela 24: Teste Tukey ($p < 0,01$) para comparação de médias de degradação (%) entre os consórcios e os respectivos controles	135
Tabela 25: Tabela de análise de variância do experimento de degradação do naftaleno	136
Tabela 26: Tabela de análise de variância do experimento de degradação do fenantreno	136
Tabela 27: Teste de toxicidade com <i>Artemia salina</i> em concentrações de 1,56 a 50%	137

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 Qualidade ambiental e qualidade de vida.....	23
2.2 Petróleo e sociedade	25
2.3 Caracterização físico-química do petróleo	26
2.3.1 Composição do Petróleo	26
2.4 Petróleo e poluição hídrica	30
2.5 Biotecnologia e biorremediação	37
2.5.1 Processos de biodegradação do petróleo e seus derivados por bactérias e fungos.....	44
2.5.2 Caracterização e biorremediação dos Hidrocarbonetos Alifáticos.	45
2.5.3 Caracterização e biorremediação dos hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)	46
2.5.4 Técnicas para a biorremediação	48
2.5.4.1 Processos Bióticos de Remediação	48
2.5.4.2 Processos de biorremediação “ <i>ex situ</i> ”	50
2.6 A biodiversidade Amazônica e as macrófitas aquáticas	53
2.7 Microrganismos isolados das espécies vegetais	58
2.8 Biorremediação: Estado da arte	60
3 MATERIAL E MÉTODOS	64
3.1 Coleta das plantas hospedeiras	65
3.2 Isolamento da microbiota associada	66
3.2.1 Isolamento dos microrganismos epifíticos	66
3.2.2 Isolamento dos microrganismos endofíticos	68
3.2.3 Caracterização morfológica, purificação e preservação dos microrganismos isolados.....	69

3.2.3.1 Preparo das bactérias.....	69
3.2.3.2 Preparo dos fungos	70
3.3 Ensaio de biodegradação com e sem a presença do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) como acceptor de elétrons...	70
3.3.1 Ensaio de biodegradação utilizando o petróleo como fonte de carbono – Meio I = meio mineral (BH) + Petróleo	71
3.3.1.1 Preparo dos microrganismos – Bactérias.....	71
3.3.1.2 Preparo do ensaio com petróleo – Bactérias.....	71
3.3.1.3 Preparo dos microrganismos - Fungos	72
3.3.1.4 Preparo do ensaio com petróleo – Fungos	72
3.3.2 Ensaio de biodegradação utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol - Meio II = meio mineral + petróleo + DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol)	73
3.3.2.1 Preparo dos microrganismos – Bactérias.....	74
3.3.2.2 Preparo do ensaio de biodegradação utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol – bactérias	74
3.3.2.3 - Preparo dos microrganismos – Fungos	74
3.3.2.4 Preparo do ensaio de biodegradabilidade utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol com fungos.....	74
3.4 Identificações das amostras selecionadas – Bactérias	75
3.4.1 Identificação Fenotípica.....	76
3.4.2 Extração de DNA Genômico.....	77
3.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Amplificação do Gene rRNA 16S	77
3.4.4 Purificação das Amostras de Produtos de PCR	78
3.4.5 Sequenciamento da Região Gênica rRNA 16S	78
3.5 Identificações dos isolados selecionados – Fungos	79
3.5.1 Extração de DNA cromossomal total de fungos filamentosos.....	79
3.5.2 Quantificação do DNA.....	80
3.5.3 Amplificação do DNA pela reação de PCR.....	81
3.5.4 Sequenciamento do DNA por PCR ExoSAP (Exonuclease I + Fosfatase Alcalina de Camarão).....	81
3.5.5 Reação de sequenciamento	82
3.5.6 Análise de dados.....	83
3.6 Petróleo e óleo diesel utilizados no ensaio de biodegradação	83
3.7 Produção e ensaio de degradação por consórcios microbianos, através da técnica de bioaumento, com potencial em degradar óleo diesel nas águas do rio Negro	83
3.7.1 Coleta da água do rio Negro para realizar ensaio de biodegradação por consórcios microbianos.....	84
3.7.2 Bactérias utilizadas no consórcio	85
3.7.3 Produção e ensaio do consórcio de bacterias com potencial em degradar óleo diesel em águas do rio Negro.....	85
3.7.4 Fungos utilizados no consórcio.....	85
3.7.5 Produção e ensaio do consórcio de fungos com potencial em	

degradar óleo diesel nas águas do rio Negro.....	86
3.7.6 Produção e ensaio do consórcio misto de microrganismo composto de fungos e bactérias.....	87
3.7.7 Produção de consórcio misto (fungos e bactérias) com potencial em degradar óleo diesel nas águas do rio Negro.....	88
3.8 Quantificação dos HPAs nos ensaios de biodegradação do diesel por consórcios microbianos	89
3.8.1 Solventes e padrões utilizados.....	89
3.8.2 Extração líquido – líquido dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)	89
3.8.3 Condições Cromatográficas	91
3.8.4 Quantificação dos HPA do diesel dos ensaios de biodegradação.	92
3.8.4.1 Curva analítica.....	93
3.8.4.2 Controle de Qualidade Analítica.....	96
3.9 Análise estatística	97
3.10 Ensaio de toxicidade utilizando espécies de <i>Artemia salina</i>	97
3.10.1 Preparo e cultivo das <i>Artemia salina</i>	97
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
4.1 Isolamento seletivo de bactérias e fungos epifíticos e endofíticos de macrofitas aquáticas	101
4.2 Ensaio de biodegradabilidade com e sem a presença do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) como acceptor de elétrons.....	103
4.3 Identificação das Linhagens de bactérias	106
4.3.1 Análise Morfológica	106
4.3.2 Identificação Molecular	107
4.3.2.1 Principais gêneros de bactérias isoladas: relação e importância com processos de biorremediação.....	111
4.4 Identificação das Linhagens de fungos	114
4.4.1 Análise Morfológica	114
4.4.2 Identificação pela técnica molecular	115
4.4.2.1 Principais gêneros de fungos isolados e suas relações com processos de biorremediação.....	118
4.5 Petróleo e óleo diesel utilizados no experimento	120
4.6 Análises da degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos do óleo diesel por consórcios de microrganismos através da quantificação por cromatografia gasosa e espectrometria de massa	122
4.6.1 Análise da degradação dos compostos fenantreno e naftaleno por consórcios de microrganismos através da quantificação por	

cromatografia gasosa e espectrometria de massa.....	129
4.7 Análise estatística	134
4.8 Avaliação da Toxicidade	137
5 CONCLUSÕES	139
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	141

INTRODUÇÃO

A Amazônia detentora da maior fauna e flora do mundo apresenta inigualável diversidade biológica. Entretanto, manter intacta essa megadiversidade requer conhecimentos científicos e tecnológicos como alternativa para a manutenção e preservação da floresta e de todo o ecossistema. Nesse contexto, toda a comunidade enfrenta vários desafios, sendo necessários investimentos efetivos que possam assegurar o real desenvolvimento para a região. Essas condições são hoje possíveis, graças à revolução, científico-tecnológica, que a partir dos anos 1970 valorizou duplamente a natureza amazônica como capital natural e como condição de sobrevivência do planeta, além de criar possibilidades de lidar com esse fantástico patrimônio com novas formas de produção (BECKER, 2012).

Diante do paradigma entre desenvolvimento sustentável, meio ambiente, e industrialização, o meio ambiente vem sofrendo com constantes degradações provenientes de derramamentos de petróleo e seus derivados. Desse modo, o tema tem despertado atenção especial por parte dos pesquisadores e cientistas devido ao grande impacto causado tanto em solos como também nas águas, demandando várias pesquisas destinadas à prática do tratamento biológico destes ambientes.

O interesse em utilizar a estratégia da atenuação natural monitorada como técnica de tratamento de solos e águas contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo é crescente. As técnicas relacionadas à biorremediação são consideradas de baixo custo em comparação com o de processos convencionais (SHARMA, 2012). A biorremediação é uma opção que oferece a possibilidade de eliminar ou transformar diversos contaminantes em compostos menos prejudiciais usando a atividade biológica dos microrganismos que possuem capacidade de decompor poluentes, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos do petróleo.

Na área de biorremediação estão sendo realizados diversos trabalhos na região Amazônica com a preocupação em prevenir e amenizar possíveis danos ambientais causados por derramamentos de petróleo na região, dentre eles destaca-se a pesquisa desenvolvida por Batista (2009) com o isolamento de bactérias de macrofitas aquáticas da Amazônia com o objetivo de produção de consórcio bacteriano para degradação de hidrocarbonetos de petróleo. A referida autora destaca que encontrou isolados bacterianos promissores para a formação de um consórcio capaz de degradação dos compostos do petróleo. Seguindo esse enfoque Elias et al., (2009) trabalhando com fungos, demonstrou resultados positivos, destacando o potencial biodegradador desses microrganismos.

Diante do exposto e objetivando ampliar conhecimentos e tecnologias, optou-se em unificar estas importantes pesquisas apresentadas para nossa região. Os microrganismos, epifíticos e endofíticos, foram isolados a partir de macrofitas aquáticas, coletadas em área contaminada por resíduos de petróleo na região Amazônica. A escolha desses hospedeiros vegetais para a realização desta pesquisa se deve aos frequentes registros na literatura da presença dessas plantas em ambientes contaminados e poluídos. Analisou-se a existência de microrganismos associados com as referidas macrofitas que pudessem estar relacionados com processos de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. Verificou-se ainda a ação *ex situ* de consórcios com bactérias, consórcios com fungos e consórcio misto composto por fungos e bactérias para biorremediação de ambientes contaminados por petróleo.

Assim, esta pesquisa teve como objetivo a produção de inóculo microbiano, obtido de macrofitas aquáticas na Amazônia, com potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo e derivados. A compreensão do poder de ação de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos possibilitará ampliar este potencial em escala industrial, tornando possível encontrar alternativas viáveis para a descontaminação, em especial de ambientes aquáticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Qualidade ambiental e qualidade de vida

O ser humano ao longo dos séculos vem sistematicamente, consumindo os recursos naturais, entretanto, nos últimos 50 anos, com a explosão demográfica que assolou o planeta, o consumo dos recursos naturais disponíveis na natureza vem se intensificando e o seu impacto no ambiente é cada vez mais evidente (GUIMARÃES, 2005). A dicotomia entre consumo, sustentabilidade e qualidade de vida é, sem dúvida, um dos principais desafios do século XXI. Trazer ao consumismo um nível de racionalidade que o torne sustentável e capaz de frear o seu déficit ecológico é sem dúvida, tarefa árdua (SANTOS, 2003).

Alguns autores conceituam e destacam a importância da qualidade ambiental essencialmente vinculada à qualidade de vida e sua percepção influenciada por fatores culturais, geográficos e históricos da sociedade humana (GUIMARÃES, 2005).

Para Nahas (2003), qualidade de vida é a condição humana resultante de um conjunto de parâmetros individuais e socioambientais, modificáveis ou não, que caracterizam as condições em que vive o ser humano. Dias (1992), destaca que o meio ambiente deve ser considerado em sua totalidade, agregando qualidade ambiental com qualidade de vida, e devem atingir todas as questões ambientais do ponto de vista local, regional, nacional e internacional, analisando suas causas, consequências e complexidade.

A sociedade hoje demonstra uma maior preocupação quanto ao meio ambiente. Há inúmeros mecanismos legais que visam assegurar a proteção ambiental, mas infelizmente esses mecanismos por si só não são capazes de acabar com a degradação desenfreada dos recursos naturais (ABBAS, 2003). Para

proteger o meio ambiente é necessário que o desenvolvimento seja de forma sustentável, proporcionando qualidade de vida, e que o manejo dos recursos naturais seja feito com responsabilidade e consciência. Além do correto manejo, os resíduos gerados pelas atividades antropogênicas devem ser tratados e dispostos adequadamente. Quando isso não acontece é necessário então reparar os danos ambientais com rapidez de modo adequado e integral, com a prerrogativa de compatibilizar técnicas eficientes e economicamente viáveis (GUIMARÃES, 2005). Esta é uma questão difícil de conciliar, pois os processos de reparação ambiental estão associados a longos períodos e a altos custos (SILVEIRA e SPAREMBERGER, 2004).

A preocupação com a qualidade ambiental teve real início em 1981, com a Lei Federal nº 6.938, que instituiu a Política Nacional do Meio Ambiente, seguida pela Constituição Federal de 1988, a qual passou a assegurar constitucionalmente a preservação ambiental para um ambiente saudável para todos. A ausência de uma visão crítica do comportamento humano enquanto sociedade e indivíduo que busque uma maior consciência de cidadania e de senso de coletividade gera um comportamento limitado, único e inquestionável, prejudicando uma reflexão mais profunda sobre nosso comportamento (GUIMARÃES, 2005). Estamos diante, portanto, de uma crise paradigmática, onde nossos hábitos de vida e de consumo, o nosso estilo de vida, impedem uma maior reflexão sobre o futuro que desejamos para os nossos descendentes. É necessário, que rompamos com esta estrutura de paradigmas e passemos a pensar de uma forma coletiva e racional para que não cheguemos à inviabilidade da sobrevivência dos seres humanos no planeta (LOUREIRO, 2006).

Assim, considerando que a qualidade de vida está diretamente relacionada à qualidade dos diferentes ambientes, o interesse pela biotecnologia ambiental tem crescido consideravelmente. Um de seus potenciais usos vem ser a remediação de ambientes contaminados por petróleo. Diante dos desafios, a biotecnologia apresenta-se como aliada a favor dessa relação no que tange qualidade de vida e qualidade ambiental.

2.2 Petróleo e sociedade

A sociedade ao longo do tempo vem utilizando intensamente os recursos naturais, explorando-os e transformando-os em produtos de interesse para vários setores, e o petróleo e seus derivados destacam-se, pois estão presentes em larga escala em praticamente todas as atividades humanas. O petróleo assume assim significativa importância dentro da atual configuração de nossa sociedade, sendo utilizado desde sua forma bruta até as mais refinadas (ROSENBERG & RON 1996).

Nos grandes centros urbanos os lançamentos de esgotos domésticos e industriais em corpos hídricos merecem destaque dentre as diversas fontes de hidrocarbonetos. Volumes consideráveis de petróleo e derivados são introduzidos constantemente no ambiente pelas descargas dos efluentes industriais e acidentes envolvendo derrames de óleo (READMAN et al., 2002). Os gases provenientes da exaustão veicular e de outros processos de combustão são comuns nos grandes centros urbanos, sendo fontes importantes de compostos orgânicos, em especial de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (STOUT et al., 2001). Os derrames acidentais dos grandes petroleiros chamam atenção face ao potencial agudo de contaminação.

A atividade de transporte de petróleo e derivados tem grande potencial poluidor, principalmente devido ao grande volume em operação. O transporte de petróleo pode causar descargas de portes variáveis, desde as maiores proporcionadas por acidentes com petróleo até as relativamente pequenas, mas frequentemente por descargas operacionais. Mundialmente, esse transporte lança no ambiente cerca de 100.000 toneladas de hidrocarbonetos por ano. Comparando a outras fontes de hidrocarbonetos, apenas as fontes antropogênicas são responsáveis por cinquenta por cento do total de hidrocarbonetos lançados anualmente no meio ambiente (WALKER, 2003).

2.3 Caracterização físico-química do petróleo

2.3.1 Composição do Petróleo

Do latim *petra* (pedra) e *oleum* (óleo), o petróleo no estado líquido é uma substância oleosa, inflamável, menos densa que a água, com cheiro característico e cor variando entre o negro e o castanho-claro (THOMAS, 2004).

O petróleo é uma mistura de hidrocarbonetos parafínicos, nafênicos e aromáticos em proporções variáveis, contendo impurezas, denominadas impurezas olefínicas, como os compostos de enxofre, nitrogênio, oxigênio e metais, estão ainda associados ao petróleo: gás natural, sedimentos (areia) e água salgada (SILVA, 2005).

O petróleo não é uma substância uniforme e suas características variam de acordo com o campo produtor, até em um mesmo campo, podendo estar dissolvidos em sua massa líquida gases, sólidos e suspensões coloidais. Em decorrência disto, as propriedades físicas do petróleo podem variar bastante, podendo-se ter óleos muito fluídos e claros, com grandes proporções de destilados leves, e óleos viscosos e escuros, com grandes proporções de destilados pesados. Apesar destas diferenças em suas características físicas, sua composição elementar varia muito pouco porque o óleo cru é composto por séries homólogas de hidrocarbonetos e as diferenças físicas são decorrentes da quantidade relativa de cada série homóloga e dos componentes individuais. A faixa de variação da composição elementar do óleo bruto é bem estreita, como mostra a Tabela 1 (VALLE, 2007).

Tabela 1: **Composição elementar média do óleo cru**

Elemento	% em Peso
Carbono	83 a 87
Hidrogênio	11 a 14
Enxofre	0,06 a 8
Nitrogênio Básico	0,11 a 1,7
Oxigênio	0,1 a 2
Metais	Até 0,3

Fonte: Valle, (2007)

Os principais constituintes do petróleo são os hidrocarbonetos, podendo chegar a mais de 90% de sua composição. Os outros elementos presentes

aparecem sob a forma de compostos orgânicos, os quais em alguns casos formam complexos organometálicos, podendo ocorrer metais. Além disto, podem aparecer sais de ácidos orgânicos, o enxofre pode ainda estar presente na forma inorgânica como H_2S . Os constituintes do petróleo podem ser divididos em duas grandes classes: Hidrocarbonetos e Não-hidrocarbonetos (compostos orgânicos sulfurados, oxigenados, nitrogenados e organometálicos) (MILLANI et al., 2000).

Os hidrocarbonetos são compostos orgânicos formados por carbono e hidrogênio. De acordo com sua estrutura são classificados em saturados, insaturados e aromáticos. Os hidrocarbonetos saturados, também denominados de alcanos ou parafinas são aqueles cujos átomos de carbono são unidos somente por ligações simples, constituindo cadeias lineares, ramificadas ou cíclicas, interligadas ou não. Os hidrocarbonetos insaturados, também denominados de olefinas, apresentam pelo menos uma dupla ou tripla ligação carbono-carbono, enquanto os hidrocarbonetos aromáticos, também chamados de arenos, apresentam pelo menos um anel benzênico na sua estrutura (MILLANI et al., 2000). Os hidrocarbonetos presentes no óleo cru são de diferentes tipos, ocorrendo desde compostos com 1 a 80 átomos de carbono, todos pertencentes a séries homólogas de hidrocarbonetos (VALLE, 2007).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são uma extensa série de compostos de ocorrência ubíqua, isto é, estão presentes em todos os ambientes terrestres e marinhos, constituindo uma importante classe dos compostos orgânicos extensamente investigados na literatura científica não apenas pela sua abundância, mas também face ao seu potencial tóxico aos organismos dos ecossistemas naturais (NEFF, 1979).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são uma família de moléculas constituídas unicamente de carbono e hidrogênio, com estrutura de 2 ou mais anéis condensados, cada anel com 5 ou 6 átomos de carbono (HPAs parentais) e podem apresentar ramificações constituídas de cadeias hidrocarbônicas alifáticas, sendo denominados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos alquilados.

As propriedades químicas dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são dependentes do número de anéis aromáticos e da configuração da molécula. Geralmente, o aumento no tamanho e na angulação da molécula resulta no aumento da hidrofobicidade e estabilidade eletroquímica (OLIVEIRA e MANFIO, 2006).

Na Tabela 2 observa-se a relação existente entre a massa molar e as propriedades físico-químicas dessa classe de compostos, assim hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) com maior massa molar apresentam um maior valor de coeficiente de partição octanol/água, que é uma medida da lipofilicidade de um composto, e é definido como a razão da concentração do composto, no equilíbrio, após a dissolução em um sistema de duas fases, formadas por água e octanol (PERIN, 2010).

Em relação à pressão de vapor ela também diminui com o aumento da massa molar, e a consequência disso é que hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) com 2 ou 3 anéis tendem a concentrar-se na fase gasosa do ar, aqueles com 4 anéis distribuem-se entre as fases do ar e os compostos com 5 ou mais anéis concentram-se principalmente no material particulado atmosférico (COSTA, 2001).

Tabela 2: Propriedades físico-químicas dos HPAs

HPA	Nº de anéis	PM (g.mol ⁻¹)	PF (°C)	PE (°C)
Naftaleno	2	128	80	218
Acenaftileno	3	150	92	265
Acenafteno	3	154	96	279
Fluoreno	3	166	16	293
Fenantreno	3	178	101	340
Antraceno	3	178	216	340
Fluoranteno	4	202	11	375
Pireno	4	202	149	360
Benzo [a]antraceno	4	228	158	400
Criseno	4	228	255	448
Benz[b]fluoranteno	5	252	165	480
Benz[k]fluoranteno	5	252	217	480
Benz[a]pireno	5	252	179	496
Indeno [1,2,3-cd]pireno	6	278	163	536
Dibenzo[a, h]antraceno	5	278	262	524
Benzo[g,h,i]perileno	6	268	222	545

Fonte: Adaptado de Latimer e Zheng (2003); Oliveira e Manfio (2006).

Nota: Número de anéis; PM peso molecular (g.mol⁻¹); S, solubilidade em água (mg.L⁻¹); PV, pressão de vapor (Pa=Pascal); PF (Ponto de Fusão); PE (Ponto de Ebulição).

Devido à possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si, a IUPAC, União Internacional

de Química Pura e Aplicada, tem reconhecido atualmente mais de 100 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) sendo que somente 16 deles são considerados poluentes prioritários em função das informações físico-químicas, toxicológicas, ambientais e industriais existentes (PERIN, 2010).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) listou 16 HPAs como poluentes prioritários para remediação nos diferentes tipos de ambientes (sedimento, água, solo e biota), que estão dispostos na Figura 1 tendo em vista que seu caráter lipofílico permite que esses compostos sejam facilmente adsorvidos ao sedimento, o que propicia a sua permanência no ambiente por um longo período. São eles: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno. Esses compostos apresentam de 2 a 6 anéis aromáticos e peso molecular (PM) variando entre 128 e 278 g/mol.

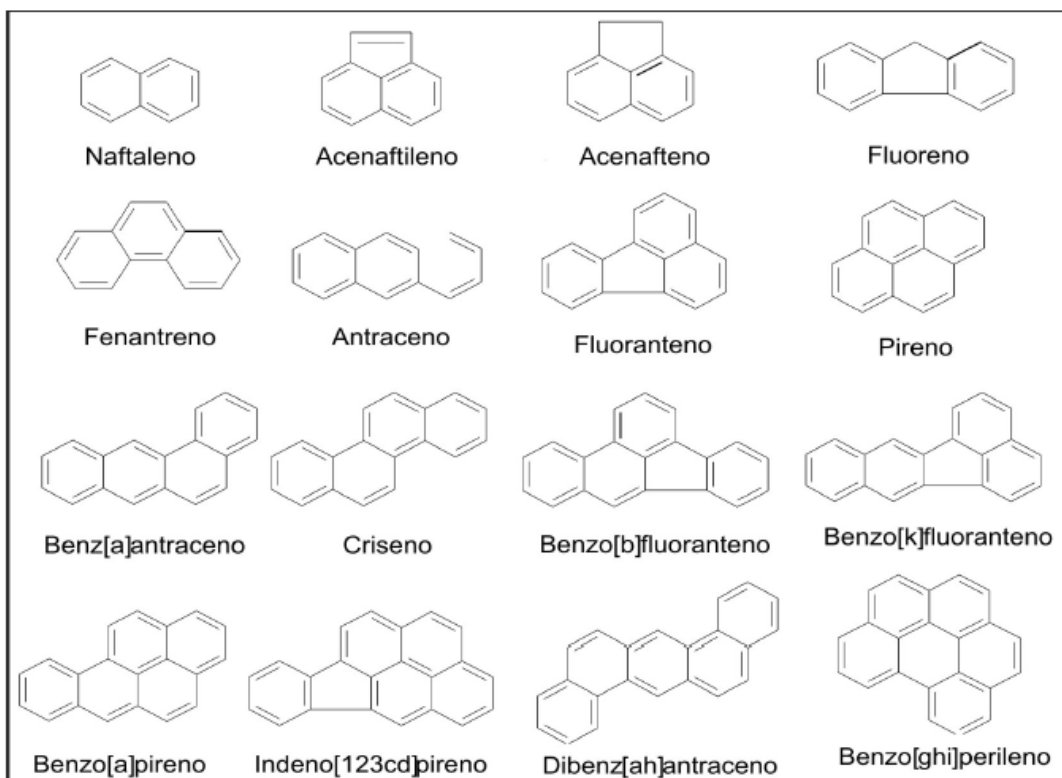


Figura 1: Estrutura e nomenclatura dos 16 HPA parentais prioritários em estudos ambientais de acordo com a Agência de Proteção Americana (USEPA), sendo os mais frequentemente reportados pela literatura (SCHIRMER et al., 1998)

McElroy e colaboradores (1989) destacam que a solubilidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na água é baixa (a solubilidade do naftaleno é 31mg L^{-1}) e diminui com o aumento de sua massa molar (até 4 ordens de magnitude entre os compostos de 2 a 6 anéis). Por apresentar solubilidade limitada na água e natureza hidrofóbica, a concentração dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) dissolvidos na água (associados à matéria orgânica dissolvida presente na água) é muito baixa. Devido a estas características, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) tendem a se adsorver em material orgânico natural sólido disponível na água (presentes nas partículas ou coloides em suspensão) e subsequentemente depositado nos sedimentos de rios, lagos e águas marinhas.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) podem passar por transformações através de mecanismos físicos, químicos e biológicos. Quando presentes na superfície da água ou durante o processo de sedimentação, podem ser foto-oxidados dentro da zona fótica ou biodegradados por fungos e bactérias, essa degradação biológica, no entanto, depende de fatores tais como disponibilidade de nutrientes, existência de substratos alternativos, concentração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e concentração dos microrganismos. Depende também do número de anéis na estrutura, quanto menor o número de anéis, maior a taxa de degradação do composto. Portanto, com o acréscimo da massa molecular dos compostos a resistência à degradação aumenta (CERNIGLIA, 1997). Estão sujeitos também a evaporação, com perdas seletivas dos compostos de baixa massa molar (abaixo de 150 unidades de massa atômica) e baixo ponto de ebulição (abaixo de aproximadamente 175°C) (STOUT et al., 2001).

2.4 Petróleo e poluição hídrica

O mundo atual está cada vez mais dependente do petróleo e de seus derivados para a manutenção de sua atividade industrial. Durante a exploração, o refino, o transporte e as operações de armazenamento do petróleo e/ou de seus derivados podem vir a ocorrer derramamentos acidentais ocasionando a contaminação de solos, rios e mares. Tais ocorrências vêm motivando, principalmente, a realização de pesquisas relacionadas com a remediação de sítios contaminados (AISLABIE et al., 2004; MARÍN et al., 2006).

O que se tem notado, nas duas últimas décadas, é que a poluição causada por petróleo e seus derivados tem sido um dos principais problemas ao meio ambiente. Quando ocorre o derramamento de gasolina em solos, uma das principais preocupações é a contaminação das águas subterrâneas, que também podem contaminar, especialmente, os aquíferos que são usados como fontes de abastecimento de água para o consumo humano (CUSTANCE et al., 1992).

O comércio internacional de petróleo baseia-se essencialmente no transporte marítimo, que vem se expandindo bastante pelo aumento tanto da frota de petroleiros como do tamanho destes. Isto significa que tanto a probabilidade como as consequências de um acidente também aumentaram enormemente. A experiência dos grandes acidentes de derramamento de óleo mostrou a importância dos danos causados ao meio ambiente, prejudicando a vida marinha, a pesca e o turismo. Os mares e os oceanos são uma fonte abundante de recursos biológicos e naturais, comparáveis ou até mesmo superiores às florestas tropicais, essenciais para determinar o clima da Terra. São responsáveis pela constante reciclagem de produtos químicos, nutrientes e água e apresenta-se como uma fonte importantíssima de alimentos e emprego, além de constituírem vias naturais de comunicação, transporte e comércio (CARDOSO, 2007).

A maior parte do óleo que chega aos oceanos é proveniente de eventos menos agudos, como descargas rotineiras de navios, poluição atmosférica e óleo lubrificante descartado em águas. Entretanto, são os derramamentos provenientes de dutos e navios que recebem maior apelo para seu combate, dado a grande visibilidade e pelas consequências trágicas que a poluição aguda pode provocar sobre os ecossistemas atingidos (SOUZA FILHO, 2006).

Na tentativa de estimar a contaminação por hidrocarbonetos de petróleo e derivados, numerosos índices geoquímicos têm sido propostos a partir das concentrações dos diferentes compostos aromáticos e saturados. Estudos visando determinar valores máximos e mínimos de concentrações de hidrocarbonetos em sedimentos, são realizados em diversas partes do mundo, objetivando a criação de parâmetros referenciais para os estudos de avaliação do comprometimento ambiental dos ecossistemas marinhos (MAI et al., 2002),

Grischenko et al., (2000) destacam os acontecimentos recentes ocorridos no Brasil, que incluem a liberação de petróleo bruto e óleo combustível em terra e ecossistemas costeiros, relacionados aos incidentes ocorridos na Baía da

Guanabara (Rio de Janeiro), nos rios Barigui e Iguassú (Paraná) e no canal de São Sebastião (São Paulo), que resultaram em danos aos ecossistemas atingidos. Na Baía da Guanabara foram liberados cerca de 1300 m³ de óleo MF-380 como consequência do rompimento de um oleoduto em refinaria da Petrobrás. O episódio ocorrido no Paraná consistiu da liberação de 4.000 m³ de petróleo bruto (41° API), também pelo rompimento de um oleoduto da Petrobrás. O derrame ocorrido no canal de São Sebastião consistiu da liberação de cerca de 86 m³ de petróleo bruto devido à colisão de um navio petroleiro com o cais do terminal da Petrobrás. Além desses três episódios citados, o naufrágio da plataforma de petróleo P-36, da Petrobrás – ocorrido em março de 2001 – também ocasionou derramamento de óleo, só que diferentemente dos outros episódios relatados, como a plataforma encontrava-se em alto-mar e também pela ação de resposta da empresa, não foram observados danos aparentes a áreas ambientalmente sensíveis ou de intensa utilização humana.

A maior parte do petróleo brasileiro é extraída de plataformas de produção instaladas no mar, em sua maioria, na Bacia de Campos. Além disso, parte do petróleo utilizado no país é transportada por via marítima, principalmente para o abastecimento de refinarias localizadas em áreas distantes das zonas produtoras de petróleo, as quais recebem óleos nacionais e/ou importados, para comporem “blends” (misturas de óleos brutos) adequados aos seus processos de refino. Conclui-se que as rotas de navegação e os terminais de carga e descarga de óleo são os ambientes de maior risco para a introdução aguda de poluentes advindos da indústria do petróleo, decorrentes do transporte de óleo bruto, combustíveis e lubrificantes. Outras vias de introdução não tão aparentes, mas também danosas, consistem de operações de lavagem de tanques de embarcações e da descarga de água de lastro contaminada por óleo, dentre outras operações irregulares, já que se trata de episódios bastante frequentes em que quantidades relativamente pequenas de óleo são descartadas de forma inadequada e acabam por poluir o meio ambiente de forma crônica (SOUZA FILHO, 2006).

Segundo informações da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (Brasil) (2012) no final de 2011, as reservas totais de petróleo do Brasil foram contabilizadas em 30,1 bilhões de barris, um acréscimo de 5,7% frente a 2010. Já as reservas provadas aumentaram 5,6% e atingiram a marca de 15 bilhões de barris, volume que representou 50% das reservas totais. Das reservas

provadas, 93,9% se localizavam em mar, com destaque para o Rio de Janeiro – que deteve 85,9% das reservas provadas offshore e 80,7% do total, conforme mostra a figura 2.

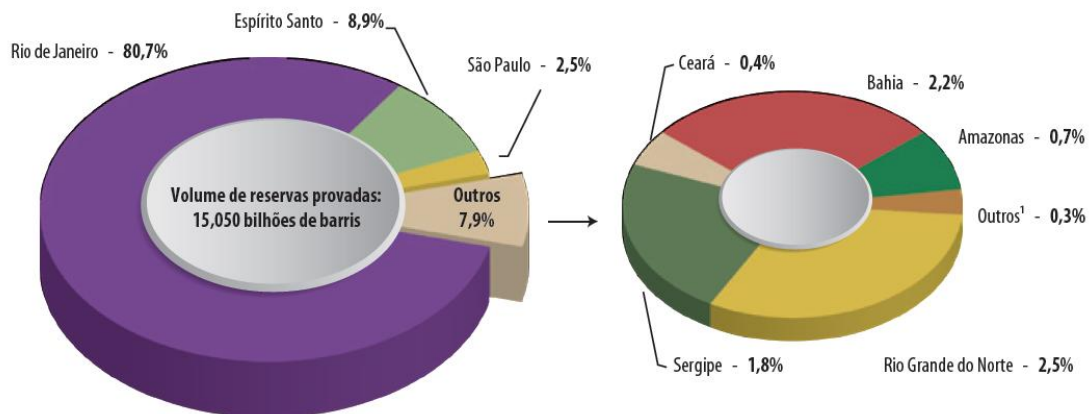


Figura 2: Distribuição percentual das reservas provadas de petróleo, segundo unidades da Federação – 31/12/2011.
Fonte: ANP/SDP, 2012.

De acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (Brasil) (2012) em 2011 o Brasil ocupou a 14ª posição no ranking mundial de países com as maiores reservas provadas de petróleo. São Paulo foi o estado que registrou o maior crescimento em 2011, sua produção offshore subiu 164,9%, para 14 milhões de barris, seguido do Espírito Santo, com 47,1% e uma produção de 110,7 milhões de barris em mar. Em terra, novamente o Rio Grande do Norte foi o estado que mais produziu: 18,6 milhões de barris, após um aumento de 4,1% em relação a 2010. Em 2011, foram produzidas no Brasil 54 correntes de petróleo com densidade média de 24,36 graus API e teor de enxofre de 0,54% em peso. A relação reserva/produção (R/P) de petróleo passou de 18,5 anos em 2002 para 19,6 anos em 2012, crescendo a uma taxa média de 0,7% ao ano no período.

De acordo com a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (Brasil) (2012), no ano de 2005 a produção nacional de petróleo (terra e mar) no Brasil chegou a 94.796.734 m³/ano, sendo que 2,41% desta produção provém da Região Amazônica. O potencial de petróleo e gás natural da região Amazônica é muito significativo. Atualmente, a produção de petróleo no

estado foi de 2.285.586 m³/ano de óleo de excelente qualidade e 3.567.205 (x 10³) m³/ano de gás natural. Segundo estimativas, a meta é de produzir 45.000 bbl de óleo e 6 milhões de m³ de gás natural na Bacia do Solimões. Atualmente, a região Amazônica detém a segunda reserva de gás natural do Brasil, com 90.109 m³, perdendo apenas para a Bacia de Campos (RJ), com cerca de 300.109 m³.

Por ser a segunda maior produtora terrestre de petróleo do Brasil, a região amazônica, como a várzea dos rios Urucu e Amazonas (rota de transporte do petróleo Coari-Manaus), estão em constante risco de acidentes ambientais. Os estudos que avaliam os danos causados à vegetação e animais são escassos, sendo que um derramamento de petróleo teria consequências catastróficas ao papel ecológico fundamental das espécies que participam da reciclagem de carbono e nutrientes da várzea. Caso essas plantas sofram agressão por meio do derramamento de petróleo, uma série de efeitos diretos e indiretos pode modificar todo o ecossistema do local (LOPES et al., 2005).

As regiões com atividades petrolíferas na Amazônia são a planície de inundação (várzea) dos rios Urucu e Amazonas. As várzeas são as regiões mais densamente povoadas da Amazônia, pois seus solos possuem quantidade de nutrientes maior que a de terra firme, o que permite a agricultura (JUNK, 2000). Recentemente, essas áreas têm sido expostas a atividades antrópicas, como a extração e o transporte de substâncias potencialmente tóxicas, a exemplo do petróleo extraído de Urucu (Coari, AM).

Os poucos estudos realizados com a utilização de petróleo de Urucu mostram a alta toxicidade deste sobre as plantas aquáticas (LOPES et al., 2005) e sobre peixes amazônicos, nos quais a ingestão do petróleo, ou mesmo a parte solúvel em água, provocou danos respiratórios (VAL; ALMEIDA-VAL, 1999).

No Amazonas, alguns eventos de derramamento de petróleo aconteceram e foram de grande impacto. Deve-se novamente ressaltar que eventos em pequena escala são importantes, mas que muitas das vezes não são notificados. Em 2013, uma balsa tombou e causou o vazamento de óleo no rio Negro, nas proximidades do Porto do São Raimundo, na Zona Oeste de Manaus. O acidente causou vazamento de aproximadamente 60 mil litros do óleo no local (HENRIQUES, 2013).

Em 27 de outubro de 1979, o petroleiro Gunvor MAERSK se incendiou e derramou 12.000 t de óleo combustível no rio Amazonas (Marinha do Brasil).

Nas regiões urbanas, as ruas, os igarapés que cortam a cidade e as águas subterrâneas, são afetadas pelos pequenos vazamentos frequentes que acontecem de óleos combustíveis. Estes pequenos derramamentos são negligenciados, mas são de grande importância, pois afetam diretamente a saúde humana, principalmente quando estes compostos nocivos se diluem nas águas subterrâneas, que por sua vez, serão consumidos com a água dos poços artesianos. Igarapés são também o destino de muitos dejetos humanos e resíduos sólidos.

Além dos impactos diretos do derramamento de petróleo sobre o ambiente natural e recursos naturais (a água, o solo, os animais e plantas), a liberação de componentes constituintes do petróleo pode atingir grandes escalas e permanecer por tempos prolongados. Um exemplo é a liberação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA) e benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos - isômeros: orto-, meta- e para-xileno (BTEX) que são extremamente perigosos.

Diante desse cenário com uma crescente produção de petróleo no Brasil, o ecossistema passa a ser mais vulnerável devido aos grandes derrames de petróleo e derivados. Assim, o comportamento de óleos derramados nos mais diversos ecossistemas, e principalmente no mar, depende da composição química do petróleo, e também, da atuação de processos como evaporação, dispersão, emulsificação, dissolução, biodegradação, oxidação e das interações entre óleo, sedimentos e água. A combinação destes processos é conhecida como intemperismo, o qual reduz a concentração de diferentes grupos de compostos, modificando as características químicas e físicas do petróleo (SOUZA e TRIGÜIS, 2005).

Os processos de intemperismos, que atuam sobre um óleo derramado no mar, podem ocorrer simultaneamente, mas a diferentes velocidades. A velocidade e a extensão desses processos dependem das propriedades físicas e químicas do óleo original e de condições ambientais como: temperatura, velocidade e direção dos ventos e das correntes marinhas. A evaporação é a responsável pelas mudanças mais importantes ocorridas no óleo durante um derrame. Nos ambientes tropicais, as temperaturas elevadas fazem com que a perda por evaporação dos componentes voláteis do petróleo seja mais rápida, diminuindo seus efeitos tóxicos sobre a microflora local (SOUZA FILHO, 2006).

Os compostos saturados, predominantes na maioria dos óleos, são os mais suscetíveis à evaporação, biodegradação e à dispersão. Os compostos aromáticos

de baixo peso molecular são parcialmente solúveis em água, mas evaporam rapidamente após um derrame. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) de elevado peso molecular não apresentam o mesmo comportamento, sendo considerados tóxicos aos organismos aquáticos, em função do seu potencial carcinogênico e neurotóxico (SOUZA e TRIGÜIS, 2005).

Segundo Mariano (2006), cerca de 24h após o derramamento de petróleo, a água e o óleo formam uma emulsão que tem como principais consequências a redução da quantidade de luz solar disponível, devido à formação de um filme de óleo. Tal fato reduz a taxa de fotossíntese, prejudicando o fitoplâncton. A toxicidade de certas frações do petróleo (tolueno, xileno, benzeno e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) pode provocar a morte de certos organismos (moluscos, peixes e crustáceos) dependendo do tipo de óleo e da quantidade presente no meio aquático.

Outras consequências observadas 24h após o derramamento são a aderência do óleo sobre os corpos dos animais, mamíferos, peixes, pássaros, crustáceos, causando prejuízo à saúde ou até mesmo a morte. A porção de petróleo que se deposita no fundo do mar forma um sedimento prejudicando os organismos aquáticos, principalmente a fauna benthica, que é particularmente suscetível, bem como os ovos dos peixes depositados nesses locais (BENTO et al., 2005).

Segundo Delille (1998), as principais consequências a nível ambiental e socioeconômico dos vazamentos de óleo em sistemas aquáticos são a redução dos nutrientes essenciais (nitratos e fosfatos) por decompositores que utilizam o óleo como fonte de carbono; a redução da oxigenação devido ao processo biológico de degradação do óleo e ao aumento da biomassa microbiana; aumento dos microrganismos heterotróficos em relação aos autotróficos, visto que os últimos não resistem à escassez de luminosidade, de oxigênio e de nutrientes e acabam morrendo; o desaparecimento dos peixes nas zonas atingidas, suspendendo a pesca; a mortandade de moluscos devido à ingestão de grande quantidade de substâncias tóxicas, os tornando impróprios para consumo e prejudicando sua comercialização; o prejuízo turístico quando as praias são atingidas; o cheiro intenso do óleo que provoca mal-estar na população e o prejuízo para as companhias petrolíferas.

Burns et al., (2000) destacam que as consequências ocorrem tanto a nível ambiental como sócio-econômico ou seja, configura-se um quadro de externalidades ambientais imprevisíveis.

Segundo Gogou et al., (2000), quando ocorrem acidentes ambientais envolvendo aporte de óleo e/ou derivados em ambientes marinhos, muitos são os tipos de problemas sentidos pela fauna e flora e, conseqüentemente, pela comunidade humana que vive nas proximidades das áreas atingidas pelos poluentes.

Os frequentes derramamentos de petróleo e seus derivados registrados em solos brasileiros vêm motivando o desenvolvimento de novas técnicas que visam, principalmente, a descontaminação dessas matrizes. Diante disso, diversas técnicas, físicas, químicas e biológicas, vêm sendo desenvolvidas para a remoção ou a degradação *in-situ* ou *ex-situ* de petróleo derramado e para a redução de seus efeitos sobre o ecossistema, especialmente os tóxicos. Dentre as técnicas desenvolvidas, a “biorremediação” vem se destacando como uma alternativa viável e promissora para o tratamento de solos e águas contaminadas por petróleo e seus derivados (BENTO et al., 2005).

2.5 Biotecnologia e biorremediação

O interesse industrial na biotecnologia e o reconhecimento de sua importância por todos os países industrializados possibilitam modificações no tratamento de efluentes e torna emergente a necessidade de novas tecnologias. Sendo assim, o maior estímulo para o estudo do crescimento de microrganismos na presença de hidrocarbonetos, consiste na possível utilização destes organismos no tratamento da poluição do meio ambiente por compostos oleosos (CARVALHO et al., 2005).

Com o grande avanço tecnológico dos últimos anos, baseado na evolução das metodologias de biologia molecular aplicada ao estudo do meio ambiente, foi possível verificar que o conhecimento acerca da biodiversidade existente no planeta é praticamente insignificante. Sabe-se atualmente que apenas uma pequena parcela dos microrganismos presentes no meio ambiente (<10% em solos e <1% em ambientes aquáticos) pode ser cultivada em laboratório por técnicas padrões de cultivo (OLIVEIRA; MANFIO, 2006; COUTINHO et al., 2001).

Essas técnicas tornaram possível a caracterização de comunidades microbianas mistas em determinados ecossistemas, revelando os grupos atuantes, muitos destes até então desconhecidos (CUNHA et al., 2008). Várias técnicas vêm sendo desenvolvidas, dentre elas a metagenômica que vem ser a análise genômica da comunidade de microrganismos de um determinado ambiente por técnicas independentes de cultivo e contêm muito mais informação genética do que aquela verificada na diversidade microbiana cultivada. Essa análise pode permitir o acesso a 100% do material genético de toda biodiversidade encontrada no ambiente (OLIVEIRA; MANFIO, 2006).

Umas das técnicas que se destaca nesse cenário é a cromatografia e espectrometria de massas (CG/MS) ferramenta muito utilizada para identificar centenas de componentes em misturas orgânicas ou bioquímicas complexas. O espectro de massas usado como detector na cromatografia acoplada à espectrometria de massas (CG/MS) faz a caracterização dos compostos orgânicos através dos fragmentos iônicos produzidos pelo bombardeio das moléculas na fase vapor com um feixe de elétrons de energia. Este modo de ionização é denominado impacto eletrônico, cuja energia de bombardeamento pode variar de 12 a 100 eV. Imediatamente após a ionização da amostra, as moléculas ou os seus fragmentos ionizados entram no setor de análise do espectrômetro de massas, onde serão separados de acordo com a razão massa/carga (m/z). A velocidade de varredura é grande o suficiente para permitir a obtenção de diversos espectros de massas por pico eluído no cromatógrafo (COLLINS et al., 2006).

Wang e Fingas (1997) utilizaram a técnica de cromatografia e espectrometria de massas (CG/MS) para identificar e quantificar hidrocarbonetos em amostras de óleo bruto, de óleo biodegradável, amostras ambientais de derramamento de petróleo em diferentes concentrações, composição e natureza. Os compostos analisados incluem alcanos normais, isoprenóides, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), alquil benzeno, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e os seus homólogos alquilados, e biomarcadores triterpanos e esteranos. Os autores relatam que a técnica de cromatografia acoplada à espectrometria de massas (CG/MS), é a mais apropriada para estudo de intemperismo, acompanhada das mudanças da composição química do óleo derramado. Aplicada também à identificação da fonte de petróleo, para um conhecimento detalhado da composição,

uma vez que cada tipo de óleo apresenta uma distribuição diferente de componentes.

A biorremediação pode ser considerada como uma nova tecnologia para tratar locais contaminados mediante o uso de agentes biológicos capazes de modificar ou decompor poluentes alvos. Estratégias de biorremediação incluem: a utilização de microrganismos autóctones, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (biorremediação intrínseca ou natural); a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e biossurfactantes (bioestimulação); e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento) (MARIANO et al., 2007). O benefício desses processos é a mineralização do poluente, isto é, a transformação em gás carbônico, água e biomassa. Este processo teve início em 1988, quando cientistas começaram a utilizar microorganismos para limpar poluentes e lixo tóxico (TORTORA, et al., 2008). A partir daí vários estudos têm sido conduzidos na tentativa de decompor os diversos tipos de poluentes.

Diante do exposto, a biorremediação tem sido um processo de crescente pesquisa, pois tem como vantagem oferecer maior segurança e menores danos ao meio ambiente, além de ser uma ferramenta eficiente e de baixo custo. O Brasil vem intensificando estudos na área de biorremediação de solos, rios e mares, objetivando reduzir alguns impactos ambientais resultantes de derramamentos acidentais de óleo (ABBAS, 2003; SANTOS, et al., 2007).

A verificação da ocorrência de biorremediação natural exige a caracterização da geologia, hidrologia e ecologia microbiana local. Para a biodegradação dos hidrocarbonetos é essencial uma reação de oxi-redução, em que o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétron) e um aceptor de elétron é reduzido. Existem diferentes compostos que podem agir como aceptores de elétrons, entre eles o oxigênio (O_2), o nitrato (NO_3^-), os óxidos de Fe (III), o sulfato (SO_4^{2-}). Assim, mediante o acompanhamento da evolução espacial e temporal da concentração desses indicadores geoquímicos presente na água subterrânea é possível verificar como está ocorrendo a biorremediação natural de um local contaminado. Além dos aceptores de elétrons, outras variáveis podem ser relacionadas a processos biológicos, como o pH e o potencial redox (CHEON et al., 2004; KAO e WANG, 2000; RÖLING e VERSEVEL, 2002). Outro ponto a ser considerado na execução de tratamentos biológicos é a necessidade de testes laboratoriais prévios para se

determinar o potencial microbiológico em degradar determinado poluente em um local específico (MARIANO, 2006).

A capacidade em degradar hidrocarbonetos do petróleo é realizada por diversos microrganismos, principalmente fungos e bactérias (RODRIGUES e DIAS-FILHO, 1996). Os microrganismos podem ser encontrados praticamente em todos os lugares no nosso planeta, eles contribuem enormemente para a manutenção do equilíbrio entre os seres vivos e os compostos químicos do nosso ambiente (TORTORA, et al., 2008).

O número de microrganismos e a diversidade de espécies são fatores primordiais para a eficácia do tratamento por biorremediação da área impactada. Sabe-se que quanto maior for a versatilidade enzimática e o número de células metabolicamente ativas, maior será a eficiência da degradação do contaminante. A diversidade microbiana do solo ainda é pouco conhecida, no entanto alguns gêneros de bactérias e fungos apresentam destaque no que concerne à biorremediação de compostos xenobióticos, principalmente àqueles derivados de combustíveis fósseis (ROLING et al., 2003).

Desde a década de 1950, vêm sendo isoladas bactérias degradadoras destes compostos, pertencentes principalmente aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Gordonia* entre outros (JACQUES, et al., 2007; MUTNURI, 2005) e vários fungos dos gêneros *Cunninghamella*, *Phanerochaete*, *Fusarium*, *Candida penicillium*, *Pleorotus*, *Trametes*, *Aspergillus*, *Bjerkandera*, *Chrysosporium*, entre outros. No entanto, nos últimos anos, tem sido dada atenção à obtenção de consórcios microbianos, que comparativamente às culturas puras, apresentaram-se mais efetivos na degradação destes compostos. Estes consórcios apresentam maior capacidade de utilização de um grande número de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) como fonte de carbono e, principalmente, podem mineralizar completamente estes compostos, devido à complementariedade metabólica entre os membros do consórcio, em que os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) seriam transformados em gás carbônico e água através da ação de mais de um microrganismos (JACQUES, 2005).

Richard & Vogel (1999), estudando um consórcio bacteriano degradador de óleo diesel no solo, verificaram que, dos setes membros deste consórcio, quatro não

utilizavam diretamente o óleo como fonte de carbono e energia. Entretanto, a presença destes aumentava a produção de gás carbônico pelo consumo intermediário produzido pelos demais membros.

Em geral, a composição química dos contaminantes é heterogênea e altamente complexa. Dessa forma é improvável a existência de um único microrganismo, que naturalmente, seja capaz de decompor todas as substâncias químicas presentes. Por isso, em processos de biorremediação é comum o emprego de consórcios microbianos para obter um melhor resultado final (GHAZALI et al., 2004).

Hamme, Sigh & Ward (2003), mencionam que os microrganismos com a capacidade de utilizar petróleo e seus derivados como fontes de carbono e energia são chamados de hidrocarbonoclásticos. Essa população microbiana possui em seu material genético, os genes específicos para a produção das enzimas que atuam no processo de biodegradação.

É possível encontrar essas espécies em ambientes sem histórico de contaminação. Nesse caso, a sua detecção pode ser dificultada pela predominância de outras populações mais adaptadas ao ambiente natural. Contudo, em casos de contaminação pode haver a seleção e aumento das populações tolerantes e com potencial para a degradação ao contaminante (OLLIVIER & MAGOT, 2005). Entretanto, é importante ressaltar que o aumento da população com potencial degradador só ocorre se o solo apresentar condições favoráveis. Semple e colaboradores (2001), destacam que a biorremediação de solos pode ser afetada por diferentes fatores como a concentração de oxigênio dissolvido, pH, temperatura, presença de metabólitos tóxicos, potencial de oxi-redução, disponibilidade de nutrientes e umidade. Moreira & Siqueira (2006) citam como exemplo, que em alguns casos, o solo pode conter um grande teor de matéria orgânica que se encontra humificada e, portanto, não disponível para o consumo imediato, essa característica permite que as fontes de carbono sejam lançadas paulatinamente no solo funcionando como um mecanismo de controle da dinâmica populacional.

Alexander (1999) destaca que no ambiente natural, resíduos de plantas e animais mortos são fontes de carbono disponíveis para a pronta assimilação pelos microrganismos autóctones. Em contrapartida, em situações de contaminação o xenobiótico pode interagir com a matriz do solo e tornar-se indisponível para a biodegradação. Além da fonte de carbono, outros elementos nutricionais são

limitantes para o desenvolvimento dos microrganismos, em especial fontes de nitrogênio e fósforo, cujas concentrações devem ser convenientemente ajustadas. Esses elementos são fundamentais para as funções vitais dos microrganismos como na síntese de material genético (RNA e DNA) e proteínas, e para a geração de energia (ATP) (ROGERS et al., 1993).

A presença de oxigênio, que atua como doador de elétrons estimula o metabolismo aeróbico, permitindo a geração de maior quantidade de energia para as células. No entanto, na sua ausência outros compostos podem substituí-lo como, por exemplo, NO^{-3} , SO_4^{-2} , Mn^{+4} e Fe^{+3} , estabelecendo uma condição de anaerobiose (MADIGAN et al., 2004).

Condições aeróbias são necessárias para que ocorra a biodegradação relativamente rápida de hidrocarbonetos de petróleo, uma vez que a degradação anaeróbia destes compostos já foi demonstrada como sendo extremamente lenta (BANERJI et al., 1995). O oxigênio é utilizado pelos microrganismos não só como aceitor final de elétrons na respiração aeróbia, mas também como substrato nas reações biodegradativas catalisadas pela enzima oxigenase. Isto inclui o rompimento dos anéis, a hidroxilação dos compostos aromáticos e a oxidação dos compostos alifáticos (PROVIDENTI et al., 1993). A adequada aeração do sistema solo/contaminante é, portanto, essencial ao processo de biodegradação aeróbia.

A presença de água e sua disponibilidade, assim como os nutrientes também são fundamentais, já que estão diretamente relacionadas à homeostase e ao transporte de nutrientes através da membrana celular. Com exceção dos períodos de chuva ou irrigação, os solos contêm quantidades de água insuficientes para suportar o pleno funcionamento do metabolismo microbiano, pois normalmente a água é drenada até atingir o lençol freático (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Reduzidos teores de umidade afetam negativamente o metabolismo microbiano, a movimentação dos microrganismos nos diferentes sistemas, assim como o transporte dos nutrientes através destes. Durante o processo de biorremediação de solos contaminados o teor de umidade deve ser mantido entre 50 a 80% da capacidade de retenção do solo para que taxas ótimas de degradação sejam obtidas (DEUEL & HOLLLDAY, 1997). Por outro lado, teores excessivos de umidade limitam o transporte de oxigênio no solo (PROVIDENTI et al., 1993).

A temperatura tem profundo efeito não só nas características físicas (solubilidade, sorção, viscosidade, volatilização) dos contaminantes presentes no

solo, mas também no metabolismo microbiano (PROVIDENTI et al., 1993; BANERJI et al., 1995). Em temperaturas baixas, hidrocarbonetos líquidos se transformam em parafinas sólidas, hidrocarbonetos solúveis precipitam e ocorre uma queda considerável na solubilidade destes. Estas características físicas alteradas podem interferir significativamente na disponibilização destes contaminantes para os microrganismos responsáveis pela biodegradação, afetando assim as taxas de degradação dos mesmos. Na camada superior do solo, onde se concentra o maior número de microrganismos, praticamente a temperatura não varia, estando próxima da temperatura ambiente do local. Por isso, os microrganismos são predominantemente mesófilos (MADIGAN et al., 2004).

D'Esposito (1999), relata que a concentração do íon hidrogênio no solo é outro parâmetro de relevância que deve ser considerado. Em geral, em solos ácidos predominam fungos, enquanto que em solos neutros predominam bactérias, o pH também afeta o potencial de oxi-redução, que pode ainda ser influenciado pela temperatura, pressão e compostos presentes. A coexistência de microrganismos aeróbios, facultativos e anaeróbios na mesma amostra de solo indica que pode haver micro nichos próximos com diferentes valores (BANERJI et al., 1995).

Providenti et al., (1993), destaca que a atividade microbiana é fortemente dependente do pH do meio, da mesma forma, a solubilidade dos contaminantes e a possibilidade de sorção deste em diferentes matrizes como o solo podem variar em função do pH.

Moreira e Siqueira (2006) descrevem que as rotas metabólicas da degradação dependem de um conjunto de fatores determinados pela estrutura química funcional do composto, da capacidade do microrganismo em promover a degradação e do ambiente, como tipo de solo, local alcançado pelo composto, que pode ser de difícil acesso pelo microrganismo, bem como as condições desse ambiente para o organismo envolvido. Os estudos pioneiros em biorremediação visavam principalmente à degradação de matéria orgânica, muito comum em resíduos domésticos destinados a lixões e aterros sanitários (BRITO, 2005). Mais recentemente, estudos envolvendo biorremediação de compostos químicos de composição variada e elevado potencial de toxidez também apresentam grandes avanços (GAYLARDE et al, 2005). Desta forma, diante da crescente geração de resíduos por indústrias, sistemas agrícolas, acidentes diversos com diferentes poluentes, como por exemplo, óleos e derivados de petróleo, existe uma grande

preocupação com o meio ambiente, levando à busca de maiores conhecimentos sobre a degradação de tais compostos.

2.5.1 Processos de biodegradação do petróleo e seus derivados por bactérias e fungos

A biodegradação do petróleo envolve todos os fenômenos de quebra de seus componentes para componentes de menor peso molecular ou mais polares. A biodegradação completa dos hidrocarbonetos resulta como membros finais o dióxido de carbono e a água. A biodegradação do petróleo por populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos primários pelo qual os compostos poluentes são eliminados do meio ambiente. Alguns compostos do petróleo são facilmente evaporados ou biodegradados, enquanto outros persistem recalcitrantes na natureza (ATLAS, 1977; LEAHY & COLWELL, 1990). Baird, (2002), definiu a biorremediação como “o uso de microrganismos vivos para degradar ou eliminar resíduos ambientais”.

Zobell (1946) um dos pioneiros da pesquisa com microrganismos demonstrou a capacidade de certos microrganismos utilizarem hidrocarbonetos como fonte de carbono. Mostrou que esses microrganismos eram amplamente distribuídos na natureza e que a utilização de hidrocarbonetos era altamente variável de acordo com a natureza química do composto na mistura do petróleo e com as condições ambientais.

Rodrigues (1984) e Baird (2002) destacam que os microrganismos necessitam de condições ambientais de crescimento, por sua vez, a velocidade e a extensão com que os componentes do petróleo são degradados dependem da existência de pelo menos quatro fatores principais:

- I. Umidade, para facilitar as reações;
- II. Oxigênio, para rápida oxidação dos hidrocarbonetos e outros compostos do petróleo. Sob condições anaeróbicas a biodegradação é mais lenta e normalmente efetuada por bactérias sulfato-redutoras;
- III. Contato óleo-água, devido à relativa insolubilidade do óleo na água. Esse contato controla a velocidade de oxidação e da degradação;

IV. Presença de nutrientes (fosfatos, sulfatos, nitratos) para o desenvolvimento microbiano.

Como a degradação de hidrocarbonetos para CO_2 envolve uma reação de oxidação, os organismos, em sua maioria, são aeróbios. O destino dos hidrocarbonetos, além da produção de CO_2 na degradação total, pode também oferecer caminhos alternativos ainda pouco estudados.

2.5.2 Caracterização e biorremediação dos Hidrocarbonetos Alifáticos

Os hidrocarbonetos de cadeia carbônica linear e de comprimento intermediário são mais susceptíveis a biodegradação do que os de maior tamanho ou de cadeias anelares. Com o aumento da cadeia carbônica, estes compostos tornam-se menos disponíveis ao ataque microbiano devido à hidrofobicidade, dificultando assim a biodegradação. A biodegradação aeróbia dos alcanos lineares envolve a ação de enzimas denominadas de monoxigenases capazes de transformar estes compostos em alcoóis correspondentes pela oxidação do grupo terminal, conseqüentemente os alcoóis produzidos são oxidados a aldeídos e posteriormente a ácidos graxos os quais são degradados, pela via da oxidação (BALBA, 2001).

Pereira Jr (2009) destaca que um grande número de bactérias, fungos e leveduras mostram-se capazes de metabolizar os hidrocarbonetos alifáticos e por este motivo, muitos vêm sendo estudados acerca de suas fisiologias, sobretudo no que diz respeito aos mecanismos de assimilação de contaminantes e aos processos metabólicos responsáveis pela iniciação do catabolismo dos mesmos. Os hidrocarbonetos alifáticos representam, para os microrganismos, uma fonte de substrato em potencial. Esta classe engloba substâncias gasosas (como metano e etano), líquidas e sólidas, sendo que o estado líquido prevalece em compostos de até 20 átomos de carbono, patamar além do qual predominam os sólidos. O estado físico é em muito responsável pela susceptibilidade ao ataque microbiano. Os hidrocarbonetos alifáticos englobam tanto cadeias lineares, como ramificadas. No entanto, todos os compostos são insolúveis e hidrofóbicos, características facilmente explicáveis, pelo fato de só existirem ligações do tipo carbono-carbono e carbono-hidrogênio. Coerentemente, a solubilidade é inversamente proporcional à massa

molecular e exerce influência marcante nas taxas de metabolização da matéria orgânica.

Banerji e colaboradores (1995) afirmam que os agentes degradadores desta classe de compostos apresentam diferentes afinidades pelos substratos. Em geral compostos gasosos e líquidos são mais rapidamente atacados, muito embora hidrocarbonetos líquidos de baixa massa molecular confirmem certo efeito inibitório sobre os microrganismos, face ao caráter solvente dos mesmos. No outro extremo, parafinas de C20 a C40 normalmente obstruem a ação microbiana, exatamente pelo fato de serem sólidas e hidrofóbicas.

2.5.3 Caracterização e biorremediação dos hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem a classe de compostos orgânicos perigosos que contém dois ou mais anéis benzênicos condensados, podendo se apresentar sob a forma linear, angular ou, ainda, em forma de cacho. Dentre as diferentes origens dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) destacam-se os resíduos oleosos. O desaparecimento dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) pode ser causado por diferentes fatores, tais como volatilização, foto-oxidação, oxidação química, bioacúmulo, adsorção em partículas sólidas, lixiviação e degradação microbiana (PEREIRA Jr., 2009).

Conhece-se atualmente, uma grande variedade de bactérias, fungos e algas que apresentam a habilidade de metabolizar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Os gêneros e espécies mais representativos encontram-se largamente listados na literatura (CERNIGLIA e HEITKAMP, 1989).

Ressalta-se, no entanto, que a susceptibilidade ao ataque microbiano é inversamente proporcional ao número de anéis condensados compreendidos na molécula do contaminante e diretamente proporcional à sua solubilidade em água. Os processos de degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) como o naftaleno, fenantreno, antraceno e acenafteno já serviram como objetos de muitos estudos, o que contribuiu em muito para a elucidação das vias bioquímicas envolvidas. O antraceno é um hidrocarboneto policíclico aromático (HPAs) de produção industrial, determinado a partir do carvão, conhecido vulgarmente como

óleo de antraceno ou ainda como óleo verde. O antracino ou ainda paranaftaleno, como também é conhecido, é formado por três anéis aromáticos, arranjados de forma linear, apresentando massa molecular de 178,2g, tem sido bastante utilizado como modelo para estudos envolvendo a dinâmica destes compostos no ambiente, devido ao fato de ser menos tóxico quando comparado aos demais hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (JACQUES, 2005). O fenantreno é utilizado na produção de corantes e explosivos do ponto de vista industrial. O isômero do antraceno apresenta-se com um dos três anéis aromáticos rearranjado de forma não linear em relação aos demais (Figura 3), conhecido ainda como fenantrin, apresenta massa molecular de 178,2g (VERSCHUEREN, 2001).

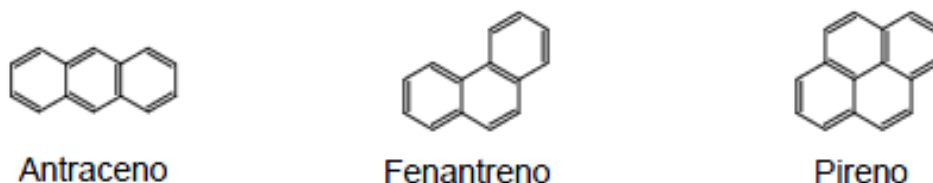


Figura 3: Fórmulas estruturais de alguns Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPAs)
Fonte: Nitschke e Pastore, (2002).

Quanto aos mecanismos de transformação destes substratos, foi descoberto que, tanto para organismos procariontes como eucariontes, faz-se necessária a presença de oxigênio molecular para dar início ao ataque enzimático. Outros sistemas enzimáticos como os das enzimas metanooxigenases e das ligninaperoxidasas também surgem como participantes ativos no catabolismo dos hidrocarbonetos poliaromáticos. Da mesma forma, o envolvimento de plasmídios na degradação do naftaleno e do fenantreno também foi relatado; muito embora pouco se saiba, ainda, sobre os mecanismos genéticos e regulatórios ligados ao consumo de HPAs de alta massa molecular. Bactérias e fungos apresentam algumas diferenças quanto à forma de ataque dos substratos em questão: enquanto os fungos filamentosos lançam mão da etapa de hidroxilação para dar início à destoxificação, a maioria das bactérias utiliza a oxidação como ponto de partida para a fissão dos anéis e posterior assimilação (PEREIRA Jr., 2009).

Normalmente os microrganismos degradadores destes compostos encontram-se em pequeno número, com populações maiores e mais ativas nos locais que se

apresentam contaminados. Amostras coletadas nestes locais possibilitaram o isolamento em laboratório de microrganismos que, com o auxílio de técnicas analíticas como cromatografia gasosa ou cromatografia líquida de alto desempenho, comprovaram a capacidade de degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Várias vias metabólicas de degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) já foram identificadas em diferentes microrganismos, porém as mais estudadas são do metabolismo aeróbico realizado pelas bactérias, pelos fungos lignolíticos e pelos fungos não-lignolíticos (JACQUES, 2005).

2.5.4 Técnicas para a biorremediação

Uma grande variedade de tecnologias utilizadas na remediação de ambientes impactados por petróleo e seus derivados é conhecida e diante de um incidente envolvendo a liberação de grandes quantidades de petróleo ou produtos derivados, as medidas tomadas inicialmente são de natureza física, através de remoção mecânica do óleo. Em seguida, podem ser utilizadas substâncias químicas capazes de dispersar o contaminante, os surfactantes químicos. Em última instância, lança-se mão das medidas de remediação, dentre as quais se destacam as técnicas biotecnológicas (PEREIRA Jr., 2009).

A contaminação do solo, rios e mares é uma grande preocupação ambiental, uma vez que interfere no ambiente global da área afetada (água, ar, fauna, vegetação) podendo ocasionar problemas de saúde pública (LEMOS, 2008).

De acordo com Nunes (2008), a presença de substâncias químicas estranhas ao ambiente natural provoca um desequilíbrio físico-químico que, por sua vez, induzirá uma série de transformações nesse local até que seja atingida uma nova condição de equilíbrio. A biorremediação tem se mostrado como uma alternativa promissora na descontaminação do solo e da água.

Segundo Alexander (1999), as técnicas mais utilizadas na biodegradação de petróleo e seus derivados são: o aumento da microbiota do solo através da adição de microrganismos endógenos ou exógenos (Bioaumento e/ou Bioenriquecimento) e adição de fontes de nutrientes e oxigênio (Bioestimulo).

2.5.4.1 Processos Bióticos de Remediação

A biorremediação é um conjunto de técnicas biotecnológicas em que se utilizam microrganismos ou produtos e processos microbianos para a redução de impactos causados ao meio ambiente por contaminantes (ATLAS, 1995).

O local para o processo de biorremediação pode ser classificado como:

1) Remediação “*in situ*”: As técnicas de remediação “*in situ*” são aquelas em que não há necessidade de remoção do material, sendo a biorremediação no próprio local contaminado. Isso evita custos e distúrbios ambientais associados ao movimento do material contaminado para o local de tratamento (JACQUES, 2005; MARIANO, 2006). A remediação “*in situ*” pode ser:

a) Biorremediação passiva ou intrínseca: É um processo de atenuação natural de um contaminante orgânico, sem que haja acréscimo de nutrientes ou adequação de qualquer condição ambiental. Os microrganismos presentes no local passam então a utilizar o composto orgânico poluente como fonte de carbono, reduzindo assim sua concentração com o tempo (MENEGETTI, 2007).

De acordo com Mariano et al., (2007), a remediação natural não se trata de uma alternativa de ação de tratamento, mas sim uma forma de minimizar os riscos para a saúde humana e para o meio ambiente. A biorremediação passiva por ser uma técnica que depende exclusivamente dos processos naturais, torna-se muito lenta, o que exige o uso conjunto de outras técnicas e o monitoramento do local por um longo período de tempo (JACQUES et al., 2006).

b) Bioestimulação: Ao contrário da biorremediação passiva, na bioestimulação há um acréscimo de nutrientes orgânicos e inorgânicos que visam estimular a atividade microbiana (JACQUES et al., 2006).

Vários nutrientes devem estar disponíveis no meio ambiente, pois os microrganismos não dependem somente da energia do carbono. O nitrogênio e o fósforo são considerados fatores limitantes para a degradação microbiana, por isso são comumente utilizados na técnica de bioestimulação (BAPTISTA et al., 2003). O nitrato é também um componente importante na bioestimulação, pois ele é utilizado por alguns microrganismos em duas diferentes rotas metabólicas; como fonte de nutrientes no metabolismo assimilativo ou como receptor de elétrons no metabolismo (COSTA et al., 2008).

Para que o processo de bioestimulação possa ser utilizado, deve-se analisar primeiramente o local contaminado, para verificar a presença de uma população natural de microrganismos capazes de degradar o contaminante presente

(MARIANO, 2006). Gaylarde et al., (2005), relatam que as técnicas de bioestimulação demonstraram um aumento de 5 a 10 vezes nas taxas de degradação do contaminante. No entanto, existem dúvidas sobre os efeitos em longo prazo, uma vez que as taxas de degradação tendem a se equalizar com o tempo.

A biodegradação de um composto químico no meio ambiente depende, sobretudo, da presença, de uma população de microrganismos capaz de metabolizar a molécula original e seus produtos de degradação (GAYLARDE et al., 2005).

c) Bioaugmentação: O processo de bioaumento é aquele no qual há adição de microrganismos especializados. Frequentemente são empregadas populações de microrganismos autóctones, com objetivo de aumentar as taxas de biodegradação (MARIANO, 2006). Utiliza-se microrganismos que são previamente selecionados para se desenvolverem em certos poluentes, ou bactérias geneticamente modificadas que são adaptadas para metabolizar determinados produtos. O bioaumento é um processo de importante utilização em locais contaminados, principalmente naqueles que não possuem ou possuem em pequenas quantidades as populações de microrganismos necessários para que o processo de biodegradação ocorra (TORTORA, 2008).

Para que haja um efetivo benefício dessa técnica, condições mínimas devem ser fornecidas aos microrganismos que foram introduzidos no local, como: a manutenção do pH, a temperatura e o fornecimento de nutrientes. De acordo com Mariano (2006), a bioaugmentação quando é bem utilizada pode intensificar o processo de biodegradação do contaminante. Entretanto devem ser considerados os seguintes aspectos: a aprovação do órgão ambiental competente, sua eficiência e inocuidade ao ambiente e os microrganismos aplicados devem atuar em sinergia sem interferir nos processos biogeoquímicos naturais.

2.5.4.2 Processos de biorremediação “*ex situ*”

Na tecnologia “*ex situ*” o material contaminado é retirado do local de origem e encaminhado para outro adequado, esta técnica é necessária para evitar o alastramento do contaminante e é muito utilizada em contaminações de cursos de água e lençóis freáticos (SANTOS et al., 2007).

As técnicas de biorremediação “*ex situ*” produzem um resultado mais rápido, pois são mais fáceis de serem controladas e apresenta maior versatilidade para o tratamento de vários tipos de contaminantes. Entre as técnicas mais utilizadas nos processos “*ex situ*” destaca-se Landfarming, compostagem e os biorreatores.

a) Landfarming: de acordo com a NBR 13894 (1997) *in* Castro (2005), landfarming é um método de tratamento do solo, onde um substrato orgânico de um resíduo é degradado biologicamente na camada superior do solo. Em vários países inclusive no Brasil o biotratamento em “landfarming” é bastante utilizado em compostos de hidrocarbonetos de petróleo nas indústrias e refinarias. Este sistema pode ser citado como “*in situ*” ou “*ex situ*” quando é necessário fazer escavação (FERNANDES e ALCÂNTARA, 2004). A biodegradação é base deste tratamento, por isso é importante manter uma comunidade microbiana heterotrófica ativa. Para aperfeiçoar esse processo algumas condições devem ser monitoradas, como: o teor de umidade, a aeração, o pH, os nutrientes, permeabilidade, e volume do solo.

Para garantir sua efetividade o sistema landfarming deve ser monitorado periodicamente para que se possa verificar a redução da concentração dos constituintes, a emissão de vapores, a migração dos constituintes no solo e as águas subterrâneas (JACQUES et al., 2006)

De acordo com Tocchetto (2008), a eficiência do landfarming depende das características do solo, dos constituintes do resíduo e de circunstâncias climáticas.

b) Compostagem ou biopilhas: Fernandes e Silva, (1999), destacam que a compostagem pode ser definida como uma biooxidação aeróbica exotérmica de um substrato orgânico heterogêneo, no estado sólido, caracterizado pela produção de gás carbônico, água, liberação de substâncias minerais e formação de matéria orgânica estável.

Jacques et al., (2006), demonstram que o processo de compostagem é eficiente para a biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs). O solo geralmente é removido do local de origem e acondicionado em forma de pilhas, em um local que permite o controle da lixiviação e do escoamento dos líquidos gerados.

Sendo um processo biológico, alguns fatores influenciam na degradação da matéria orgânica como: a temperatura, a umidade, aeração, tamanho das partículas e a disposição dos nutrientes (FERNANDES e SILVA, 1999).

Sob condições favoráveis bactérias termofílicas, irão aumentar a temperatura do composto para 55-60°C em poucos dias. Depois que a temperatura baixar a pilha pode ser revirada para renovar o suprimento de oxigênio, e em segundos o aumento de temperatura irá ocorrer. Com o tempo populações microbianas termofílicas são substituídas por populações mesofílicas que continuam lentamente a conversão para um material semelhante ao húmus (TORTORA, 2008).

c) Sistemas de Biorreatores: Os biorreatores mostram-se eficientes na recuperação de solos e águas contaminados com hidrocarbonetos e orgânicos. Os nutrientes são muitas vezes adicionados aos biorreatores para aperfeiçoar a taxa de crescimento dos microrganismos. Essa tecnologia foi utilizada durante muitas décadas no tratamento de efluentes urbanos e industriais. No entanto, somente nessa última década é que se intensificaram os estudos para analisar a eficácia dos biorreatores no processo de biorremediação.

Pereira Jr., (2009) destaca que para estas finalidades, diferentes modos de operação de biorreatores têm sido estudados, tanto em escala de bancada como em escala piloto. Sistemas operados por batelada simples, bateladas sequenciais, bateladas alimentadas, processos contínuos e biorreatores em série, são exemplos dos mais amplamente estudados. Os modos operacionais influenciam sobremaneira na eficiência do processo de degradação do poluente. Considerações importantes devem ser feitas quando da escolha do modo de operação. A natureza do resíduo poluente também deve ser levada em consideração. Entre os modos de operação por batelada sequencial e o modo contínuo, as vantagens e desvantagens associadas relacionam-se principalmente à capacidade de remoção da carga orgânica e aos requerimentos operacionais. Embora o modo de operação por batelada sequencial em muitos casos seja mais efetivo do ponto de vista das altas taxas de biodegradação atingidas, demanda maior complexidade operacional, ao contrário do modo contínuo, que prevê a alimentação constante do biorreator.

A biorremediação é uma alternativa promissora na descontaminação dos ambientes aquáticos e terrestres. Sua grande aplicabilidade é devido à existência de milhares de microrganismos com capacidade de degradação. Para que a biorremediação traga resultados satisfatórios, é de fundamental importância o conhecimento dos princípios e das técnicas, isso possibilita uma utilização e seleção correta de acordo com as condições específicas de cada local e de cada contaminante presente (JACQUES et al., 2006).

2.6 A biodiversidade Amazônica e as macrófitas aquáticas

A Amazônia, com uma superfície de quase 7,8 milhões km², ocupa 44% da América do Sul. Abriga um quinto de toda disponibilidade de água doce. Suas extensões florestais representam mais da metade das florestas tropicais úmidas existentes, concentrando grande parte da biodiversidade mundial. As perspectivas de desenvolvimento sustentável para a Amazônia passam pelas oportunidades de uso da megadiversidade biológica de forma a manter intacta a floresta. Isto, obviamente, constitui importante e decisivo desafio que traz nas biotecnologias potenciais alternativas para este fim. Assim, a biodiversidade amazônica representa importante fonte de novos produtos biotecnológicos, sendo necessários estudos e investimentos efetivos que possam assegurar o real desenvolvimento para a região (BATISTA, 2009).

Um dos aspectos da biodiversidade ainda carente de pesquisas que evidenciem sua imensa potencialidade é a prospecção de microrganismos com capacidade de atuar em processos de interesse nos variados setores da atividade humana. É válido ressaltar que parte significativa da biodiversidade amazônica está representada por fungos e bactérias, sendo a maioria ainda desconhecida. Entre os microrganismos existentes, poucos estão relacionados a doenças. Em sua grande maioria, os microrganismos desempenham algum benefício, direto ou indireto, nos mais diferentes aspectos de interesse ambiental e/ou biotecnológico (PEREIRA et al., 1993).

Em relação a biodiversidade de microrganismos em países tropicais, sem dúvida o Brasil possui ainda um grande potencial a ser explorado (AZEVEDO et al., 2014). A complexidade dos variados ecossistemas e a exploração ininterrupta dos recursos naturais impõem a necessidade de novas formas de gestão no sentido de manter o equilíbrio das condições ambientais, imprescindível à qualidade de vida humana. Considerando esses aspectos, a busca por microrganismos e seus produtos para processos de biorremediação tem sido destaque nas ações que visam garantir maior qualidade ambiental. Desse modo, investimentos têm sido direcionados para a detecção de microrganismos com potencial de atenuar, ou até mesmo eliminar poluentes em condições diversas (BATISTA, 2009). Nesse contexto, pesquisas vêm sendo desenvolvidas na Amazônia com o objetivo de isolar microrganismos de espécies vegetais.

Várias espécies vegetais destacam-se por apresentarem potenciais característicos, entretanto, as macrofitas aquáticas da Amazônia apresentam o potencial de sobreviverem em ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo e derivados por longos períodos. Associadas as espécies vegetais os microrganismos chamam atenção, pois tornam-se possíveis ferramentas para pesquisas *in situ* e *ex situ*, proporcionado dessa forma, informações relevantes para a literatura, o que se refere a microrganismos isolados de macrofitas aquáticas na Amazônia.

As macrófitas aquáticas podem ser encontradas principalmente nas margens e nas áreas mais rasas de rios, lagos e reservatórios também em cachoeiras (WETZEL, 1981).

Esteves (1998) destaca que uma das primeiras menções ao termo macrófitas aquáticas foi proposta por Weaner & Clements (1938), que definiram de maneira muito ampla: plantas herbáceas que crescem na água, em solos cobertos por água ou em solos saturados com água. Contudo a definição de macrófitas aquáticas já é um termo consagrado, adotado pelo International Biological Program (IBP), sendo a denominação mais adequada para caracterizar vegetais que ocorrem desde brejos até ambientes verdadeiramente aquáticos, incluindo desta forma, vegetais desde macroalgas até plantas vasculares.

As macrófitas aquáticas são originalmente vegetais terrestres que sofreram modificações adaptativas, ao longo do curso evolutivo, sendo capazes de colonizar diversos tipos de ambientes aquáticos como lagos, lagoas, zonas úmidas, rios, represas, cachoeiras, (ESTEVES, 1998). Isto se deve ao fato das espécies de macrófitas apresentarem adaptações morfofisiológicas, além de possuírem a capacidade de colonizar os ambientes aquáticos com diferentes características físicas e químicas (SCULTHORPE, 1967).

Espécies de plantas aquáticas podem apresentar mais de uma forma biológica, dependendo da condição do habitat, ou seja, no nível de água em que esteja submetida, ou mesmo com o tempo de vida da espécie. Por exemplo, *Echinodorus tenellus* (Mart.) Buch. (Alismataceae), passa de submersa, a emergente para terrestre, portanto anfíbia e *Eichhornia azurea* (Sw.) Kunth (Pontederiaceae) varia conforme a idade, pois quando jovem é submersa fixa e adulta flutuante fixa ou livre (POTT e POTT, 2000) (Figura 4).

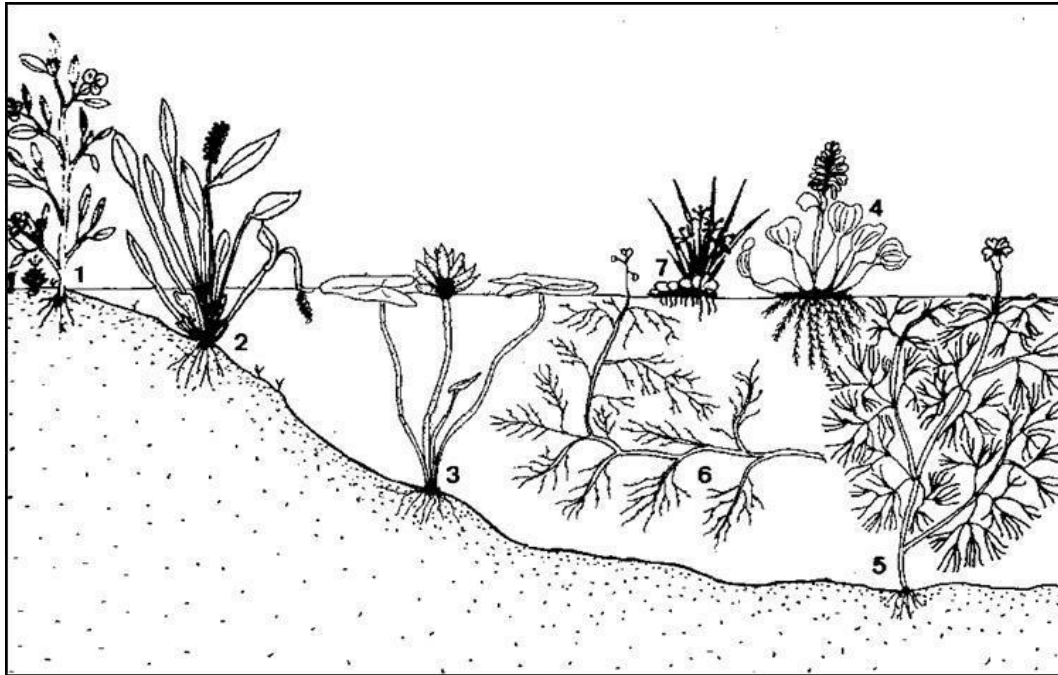


Figura 4: Formas de vida das macrófitas aquáticas: 1- Anfíbia, 2 - Emergente, 3 - Flutuante fixa, 4 - Flutuante livre, 5 - Submersa fixa, 6 - Submersa livre, 7 - Epífita.
Fonte: Pott e Pott (2000).

Este fato possibilita que uma mesma espécie colonize os mais diferentes tipos de ambientes, além disso, a grande maioria das macrófitas aquáticas são capazes de suportar longos períodos de seca. Neste caso tomando formas terrestres, com profundas modificações morfológicas, adaptações anatômicas, fisiológicas e, sobretudo, fenotípicas. Até a década de 50, acreditava-se que as macrófitas aquáticas desempenhavam papel pouco relevante na dinâmica dos ecossistemas lacustre sendo seu estudo muito negligenciado no âmbito das pesquisas limnológicas. No entanto, com o aprofundamento do conhecimento, particularmente após estudos efetuados nas regiões tropicais, ficou evidenciado o seu importante papel (ESTEVEES, 1998).

As macrófitas são partes integrantes dos ecossistemas aquáticos, desempenhando funções vitais ao balanço natural do sistema, e entre os diversos papéis desempenhados cita-se como função a habilidade de hospedeiras para associações com algas perifíticas e bactérias fixadoras de nitrogênio e seu importante papel trófico devido aos altos conteúdos de proteínas e carboidratos solúveis e sua reduzida fração de parede celular (CAMARGO, 1984). As macrófitas também atuam como armazenadoras de nutrientes, influenciando as características físico-químicas dos corpos d'água.

Em regiões tropicais, estes vegetais são importantes fornecedores de matéria orgânica para as cadeias herbívoras e detritívas, sendo responsáveis muitas vezes por mais de 50% do material orgânico dos ambientes aquáticos através dos processos de decomposição e ciclagem de nutrientes. Além disto, as macrófitas podem desempenhar importante papel no ciclo do carbono em ambientes onde são abundantes, isto porque podem assimilar grandes quantidades de carbono inorgânico da atmosfera ou da água e transformá-lo em biomassa por meio do processo fotossintético (BIANCHINI, 2003).

As macrófitas aquáticas possuem distribuição fitogeográfica mais ampla do que a maioria das plantas terrestres. Este fato é decorrente das variações sofridas pelos fatores do ambiente aquático, possibilitando assim, o aparecimento de muitas espécies cosmopolitas (IRGANG e GASTAL Jr., 1996). Elas estão presentes em muitos nichos e em diversos tipos de habitats como tanques, lagos, lagoas, brejos, cachoeiras, rios, riachos, canais, reservatórios, mares e oceanos (ESTEVES, 1998). Alguns dos fatores que auxiliam nesta vasta distribuição é o fato de grande parte das macrófitas aquáticas apresentarem disseminação por pássaros e um alto potencial de reprodução vegetativa (IRGANG e GASTAL Jr., 1996).

Vereecken et al., (2006), destacam que o crescimento excessivo de macrófitas aquáticas pode ocorrer como resultado das alterações provocadas pelas atividades humanas que criam condições favoráveis ao seu desenvolvimento tais como a eutrofização artificial e as modificações hidrológicas do ecossistema aquático. Os referidos autores mencionam que essas alterações podem provocar a proliferação de uma espécie, criando condições ótimas para o seu crescimento ou proporcionando condições desfavoráveis para outras espécies, que deixam de exercer uma pressão competitiva sobre ela. O conhecimento da ecologia destes vegetais, bem como os fatores físicos e químicos que podem influenciar no crescimento de macrófitas aquáticas são importantes para a compreensão do comportamento desses organismos (THOMAZ et al., 1999).

Segundo Dhir et al., (2009), as macrófitas aquáticas (particularmente as livres, submersas enraizadas e emergentes) ganharam importância mundialmente por apresentarem grande eficiência para remover uma variedade de poluentes (metais-traço, radionuclídeos, explosivos e poluentes orgânicos e inorgânicos) de águas poluídas, ainda que esta eficiência varie de espécie para espécie.

No Brasil, apesar de crescente, ainda existe um número reduzido de pesquisadores que têm se dedicado ao estudo de plantas aquáticas. Segundo um levantamento feito por Thomaz & Bini (2003), os estudos pioneiros sobre plantas aquáticas no Brasil podem ser atribuídos a Eugene Warming, pesquisador dinamarquês que publicou, em 1892, na sua língua de origem, o livro intitulado “Lagoa Santa”. Somente em 1908 o referido livro foi traduzido para o português, nele constando descrições da vegetação aquática e anfíbia e comparações com vegetação de brejos de ambientes temperados.

Ainda sobre trabalhos pioneiros específicos de macrófitas aquáticas no Brasil, destaca-se o realizado por Hoehne (1948), no qual o autor aborda os diversos grupos vegetais aquáticos, como microalgas, macroalgas, pteridófitas e fanerógamas e ainda hoje é uma referência sobre a sistemática, distribuição e aspectos ecológicos básicos sobre a vegetação aquática. Até a década de 60, as populações de plantas aquáticas continuavam a ser negligenciadas, pois os pesquisadores não acreditavam que esta vegetação desempenhasse funções relevantes nos ecossistemas limnéticos (ESTEVES, 1998; POMPEO & MOSCHINI-CARLOS, 2003). Segundo Thomaz & Bini (2003), só a partir da década de 80, é que os trabalhos tiveram impulso, devido ao entendimento de sua real importância, sendo considerada inclusive como uma das comunidades vegetais mais produtivas, e principalmente porque algumas espécies têm potencialidade em atingir um rápido processo de colonização (invasão), principalmente em reservatórios com fins hidroelétricos.

Na década de 90, destacaram-se aqui no Brasil as publicações de importantes livros sobre esta vegetação: Irgang & Gastal Júnior (1996) e Pott & Pott (2000), os quais são considerados básicos para identificação desta vegetação. No entanto, e de maneira geral, dados referentes especificamente sobre diversidade e ocorrência de macrófitas em ecossistemas aquáticos brasileiros ainda são escassos na literatura. Há, além disso, uma concentração de informações provenientes de pesquisas realizadas nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul, devido aos grandes centros de pesquisas limnológicas estarem localizados nestas regiões. Para as demais regiões, observa-se uma escassez de estudos, destacando-se o Nordeste como a mais carente.

Observa-se que atualmente, existe uma necessidade de geração de mais informações sobre as macrófitas em sistemas aquáticos, pois apesar de crescente, são informações básicas para a área de estudo e pesquisa.

2.7 Microrganismos isolados das espécies vegetais

Magnani (2005) destaca que as plantas constituem um verdadeiro ecossistema microbiano e que nestas plantas hospedeiras, diferentes nichos são ocupados pelos microrganismos, tais como as superfícies das raízes, caules e folhas (as epífitas), ou então, colonizando o interior de diversos tecidos das plantas (endofíticas). Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são agentes transformadores eficazes, com o potencial de degradar uma ampla diversidade de substâncias orgânicas, comumente encontradas nos efluentes gerados pelas refinarias e indústrias. Por assimilarem tais substâncias como fonte de carbono e/ou de energia, os microrganismos vêm se apresentando como poderosa alternativa aos métodos convencionais de tratamento, sendo cada vez mais empregados na resolução de problemas ambientais (URURAHY et al., 1998).

Uma parcela dos microrganismos, principalmente bactérias e fungos, habitam o interior das plantas. São os microrganismos endofíticos que, segundo Pereira et al., (1993), colonizam os tecidos sadios de partes aéreas da planta, em algum tempo do seu ciclo de vida, sem lhes causar danos aparentes, este conceito também é estendido aos microrganismos das raízes. Entre os microrganismos endofíticos, os fungos e bactérias que formam nódulos nas raízes das plantas, as quais estão associados são bastante estudados devido sua importância na agricultura, particularmente por sua participação na fixação de nitrogênio pelas plantas (STAMFORD et al., 1998). Ao contrário, os microrganismos endofíticos das partes aéreas dos vegetais só recentemente têm despertado o interesse da comunidade científica, especialmente por seus potenciais na produção de metabólitos de interesse econômico, incluindo os relacionados às plantas hospedeiras (RODRIGUES & DIAS FILHO, 1996).

Pereira et al., (1993) mencionam que as interações endófito/planta, ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagônicas (neste caso, estudadas pela fitopatologia). Nas interações simbióticas os

microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como: a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos. Exemplo de metabólitos que podem ser induzidos pelos microrganismos endofíticos são as fitoalexinas, substâncias de baixo peso molecular com atividades antimicrobianas, produzidas pelas plantas ante a ação de microrganismos ou de agentes estressantes. Da parte dos fungos pode-se citar a produção de micotoxinas, metabólitos secundários que podem causar doenças em humanos e outros animais (RODRIGUES & DIAS FILHO, 1996). Os microrganismos endofíticos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas (FAHEY, 1988; MURRAY et al., 1992), como agentes inibidores de pragas e patógenos (HALLMANN & SIKORA, 1996) e como fontes de metabólitos primários (STAMFORD et al., 1998) e secundários de interesse como o taxol, poderoso anticancerígeno (STIERLE et al., 1993), a cryptocandina, lipopeptídeo antimicótico e diversos outros antibióticos.

Os microrganismos epifíticos são assim denominados, por habitarem os tecidos externos, vivendo na superfície dos vegetais. Azevedo (1999) descreve que as distinções entre microrganismos endofíticos, epifíticos e patogênicos são de natureza apenas didática, não existindo um claro limite entre grupos e sim um gradiente entre eles. Segundo o autor, um organismo endofítico, por exemplo, pode tornar-se um patógeno conforme as condições de ambiente ou equilíbrio com outros endofíticos; um microrganismo epifítico pode, eventualmente, entrar em uma planta e lá permanecer por certo período, causando ou não danos à mesma. Assim a compreensão da microbiota associada ao vegetal inclui tanto os epifíticos quanto os microrganismos denominados endofíticos.

Strobel et al., (1999) destacam que no processo de seleção de plantas e seus microrganismos associados é importante investigar plantas que ocupem nichos ecológicos não usuais, por exemplo, aquelas que crescem em temperaturas extremamente altas ou baixas, sobrevivem por muito tempo ou resistem a altas concentrações de radiações e de sal. A adversidade nos ecossistemas característicos da planta e sua resistência a eles remetem a potencial interação com microrganismos endofíticos.

2.8 Biorremediação: Estado da arte

Há algumas décadas, têm-se realizado estudos relacionados aos degradadores de petróleo, os quais diversos autores em todo o mundo buscam formas de isolar, selecionar e cultivar microrganismos competentes na degradação de diversos compostos de petróleo.

Os trabalhos pioneiros em seleção e isolamento de bactérias salinas foram realizados por Zobell (ZOBELL, 1946), em uma extensa revisão sobre a habilidade dos microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia e que estes microrganismos estão amplamente distribuídos na natureza. Destacou em sua obra que mais de 100 espécies de 30 gêneros microbianos foram capazes de utilizar hidrocarbonetos.

Com a alta demanda da produção e comercialização do petróleo e de seus derivados, as preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de solos e águas subterrâneas, principalmente por vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneos em postos de combustíveis, vêm crescendo (FATORELLI, 2005).

As informações divulgadas para o público a respeito do uso de técnicas de biorremediação se restringem, no Brasil, ao levantamento da CETESB. Das áreas contaminadas e tratadas com técnicas de biorremediação, verifica-se o uso da fitorremediação, barreiras reativas, lavagem de solo, encapsulamento geotérmico, barreira física, atenuação natural e biopilhas (CETESB, 2006). Nos demais estados mais industrializados, existem iniciativas localizadas ou incipientes e, na grande maioria, a biorremediação ainda é um termo de ficção científica.

Uma das técnicas de biorremediação que vem chamando atenção no Brasil é a bioaugmentação, técnica relativamente recente e ainda em fase de desenvolvimento. No entanto, vários autores a descrevem com clareza na literatura. Essa técnica é caracterizada pelo aumento da microbiota nativa através da inoculação de microrganismos exógenos (alóctones). Estes microrganismos são pertencentes à espécie não nativa de determinada região biogeográfica, introduzidos em um ecossistema, podendo persistir e até reproduzir-se por um tempo, participando ou não de interações e de transformações ecológicas (EPA, 2004).

O emprego desta técnica depende, primeiramente, da concordância e da autorização de órgãos governamentais e de agências de fiscalização ambiental, como a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2007b). A

aprovação da bioaugmentação como estratégia de biorremediação depende de vários fatores, dentre os quais, os tipos de microrganismos utilizados e a área de aplicação.

Nessa conjuntura, uma ressalva deve ser feita no que diz respeito à utilização da bioaugmentação em solos tipicamente brasileiros. Até junho de 2007, no Brasil, era proibida a utilização desta técnica em quaisquer condições e localizações. No entanto, em 22 de junho de 2007, a CETESB, através da Decisão de Diretoria (DD) no 103/2007/C/E (de caráter normativo), publicou a seguinte informação: “... A utilização de microrganismos alóctones nos sistemas de remediação deverá seguir as normas técnicas CETESB e as legais pertinentes...” (CETESB, 2007a). Assim sendo, após essa data, a utilização da bioaugmentação passou a ser permitida no Brasil, mais especificamente no Estado de São Paulo, porém, desde que sejam seguidas as normas pertinentes, explicitadas no referido documento.

Dentre as normas a serem seguidas, destaca-se a norma técnica da CETESB no L1.022, de junho de 2007, que trata sobre o uso de produtos biotecnológicos, constituídos de microrganismos, destinados ao tratamento de efluentes líquidos, de resíduos sólidos e à remediação de solos e de águas (CETESB, 2007b).

Atualmente, muitos produtos têm sido lançados no mercado mundial com o intuito de auxiliar no tratamento de solos contaminados por petróleo. Alguns produtos comerciais apresentam, em sua composição, microrganismos exógenos que são utilizados com o objetivo de induzir a bioaugmentação do solo a ser tratado (CETESB, 2007b). A fim de melhorar as condições de biodegradação do contaminante, ou seja, de favorecer a bioestimulação, determinados produtos também apresentam em sua formulação, micronutrientes, enzimas de ação externa e surfactantes que facilitam e estimulam a ação microbiana sobre os poluentes. Neste caso, as enzimas de ação externa atuam favorecendo a oxidação dos compostos de difícil degradação em compostos de fácil assimilação pelos microrganismos (SHUHONG et al., 2006).

Enquanto no país ainda estamos a passos lentos em direção do estabelecimento da biorremediação como técnica eficiente, de baixo custo e ambientalmente aceitável, tanto do ponto de vista técnico-científico como aplicado, na comunidade internacional já se discute esse processo como um conjunto ou sistema biológico. Como a biorremediação envolve uma mistura de estruturas químicas com um componente metabólico diverso e multiespecífico no ambiente contaminado, essa abordagem somente pode ser atingida com o conceito de

sistema. Além disso, com a disponibilidade de genes, genomas e metagenomas, como os do UMBBD (University of Minnesota Biocatalysis /Biodegradation Database umbbd.msi.umn.edu), que disponibilizam microrganismos degradativos de interesse ambiental (1462), enzimas (786), rotas de degradação (177), reações (1220), compostos (1133), etc., tornam possível a proposição de modelos para prever a dinâmica de contaminantes no ambiente por meio do processo metabólico global (JACQUES et al., 2009).

Com este catálogo de genomas e de genes que codificam a biodegradação e a detoxificação, é possível assumir que o importante para a biorremediação na atualidade é o desempenho catalítico, em vez de um organismo/espécie qualquer. Nessa condição, visualiza-se o uso do pool de genes biodegradativos que se difunde na célula e na comunidade microbiana, independentemente da espécie ou do hospedeiro, deixando de lado os fatores bióticos e abióticos que afetam esse desempenho, no chamado metabolismo sem fronteiras.

No Brasil, os trabalhos vêm sendo desenvolvidos principalmente pelas Universidades. Na Universidade de Passo Fundo, Rio Grande do Sul foi realizado o isolamento de fungos em solo contaminado com óleo. Os resultados obtidos foram o isolamento de dez fungos em solo contaminado com atrazine + simazine e cinco fungos em solo contaminado com atrazine. Os gêneros identificados como degradadores de hidrocarbonetos foram *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (COLLA et al., 2007).

Alunos da pós-graduação da Universidade Católica de Pernambuco (UNICAP) desenvolveram uma pesquisa onde o principal objetivo foi obter consórcios de microrganismos a partir de amostra de petróleo e investigar o potencial biotecnológico para aplicação na biodegradação de contaminantes ambientais oriundos da indústria petrolífera. Os consórcios de microrganismos formados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos com atividades oxidases, obtidos a partir de amostra de petróleo sob cultivo submerso e aerado na presença ou não de nutrientes, apresentaram potencial para aplicação na biodegradação de poluentes derivados do petróleo (COSTA et al., 2007).

Na Universidade de Campinas foi avaliada em microcosmos com solo a biodegradação de uma mistura de HPAs. Foi testado bioaugmentação com fungos e bactérias individuais e um consórcio de fungos. A bioaugmentação com o isolado de

fungo *Aspergillus* aumentou significativamente o grau de remoção de antraceno e pireno, dois HPAs bastante persistente em solos (SILVA et al., 2009).

Outro trabalho que trouxe bons resultados foi o desenvolvido no Centro de Tecnologia Mineral/Ministério da Ciência e Tecnologia/ Rio de Janeiro. O objetivo foi isolar e identificar os fungos filamentosos com capacidade degradadora de hidrocarbonetos de petróleo presentes nos solos contaminados da cidade de Guararema. Das 75 colônias isoladas do solo contaminado, 60 apresentaram capacidade para degradar hidrocarbonetos de petróleo. Cujas identificação as agrupou em 4 gêneros fúngicos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*) subdivididos nas seguintes espécies: *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium corylophilum*, *Paecilomyces variotti*, *Paecilomyces niveus* e *Fusarium* sp. (LE MOS, 2008).

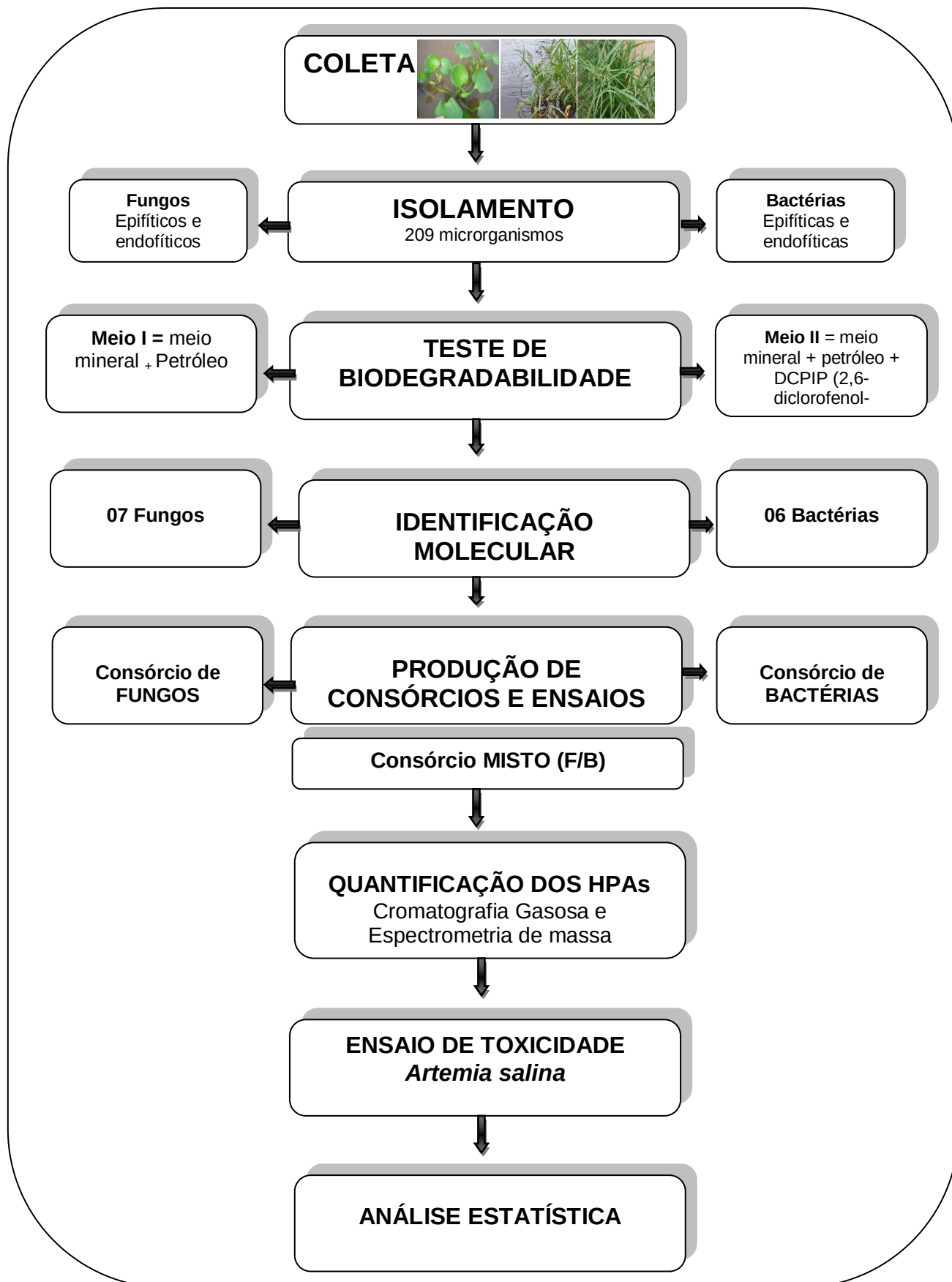
Na Universidade Federal da Bahia no âmbito do projeto RECUPETRO esta sendo desenvolvido testes a nível de bancada e laboratorial com duas espécies de fungos previamente identificadas como degradadores. Os fungos em teste são *Penicillium* sp. e *Aspergillus fumigatus*.

Diante desse cenário, algumas pesquisas têm sido desenvolvidas na Amazônia voltadas à bioprospecção de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos. A Universidade do Estado do Amazonas, o Instituto de Pesquisa da Amazônia (INPA) através da TRANSPETRO e a Universidade Federal do Amazonas desenvolvem análises em laboratório com perspectivas promissoras e com fomento à pesquisa. Dentre os estudos desenvolvidos em Manaus, Batista (2009), estudando a macrófita aquática *Eichornia crassipes* isolou 70 bactérias endofíticas e epifíticas em meio seletivo contendo petróleo. Neste estudo foi testado um inóculo bacteriano com resultados positivos para a degradação de hidrocarbonetos em ambientes aquáticos.

O próximo passo agora é associar a abordagem sistêmica da biorremediação com a já consagrada engenharia genética para se iniciar a biologia sintética aplicada à remediação. Com os avanços computacionais e os recursos da bioinformática é possível desenhar biocatalizadores de desempenho jamais vistos na biodegradação, bem como através de pesquisas aliadas as técnicas de cromatografia a produção de inóculo microbiano com potencial degradador.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Figura 5: Fluxograma das etapas desenvolvidas no estudo



3.1 Coleta das plantas hospedeiras

O estudo consistiu em utilizar amostras de macrófitas aquáticas presentes em água contaminada por derivados de petróleo, objetivando o isolamento de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos presentes nas espécies vegetais.

As amostras das espécies vegetais foram coletadas no rio Negro na cidade de Manaus-AM, em água residuárias contaminadas por derivados de petróleo na Estação Hidroviária (Porto de Manaus) situada no centro da cidade, nas coordenadas geográficas: Latitude Sul: 3° 8' 30" Longitude W. G. R. 50° 59', conforme localização (figura 6).

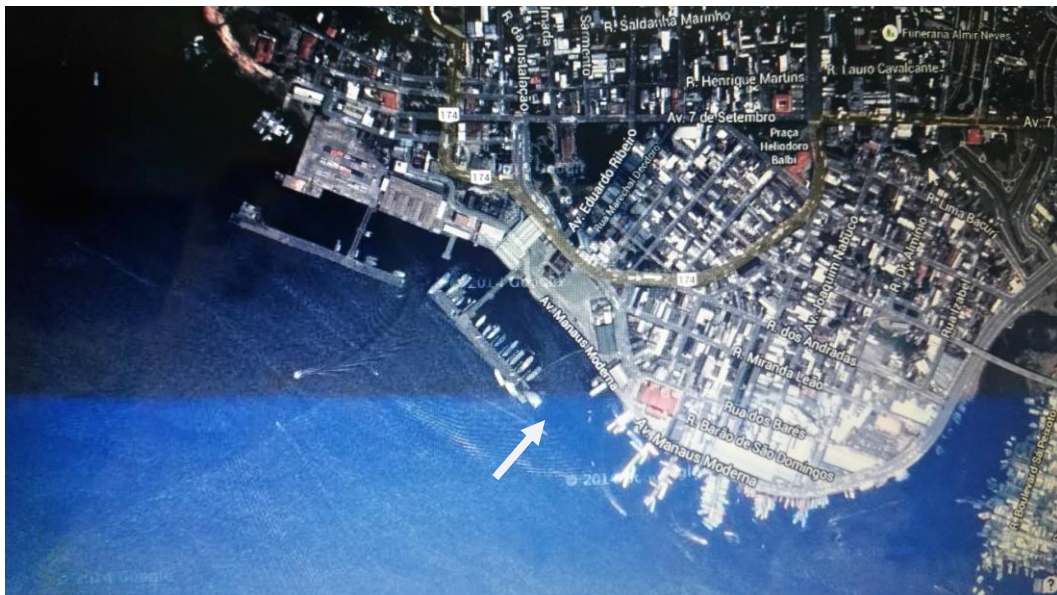


Figura 6: Localização da área de coleta no rio Negro em Manaus/AM.

Fonte: Google Earth, 2014.

Foram coletadas folhas, flores, caules, e raízes, tendo como critérios de seleção a aparência sadia das plantas, sem sintomas visuais de doenças e sem sinais de ataques de insetos.

As espécies vegetais foram identificadas no Instituto de Pesquisa da Amazônia (INPA) com suas respectivas numerações de exsicata depositada no herbário do Instituto. As espécies coletadas foram: *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms (Pontederiaceae) (número de catalogação INPA 259.239), *Ichnanthus calvenscens*

Döll (Poaceae): (número de catalogação INPA 259.240) e *Cyperus ligularis* L. (Cyperaceae): (número de catalogação INPA 259.241) (Figura 7).

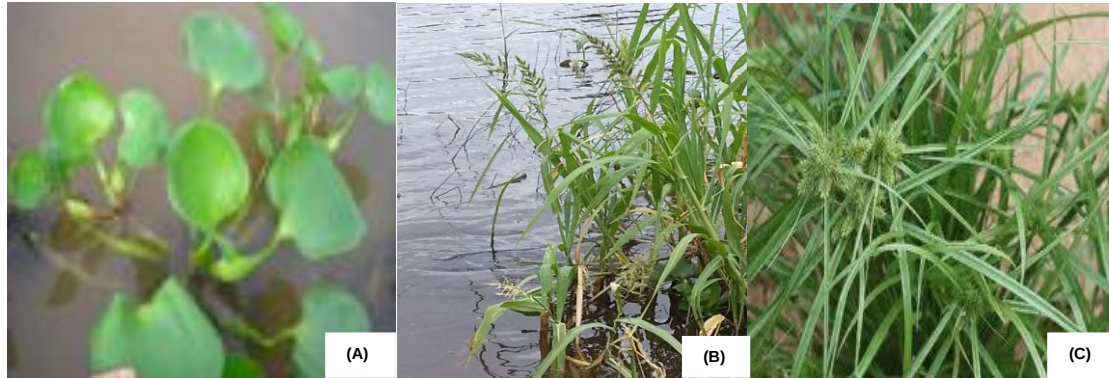


Figura 7: Amostra das macrofitas aquáticas: (A) *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms (Pontederiaceae) (B) *Ichnanthus calvescens* Döll (Poaceae) e (C) *Cyperus ligularis* L. (Cyperaceae).

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos de polietileno e levadas para o Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Amazonas, no qual procedeu-se o isolamento dos microrganismos.

3.2 Isolamento da microbiota associada

Foram realizados isolamentos dos microrganismos epifíticos e endofíticos segundo metodologia descrita por Pereira et al., (1993) com adaptações a seguir.

3.2.1 Isolamento dos microrganismos epifíticos

O procedimento foi realizado para raízes, caules, folhas e flores. Inicialmente o material coletado foi lavado superficialmente com água corrente, sendo a seguir cortados em tamanho padrão (5 cm) com o objetivo de estipular o valor da infecção. Estes fragmentos foram friccionados com o auxílio de um cotonete (swab esterilizado) nos tecidos vegetais e estriados nas placas de Petri (Figura 8), contendo meio seletivo (BH) para crescimento microbiano acrescido de petróleo.

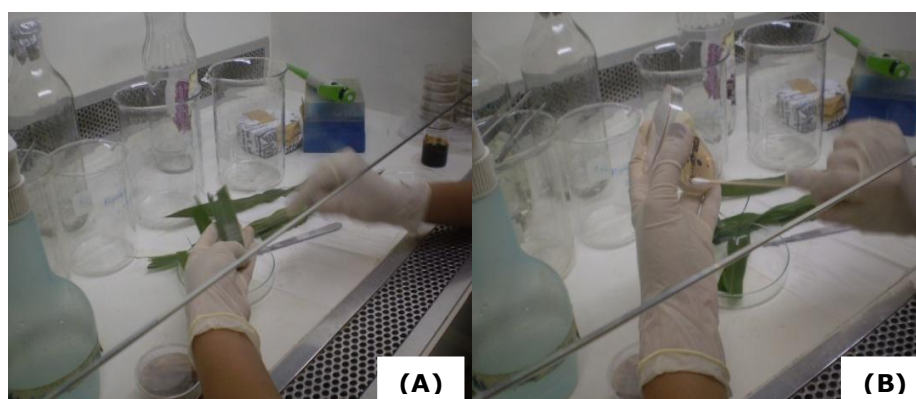


Figura 8: Etapas do Isolamento dos microrganismos epifíticos. (A) Fragmentos friccionados com o auxílio de um cotonete (swab esterilizado). (B) Estriados nas placas de Petri, contendo meio seletivo (BH).

Mariano (2006) destaca que a finalidade do uso do ágar Bushell Haas (BH) é recomendado para a análise de combustíveis contaminados por microrganismos e para o estudo de microrganismos que deterioram hidrocarboneto.

Tabela 03: Meio de cultura Desidratado: AGAR BUSHHNELL HAAS acrescido de petróleo - BH

Componentes	Quantidade/Gr
Sulfato de magnésio (MgSO_4)	0,20
Fosfato monopotássio (KH_2PO_4)	1
Fosfato dipotássico ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1
Nitrato de amônio ($\text{NH}_4^+(\text{NO}_3)^-$)	1 -
Cloreto de ferro (FeCl_3)	0,05
Cloreto de cálcio (CaCl_2)	0,02
Ágar	20
Petróleo (Urucu)	10 ml

Fonte: Bushhnell Haas, (1941).

Para o isolamento dos fungos as placas com meio seletivo foram suplementadas com o antibiótico clorafenicol (2 mL de antibiótico para 1000 mL de meio) e para o isolamento de bactérias foi adicionado o fungicida Derosal 500SC (1 mL de fungicida para cada 1000 mL de meio). As placas foram incubadas em estufa a temperaturas de 30°C, e permaneceram por um período de 3 a 10 dias para crescimento de fungos e bactérias. Após crescimento dos microrganismos as placas foram levadas ao fluxo laminar e os isolados foram repicados para tubos contendo

meio específico para fungos e bactérias e novamente incubados para crescimento e identificação.

3.2.2 Isolamento dos microrganismos endofíticos

O processo foi baseado de acordo com a metodologia descrita por Petrini; Muller (1986) e Pereira et al., (1993), iniciando-se com a desinfecção superficial dos tecidos vegetais (raízes, caule, folhas e flor), para retirada da microbiota externa, o material foi lavado com água corrente e detergente neutro com o auxílio de uma esponja de polietileno esterilizada. Em câmara de fluxo laminar o material foi mergulhado em álcool a 70% por 1 minuto, sendo introduzido em solução de hipoclorito de sódio a 3% por 1 minuto. Logo após os tecidos foram lavados novamente em solução de álcool 70% por 30 segundos para retirada do excesso de cloro da superfície. Para a retirada de todo o restante das soluções, o material foi lavado três vezes com água destilada esterilizada. Como controle, a água de lavagem foi inoculada em placas de Petri contendo os meios de cultura para o isolamento. Após passar pelo processo de descontaminação superficial, o material foi cortado em fragmentos de 5 a 7 mm com o auxílio de um furador de papel estéril e estes foram dispostos em placas com meio seletivo (BH) (Figura 9).

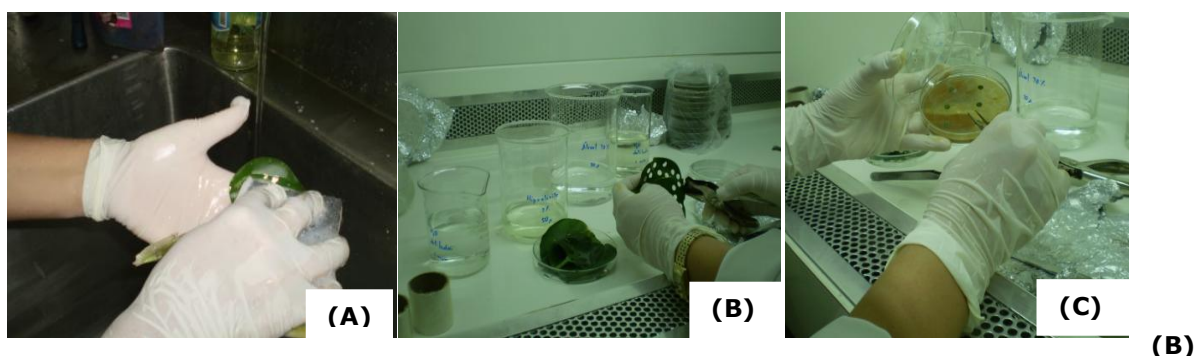


Figura 9: Etapas do isolamento de microrganismos endofíticos. (A) descontaminação superficial das plantas hospedeiras. (B) Material foi cortado em fragmentos de 5 a 7 mm com o auxílio de um furador de papel estéril. (C) Os fragmentos foram dispostos em placas de Petri com meio seletivo.

Para o isolamento dos fungos as placas com meio seletivo foram suplementadas com o antibiótico clorafenicol (2 mL de antibiótico para 1000 mL de meio) e para o isolamento de bactérias foi adicionado o fungicida Derosal 500SC (1mL de fungicida para cada 1000 mL de meio). As placas foram identificadas e

colocadas em incubadora a 30 °C, e permaneceram de 1 a 10 dias, sendo observado diariamente o crescimento da bactéria e fungo.

Após ocorrer o crescimento dos fungos, os microrganismos foram repicados para tubos de ensaio com meio seletivo (BH).

3.2.3 Caracterização morfológica, purificação e preservação dos microrganismos isolados.

3.2.3.1 Preparo das bactérias

As bactérias isoladas foram submetidas ao processo de purificação por meio de repiques sucessivos em placas de Petri contendo meio LB (Luria Bertani), utilizando-se a técnica de esgotamento por estrias para purificação das bactérias (Figura 10).



Figura 10: Purificação de bactérias.

Após crescimento, as colônias foram raspadas e inseridas em microtubos de 1,5 mL contendo glicerol 30% e mantidas a -20 °C. No momento da preservação, foi realizada a caracterização morfológica de cada colônia, sendo observadas as características cor e consistência, para posterior comparação e análise.

3.2.3.2 Preparo dos fungos

Os fungos isolados foram repicados em placa de Petri contendo meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) em triplicatas. Após crescimento foi possível observar a morfologia de cada microrganismo (Figura 11).

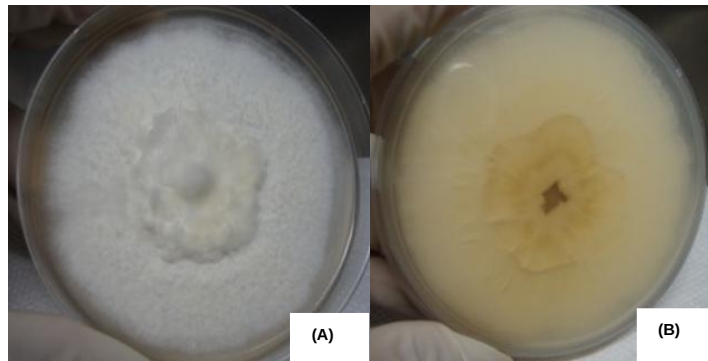


Figura 11: Purificação de fungos através de repique sucessivos. (A) Verso e (B) anverso de um fungo crescido por 10 dias.

Após repiques sucessivos, os fungos foram armazenados em tubos de ensaio com meio BDA, identificados e mantidos à temperatura de 36 °C.

3.3 Ensaio de biodegradação com e sem a presença do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) como aceptor de elétrons.

Objetivando iniciar os primeiros ensaios de degradação com fungos e bactérias para observação dos microrganismos que apresentaram eficiência, optou-se em utilizar o meio seletivo líquido BH (Bushnell Haas) (Tabela 3), específico para crescimento de microrganismos que degradam hidrocarbonetos, o petróleo como fonte de carbono, e o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) para seleção inicial dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos de petróleo.

3.3.1 Ensaio de biodegradação utilizando o petróleo como fonte de carbono – **Meio I = meio mineral (BH) + Petróleo**

3.3.1.1 Preparo dos microrganismos - Bactérias

Na seleção inicial utilizaram-se 155 bactérias isoladas das espécies vegetais propostas. De acordo com a metodologia descrita em Dias (2007), as bactérias foram estriadas em meio LB (Luria Bertani) em placa de Petri com crescimento de 24 horas, após esse período retirou-se uma alçada e colocou-se em tubos de ensaio contendo 3 mL do meio líquido LB (Luria Bertani), para crescimento, os tubos foram levados para agitação em incubadora a 120 rpm a 30 °C por 5 horas. Após este período, os tubos foram retirados do agitador e com auxílio de uma pipeta retirou-se 1 mL do caldo bacteriano e foi reservado no todo de 1,5 mL para leitura de densidade óptica do crescimento celular da bactéria, que foi determinado para o ensaio de densidade óptica (DO_{610nm}) 1. Realizado a leitura em espectrofotômetro e constatado o crescimento celular bacteriano através da densidade óptica, iniciou-se o ensaio de biodegradabilidade.

3.3.1.2 Preparo do ensaio com petróleo - Bactérias

Constatado o crescimento celular bacteriano foi retirado uma alíquota de 100 µL de caldo bacteriano e adicionado em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio seletivo líquido BH (Bushnell Haas) e 500 µL petróleo como fonte de carbono. Os frascos ficaram sob agitação em incubadora a 120 rpm a 30 °C por 10 dias. Todo o procedimento foi realizado em triplicata para cada microrganismo (Figura 12).

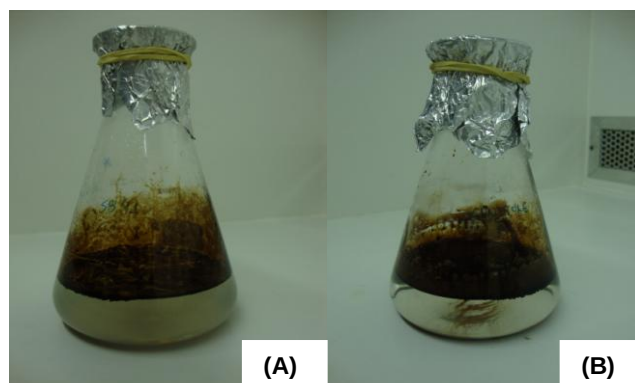


Figura 12: Ensaio de biodegradabilidade. (A) Bactéria individualmente + meio seletivo BH (Bushnell Haas) + petróleo. (B) Controle: meio seletivo BH (Bushnell Haas) + petróleo.

Para o controle do experimento foi utilizado 100 mL de meio seletivo líquido BH (Bushnell Haas) e 500 µL de petróleo nas mesmas condições.

3.3.1.3 Preparo dos microrganismos - Fungos

Para a seleção inicial utilizou-se 54 fungos isolados das espécies vegetais. Os fungos preservados foram inoculados em placa de Petri com meio BDA (Batata Dextrose e Ágar) sintético devidamente preparado. As placas foram identificadas e colocadas em incubadora à 30 °C, e permaneceram de 1 a 10 dias, sendo observado diariamente o crescimento dos fungos.

3.3.1.4 Preparo do ensaio com petróleo - Fungos

Após crescimento dos fungos, foram retirados três inóculos padrões com o auxílio de uma seringa de 3 mL esterilizada sem bico para serem introduzidos em Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio seletivo líquido BH (Bushnell Haas) e 500 µL petróleo como fonte de carbono (Figura 13).

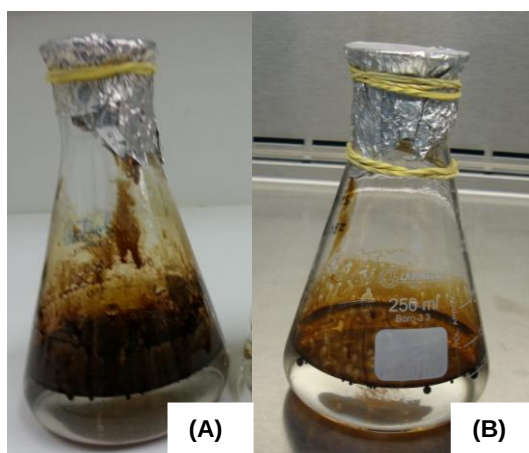


Figura 13: Ensaio de biodegradabilidade. (A) Fungos individualmente + meio seletivo BH (Bushnell Haas) + petróleo. (B) Controle: meio seletivo BH (Bushnell Haas) + petróleo.

Os Erlenmeyers foram mantidos sob agitação em incubadora a 240 rpm em temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) por um período de 10 dias. Todo o procedimento foi realizado em triplicata para cada microrganismo e observações constantes.

Para o controle do experimento foi utilizado 100 mL de meio seletivo líquido BH (Bushnell Haas) e 500 μ L de petróleo nas mesmas quantidades e condições.

3.3.2 Ensaio de biodegradação utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol - **Meio II = meio mineral + petróleo + DCPIP** (2,6-diclorofenol-indofenol).

O segundo ensaio realizado para seleção dos microrganismos degradadores de hidrocarbonetos foi o ensaio com o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol.

A técnica de utilização do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) para a verificação do potencial dos microrganismos em degradar hidrocarbonetos foi desenvolvida por Hanson et al., (1993) e seu uso foi difundido ao longo dos anos. O princípio deste ensaio consiste no fato de durante a oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, elétrons são transferidos até aceptores como gás oxigênio, nitratos e sulfatos. Ao incorporar um aceptor de elétron como o DCPIP ao meio de cultura, é possível verificar a capacidade dos microrganismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato pela observação da mudança de cor do DCPIP de azul (oxidado) para incolor (reduzido) (MARIANO et al., 2008) (Figura 14).

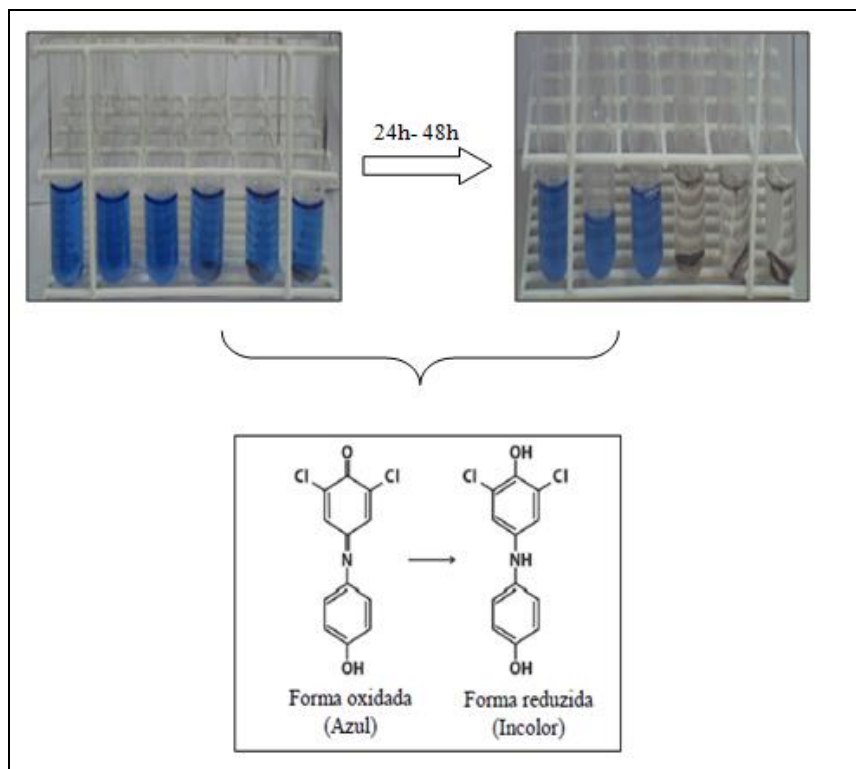


Figura 14: Reação redox realizada pelo indicador DCPIP

Fonte: <http://web.usal.es/jmcsil/biblioteca/biofisica/unizar/FOTO.htm>

3.3.2.1 Preparo dos microrganismos - Bactérias

As bactérias foram preparadas para o ensaio conforme item 3.3.1.1.

3.3.2.2 Preparo do ensaio de biodegradação utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol – bactérias

Após leitura em espectrofotômetro e constatado o crescimento celular bacteriano através da densidade óptica, iniciou-se o ensaio de biodegradabilidade. Utilizou-se 0,005 g do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) para 1 L de meio BH (Bushnell-Hass). Em cada tudo de ensaio esterilizado, acrescentou-se 3 mL de meio BH (Bushnell-Hass) acrescido do indicador, 40 μ L de petróleo, e 50 μ L do caldo bacteriano, sendo vedado com papel alumino. Os tubos foram mantidos sob agitação em incubadora a 240 rpm em temperatura ambiente (27 ± 2 °C) (Figura 15), por um período de 24 a 48 horas. O ensaio foi realizado em triplicata para cada microrganismo.

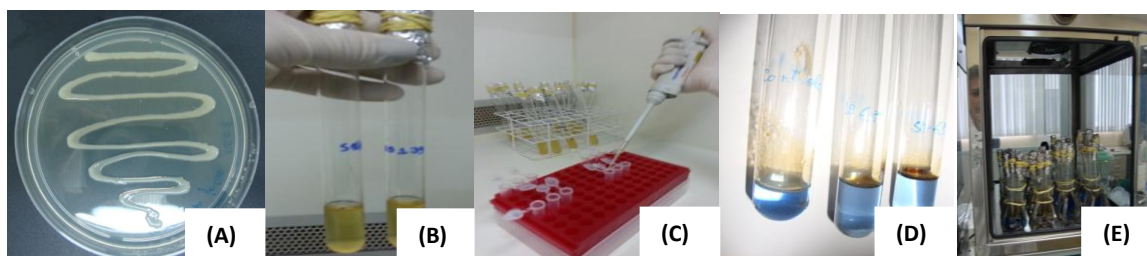


Figura 15: Ensaio de biodegradação com bactérias. (A) Bactérias com 24 horas de crescimento. (B) Crescimento celular bacteriano por 5 horas. (C), (D) e (E) Em cada tudo de ensaio esterilizado, acrescentou-se 3 mL de meio BH (Bushnell-Hass) acrescido do indicador, 40 μ L de petróleo, e 50 μ L do caldo bacteriano. Os tubos foram mantidos sob agitação em incubadora a 240 rpm em temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ\text{C}$).

3.3.2.3 - Preparo dos microrganismos - Fungos

Os fungos foram preparados para o ensaio conforme item 3.3.1.3

3.3.2.4 Preparo do ensaio de biodegradabilidade utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol com fungos

Após crescimento do fungo, foram retirados três inóculos padrões com o auxílio de uma seringa de 3 mL esterilizada sem bico para padronização do inóculo no ensaio.

Para o preparo do ensaio de biodegradabilidade utilizou-se 0,005 g do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) para 1 L de meio BH (Bushnell-Hass). Em tubos de ensaio esterilizados foram adicionados 3 mL do meio acrescido de indicador, 40 µL de petróleo, e um inóculo padronizado de fungo, sendo vedado com papel alumínio e observados por um período de 24h (Figura 16). O experimento foi realizado em triplicata para cada microrganismo. Para os meios de controle, os tubos de ensaio continham 3 mL de meio Bushnell-Hass acrescido de indicador e 40µL de petróleo, vedado com papel alumino nas mesmas condições.

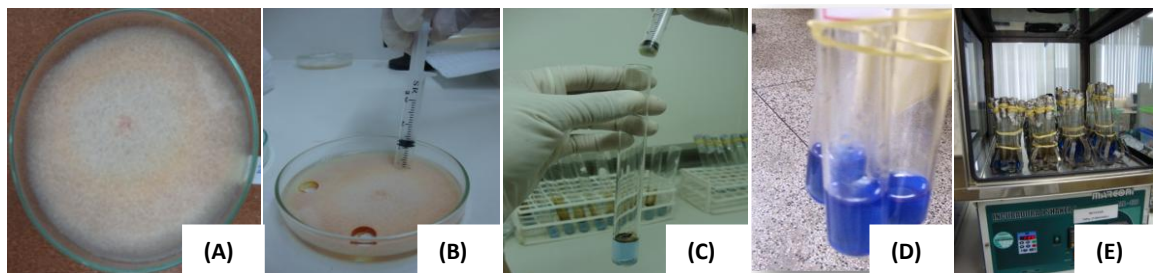


Figura 16: Ensaio de biodegradação com fungos. (A) Fungos com 10 dias de crescimento. (B) Inóculos patronizados de fungos. (C), (D) e (E) Em cada tubo de ensaio esterilizado, acrescentou-se 3 mL de meio BH (Bushnell-Hass) acrescido do indicador, 40 µL de petróleo, e 1 inóculo de fungo. Os tubos foram mantidos sob agitação em incubadora a 240 rpm em temperatura ambiente (27 ± 2 °C).

Os tubos foram observados na mudança de sua coloração, por um período de 24 e 48 horas.

3.4 Identificações das amostras selecionadas - Bactérias

A identificação molecular foi realizada no Laboratório de Tecnologia de DNA da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

3.4.1 Identificação Fenotípica

As linhagens foram caracterizadas por meio de caracterização morfológica. As seis bactérias isoladas e selecionadas de macrófitas aquáticas foram submetidas à coloração de Gram para verificação do padrão de coloração e morfologia bacteriana. As culturas foram fixadas, seguidas de coloração com cristal violeta por 1min, lavando com um filete de água ao término do tempo. Em seguida, adicionou-se lugol por 1min, procedendo à lavagem com filete de água após o tempo. Lavou-se com etanol 95%, seguido de lavagem com filete de água. Corou-se por 30s com contracorante fucsina, seguido de lavagem com filete de água e secagem em temperatura ambiente (MATSUURA, 1992).

As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico com aumento de 1000x (10x ocular por 100x objetiva) com óleo de imersão para verificação da morfologia (TORTORA et al., 2008).

3.4.2 Extração de DNA Genômico

A extração de DNA genômico, foi realizada utilizando o método fenol/clorofórmio (SAMBROOK E RUSSEL, 2001) com algumas modificações. Seguindo o protocolo, células bacterianas foram inoculadas em 3 mL de caldo LB (Luria-Bertani), e deixadas para crescimento em incubador com agitação durante 24h a 30 °C e 150 rpm. Após crescimento celular o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 2min para recuperação de células (repetição de duas vezes para concentração de 3 mL de cultivo). Para a etapa de lise celular o sedimento foi ressuspensionado em 1mL de tampão de extração (NaCl 100mM; EDTA 50nM; Tris-HCl 50mM com pH 8,0) e centrifugado a 12.000 rpm por 2min. Em seguida o material foi ressuspensionado em 300 µL de tampão de extração, 30 µL de enzima lisozima (10mg/mL), 10 µL de RNase (10mg/mL) para remoção de RNAs da reação e incubado durante 10min em temperatura ambiente. Foi adicionado 50 µL de Triton X-100 10% e 30 µL de NaCl 3M e incubado em banho seco a 60 °C por 5min. Após a incubação, foi acrescentado 20 µL de SDS 10% e 3mL proteinase K (10mg/mL), para remoção proteica, o material foi homogeneizado e incubado durante 30min a 37 °C.

Para o procedimento de lavagens das amostras, foi adicionado 450µL de fenol, visando à desnaturação de proteínas tornando-as insolúveis à fase aquosa, onde se encontram os ácidos nucleicos. O material foi agitado manualmente por 5min e centrifugado em 12.000 rpm por 2min. Neste processo formaram-se duas fases, sendo que apenas a fase aquosa foi recuperada onde foi adicionado 450µL de clorofórmio, para remoção de resíduos fenólicos e novamente centrifugados por 12.000 rpm por 2min. A fase aquosa formada na lavagem com clorofórmio foi recuperada para a etapa de precipitação do DNA, na qual foi adicionada 30µL de NaCl 3M e vagarosamente 1mL de etanol absoluto a -20 °C, novamente centrifugado a 12.000 rpm durante 2min. O precipitado foi hidratado com 1mL de etanol 70%, novamente centrifugado nas mesmas condições anteriores e foi deixado em repouso em fluxo laminar para secagem final por aproximadamente 15min. Após secagem, foi ressuspensionado com 100µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM pH 7.5; EDTA 1mM), incubado a 56°C por 15min e logo em seguida armazenado por 24h a -20 °C. Para visualização do DNA foi feita eletroforese em gel de agarose 0,8% em seguida o gel foi corado com brometo de etídio (0,5µg/mL).

3.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para Amplificação do Gene rRNA 16S

Para amplificação do gene 16S rRNA, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: 530 F (5'-TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMG CCG CGG -3') e 1492R (5'-TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT-3'). A reação de PCR foi feita com volume total de 25µL (2,5µL de tampão 10X sem MgCl₂; 2,5µL de MgCl₂ 25mM; 2µL de dNTPs 2,5mM; 1µL de iniciador forward 5pmol/µL; 1µL de iniciador reverso 5pmol/µL; 0,3µL de *Taq* DNA polimerase 5UµL, 14,7µL de água e 1µL DNA bacteriano em diferentes diluições).

O sistema de amplificação foi realizado em aparelho termociclador (*Applied Biosystems, 96 Well*), com desnaturação inicial a 95 °C por 2min, seguido por 30 ciclos com desnaturação de 94 °C por 40s; anelamento dos iniciadores a 58 °C por 40s e extensão a 72°C por 2min, seguido de extensão final de 72°C por 5min e término da reação a 10 °C por tempo indeterminado. Após a reação de amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% coradas com 0,5 µg/mL de brometo de etídeo e fotografadas sob luz UV em fotodocumentador

para verificação dos fragmentos 16S rRNA amplificados, tamanho e concentração aproximada. O marcador padrão utilizado para verificar o tamanho das bandas foi 1kb *ladder promega*.

3.4.4 Purificação das Amostras de Produtos de PCR

Os produtos da PCR foram submetidos à purificação usando enzimas ExoSap (exonuclease e fosfatase alcalina de camarão). 10µL do produto de cada reação de PCR foram usados, na qual se adicionou 4µL de *mix ExoSap* (exonuclease 10U/µL e Sap 1U/µL) nas proporções de 0,66µL/1µL de exonuclease e 0,34µL/µL de Sap. Incubou-se as amostras, primeiro por 15min a 37 °C e seguida por 15min a 80 °C.

3.4.5 Sequenciamento da Região Gênica rRNA 16S

Na reação de sequenciamento foi utilizado o *Kit Applied Biosystems*. Foram utilizados 5µL de DNA purificado para cada iniciador. Em cada tubo de amostra, adicionou-se 5µL de máster mix (0,65 µL de cada oligonucleotídeo iniciador; 2µL de tampão [5X Tris-HCl 1M pH 9,0; MgCl₂ 1M]; 0,3µL de ABI BigDye; e 5µL de água deionizada estéril e filtrada). O volume final da reação de sequenciamento foi de 10µL. A reação foi realizada em termociclador (*Applied Biosystems, 96 Well*) com o seguinte perfil de temperatura: 1) desnaturação inicial de 96 °C; 2) 16 ciclos de desnaturação a 96 °C por 10s, anelamento a 50°C por 15s e extensão a 60 °C por 75s; 3) 6 ciclos de desnaturação a 96 °C por 10s, anelamento a 50 °C por 15s e extensão a 60 °C por 90s; 4) 6 ciclos de desnaturação a 96 °C por 10s, anelamento a 50 °C por 15s e extensão a 60 °C por 120s; 5) 10 °C para finalizar.

Após a reação de sequenciamento foi feita a precipitação dos produtos seguindo o protocolo de etanol/EDTA, adicionando-se sobre este 32,5µL de mix Etanol/EDTA (2,5µL EDTA 125mM; 30µL de Etanol 100%), em seguida o material foi agitado vagarosamente por inversões de 3 a 4 vezes e deixado em repouso por 15min. O material foi centrifugado durante 25min em 2500 rcf a 4 °C. Imediatamente após a centrifugação, os poços foram invertidos sobre um papel para secagem e centrifugados por 1min a 100 rcf. Posteriormente, foi adicionado 30µL de etanol 70%, novamente o material foi centrifugado por 15min em 1450 rcf a 4 °C.

Imediatamente após a centrifugação, os poços foram invertidos sobre um papel para secagem e centrifugados por 1min a 100 rcf. Em seguida o material foi deixado em estufa para incubação por 15min a 37 °C e, logo após, foi ressuspenso em 10µL de formamida e vagorosamente vortexado. Em seguida o DNA foi desnaturado em termociclador a 95 °C durante 1min. Ao final as amostras foram submetidas à eletroforese capilar em sequenciador (3130XL - *Applied Biosystems DNA sequence*).

As sequências obtidas foram submetidas à análise de bioinformática para obtenção da tabela de qualidade de sequências, sequência *forward*, sequência *reverse* e sequências *contigs*, usando programa *Phred* e *Cap3* que estão disponíveis no site <<http://www.biomol.unb.br/phph/index.html>>. As sequências *reverse-complementar* foram obtidas usando suíte de manipulação de sequência disponível:< <http://www.bioinformatics.org/>>. A identificação molecular derivou do alinhamento comparativo entre espécies obtidas no BLAST assumindo-se o percentual de confiança para identidade bacteriana (ID) a partir de 99%.

3.5 Identificações dos isolados selecionados - Fungos

A identificação molecular foi realizada no Laboratório de Tecnologia de DNA da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

3.5.1 Extração de DNA cromossomal total de fungos filamentosos

A fim de complementar a identificação dos fungos, utilizou-se o método para a extração de DNA fenol/clorofórmio. Após o crescimento do fungo em meio líquido, o meio de cultura foi filtrado em funil de buckner em papel filtro e separado do micélio. Em seguida, o micélio foi macerado com pistilo e almofariz de porcelana com auxílio de nitrogênio líquido até formar uma pasta homogenia. A pasta formada foi transferida para um tubo eppendorf identificado, no qual acrescentou-se 1 ml de tampão de extração (SDS 10%, EDTA 0,5M, H₂O Miliq, TRIS-HCl pH 8, NaCl 5M). Após a maceração e o tampão de extração, os tubos foram incubados no banho-maria a 70°C por uma 1 hora. Após esse período, as amostras foram retiradas do banho-maria e centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado em um novo tubo eppendorf, indicando volume

aproximado de 1 ml. Em um novo tubo com o sobrenadante, adicionou-se fenol na mesma quantidade do sobrenadante. Os tubos foram agitados levemente para misturar o fenol à amostra.

Depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. Novamente, o sobrenadante foi coletado cuidadosamente e transferido para outro tubo eppendorf. Ao tubo com sobrenadante, adicionou-se a mesma quantidade do sobrenadante de clorofane (clorofórmio e fenol na proporção 1:1). Depois de adicionado o clorofane, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm. Novamente, o sobrenadante foi coletado em um novo tubo eppendorf e ao mesmo volume do sobrenadante, é adicionado clorofil (clorofórmio e álcool isoamílico na proporção 24:1). Em seguida, o sobrenadante foi coletado cuidadosamente e transferido para um novo tubo eppendorf. Depois de adicionado o clorofil, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi coletado em novo tubo eppendorf. Para precipitar o DNA, em cada amostra, ao seu sobrenadante foi colocado 60% do seu volume de álcool etílico e 30% de seu volume de NaCl 5M. Todas as amostras foram homogeneizadas levemente e colocadas no freezer por 10 minutos.

Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante de cada amostra foi descartado com muito cuidado para que o pellet não fosse também descartado. A fim de limpar de modo mais completo o pellet, adicionou-se 300 µl de álcool etílico 70% em cada amostra e retirado em seguida. Depois desse processo, todos os tubos permaneceram secando por 1 hora a 37 °C. Após a secagem, aos tubos foram adicionados de 300 a 600 µl de TE, dependendo da viscosidade do líquido. As amostras foram guardadas no freezer a -20 °C.

3.5.2 Quantificação do DNA

Para verificar a extração e estimar a concentração de DNA, foram colocados 5µl do DNA genômico e 5µl de tampão TBE de amostra em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo 10mg/mL. Foi realizada a fotodocumentação das imagens com auxílio de transluminador com luz ultravioleta.

3.5.3 Amplificação do DNA pela reação de PCR

Para a amplificação, foram usados os *primers* do gene 5,8S rDNA e as regiões espaçadoras ITS 1 e ITS 4. A reação de amplificação de PCR foi realizada conforme o protocolo descrito na tabela 4, sendo o volume final de 25 μ L.

Tabela 4: Protocolo da reação de amplificação do PCR para fungos, distinguindo somente o tipo de *primers* específicos

Reagentes	1 Reação (μ L)	Concentração
Água deionizada autoclavada	7,7	---
Tp 5X	5,0	1x
MgCl ₂ 25mM	2,5	2,5 mM
dNTP 2,5mM	2,5	2,5 mM
Primer(F) 5 pmoles/ μ L	1,0	0,2 μ L
Primer2(R) 5 pmoles/ μ L	1,0	0,2 μ L
Taq 5U/ μ L	0,3	1,5 U
DNA 10ng/ μ L	5,0	
Total	25,0	

A quantidade de DNA utilizado para a reação de PCR foi de 50 ng de DNA. O programa utilizado foi programado com o seguinte perfil de temperatura, desnaturação inicial: 95 °C por 2 minutos; desnaturação: 94 °C por 40 segundos; anelamento dos *primers*: 60 °C por 1 minuto; extensão da fita: 72 °C por 2 minutos; repetição das etapas de 2 a 4 em 35 ciclos; extensão final: 72 °C por 5 minutos; e °C: Forever.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% por cerca de uma hora e em seguida, corados por 20 minutos com brometo de etídio 1%.

3.5.4 Sequenciamento do DNA por PCR ExoSAP (Exonuclease I + Fosfatase Alcalina de Camarão)

As enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina de Camarão foram utilizadas para limpar a reação de PCR de restos de *primers* que não foram incorporados ao DNA. Essa reação de limpeza teve como volume final 28 μ l para cada amostra: 20 μ l da amostra + 8 μ l de ExoSAP (para cada 5 μ l da amostra, coloca-se 2 μ l de ExoSAP).

O programa obedeceu as seguintes condições de ciclagem, incubar a 37 °C por 15 minutos e inativar ExoSAP a 80 °C por 15 minutos.

Em seguida, para a reação de sequenciamento, 8µl do Mix (H₂O, *Primers* e BigDye) foram adicionados a 2 µl de DNA, com os reagentes listados na tabela 5.

Tabela 5: Protocolo da reação para a limpeza da reação por meio das enzimas Exonuclease I e Fosfatase Alcalina de Camarão

Reagentes	1 Reação (µL)
Água deionizada autoclavada	3,7
Tp 5X Buffer	2,0
Primer1(F) 2 µM	1,0
Primer2(R) 2 µM	1,0
ABI BigDye v 3.1	0,3
DNA 10ng/µL.	2,0
Total	10,0

O programa utilizado foi programado com o seguinte perfil de temperatura: desnaturação inicial: 96 °C por 60 segundos; desnaturação: 96 °C por 10 segundos; anelamento dos *primers*: 50 °C por 15 segundos; extensão da fita: 60 °C por 75 segundos; repetição das etapas de 2 a 4 em 15 ciclos; desnaturação: 96 °C por 10 segundos; anelamento dos *primers*: 50 °C por 15 segundos; extensão da fita: 60 °C por 90 segundos; repetição das etapas de 6 a 8 ciclos e desnaturação: 96 °C por 10 segundos.

3.5.5 Reação de sequenciamento

Após a “limpeza” da reação de PCR de restos de *primers*, a reação para o seqüenciamento seguiu o seguinte protocolo para precipitação de placa em sequenciador ABI. O volume do produto de reação de seqüenciamento foi de 10µl, adicionar 2,5 µl de EDTA Mm, 30 µl de álcool etílico absoluto, seguido pela agitação em vortex. Após esse processo a placa ficou em repouso por 15 minutos, seguindo pela centrifugação por 30 minutos a 2500 rcf a 4°C. Seguido da centrifugação a placa foi invertida em papel toalha e novamente centrifugada por um minuto a 100 rcf. Foi adicionado 30 µl de álcool etílico diluído a 70% em cada poço e centrifugado novamente por 15 minutos a 1650 rcf. Após a centrifugação, a placa foi invertida em papel toalha e centrifugada por um minuto a 100 rcf. As placas foram secas ao

abrigo da luz, por uma hora a temperatura ambiente. Após esse processo as amostras foram ressuspensas em 10 µl de formamida HiDi e levemente vortezadas. As amostras foram desnaturadas em termociclador por 2 minutos a 95 °C para injeção.

3.5.6 Análise de dados

A fim de verificar a qualidade das sequências nucleotídicas, as ferramentas usadas foram: Análise via PHRED (verificação da qualidade das sequências); BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI (The National Center for Biotechnology Information) para análise de similaridade com bancos de dados.

3.6 Petróleo e óleo diesel utilizados no ensaio de biodegradação

No experimento utilizou-se o petróleo cru e óleo diesel proveniente da Base Petrolífera de Urucu, Amazonas, Brasil. O petróleo é considerado leve e de alta qualidade (LOPES et al., 2005). As dosagens de petróleo foram utilizadas conforme descrita por Batista (2009) com adaptações.

3.7 Produção e ensaio de degradação por consórcios microbianos, através da técnica de bioaumento, com potencial em degradar óleo diesel nas águas do rio Negro.

Por meio dos ensaios iniciais de biodegradabilidade com 155 bactérias e 54 fungos, foram selecionados os microrganismos que apresentaram maior eficiência em degradar os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), dentre eles destacaram-se seis bactérias e sete fungos. As cepas selecionadas de fungos e bactérias a partir dos ensaios preliminares constituíram consórcios microbianos, visando avaliar a capacidade que os microrganismos em conjunto possuem em degradar óleo diesel nas águas do rio Negro.

Os experimentos com os ensaios dos consórcios, denominados de técnica de bioaumento, foram desenhados conforme tabela 6.

Tabela 6: Especificações e produção de consórcios microbianos através da técnica de bioaumento

Nº	Consórcio	Especificações
01	Bactérias	40mL de água do rio Negro + 40µL de diesel + consórcio de bactérias.
02	Fungos	40mL de água do rio Negro + 40µL de diesel + consórcio de fungos.
03	Controle I	40mL de água do rio Negro + 40µL de diesel
04	Controle II	40mL de meio líquido BH (Bushnell-Hass) + 40µL de diesel
01	Misto (Fungos e Bactérias)	80mL de água do rio Negro + 80µL de diesel + consórcio de bactérias e consórcio de fungos.
02	Controle I	80mL de água do rio Negro + 80µL de diesel
03	Controle II	80mL de meio líquido BH (Bushnell-Hass)+ 80µL de diesel

Após 15 dias de incubação o ensaio foi encaminhado para extração líquido-líquido dos HPAs.

3.7.1 Coleta da água do rio Negro para realizar ensaio de biodegradação por consórcios microbianos.

Um dos componentes para a realização dos ensaios foi a água do rio Negro, com o objetivo de aproximar o máximo possível do ambiente de estudo, com o cultivo de um microcosmo.

O local escolhido foram as mediações da área da praia do Tupé, pois o ambiente apresentava pouca interferência humana. A água foi coletada com auxílio de uma garrafa de profundidade VAN DORN, que devido a sua robustez e nenhum contato da amostra com metal as condições de temperatura e estabilidade de valores de pH entre 4,3 e 5,2 da água apresentaram-se estáveis para o ensaio. A coleta foi realizada em uma profundidade de aproximadamente 5 metros da superfície (Figura 17).

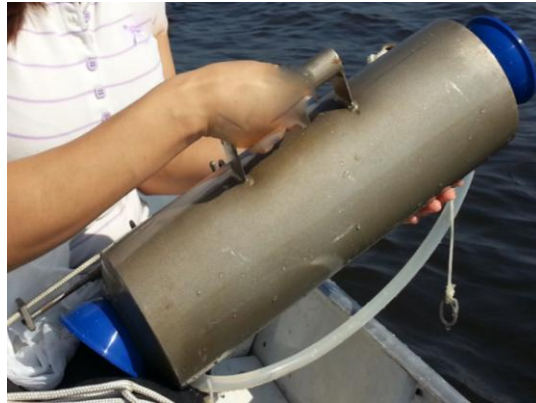


Figura 17: Coleta da água no rio Negro nas mediações da área da praia do Tupé.

3.7.2 Bactérias utilizadas no consórcio

As bactérias isoladas e selecionadas das macrófitas aquáticas foram: B123, B121, B41, B132, B102 e B139 e preparadas para o ensaio conforme item 3.3.1.1.

3.7.3 Produção e ensaio do consórcio de bactérias com potencial em degradar óleo diesel em águas do rio Negro.

Constatado crescimento celular bacteriano através da densidade óptica (DO_{610nm}) 1, iniciou-se o consórcio.

Conforme metodologia descrita por Batista (2009) com adaptações, de cada bactéria retirou-se alíquotas 50 µL de caldo bacteriano e foram colocadas em tubo eppendorf de 2,0 mL para formulação do consórcio. As alíquotas foram centrifugadas em centrífuga PROLAB 6200 rpm por 10 minutos a 12000 rpm. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado (células) ressuspenso com 1 mL do meio líquido BH (Bushnell-Hass).

As alíquotas de 1 mL de bactérias compõe o consórcio, e este foi adicionado em Erlenmeyers de 125 mL com 40 mL de água do rio Negro e 40 µL de óleo diesel. Após preparo do consórcio bacteriano os Erlenmeyers foram vedados com papel alumino e mantidos sob agitação em incubadora a 120 rpm em temperatura ambiente (27±2 °C) por um período de 15 dias. O experimento foi realizado em triplicata.

Para o consórcio bacteriano foram utilizados dois controles, o primeiro em Erlenmeyers 125 mL, acrescentou-se 40 mL de água do rio Negro e 40 μ L de óleo diesel, para o segundo controle em Erlenmeyers 125 mL acrescentou-se 40 mL de meio líquido BH (Bushnell-Hass) e 40 μ L de óleo diesel, seguindo as mesmas condições do consórcio e com triplicata para o ensaio (Figura 18).

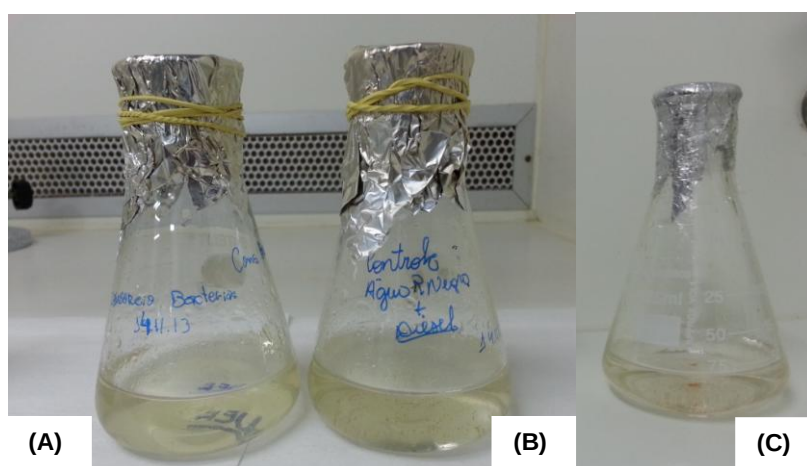


Figura 18: Produção de Consórcio: (A) Consórcio de bactérias, composto por seis bactérias + água do rio Negro + diesel. (B) Controle: água do rio Negro + diesel. (C) Controle: meio seletivo BH (Bushnell Haas) + diesel.

Após 15 dias o ensaio foi encaminhado para extração líquido-líquido dos HPAs.

3.7.4 Fungos utilizados no consórcio

Os fungos isolados e selecionados das macrófitas aquáticas foram: F17, F24, F5, F53, F31, F36 e F14 e preparados para o ensaio conforme item 3.3.1.3.

3.7.5 Produção e ensaio do consórcio de fungos com potencial em degradar óleo diesel nas águas do rio Negro.

Após crescimento dos fungos, foram retirados com auxílio de uma seringa de 3 mL esterilizada, sem bico, um inóculo padronizado de cada fungo selecionado para serem introduzidos no consórcio.

Os sete fungos fizeram parte do consórcio, os inóculos retirados de cada um dos fungos foram inoculados em Erlenmeyers de 125 mL com 40 mL de água do rio Negro e 40 µL de óleo diesel. Após preparo do consórcio dos fungos os Erlenmeyers foram vedados com papel alumínio e mantidos sob agitação em incubadora a 120 rpm em temperatura ambiente (27 ± 2 °C) por um período de 15 dias. O experimento foi realizado em triplicata para os experimentos.

Para o consórcio dos fungos foram utilizados dois controles, o primeiro em Erlenmeyers 125 mL, acrescentou-se 40 mL de água do rio Negro e 40 µL de óleo diesel, para o segundo controle em Erlenmeyers 125 mL acrescentou-se 40 mL de meio líquido BH (Bushnell-Hass) e 40 µL de óleo diesel, seguindo as mesmas condições do consórcio e com triplicata para cada controle (Figura 19).

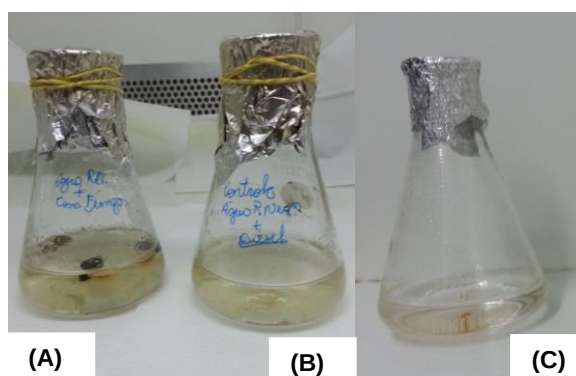


Figura 19: Produção de Consórcio: (A) Consórcio de fungos composto por sete fungos + água do rio Negro + diesel. (B) Controle: água do rio Negro + diesel. (C) Controle: meio seletivo BH (Bushnell Haas) + diesel.

Após 15 dias o ensaio foi encaminhado para extração líquido-líquido dos HPAs.

3.7.6 Produção e ensaio do consórcio misto de microrganismo composto de fungos e bactérias.

Para a composição do consórcio misto foram utilizadas as seguintes bactérias: B139, B102, B132, B41, B121 e B123. As bactérias foram preparadas para o ensaio conforme itens 3.3.1.1., complementando o consórcio misto os fungos utilizados foram: F17, F24, F5, F53, F31, F36 e F14, para a composição do consórcio. Os fungos foram preparados para o ensaio conforme item 3.3.1.3.

3.7.7 Produção de consórcio misto (fungos e bactérias) com potencial em degradar óleo diesel nas águas do rio Negro.

Para a composição do consórcio misto utilizou-se a composição de 1mL de bactérias, conforme item 3.7.3 e os inóculos retirados de cada um dos sete fungos, conforme item 3.7.5. Em Erlenmeyers de 125 mL acrescentou-se 80 mL de água do rio Negro, a composição de 1 mL de bactérias e sete inóculos de fungos e mais 80 μ L de óleo diesel. Após preparo do consórcio misto, os Erlenmeyers foram vedados com papel alumino e mantidos sob agitação em incubadora a 120 rpm em temperatura ambiente (27 ± 2 °C) por um período de 15 dias. O experimento foi realizado em triplicata (Figura 20).

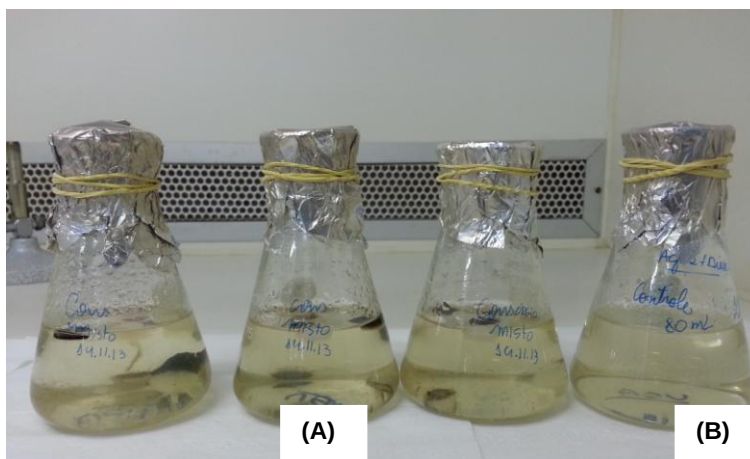


Figura 20: Produção de Consórcio: (A) Consórcio misto: composto por sete fungos e seis bactérias + água do rio Negro + diesel. (B) Controle: água do rio Negro + diesel.

Para o ensaio do consórcio microbiano misto foram utilizados dois controles, o primeiro em Erlenmeyers 125 mL, acrescentou-se 80 mL de água do rio Negro, 80 μ L de óleo diesel e para o segundo controle em Erlenmeyers 125 mL acrescentou-se 80 mL de meio líquido BH (Bushnell-Hass) mais 80 μ L de óleo diesel, seguindo as mesmas condições do consórcio de bactéria e consórcio de fungo com triplicata para o ensaio. O objetivo do controle II é verificar a interferência da microbiota presente na água do rio Negro.

3.8 Quantificação dos HPAs nos ensaios de biodegradação do diesel por consórcios microbianos

As análises foram realizadas na Universidade do Estado do Amazonas, no Núcleo de Apoio Instrumental de Análises Químicas e Biológicas (NAI).

Os HPAs do diesel foram quantificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG/ EM). Os ensaios analisados foram do consórcio de bactérias conforme item 3.7.3, consórcio de fungos conforme item 3.7.5 e consórcio misto (F/B) conforme item 3.7.7.

3.8.1 Solventes e padrões utilizados

Os solventes e reagentes utilizados no experimento para extração foram: hexano, diclorometano, fenantreno-d10, fluoranteno-d10, e sulfato de sódio anidro.

A solução padrão dos *surrogates* foi composta por dois HPA's deuterados, o naftaleno-d8 e o fenantreno-d10, na concentração de 1000 ug.mL⁻¹. E a solução do padrão interno (PI) foi preparada com fluoranteno deuterado (Flu-d10) a 500 ug.mL⁻¹. A escolha destes compostos como *surrogate* e PI, ocorreu devido a semelhança entre as suas características estruturais e às dos analitos.

Para a quantificação e identificação dos compostos foi utilizada uma solução padrão de 18 HPAs (*Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix* - Supelco Analytical, 47543-U/ 2000ug/mL em C₆H₆:CH₂Cl₂), com 99% de pureza, da marca Sigma Aldrich contendo: Naftaleno; 2-metilnaftaleno; 1-metilnaftaleno; Bifenil, Acenaftileno; Acenafteno; Fluoreno; Fenantreno; Antraceno; Fluoranteno; Pireno; Benzo[a]antraceno; Benzo[b]fluoranteno; Benzo[k]fluoranteno; Benzo[a]pireno; Indeno[1,2,3-c,d]; Dibenzo[a,h]antraceno; Benzo[g,h,i]perileno.

Neste ensaio foi utilizado o diesel que é um derivado do petróleo com menos interferentes para as análises de cromatografia e apresenta o mesmo perfil de constituinte de hidrocarbonetos aromáticos que o petróleo.

3.8.2 Extração líquido – líquido dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

A extração dos HPA foi realizada pelo método de extração líquido-líquido. Antes de iniciar o processo, foi adicionado na amostra 50 µL do padrão *surrogate* (1

mg/mL) e agitado em Vórtex, para homogeneização da amostra com os padrões. Após este procedimento, a extração iniciou-se com a adição de 30 mL da mistura de solventes, seguida de agitação em Vórtex por um minuto no modo contínuo.

O *surrogate* servirá para verificar possíveis perdas dos constituintes das amostras durante o processo de extração, visando obter a porcentagem de recuperação do método.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) do diesel presente nas amostras foram extraídos com 80 mL da mistura de solventes hexano e diclorometano para as amostras de 40 mL e 160 mL da mistura de solventes hexano e diclorometano para as amostras de 80 mL, na proporção 3:2 (v/v). As misturas de solventes foram adicionadas nas amostras e agitada no ultra-turrax a 14.500 rpm por 2 minutos, com três repetições para retirada da fase orgânica. Após agitação vigorosa e a separação das fases, foi retirada a fase orgânica contendo o composto de interesse para um erlemeyer. Foram feitas três extrações em cada amostra ou até atingir a eficiência da extração verificada pela técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com revelação na luz ultravioleta. Acrescentou-se sulfato de sódio anidro no erlemeyer contendo a fase orgânica, para retirada de água remanescente. Em seguida as amostras secas foram filtradas em um funil e papel de filtro para um balão de fundo chato. O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo até 900 uL para concentração das amostras até 1 mL (Figura 21).

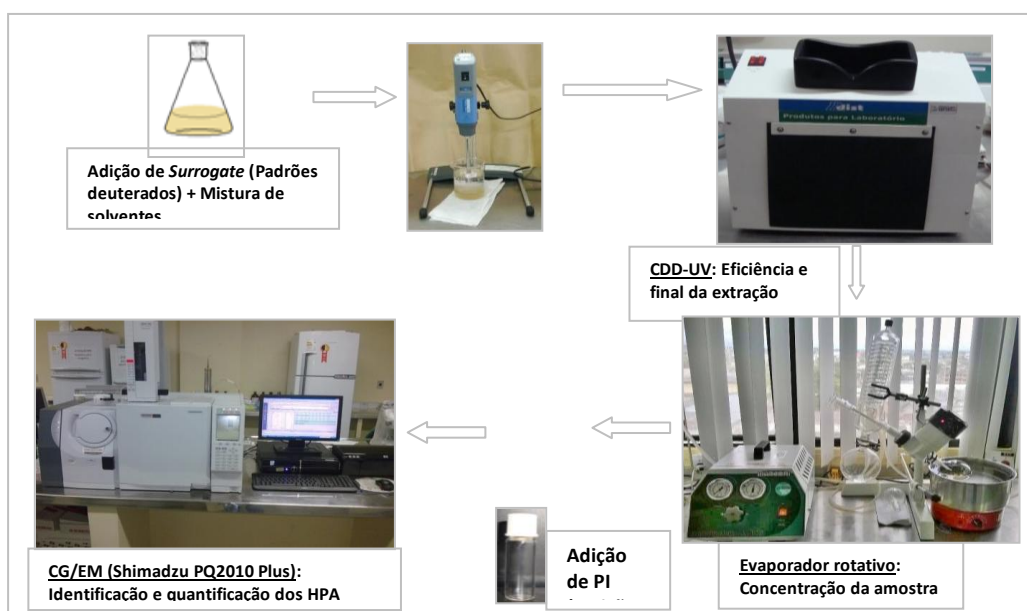


Figura 21: Processo de extração com o sistema Ultra- turrax, adaptado de Passarini (2011)

Após a concentração dos extratos foi adicionado o P.I. (Padrão Interno), para verificação e comparação se ocorreram perdas dos compostos das amostras.

As amostras concentradas foram analisadas por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG/EM).

3.8.3 Condições Cromatográficas

Foi utilizado um Cromatógrafo a Gás (Shimadzu 2010) equipado com *Autosampler* Shimadzu AOC-20i e Espectrômetro de Massas (CG-EM Shimadzu QP 2010 Plus). O equipamento operou no modo de monitoramento seletivo de íons (SIM – single ion monitoring) (70eV). No CG foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida RESTEK RTX-5MS 30m x 0,25 mm de diâmetro interno e 1 µm de filme interno formada por 5% de difenil e 95% de dimetil-polissiloxano .

A rampa de temperatura utilizada na separação dos compostos iniciou em 40°C mantendo-se em isoterma por um minuto, seguido de uma rampa de aquecimento na taxa de 20 °C/min até 60 °C, depois 5 °C/min até 260°C e 10 °C/min até 280°C com isoterma de um minuto, finalizando com 45 min de tempo de corrida (Figura 22).

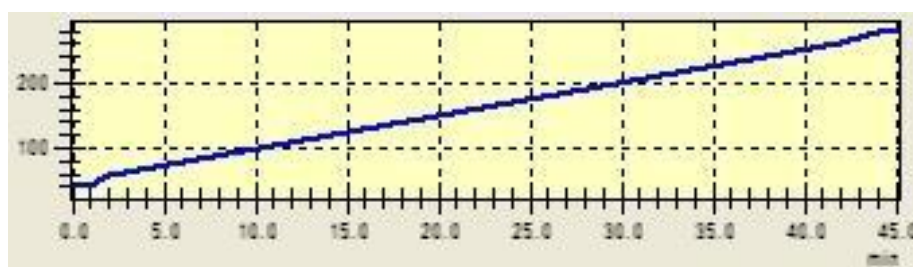


Figura 22: Rampa analítica da variação de temperatura utilizada nas análises das amostras, dos ensaios de biodegradação de HPA, por Cromatografia Gasosa.

A temperatura do injetor foi 270 °C no modo *splitless*, com *Sampling Time* ajustado a 1min. Modo do fluxo ajustado para velocidade linear, com pressão de 101.5 kPa; fluxo total 95.2 ml/min; fluxo da coluna 1.81ml/min; velocidade linear a 48.5 m/sec; fluxo de purga com 3.0 ml/min e *Split ratio* 50.

As temperaturas da fonte de íons e da interface do espectrômetro de massas, ambas foram de 250°C, com tempo de corrida do corte do solvente para 3 minutos. A voltagem dos detectores foi definida de acordo com o *tunning* fixado para o método.

Foi injetado 1 µL do extrato com PI em CG/EM e obtidos os cromatogramas.

Os HPAs foram identificados pela comparação entre os tempos de retenção, obtidos nos cromatogramas, dos compostos da amostra e da mistura de padrões, e/ou pela massa do íon molecular principal (Tabela 7).

Tabela 7: 18 HPAs constituintes da mistura de padrões utilizados para identificar e quantificar os HPAs, e seu respectivo íon molecular

HPA	Íon	HPA	íon
Naftaleno	128	Fluoranteno	202
2-metilnaftaleno	142	Pireno	202
1-metilnaftaleno	142	benzo(a)antraceno	228
Bifenil	154	benzo(b)fluoranteno	252
Acenaftileno	152	benzo(k)fluoranteno	252
Acenafteno	153	benzo(a)pireno	252
Fluoreno	166	indeno(1,2,3-c,d)pireno	276
Fenantreno	178	dibenzo(a,h)antraceno	278
Antraceno	178	benzo(g,h,i)perileno	276

3.8.4 Quantificação dos HPA do diesel dos ensaios de biodegradação

Os HPA foram quantificados pelo método da padronização interna. A quantificação foi realizada pela área do pico de cada composto e a curva analítica de padrões. Considerando-se a correção da área, pelo fator de resposta obtido, em relação à área do *surrogate* e do padrão interno (PI).

A solução dos padrões foi injetada em CG/EM para o desenvolvimento do método de análise e da rampa de temperatura no CG. Após várias tentativas de análise, o método foi otimizado e os tempos de retenção dos compostos foram estabelecidos.

Utilizando o método desenvolvido, foram injetadas as soluções da curva analítica e as amostras. Após a injeção foram obtidos os cromatogramas com as

áreas dos compostos. Inicialmente, foram utilizadas as áreas dos *surrogates* e do PI para determinar a eficiência do método, isto é, verificar o quanto do padrão *surrogate*, que foi submetido ao processo de extração, foi recuperado em relação ao PI adicionado no final da extração. A porcentagem de recuperação foi obtida pela Equação 1.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Área do Padrão Surrogate}}{\text{Área do Padrão Interno}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

A partir da porcentagem de recuperação dos *surrogates* foi obtido o fator de correção, a fim de corrigir as áreas dos compostos de possíveis perdas ocorridas durante o processo de extração. Após a correção da área dos compostos, foram determinadas as concentrações finais, através da equação da reta gerada pela curva analítica de cada composto. Assim, foram calculadas as concentrações individuais dos HPAs e a partir destas foi obtida a somatória dos HPAs (Σ HPAs totais) das amostras e dos controles.

A partir das concentrações dos HPAs individuais e totais foi calculada a Taxa de biodegradação (Taxa%) dos microrganismos, conforme a Equação 2.

$$\text{Biodegradação (\%)} = \frac{(\text{Média HPA Controle} - \text{HPA Amostra}) \times 100}{\text{Média da HPA Controle}} \quad \text{Equação 2}$$

3.8.4.1 Curva analítica

A partir da solução padrão do Mix de 18 HPAs foi estabelecida uma curva analítica com seis concentrações conhecidas (1, 5, 10, 15, 20 e 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). As concentrações dos pontos da curva analítica foram escolhidas de acordo com a faixa estimada para as concentrações das amostras. As áreas dos picos obtidos no

CG/EM foram integrados por um sistema de aquisição de dados, determinando o fator de resposta, os índices de retenção e as curvas para cada composto. A partir da curva dos analitos, foi obtida a equação da reta ($y=ax+b$) e o valor de R^2 . O índice de correlação linear de Pearson foi igual ou superior a 99% ($r^2 = 0,996$). Conforme observa-se nas curvas dos compostos estudados (Figuras 23, 24, 25, 26 e 27)

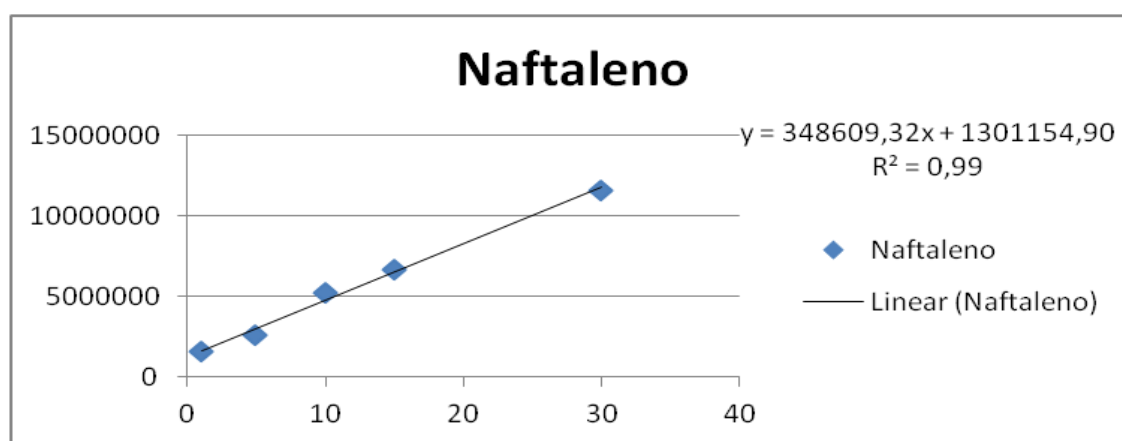


Figura 23: Curva de calibração do Naftaleno baseado em diferentes concentrações.

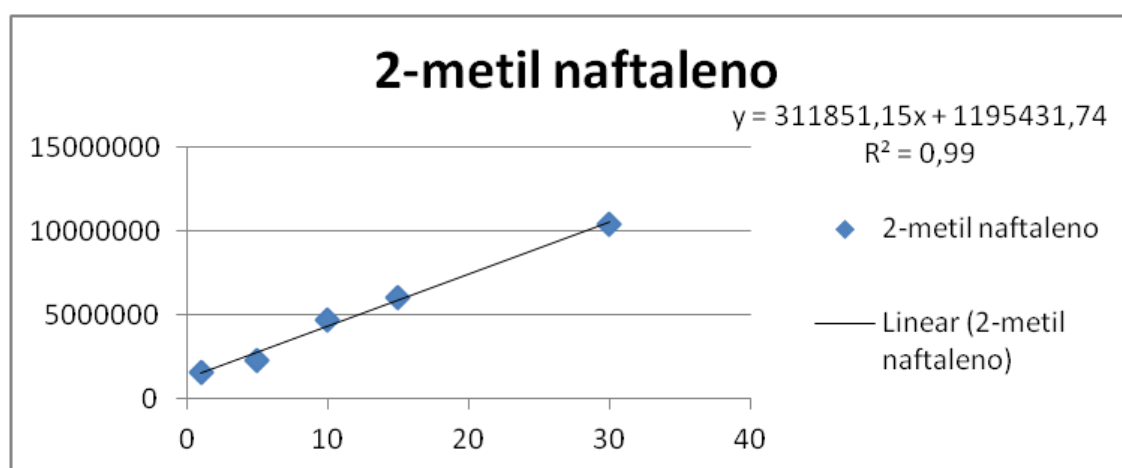


Figura 24: Curva de calibração do 2-metil naftaleno baseado em diferentes concentrações.

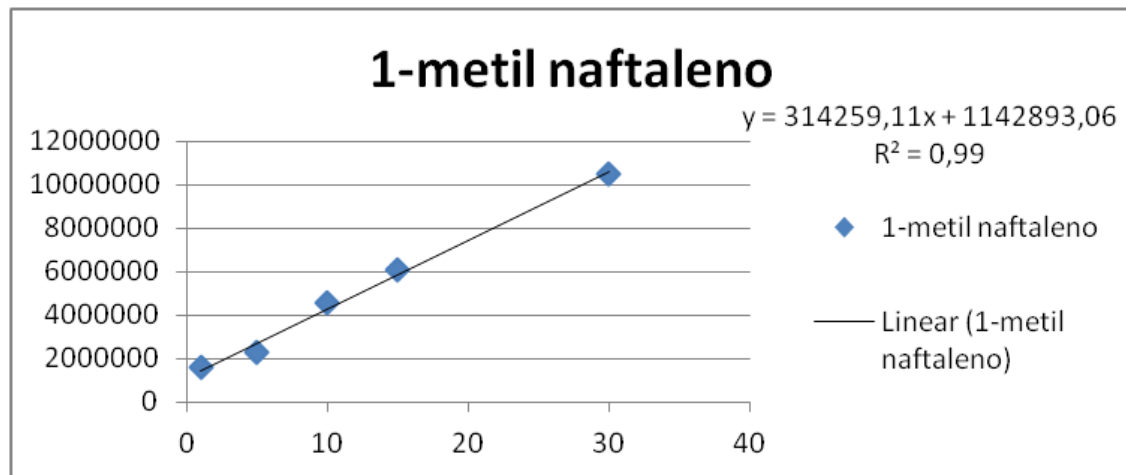


Figura 25: Curva de calibração de 1-metil naftaleno baseado em diferentes concentrações.

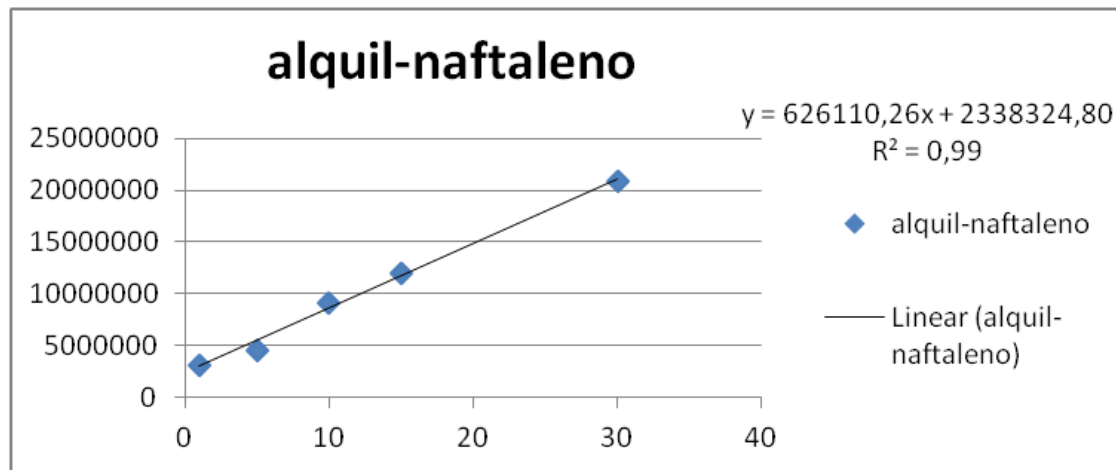


Figura 26: Curva de calibração de alquil-naftaleno baseado em diferentes concentrações.

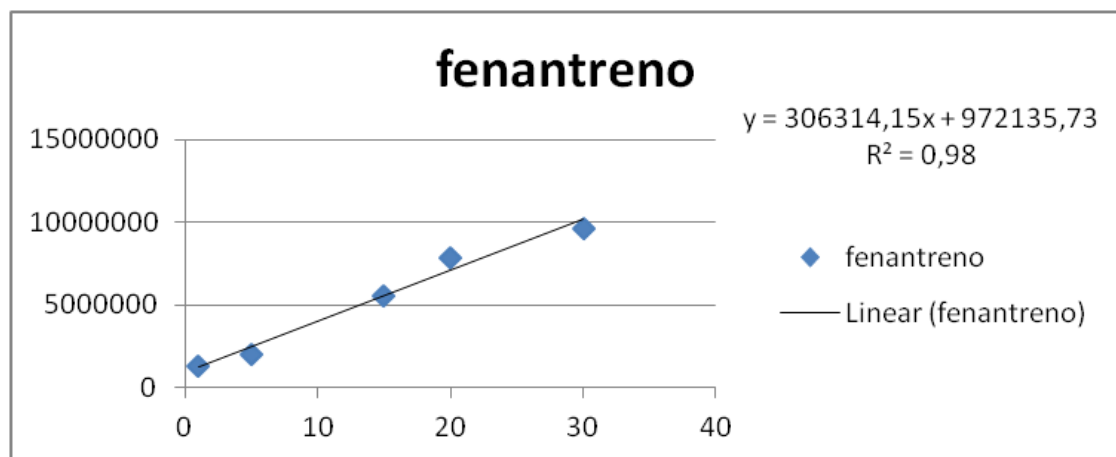


Figura 27: Curva de calibração do e alquil-naftaleno baseado em diferentes concentrações.

3.8.4.2 Controle de Qualidade Analítica

O controle de Qualidade Analítica consiste em um conjunto de procedimentos, técnicas e estratégias para assegurar maior confiabilidade aos resultados analíticos. Através da leitura de amostras padrões determina-se a precisão, exatidão e a recuperação dos processos analíticos que estão sendo utilizados (WADE & CANTILLO, 1994).

No controle de qualidade deste trabalho foram realizados os seguintes procedimentos:

Foram utilizados os padrões *Surrogate* e o Padrão Interno (PI) que devem ser compostos quimicamente inertes, que se assemelham aos compostos analisados e não causam interferências. Devem ser compostos que não ocorrem na natureza (geralmente fluorados e deuterados), além de terem tempo de retenção, espectros diferentes dos analitos e eluir em uma área representativa do cromatograma.

Os *Surrogates* são sempre adicionados na amostra antes da extração e análise para monitorar todas as perdas dos processos, que ocorrem por efeitos incomuns da matriz, erros grosseiros de processamento da amostra.

A recuperação dos *surrogates* é feita de maneira indireta, através da adição do PI na amostra, ao final da extração. A área do *Surrogate* é relacionada com o a área do PI, obtendo-se as perdas do processo e os fatores de correção. Assim, as áreas dos compostos analisados, antes de serem quantificados, foram corrigidas através do fator de correção.

As amostras em triplicata foram utilizadas para avaliar a precisão analítica do método, servindo de controle para os erros de manuseio.

Os controles foram utilizados para obtermos as concentrações dos HPAs do diesel adicionados no ensaio, sem a interferência dos microrganismos. Foram utilizados para obtermos as taxas de biodegradação dos HPAs.

3.9 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico BioEstat 5.0.

3.10 Ensaio de toxicidade utilizando espécies de *Artemia salina*

Após cada período de incubação para a realização dos ensaios de biodegradação foram colhidas alíquotas dos sobrenadantes para a realização dos ensaios de toxicidade. As amostras utilizadas foram alíquotas dos extratos dos consórcios de bactérias, fungos e consórcio misto composto por fungos e bactérias.

3.10.1 Preparo e cultivo das *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade com espécies de *Artemia salina* foi descrito conforme Atayde (2008).

1) Preparo da solução SM3%

Preparou-se uma solução de sal marinho não-iodado 3% (SM3%). Em Erlenmeyers de 500 mL acrescentou 100 mL de água destilada e 3 g de NaCl ajustou-se o pH para 6,5, sendo considerado ótimo para eclosão dos cistos e crescimento das larvas. Após preparo a solução foi esterilizada em autoclave a 121°C, durante 15 minutos.

2) Preparo dos cistos comerciais de *Artemia salina*

Os cistos comerciais foram mantidos na geladeira, dessa forma, retirou-se 15 minutos antes para o manuseio, pesou-se 100mg (0,1g) e semeou-se este quantitativo em 100 mL de solução SM3% contido em Erlenmeyers de 500 mL. Os Erlenmeyers foram levados para agitação em agitador regulado à 30°C e 140

rpm.min⁻¹, durante 28 horas, sob iluminação constante de luminária de bancada acoplada lâmpada de 40 watts.

3) Coleta das larvas de *Artemia salina*

Após crescimento das larvas, transferir 200 µm da suspensão para uma placa de Petri previamente esterilizada, e com auxílio de uma micropipeta regulada para 10 µm retirar uma larva a cada pipetagem, observada com microscópio estereoscópio. Ao final deverão ser colocadas 10 larvas num volume de 100 µm.

4) Preparo das concentrações-teste para determinação de CL₅₀ (concentração letal média)

Para a realização do referido ensaio, utilizou-se diferentes concentrações aquosas, conforme tabela a seguir:

Tabela 8: Ensaio de toxicidade com *Artemia salina* em concentrações de 1,56 a 50%

Concen- trações	100% Controle negativo	Água 0% Controle positivo	50%	25%	12,5%	6,25%	3,125%	1,56%
SMS%	1700 µL	1700 µL	1700 µL	1700 µL	1700 µL	1700 µL	1700 µL	1700 µL
Extrato	200 µL	-	100 µL	50 µL	25 µL	12,5 µL	6,25 µL	3,12 µL
Água purificada	-	200 µL	100 µL	150 µL	175 µL	187,5µL	193,75µL	196,88µL
Susp. de larvas	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Volume final	2000 µL (2mL)	2000 µL (2mL)	2000 µL (2mL)	2000 µL (2mL)	2000 µL (2mL)	2000 µL (2mL)	2000 µL (2mL)	2000 µL (2mL)

O procedimento foi realizado em placas multipoços, que foram colocadas as concentrações definidas e identificadas com o volume final para 2 mL e com 10 larvas de *Artemia salina* em cada poço (Figura 28).

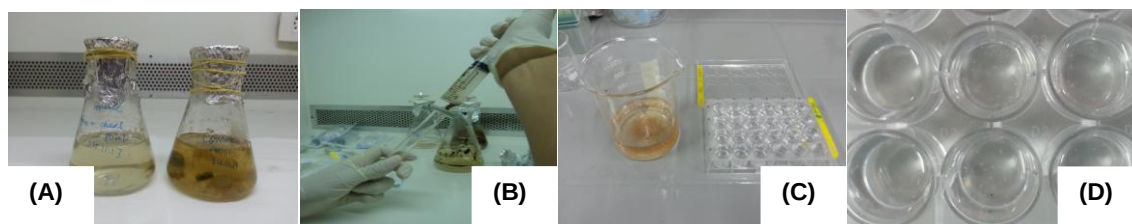


Figura 28: Etapas do ensaio de toxicidade com *Artemia salina*. (A) Consórcio de microrganismos com 15 dias de incubação. (B) Extratos filtrados em millipore 0,25µm. (C) *Artemia salina* com 28 horas de incubação. (D) Multiposos com as concentrações dos extratos e 10 *Artemias salina* em cada poço.

Após 28 horas foi determinada, sob iluminação constante, a mortalidade dos náuplios de *Artemia salina*. A observação foi realizada com auxílio de microscópio estereoscópio para verificar a imobilidade das larvas.

5) Determinação do grau de toxicidade

A determinação do grau de toxicidade dos extratos foi baseado na mortalidade das larvas de *Artemia salina*, conforme tabela 9.

Tabela 9: Classificação da toxicidade de extratos de acordo com a mortalidade das larvas *Artemia salina*

MORTALIDADE (em%)	CLASSIFICAÇÃO (SIGLA)
0 – 9%	Não tóxico (NT)
10 – 49%	Ligeiramente tóxico (LT)
50 – 89%	Tóxico (T)
90 – 100%	Altamente tóxico

Fonte: Harwig; Scott (1971)

Com os dados de mortalidade obtidos, determinou-se a CL50 (concentração letal média), isto é, a concentração que causa mortalidade dos organismos em 24 horas. A determinação da CL50 foi efetuada mediante critérios estabelecidos por Dolabela (1997), conforme Tabela 10.

Tabela 10: Classificação da toxicidade de extratos vegetais de acordo com a CL_{50} em larvas *Artemia salina*.

MORTALIDADE (em%)	CLASSIFICAÇÃO DA TOXICIDADE
Menor que 80 $\mu\text{g/mL}$	Alta
80 – 250 $\mu\text{g/mL}$	Moderada
Maior que 250 $\mu\text{g/mL}$	Baixa ou nula

Fonte: Dolabela (1997)

Dolabela (1997) estabeleceu critérios para a classificação da toxicidade de um composto, baseando em estudos de atividades antitumoral e anti-*Trypanossoma cruzi*, conforme concentração do extrato e a mortalidade dos microcrustáceos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento seletivo de bactérias e fungos epifíticos e endofíticos de macrofitas aquáticas

As macrófitas aquáticas coletadas foram identificadas no Instituto de Pesquisa da Amazônia (INPA), como: *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms, *Ichnanthus calvenscens* Döll e *Cyperus ligularis* L.

Destas espécies, designadas como plantas hospedeiras, foram isoladas 155 linhagens de bactérias (Tabela 11) e 54 linhagens de fungos (Tabela 12) em meio seletivo líquido BH (Bushhneel Haas) acrescido de petróleo. Dentre as bactérias, 97 foram isoladas de origens epifíticas e 58 de origens endofíticas. Dentre os fungos, 30 foram de origens epifíticos e 24 de origem endofíticos.

A partir de fragmentos das folhas da espécie *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms (Pontederiaceae), foi obtida a maior quantidade de microrganismos epifíticos. Os endófitos foram isolados em maior número a partir de fragmentos das flores da espécie *Cyperus ligularis* L. (Cyperaceae).

Tabela 11: Isolamento de bactérias epifíticas e endofíticas a partir das espécies vegetais *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms *Ichnanthus calvenscens* Döll (Poaceae) e *Cyperus ligularis* L. (Cyperaceae)

Origem	<i>Eichornia crassipes</i> (Mart.) Solms		<i>Ichnanthus calvenscens</i> Döll (Poaceae)		<i>Cyperus ligularis</i> L. (Cyperaceae)		Total
	EP*	EN**	EP*	EN**	EP*	EN**	
Folhas	24	-	16	16	06	08	70
Raízes	15	07	18	04	11	07	62
Flores	-	-	-	-	07	16	23
Total	39	07	34	20	24	31	155

*EP: Microrganismos Epifíticos obtidos por meio de esfregaço; **EN: Microrganismos Endofíticos obtidos após a desinfecção superficial.

Tabela 12: Isolamento de fungos epifíticos e endofíticos a partir das espécies vegetais *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms *Ichnanthus calvenscens* Döll (Poaceae) e *Cyperus ligularis* L. (Cyperaceae)

Origem	<i>Eichornia crassipes</i> (Mart.) Solms		<i>Ichnanthus calvenscens</i> Döll (Poaceae)		<i>Cyperus ligularis</i> L. (Cyperaceae)		Total
	EP*	EN**	EP*	EN**	EP*	EN**	
Folhas	09	05	-	-	04	03	21
Raízes	-	07	-	-	03	02	12
Flores	-	-	-	-	05	07	12
Caule	-	-	-	-	09	-	09
Total	09	12	-	-	21	12	54

* EP: Microrganismos Epifíticos obtidos por meio de esfregaço; ** EN: Microrganismos Endofíticos obtidos após a desinfecção superficial.

Não foram isolados fungos a partir da espécie *Ichnanthus calvenscens* Döll. As amostras de *Cyperus ligularis* L. deram origem a 21 fungos epifíticos e 12 endofíticos e as amostras de *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms deram origem a 09 fungos epifíticos e 12 endofíticos.

O total geral de microrganismos obtidos a partir dos três hospedeiros em estudo foi de 209 isolados sendo 155 bactérias e 54 fungos, provenientes das plantas coletadas em águas do rio negro, aparentemente poluídas por derivados de petróleo. Este resultado está de acordo com dados de outros trabalhos desenvolvidos com macrófitas aquáticas na Amazônia destacando o potencial desses microrganismos. Batista (2009) isolou 71 bactérias, sendo 42 epifíticas e 29 endofíticas, oriundas de folhas, caules, bulbos e raízes de *Eichornia crassipes* coletadas em local com resíduos de petróleo, outro trabalho desenvolvido na região foi descrito por Elias et al., (2009) que isolou a partir da macrófita aquática *Eichhornia crassipes* na Amazônia 49 linhagens de fungos, sendo 27 epifíticos e 22 endofíticos. Todos os isolados foram provenientes de plantas encontradas em ambientes contaminados com petróleo e derivados.

4.2 Ensaios de biodegradabilidade com e sem a presença do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) como aceptor de elétrons.

Todos os microrganismos isolados foram ensaiados para verificação da real capacidade de degradar hidrocarbonetos de petróleo. Entre o total de 209 avaliados foram selecionados seis bactérias e sete fungos (tabela 13).

Tabela 13: Microrganismos, fungos e bactérias, selecionados por apresentarem atividade como degradadores de hidrocarbonetos de petróleo

Código dos Microrganismos B* / F**	***Meio I T1*****	****Meio II T2*****
B 139	6 dias	24 h
B 102	6 dias	24 h
B 132	6 dias	48 h
B 41	6 dias	24 h
B 121	6 dias	24 h
B 123	6 dias	48h
F 17	10 dias	24 h
F 24	10 dias	24 h
F 5	10 dias	48 h
F 53	10 dias	24 h
F 31	10 dias	24 h
F 36	10 dias	24 h
F 14	10 dias	24 h

*B: Bactérias; **F: Fungos; ***Meio I: meio mineral + Petróleo; ****Meio II: meio mineral + petróleo + DCPIP (2,6-diclorofenol-indofenol); *****T1: tempo necessário, em dias para visualização do aspecto do meio, indicando atividade de degradação; *****T2: tempo necessário, em horas para mudança da coloração do meio, indicando atividade de degradação.

Observou-se que tanto o ensaio do aspecto visual da degradação como o ensaio com o indicador DCPIP indicaram os mesmos microrganismos, confirmando seus potenciais.

A Figura 29 ilustra os resultados obtidos nos ensaios com o meio I, sem a presença do indicador DCPIP. As bactérias (A) com seis dias de incubação e fungos com dez dias de incubação (B) quando comparados ao controle do experimento, apresentam degradação, pois aparentemente consomem o petróleo presente e turvam o meio seletivo.

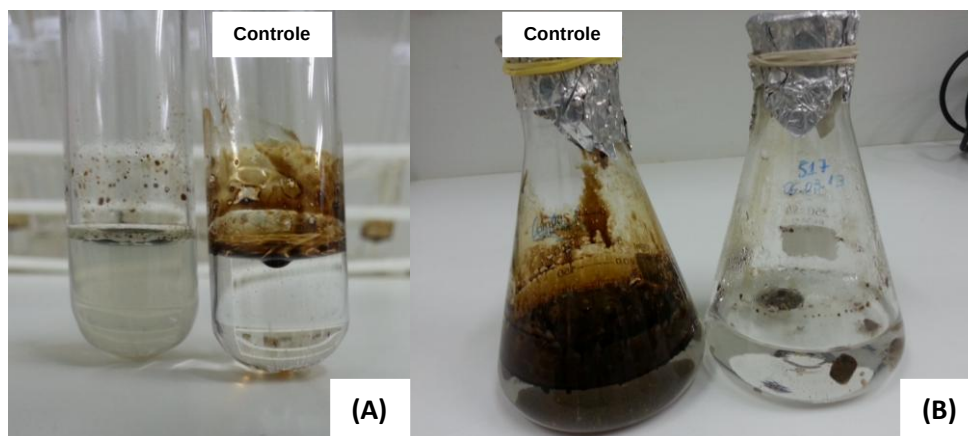


Figura 29: Ensaio de biodegradação. As bactérias (A) com seis dias de incubação e fungos com dez dias de incubação (B) quando comparados ao controle do experimento, apresentam degradação, pois aparentemente consomem o petróleo presente e turvam o meio seletivo.

Leahy; Colwell (1990) já haviam afirmado que os testes com petróleo como fonte de carbono para isolamento e seleção de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos servem como potenciais indicadores de seleção. Os mesmos autores afirmaram que o número de cepas microbianas isoladas de áreas contaminadas é maior do que das áreas que não possuem indícios de contaminação, pelo fato de estarem adaptadas a presença dos hidrocarbonetos.

Bactérias e fungos são agentes transformadores eficazes, visto sua habilidade em degradar uma ampla diversidade de substâncias orgânicas (DESAI & DESAI, 1993). Mariano et al., (2007) menciona que a estrutura química dos poluentes orgânicos tem uma profunda influência na habilidade dos microrganismos metabolizarem estas moléculas, especialmente com respeito às taxas e extensão da biodegradação, sendo que alguns compostos orgânicos são rapidamente biodegradados enquanto outros são recalcitrantes.

A Figura 30 ilustra os dados no ensaio com o meio II utilizando meio seletivo (BH), petróleo e o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). Constata-se o potencial dos microrganismos em degradar os hidrocarbonetos de petróleo no período de 24 e 48 horas, por meio da descoloração do meio azul para incolor, indicando o potencial dos microrganismos.

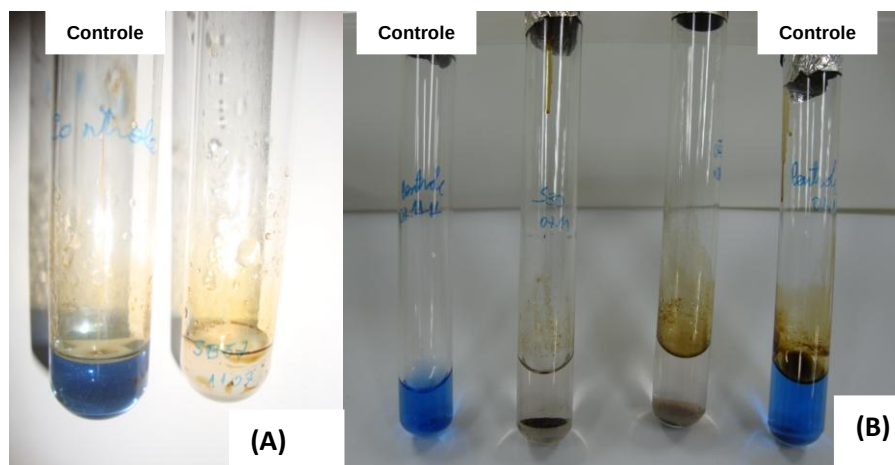


Figura 30: Ensaio de biodegradabilidade. (A) Bactérias e (B) Fungos utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) nos tempos de 24 a 48 horas de incubação para confirmação de potenciais degradadores de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com a mudança da coloração do azul para o incolor.

É importante destacar que os microrganismos selecionados apresentaram resultados positivos em ambos os meios utilizados nesta pesquisa: **Meio I = meio mineral + Petróleo e Meio II = meio mineral + petróleo + DCPIP** (2,6-diclorofenol-indofenol).

O método do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) apresentou-se eficiente e em tempo menor foi capaz de selecionar microrganismos com habilidades para degradar os hidrocarbonetos de petróleo e derivados.

Esta técnica desenvolvida por Hanson et al. (1993) tem sido utilizada em vários trabalhos, como Cormack e Fraile (1997), Roy (2002), Peixoto e Vieira (2005), Lovaglio (2005), Souza (2005). Mariano (2006) e Mariano et al., (2008) avaliaram a velocidade de biodegradação de diferentes compostos estabelecendo o tempo final de alteração da cor do meio de azul para incolor. A técnica está fundamentada na alteração de cor deste composto quando reduzido. Assim, quando o indicador DCPIP está oxidado sua coloração é azul, e quando reduzido é incolor (BIDOIA et al., 2010). A mudança de cor é devida à mudança na estrutura da molécula redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP).

Chapelle (2001) destaca que biodegradação do etanol e dos hidrocarbonetos de petróleo pode ser considerada como uma reação de oxidação-redução realizada pela ação microbiana, onde os substratos (etanol e compostos BTEX) funcionam como doadores de elétrons.

Peixoto & Vieira (2005) consideram eficientes e rápidos os testes para a detecção da capacidade de biodegradação de compostos, especificamente de hidrocarbonetos de petróleo, utilizando o redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) para reações de óxido-redução. Van Aken et al., (2004) observaram que uma bactéria endofítica do gênero *Methylobacterium* apresenta potencial para remediação de solo contaminado com o explosivo 2,4,6-trinitro-tolueno (TNT), através da reação de redução do redox 2,6-diclorofenol indofenol DCPIP.

Corroborando com o estudo, pesquisas realizadas por Wongsu e colaboradores (2004) utilizaram os derivados de petróleo nos testes de degradabilidade *in vitro* e o tempo gasto pelos isolados testados foi de uma a duas semanas, tendo *Pseudomonas aeruginosa* apresentado os melhores resultados para a atividade degradativa, e para comparação dos resultados, utilizou o teste de descoloração do redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). Os referidos autores destacam a velocidade e praticidade do teste DCPIP, podendo ser realizado em placa mini escala e com leitura de 24 a 72 horas de incubação apresentando resultados positivos e demonstrando sua real potencialidade para seleção de microrganismos degradadores de diferentes compostos.

Os autores Afuwale e Modi (2012) após isolarem 36 microrganismos de áreas contaminadas por petróleo utilizaram o petróleo bruto como fonte de carbono e o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) para seleção dos microrganismos. Do total de microrganismos isolados, somente duas bactérias foram capazes de degradar o petróleo e descolorir o indicador (DCPIP), esses microrganismos foram selecionados como potenciais degradadores de hidrocarbonetos de petróleo.

4.3 Identificação das Linhagens de bactérias

4.3.1 Análise Morfológica

A caracterização morfológica das bactérias selecionadas está descrita na Tabela 14. Destas amostras, três foram identificadas como Gram negativas, enquanto que as cinco restantes foram identificadas como Gram positivas. Seis

amostras tinham a forma de bacilo, ou bastonete, e duas apresentaram a forma cocobacilar.

Tabela 14: Características morfológicas de culturas de bactérias endofíticas e epifíticas isoladas das plantas hospedeiras

Linhagens Código B*	Plantas hospedeira	Órgão da Planta	Origem	Características das colônias		Gram	Forma
B 41	<i>Ichnanthus calvescens</i> Döll	Folha	Epifítica	Rosa	claro	Negativo	Bacilo
B 102	<i>Eichornia crassipes</i> (Mart.) Solms	Raiz	Endofítica	Amarelo cremosa	claro	Negativo	Cocobacilo
B 121	<i>Eichornia crassipes</i> (Mart.) Solms	Raiz	Epifítica	Rosa cremosa	claro	Positivo	Bacilo
B 123	<i>Ichnanthus calvescens</i> Döll	Folha	Endofítica	Amarelo rugosa	claro	Positivo	Bacilo
B 132	<i>Eichornia crassipes</i>	Folha	Epifítica	Amarelo cremosa	claro	Negativo	Cocobacilo
B 139	<i>Eichornia crassipes</i> (Mart.) Solms	Folha	Epifítica	Amarelo cremosa	claro	Positivo	Bacilo

*B: Bactérias

4.3.2 Identificação Molecular

O perfil eletroforético do DNA genômico extraído das seis amostras bacterianas (Figura 31) apresentaram DNA íntegro, uma vez que não se observou rastros típicos de degradação. A seta indica a posição correspondente à banda de DNA genômico.

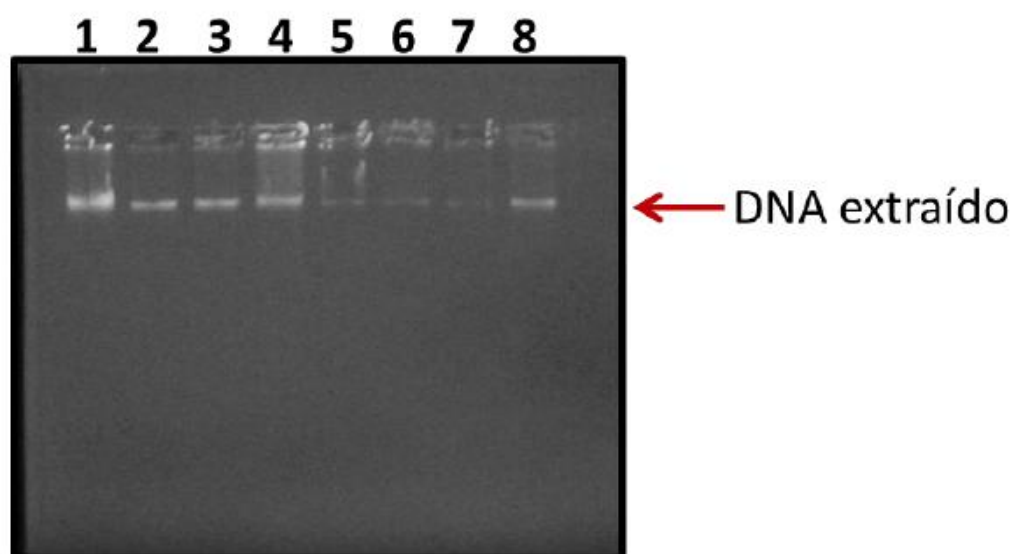


Figura 31: Perfil eletroforético em gel de agarose indicando a banda de DNA genômico de -bactérias endofíticas e epifíticas isoladas das plantas hospedeiras em estudo. 1) B41, 2) -, 3)-, 4) B102, 5) B121, 6) B123, 7) B132 e 8) B139.

Os resultados obtidos por amplificação por PCR do gene ribossomal 16S são apresentados na figura 32. A amostra 1 teve o seu DNA diluído na proporção de 1/5 para melhorar a eficiência da reação, uma vez que não foi realizado procedimento para quantificação do DNA genômico. O fragmento da região gênica rRNA 16S possui um tamanho entre 1000 a 1500 pb, indicando que as bandas observadas no gel são do respectivo gene para as amostras B41(1), - (2), B102 (3), B121 (4), B123 (5), B132 (6) e B139 (7).

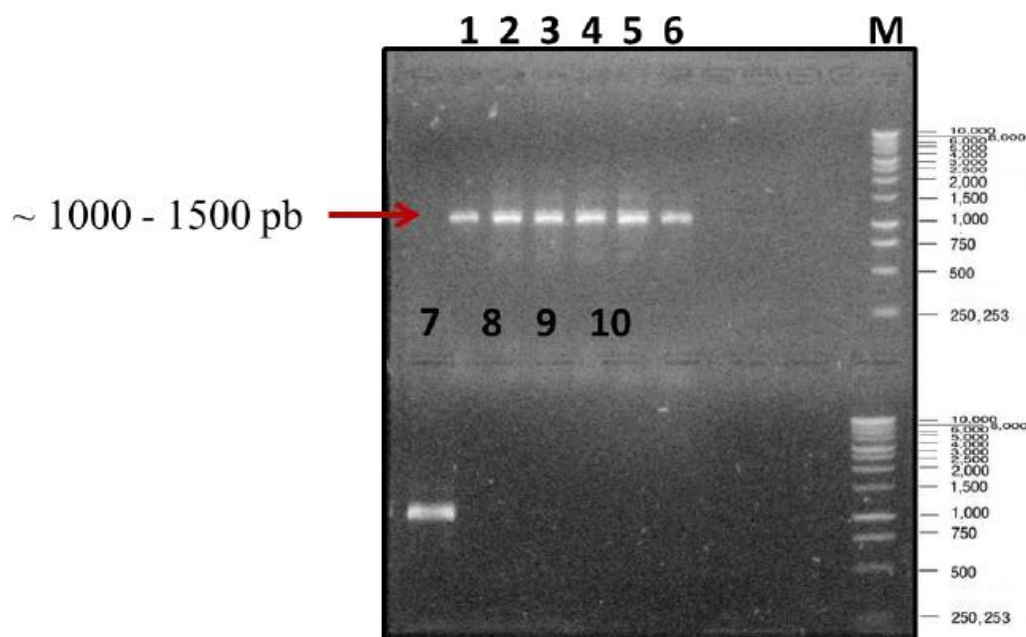


Figura 32: Amplificação da região gênica rRNA 16S. 1) B41 diluído 1/5; 2) -; 3) B102; 4) B121; 5) B123; 6) B132; 7) B139; 8) B67 não diluído; 9) B67 diluído 1/5, 10) diluído 1/10.

A amplificação por reação em cadeia da polimerase foi um requisito para que a região gênica rRNA 16S pudesse ser sequenciada. A etapa de purificação dos produtos de PCR é essencial, pois quaisquer remanescentes de dNTPs e iniciadores poderiam interferir com o sequenciamento, por isso, o uso das enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão. A exonuclease degrada qualquer DNA fita simples e a fosfatase alcalina de camarão hidrolisa dNTPs remanescentes.

As sequências obtidas foram analisadas por meio do programa *Phred* e *Bioinformatic Organization* (sequência *forward*, *reverse*, *reverse-complementar* e *contigs*).

A qualidade de uma reação de sequenciamento se refere à confiabilidade de que aquela base identificada é realmente a base real da sequência. Essa análise de qualidade é importante, pois bases não seguras tornam o resultado da identificação do microrganismo duvidosa.

As sequências *contigs* que foram obtidas pelo programa CAP3 via programa *Phred*, são resultados da sobreposição das sequências *forward* e *reverse-complementar* (*overlap*) que gera uma sequência contígua.

O resultado, após análise de alinhamento de sequência no BLAST, identificou as espécies conforme tabela 15.

Tabela 15: Identificação molecular das bactérias endofíticas e epifíticas obtidas das plantas hospedeiras *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms *Ichnanthus calvescens* Döll (Poaceae) e *Cyperus ligularis* L. (Cyperaceae)

Isolados Código B*	Espécie	%Cobertura	% ID	E-value	Gram	Forma
B41	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	99	0.0	Negativo	Bacilo
B121	<i>Lysinibacillus fusiformes</i>	100	99	0.0	Positivo	Bacilo
B102	<i>Acinetobacter junii</i>	100	99	0.0	Negativo	Cocobacilo
B132	<i>Acinetobacter junii</i>	100	99	0.0	Negativo	Cocobacilo
B123	<i>Bacillus pumilus</i>	100	99	0.0	Positivo	Bacilo
B139	<i>Bacillus pumilus</i>	100	99	0.0	Positivo	Bacilo

*B: Bactérias; %Cobertura: valor percentual da cobertura de consulta de sequências no banco de dados BLAST; % de ID: valor percentual da identidade de sequências; E-value: mede a probabilidade do alinhamento entre a sequência do banco de dados e a sequência encontrada.

Os isolados B41, identificado como *Pseudomonas aeruginosa* e o isolado B123, identificado como *Bacillus pumilus* originaram-se da planta hospedeira *Ichnanthus calvescens*, todas as outras bactérias identificadas foram isoladas de *Eichornia crassipes*.

As comparações entre os resultados fenotípicos com os moleculares foram equivalentes, visto que tanto o padrão de coloração de Gram e a forma das bactérias foram as mesmas obtidas após levantamento de informações sobre as espécies identificadas.

As amostras B123 e B139 foram identificadas como *B. pumilus*, entretanto são oriundas de diferentes hospedeiras, sendo a espécie B123 de origem endofítica de *Ichnanthus calvescens* e a espécie B139 isolada como epifítica de *Eichornia crassipes*. As amostras B102 e B132, ambas isoladas de *Eichornia crassipes*, foram identificadas como espécie *A. Junii*, mas com origens diferentes, sendo a espécie B102 um microrganismo endofítico e B132 um microrganismo epifítico.

Assim, seis bactérias foram selecionadas para composição dos consórcios conforme identificação molecular: *Bacillus pumilus* (bactéria endofítica de *Ichnanthus calvenscens*, código B123), *Lysinibacillus fusiformes* (bactéria epifítica de *Eichornia crassipes*, código B121), *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria epifítica de *Ichnanthus calvenscens*, código B41), *Acinetobacter junii* (bactéria epifítica de *Eichornia crassipes*, código B132), *Acinetobacter junii* (bactéria endofítica de *Eichornia crassipes*, código B102) e *Bacillus pumilus* (bactéria epifítica de *Eichornia crassipes*, código B139).

4.3.2.1 Principais gêneros de bactérias isoladas: relação e importância com processos de biorremediação.

Vários estudos relacionados com processos de biorremediação de petróleo e derivados são encontrados na literatura relacionando as espécies bacterianas. Gallego (2007) mencionam que a maioria das bactérias envolvidas nesses processos de biorremediação tem metabolismo aeróbio, e algumas são capazes de degradar tanto petróleo cru como frações mais refinadas.

Entre as espécies destacam-se:

Bacillus pumilus

Espécies de *B. pumilus* destacam-se como degradadoras de hidrocarbonetos corroborando com a pesquisa Calvo et al., (2004) analisando o crescimento de *B. pumilus* na presença de petróleo e naftaleno sob condições aeróbias, observaram a utilização destas substâncias como fonte de carbono e energia pelo microrganismo. Estes resultados revelaram que *B. pumilus*, ou o biossurfactante por ele produzido, podem ter aplicação na biorremediação de locais contaminados com hidrocarbonetos do petróleo.

Toledo e colaboradores (2006) estudando *B. pumilus*, constataram o crescimento de oito cepas na presença de naftaleno, porém, apenas cinco cepas cresceram na presença de pireno. Bento et al., (2005) utilizaram *B. pumilus* para produção de biossurfactantes e o óleo diesel como fonte de carbono, os referidos autores observaram que houve a redução da tensão superficial para 49 mN/m e aumento da emulsificação para 59% nos tratamentos.

Lysinibacillus fusiformes

O gênero *Lysinibacillus* é um gênero descoberto recentemente, foi proposto por Ahmed et al., (2007) com a descrição de uma nova espécie e a reclassificação de dois bacilos. O gênero *Lysinibacillus* foi composto de quatro espécies com nomes validamente publicados: *Lysinibacillus boronitolerans*, *Lysinibacillus fusiformis* e *Lysinibacillus sphaericus* (AHMED et al., 2007).

Vaz (2009) isolou bactérias de amostras de combustível coletadas de tanques de armazenamento: (1) do posto de combustível do setor de transportes da Universidade Federal de Goiás campus Goiânia; (2) de veículos que estavam em uma oficina com diagnóstico de entupimento da bomba de combustível, e (3) de tanques de biodiesel puro (B100) obtidos direto da produção. Todos os 41 isolados testados apresentaram potencial de degradação para os combustíveis analisados. Vinte e nove isolados foram identificados pelo sequenciamento da região 16S rDNA, e identificados como *Bacillus valismortis*, *B. Licheniformis*, *B. Thuringiensis*, *B. Amyloliquefaciens*, *B. Subtilis*, *Lysinibacillus phaericus*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Staphylococcus sp.*, *S. Capitis*, *Kocuria palustres*, *Citrobacter amalonaticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Foi confirmado o potencial de degradação do biodiesel B100, mistura de biodiesel/diesel (B5) e diesel puro por parte das bactérias isoladas através do teste de oxi-redução utilizando o indicador DCPIP.

Pseudomonas aeruginosa

O gênero *Pseudomonas* está relacionado com biodegradação de hidrocarbonetos (SOLANO-SERENA et al., 2000). *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de crescer e multiplicar em diversos ambientes incluindo água, esgoto, solo, plantas e animais. Por conta da sua grande versatilidade metabólica, a bactéria teria vantagens sobre os demais microrganismos na água (VASCONCELOS et al. 2006). *Pseudomonas aeruginosa* é considerado um microrganismo metabolicamente versátil, capaz de persistir por mais tempo na água e tende a resistir aos agentes cáusticos do ambiente por mecanismos ainda desconhecidos (SMITH & IGLEWSKI, 2003).

Wongsa e colaboradores (2004) sugerem em seus experimentos de teste para degradação *in vitro* de derivados de petróleo que o tempo gasto pelos isolados testados foi de uma a duas semanas, tendo *Pseudomonas aeruginosa* apresentado os melhores resultados para a atividade degradativa.

É comum o isolamento por técnicas clássicas, de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*, em ambientes com histórico de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo ou em sistemas em que se utilizem hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia. Estudos dos mais variados, detalhando, desde a metabolização de tais fontes de carbono por parte desses microrganismos até a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas aeruginosa*, têm sido produzidos desde a década de 1970.

Andreoni et al., (2004) identificaram alguns gêneros predominantes em solo contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) dentre os quais figuravam, além dos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*, os gêneros: *Methylobacterium*, *Alcaligenes*, *Rhizobium*, *Aquamicrobium*, *Stenotrophomonas* e *Ralstonia*. Díaz-Ramirez e colaboradores (2007) identificaram sequencia de 16S do rDNA do gênero *Pseudomonas*, Das & Mukherjee (2007) identificaram além do gênero *Pseudomonas*, o gênero *Bacillus*, em estudos de diversidade molecular microbiana em presença de hidrocarbonetos.

Pseudomonas aeruginosa tem sido aplicada em processos de biodegradação de corantes têxteis (BARBOSA et al., 2007), degradação do etanol e do BTEX na gasolina comercial (TEIXEIRA e BENTO, 2007), gasolina, óleo, diesel e óleo cru (KARAMALIDIS et al., 2010), entre outros.

Acinetobacter junii

O gênero *Acinetobacter junii* está relacionado com degradação de hidrocarbonetos (GALLEGO et al., 2001). *Acinetobacter* é constituído de espécies amplamente disseminadas na natureza, sendo encontrado tanto em ambientes úmidos quanto secos, o que não é comum para bacilos gram-negativos. (SCHRECKENBERGER et al., 2007).

Espécies do gênero *Acinetobacter* são importantes do ponto de vista biotecnológico e ambiental. Algumas espécies são conhecidas por biodegradarem compostos perigosos orgânicos e inorgânicos, bem como produzem produtos economicamente importantes como lipases, proteases, emulsificantes e biopoilímeros de vários tipos, etc. Do ponto de vista ambiental, estas são usadas para biorremediação de ambientes contaminados (ABDEL-EL-HALEEM, 2003).

Acinetobacter junii em particular também é importante e relatada como biodegradadora de compostos poluentes, como exemplo o óleo de máquina derramado em solo e óleo diesel (BASUKI et al. 2011).

4.4 Identificação das Linhagens de fungos

4.4.1 Análise Morfológica

Os fungos isolados apresentaram características morfológicas peculiares de cada espécie e foram confirmadas com a identificação molecular. A tabela 16 apresenta as características das espécies estudadas.

Tabela 16: **Características morfológicas de linhagens de fungos isolados de macrófitas aquáticas *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms *Ichnanthus calvescens* Döll (Poaceae) e *Cyperus ligularis* L. (Cyperaceae)**

Linhagens Código F*	Planta hospedeira	Órgão da Planta	Origem	Característica morfológica
F5	<i>Cyperus ligularis</i> L.	Caule	Epifítico	Cor: Verso: preto Anverso: preto Topografia: cotonoso Bordas: regular
F14	<i>Cyperus ligularis</i> L.	Flor	Endofítico	Cor: Verso: cinza claro Anverso: marron Topografia: cotonoso Bordas: regular
F17	<i>Cyperus ligularis</i> L.	Raiz	Epifítico	Cor: Verso: verde musgo Anverso: preto Topografia: micélio rasteiro Bordas: regular
F24	<i>Eichornia crassipes</i> (Mart.) Solms	Folha	Endofítico	Cor: Verso: branco com esporo preto Anverso: branco Topografia: micélio aéreo Bordas: regular
F31	<i>Cyperus ligularis</i> L.	Folha	Epifítico	Cor: Verso: cinza claro com o centro branco Anverso: rosa Topografia: cotonoso Bordas: regular
F53	<i>Cyperus ligularis</i> L.	Caule	Epifítico	Cor: Verso: verde escuro Anverso: preto Topografia: micélio rasteiro Bordas:irregular
F36	<i>Cyperus ligularis</i> L.	Raiz	Epifítico	Cor: Verso: laranja claro Anverso: laranja claro Topografia: cotonoso Bordas: regular

*F: Fungo

4.4.2 Identificação pela técnica molecular

As técnicas moleculares apresentam potencial para estudos da diversidade dos microrganismos. Uma grande vantagem da análise de DNA, em comparação à análise das características morfológicas, consiste na possibilidade de seleção de regiões específicas do DNA e do uso de técnicas específicas bem como estratégias que possibilitam o aumento da resolução taxonômica, permitindo identificar diferentes taxas, superiores à espécie, população ou indivíduo (KOHN, 1992). Outra característica importante deve-se à natureza repetitiva do rDNA, que torna esta região fácil de amplificar a partir de amostras pequenas, diluídas e altamente degradadas (GARDES & BRUNS, 1993).

A extração de DNA pelo método fenol/clorofórmio, com a utilização de nitrogênio líquido na fase da extração mecânica foi eficiente na extração de DNA da massa micelial dos fungos filamentosos (Figura 33), resultando em quantidade e pureza de DNA suficiente para a utilização posterior das técnicas de PCR e sequenciamento.

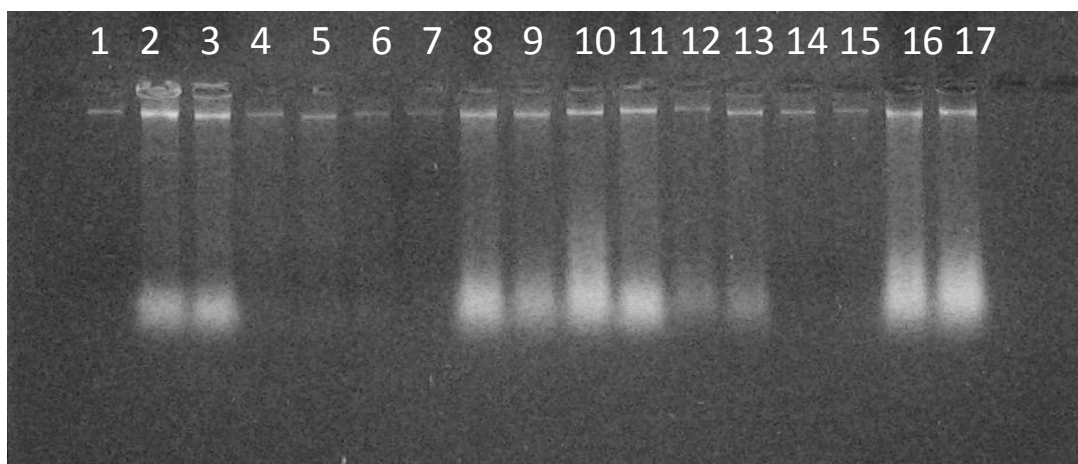


Figura 33: Gel de extração do DNA da massa micelial das amostras dos fungos filamentosos isolados de macrófitas aquáticas da Amazônia. Os poços são identificados a seguir: 1: marcador molecular; 2 e 3: amostra F17; 4 e 5: amostra F24; 6 e 7: F5; 8 e 9: amostra F53; 10 e 11: amostra F31; 12 e 13: amostra F36; 14 e 15: - e 16 e 17: amostra 14.

A região ITS conservada do gene (rDNA) foi amplificada utilizando oligonucleotídeos iniciadores ITS1/ITS4 permitindo a amplificação de uma banda

única representando um fragmento de DNA de aproximadamente 600 pares de base (pb) (Figura 34).

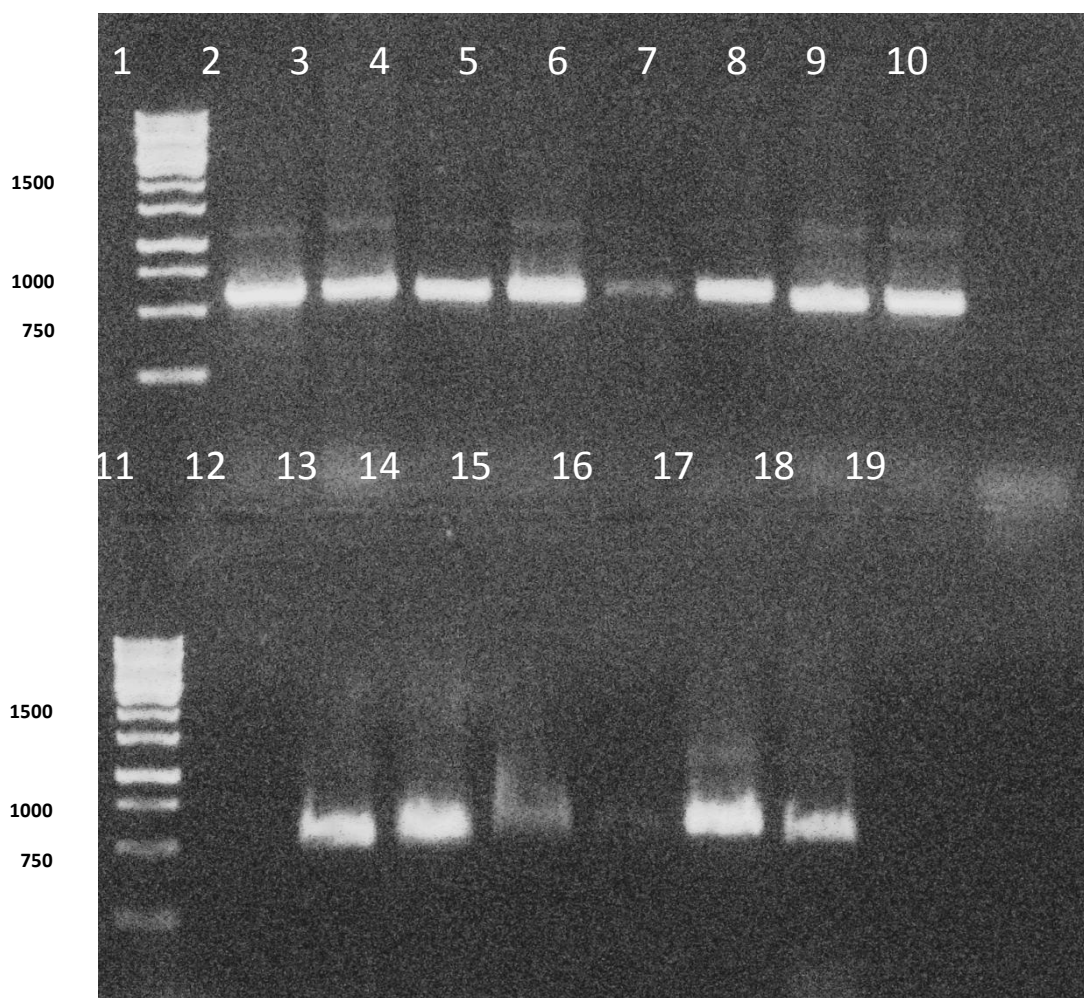


Figura 34: Amplificação da região ITS do rDNA dos isolados em gel de agarose 0,8%, corado com 0,5 ug/mL de brometo de etídio. Pente superior. Os poços são identificados a seguir: 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb da fermentas; 2-9: Amostra de 1 a 4-10 controle negativo; Pente inferior. Os poços são identificados a seguir: 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb da fermentas; 12 a 19: Amostra 5 a 8.

Os produtos da PCR do sequenciamento da região ITS1-5, 8S-ITS4 do rDNA foram analisados através de programas BioEdit e BLAST. O BLAST compara as sequências obtidas com aquelas depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e fornece informações quanto à homologia entre elas. A comparação das sequências de nucleotídeos da região ITS1-5,8S-ITS4 das amostras de fungos e as sequências cadastradas no Banco Internacional de Genes

(NCBI) permitiram a identificação taxonômica dos isolados do presente trabalho em nível de gênero e espécie.

Todas as identificações mostraram o valor de *e-value* sendo 0 (zero), isto é, quanto mais próximo de 0 (zero) é o valor do *e-value*, maior é o significado da similaridade entre as sequências comparadas. O *query cover* é um indicativo da qualidade do alinhamento e a identificação máxima e o número de nucleotídeos indica quantos pares de base da amostra identificada mostraram similaridade com as sequências armazenadas.

O resultado da identificação molecular dos gêneros e espécies *Curvularia*, *Gibberella*, *Fusarium*, *Phoma* e uma classe *Dothideomycetes*, são apresentadas na tabela 17.

Tabela 17: Análises das sequências obtidas dos fungos isolados de macrófitas aquáticas, número de nucleotídeos semelhante ao mesmo número de nucleotídeos dos isolados correspondentes armazenados no banco de dados (NCBI), *e-value*, *query cover* e a porcentagem de similaridade de cada fungo avaliado

Linhagens Código F*	Identificação Molecular	Número de Nucleotídeos	<i>e- value</i>	Query Cover (%)	Identidade Máxima (%)
F17	<i>Curvularia trifolii</i>	549/556	0	100	99
F24	<i>Curvularia clavata</i>	551/557	0	100	99
F5	<i>Curvularia clavata</i>	551/556	0	100	99
F53	<i>Gibberella intermedia</i>	525/527	0	100	99
F31	<i>Phoma herbarum</i>	503/505	0	100	99
F36	<i>Dothideomycetes sp.</i>	499/506	0	100	99
F14	<i>Gibberella intermédia</i>	536/542	0	100	99

*F: Fungo; *E-value*: mede a probabilidade do alinhamento entre a sequência do banco de dados e a sequência encontrada; *Query cover*: é um indicativo da qualidade do alinhamento e a identificação máxima e o número de nucleotídeos indica quantos pares de base da amostra identificada mostraram similaridade com as sequências armazenadas.

As linhagens F17, F24 e F5 são do gênero *Curvularia*, com a indicação para as espécies *Curvularia clavata* (F24 e F5) e *Curvularia trifolii* (F17). As amostras F53 e F14 foram identificadas com a espécie *Gibberella intermedia* e a amostra F31 com a espécie *Phoma herbarum*.

Para a composição do consórcio microbiano, os fungos selecionados foram assim identificados: *Curvularia trifolii* (epifítica) (código F17), *Curvularia clavata* (endofítica) (código F24), *Curvularia clavata* (epifítica) (código F5), *Gibberella intermedia* (epifítica) (código F53), *Phoma herbarum* (epifítica) (código F31), *Dothideomycetes* sp (epifítica) (código F36) e *Gibberella intermédia* (endofítica) (código F14). O fungo endofítico *Curvulária clavata* (código F24) foi o único isolado originário da hospedeira *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms. Todos os demais fungos selecionados para formar o consórcio tiveram origem na planta hospedeira *Cyperus ligularis* L.

4.4.2.1 Principais gêneros de fungos isolados e suas relações com processos de biorremediação.

Os fungos selecionados e identificados na pesquisa possuem características peculiares na degradação, inclusive de hidrocarbonetos e a literatura apresenta estudos sobre estes microrganismos.

Curvularia trifolii

O fungo filamentosos *Curvularia* sp, utilizado na fabricação de hidrocortizonas, foi estudado por Paraszkievicz et al., (2002), na produção de um composto extracelular, formado por uma proteína complexa (25%) e um polissacarídeo (48%), capaz de estabilizar emulsões óleo em água, quando crescendo em um meio contendo compostos hidrofóbicos como cortexolona, antraceno e fenantreno. A maior concentração do bioemulsificante (2,6 g/L) foi obtida na fase estacionária de crescimento, após 47 h de cultivo, sendo que o início da fase estacionária ocorreu em 18 h de cultivo. Após o cultivo, o bioemulsificante foi extraído do meio de cultivo e utilizado para os testes de bioemulsificação, apresentando máximas atividades de emulsificação com querosene, óleos vegetais e minerais.

Curvularia clavata

Em biorremediação, *C. clavata* é de uso potencial para a descoloração e degradação de efluentes agrícolas contendo compostos polifenólicos (NEOH et al., 2014). Uma cepa de *C. clavata* foi utilizada por Neoh et al., (2014) na descoloração do efluente de uma fábrica de óleo de dendê, o fungo foi capaz de descolorir efluentes, que está associado principalmente com polifenóis e lignina. Os resultados mostraram descoloração bem sucedida de até 80%, com 54% contribuído por bio sorção e 46% por biodegradação após 5 dias de tratamento.

Gibberella intermédia

Essa espécie já foi encontrada no ambiente marinho (SAKAYROJ et al., 2012) e é conhecida por sua capacidade de degradar lignina (ANDERSON et al., 2005). Há relatos também da degradação de etinilestradiol, um estrogênio sintético componente de contraceptivos (SHI et al., 2002) e de 2-naftol, um derivado de naftaleno geralmente presente em águas residuárias provenientes de indústrias, que é tóxico à vida marinha e à dos seres humanos (ZANG e LIAN, 2009).

Phoma herbarum

Silva (2007) selecionou linhagens de fungos filamentosos resistentes às condições adversas e capazes de degradar compostos fenólicos a partir de águas residuárias de postos de gasolina. As espécies isoladas pelos autores foram: *Aspergillus flavus*, *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. e *Phoma* sp. e estes apresentaram potencial na degradação dos referidos compostos.

***Dothideomycetes* sp**

Em geral, os membros da classe *Dothideomycetes* são descritos como agentes fitopatogênicos, endofíticos ou epifíticos de plantas vivas, bem como saprófitos degradadores de celulose e outros carboidratos complexos de matéria morta ou parcialmente digerida na serapilheira ou no esterco. Algumas espécies são liquenizadas, enquanto outras ocorrem como parasitas de fungos ou membros do reino animalia (SCHOCH et al., 2006).

Para o gênero *Dothideomycetes* sp a referida pesquisa é a primeira a destacar a espécie como degradadora de hidrocarbonetos de petróleo e derivados.

4.5 Petróleo e óleo diesel utilizados no ensaio de biodegradação

O petróleo e o óleo diesel demonstraram semelhança nos cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa e espectrometria de massa, apresentando os mesmos HPAs constituintes (Figura 35), corroborando com Hass et al., (2001), quando destacam que o óleo diesel é o principal produto do fracionamento do petróleo no Brasil. Esse combustível é constituído por hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos e aromáticos com cadeia carbônica de 6 a 30 átomos.

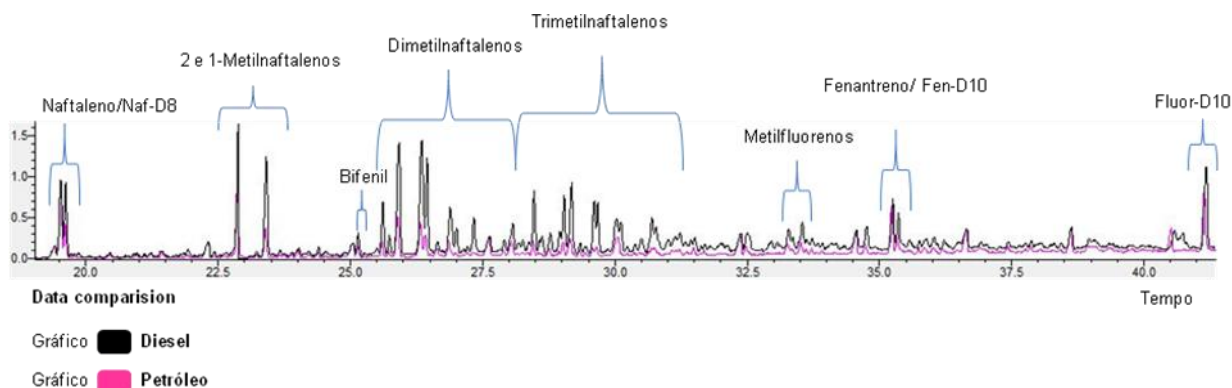


Figura 35: Cromatograma obtido por CG-EM de 30 $\mu\text{L/mL}$ de petróleo (gráfico na cor rosa) e 30 $\mu\text{L/mL}$ de óleo diesel (gráfico na cor preto) na concentração de 1mL, proveniente da Base Petrolífera de Urucu, Amazonas, Brasil, para obtenção de HPAs existentes no petróleo e óleo diesel.

Os HPAs identificados e seus respectivos fragmentos de massa (m/z) estão listados na tabela 18. Os compostos apresentaram semelhanças, sendo portanto, substituídos um pelo outro quando necessário para êxito da pesquisa.

Tabela 18: Compostos identificados através da CG-EM, assinalados na figura 28, de acordo com suas respectivas características cromatográficas

Nº	Composto	TR m/z
1	Naftaleno D-8*	136/134
2	Naftaleno	128/127
3	2-metilnaftaleno	142/141
4	1-metilnaftaleno	142/141
5	Bifenil	154/152
6	alquilnaftalenos	156/141
7	Acenafteno D-10*	164/162
8	Acenafteno	153/154
9	Trimetilnaftalenos	170/155
10	Fluoreno	166/165
11	Fenantreno D-10*	188/184
12	Fenantreno	178/179
13	Fluoranteno D-10*	212/208

D-8 e D-10*: Compostos Deuterados

UNEP (United Nations Environment Programme Chemicals) (2002) destaca que os principais HPAs (Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) presentes no petróleo bruto são o naftaleno, o fenantreno e seus derivados alquilados.

Gouvêia (2010) menciona que no Brasil, o petróleo de melhor qualidade foi descoberto em 1987, em Urucu, na Amazônia, e possui 44° API. Por ser um óleo muito leve, a partir dele são produzidos principalmente derivados de alto valor agregado, como o óleo diesel e a nafta.

O petróleo de Urucu é considerado leve porque contém 15% de hidrocarbonetos aromáticos (pesados), 20,2% de compostos naftalênicos (médios) e 64,8% de compostos parafínicos (leves) (PETROBRÁS, 1997).

4.6 Análises da degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos do óleo diesel por consórcios de microrganismos através da quantificação por cromatografia gasosa e espectrometria de massa

Para análise da degradação dos hidrocarbonetos foram selecionados consórcios de bactérias compostos por seis bactérias selecionadas conforme

identificação molecular: *Bacillus pumilus* (Endofítica), *Lysinibacillus fusiformes* (Epifítica), *Pseudomonas aeruginosa* (Epifítica), *Acinetobacter junii* (Epifítica), *Acinetobacter junii* (Endofítica) e *Bacillus pumilus* (Epifítica), para o consórcio de fungos foram selecionados sete fungos, conforme identificação molecular: *Curvularia trifolii* (epifítica), *Curvularia clavata* (endofítica), *Curvularia clavata* (epifítica), *Gibberella intermedia* (epifítica), *Phoma herbarum* (epifítica), *Dothideomycetes* sp (epifítica) e *Gibberella intermédia* (endofítica) e para o consórcio misto foram utilizados os consórcios de fungos e bactérias simultaneamente. No experimento se utilizou o óleo diesel como contaminante e a água do rio negro objetivando simular o experimento ao ambiente natural.

As Figuras 36, 37, 38, 39, 40 e 41 mostram os cromatogramas dos controles e dos experimentos com 15 dias de degradação pelos consórcios de fungos, bactérias e misto (F/B).

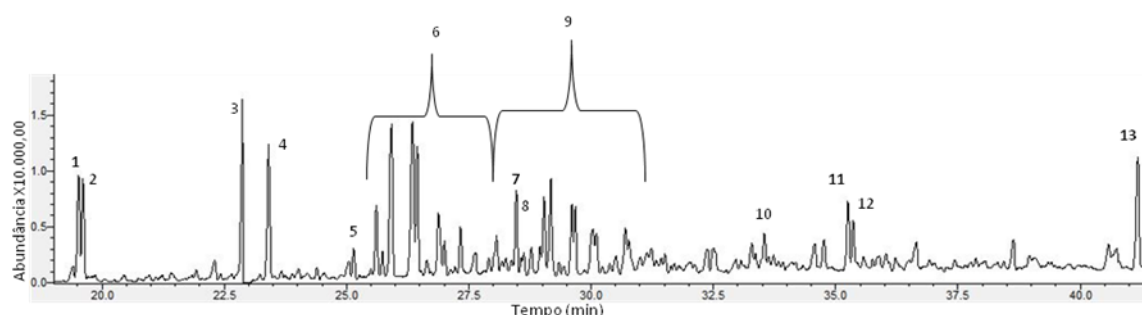


Figura 36: Espectro das amostras do controle com meio seletivo (BH) + diesel (40 mL) e (80 mL) para constatação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes, após 15 dias de incubação. Os picos estão assinalados conforme número de identificação na tabela 18.

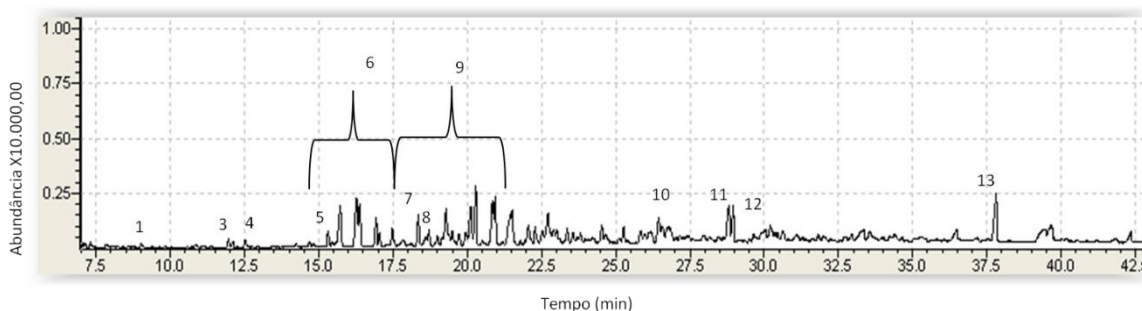


Figura 37: Espectro das amostras do controle com água do rio Negro + diesel (40mL) para constatação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes, após 15 dias de incubação. Os picos estão assinalados conforme número de identificação na tabela 18.

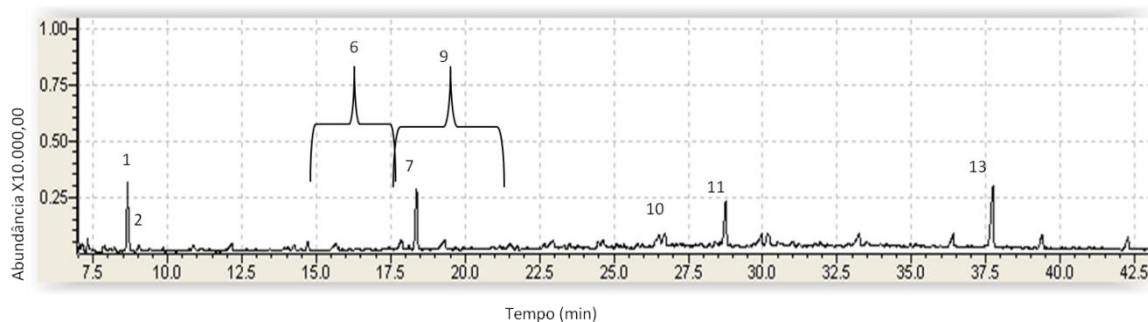


Figura 38: Espectro das amostras do consórcio de bactérias + água do rio Negro + diesel (40mL) após 15 dias de incubação. Os picos cromatográficos estão assinalados conforme número de identificação na tabela 18.

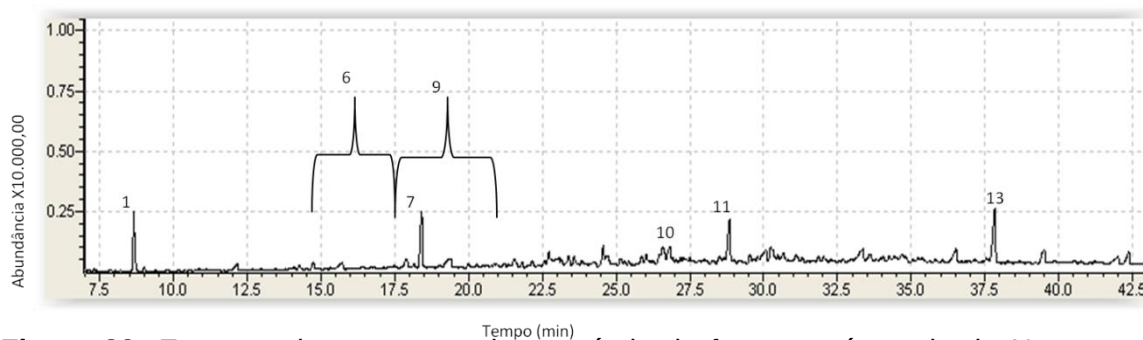


Figura 39: Espectro das amostras do consórcio de fungos + água do rio Negro + diesel (40mL) após 15 dias de incubação. Os picos cromatográficos estão assinalados conforme número de identificação na tabela 18.

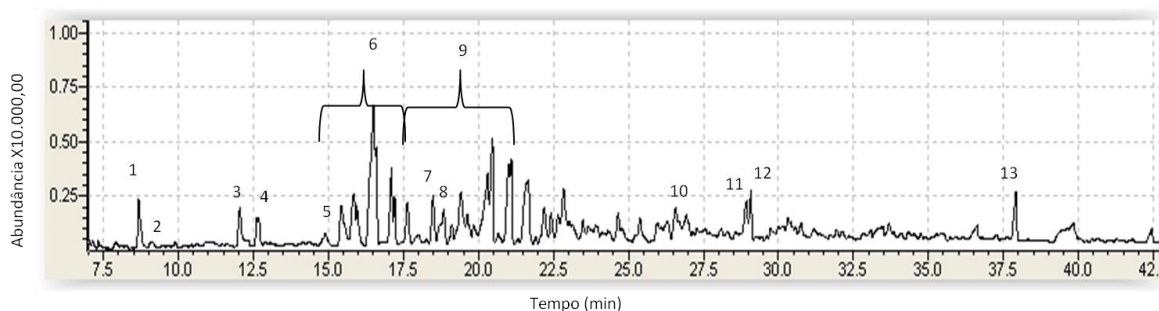


Figura 40: Espectro das amostras do controle com água do rio Negro + diesel (80mL) para constatação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes, após 15 dias de incubação. Os picos estão assinalados conforme número de identificação na tabela 18.

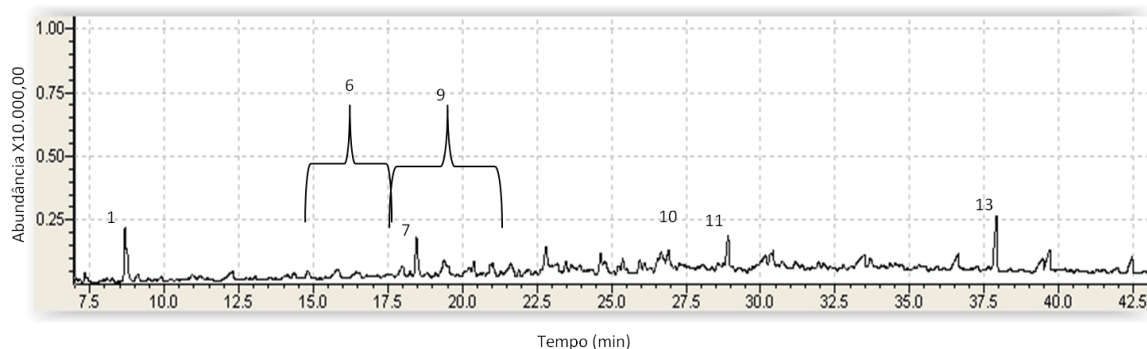


Figura 41: Espectro das amostras do consórcio misto (F/B) + água do rio Negro + diesel (80mL) para constatação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes, após 15 dias de incubação. Os picos estão assinalados conforme número de identificação na tabela 18.

Os resultados de degradação de hidrocarbonetos pelos consórcios de fungos, de bactérias e misto, composto por fungos e bactérias (F/B) estão descritos na tabela 19, com as respectivas concentrações de HPAs totais das amostras e dos controles, taxas de biodegradação das réplicas, taxa de biodegradação das médias e a média de desvio padrão da biodegradação.

Tabela 19: Somatória das concentrações dos HPAs totais (Σ HPA), média das réplicas dos Σ HPAs, porcentagem de biodegradação dos HPAs e desvio padrão dos Σ HPAs dos consórcios de fungos, consórcios de bactérias e consórcios (misto F/B)

	ΣHPAs (ug mL ⁻¹)			Médias ΣHPAs (ug mL ⁻¹)	Biodegradação (%)			Média Biodegradação	Biodegradação ± Desvio Padrão (%)
	1	2	3		1	2	3	%	
CONSÓRCIO DE FUNGOS									
CTL MEIO – 40	856,1	720,4	838,9	805,1					
CTL AGUA – 40	23,0	21,0	21,9	22,0	97,1	97,4	97,3	97	0,1
Cons. Fungos	0,0	0,0	1,0	0,3	100,0	100,0	99,9	100	0,1
CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS									
CTL MEIO – 40	856,1	720,4	838,9	805,1					
CTL AGUA – 40	23,0	21,0	21,9	22,0	97,1	97,4	97,3	97	0,1
Cons. Bactéria	0,0	0,9	0,0	0,3	100,0	96,0	100,0	98	2,3
CONSÓRCIO MISTO (F/B)									
CTL MEIO – 80	1211,6	1339,6	1219,9	1257,0					
CTL AGUA – 80	230,0	166,5	294,2	230,2	81,7	86,8	76,6	81	5,1
Cons. Misto	31,3	27,0	34,6	30,9	97,5	97,9	97,2	97	0,3

A Figura 42 apresenta a porcentagem de HPAs dos controles e dos consórcios em cada experimento, a fim de comparar o potencial de degradação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos pelos consórcios de fungos, bactérias e misto (F/B).

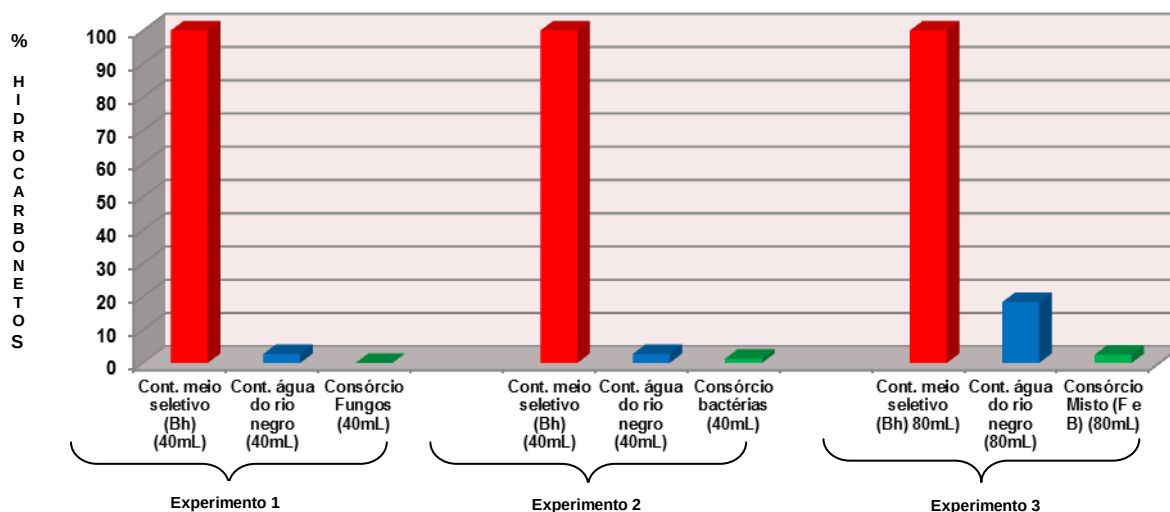


Figura 42: Porcentagem de HPAs nos controles dos ensaios com água do rio Negro e dos consórcios microbianos dos experimentos 1, 2 e 3.

No experimento 1, figura 42 ao ser comparado o controle com 100% de hidrocarbonetos, 97,3% foram degradados no controle com água do rio Negro, e 100% foram degradados pelo consórcio de fungos.

No experimento 2, ao ser comparado o controle com 100% de hidrocarbonetos, 97,3% foram degradados no controle com água do rio Negro, e 98,7% foram degradados pelo consórcio de bactérias.

No experimento 3, ao ser comparado o controle com 100% de hidrocarbonetos, 81,7% foram degradados no controle com a água do rio Negro, e 97,5% foram degradados pelo consórcio misto (F/B).

De acordo com os resultados dos ensaios dos consórcios de fungos, bactérias e misto (F/B) observa-se a ocorrência de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (98% a 100%). Entretanto, foi observado que o controle com água do rio Negro também apresentou alto percentual de biodegradabilidade (82% a 97%). Assim, no experimento 1 e 2, quando se comparou as porcentagens de degradação dos consórcios de fungos e bactérias (98% a 100%) ao resultado de

degradação dos controles com água do rio Negro (97,3%) não foi possível afirmar o potencial de degradação dos consórcios, pois não apresentaram diferenças estatisticamente.

No experimento 3, a porcentagem de degradação (97,5%) do consórcio misto foi estatisticamente maior que a degradação (82%) do controle com água do rio negro, podendo afirmar-se o potencial degradador do consórcio misto (F/B).

Estes resultados indicam que a eficiência dos consórcios foi relativa, pois na medida em que não foram diferentes estatisticamente dos controles, deve-se considerar que a microbiota natural também apresenta capacidade de degradação e que as populações de bactérias e de fungos selecionados e inoculados não são mais eficientes que a microbiota presente nas águas do rio Negro. Entretanto quando se associa o consórcio de fungos e bactérias estes apresentam potencial degradador significativo, quando comparado aos controles com água do rio negro.

Spilborghs (1997) verificou em sistema de microcosmo o comportamento de um vazamento de gasolina na subsuperfície. Através do sistema de biorremediação *air sparging* todos os compostos BTX foram degradados em um período máximo de 126 dias. As concentrações iniciais desses compostos eram de 289 mg/L de benzeno, 308 mg/L de tolueno e 230 mg/L de xilenos. O tolueno foi biodegradado mais rapidamente (98 dias) seguido do benzeno (112 dias) e finalmente os xilenos.

A literatura destaca o potencial do consórcio misto, e autores como Riser-Roberts (1992), justifica que ao contrário das bactérias e leveduras que mostram decréscimo na capacidade de degradação de alcanos com o aumento da cadeia do composto, os fungos filamentosos parecem ser mais hábeis em degradar ou transformar hidrocarbonetos de estrutura complexa e de cadeia longa. Entretanto, o metabolismo dos fungos geralmente resulta numa degradação incompleta que necessita da associação de bactérias para alcançar a completa oxidação do composto. De acordo com Atlas (1995), durante a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias há a formação de cis-diols, enquanto que durante a biodegradação por fungos formam-se trans-diols.

No trabalho de Oliveira (2001) sobre biorremediação de solos contaminados com petróleo utilizando consórcio de fungos e bactérias, foi destacado que o uso de cultura mista foi o fator que mais contribuiu para a remoção da fração pesada de óleo. O uso de cultura mista tem se configurado como importante e promissora ferramenta biotecnológica para os tratamentos ambientais.

Pesquisas “*in situ*” de Corseuil e Kulkamp (2003) investigaram a atenuação natural em um derramamento controlado de etanol e óleo diesel. Na referida pesquisa os resultados mostraram que o etanol presente na água subterrânea agia como consumidor de aceptores de elétrons e nutrientes poderiam estar disponíveis para a bioatenuação dos compostos mono e poliaromáticos. Indicadores geoquímicos mostraram que degradação aeróbia, redução de ferro e metanogênese eram os principais processos biológicos responsáveis pela degradação do etanol.

Ao realizar estudos com a inoculação de um consórcio microbiano composto por seis bactérias e um fungo no solo contaminado com antraceno, fenantreno e pireno, Jacques (2005) registraram aumento de aproximadamente 10 vezes na mineralização destes HAPs em relação à microbiota nativa do solo.

Mariano (2006) cita que Venkateswaram & Harayama (1995), por meio do enriquecimento de culturas, isolaram uma população bacteriana capaz de degradar petróleo bruto, verificando que 28-51% da fração saturada e 0-18% da fração aromática presentes foram biodegradadas por uma cultura mista. Contudo, quando as culturas foram colocadas puras, nenhuma delas apresentou melhor degradação do que quando estavam consorciadas.

Li et al., (2009) utilizando consórcios microbianos formado por cinco fungos: *Phanerochaete chrysosporium*, *Cunninghamella* sp., *Alternaria alternate*, *Penicillium chrysogenum*, e *Aspergillus niger*; e três bactérias: *Bacillus* sp., *Zoogloea* sp., e *Flavobacterium*, todos nativos de solo contaminado por petroderivados, obtiveram taxa de degradação de hidrocarbonetos de 41,3%, durante a incubação por 64 dias.

Arruda (2011) utilizando um consórcio fúngico para a degradação do óleo diesel a 7% em frascos verificou que o maior percentual de degradação foi obtido para o nonano, sendo este de 72,44%. Richard & Vogel (1999) utilizando um consórcio bacteriano para degradação de óleo diesel, constataram que 90% dos hidrocarbonetos do óleo diesel foram degradados após 50 dias de experimento.

Em estudo mais recente, desenvolvido por Mao et al. (2012), foi utilizado um solo contaminado pelos 16 HPAs listados na US - EPA retirado de uma área industrial da China. Os microrganismos foram enriquecidos por 6 meses em um agitador rotativo no escuro à 28°C. Neste estudo foi obtido uma degradação de 20,2% com adição de 10% do consórcio bacteriano e de 35,8% com a adição de 20% do mesmo consórcio. O referido estudo objetivou avaliar o comportamento da biorremediação com estes consórcios, ou seja, mistura de mais de uma espécie

bacteriana. Estes autores concluíram que o processo com consórcios é promissor para biorremediação destacando as espécies: *Mesorhizobium sp.*, *Alcaligenes sp.* e *Bacillus sp.*

Na medida em que se constatou que não houve diferença estatística entre o potencial de degradação dos consórcios de fungos e bactérias, e o potencial da água do rio Negro, buscou-se na literatura pesquisas e estudos para embasamento sobre a microbiota do rio negro.

Batista (2009) produziu um consórcio de bactérias isoladas a partir de macrófita aquática amazônica e avaliou quanto à degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos em experimento contendo água de rio da Amazônia. O consórcio foi constituído pelas linhagens identificadas como *Stenotrophomonas sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp.*, *Methylobacterium radiotolerans* e *Acinetobacter baumannii*, sendo utilizadas as técnicas de bioaugmentação e bioestimulação. Os resultados obtidos demonstraram que o efeito principal de todos os parâmetros analisados (consórcio, fonte adicional de carbono e nitrogênio e correção de pH) influenciaram positivamente na degradação dos hidrocarbonetos avaliados.

Neves (2013) desenvolveu pesquisa com o objetivo de caracterizar a microbiota bacteriana do rio Negro em relação ao período sazonal, com ênfase em unidade formadora de colônias, metagenômica e abordagem Molecular. O autor destaca que o filo *Proteobacteria* foi dominante nestas duas coletas do rio, os gêneros dominantes deste filo na época de cheia do rio foram *Limnohabitans*, *Methylobacter*, e outro filo expressivo foi *Acidobacteria* do gênero Gp3. No período de vazante os gêneros abundantes foram *Polynucleobacter*, *Acinetobacter*, *Curvibacter*, *Chromobacterium*, dentro do filo *Proteobacteria*. Corroborando Peixoto e colaboradores (2011) em estudo realizado nos rios Negro e Solimões registraram a dominância do gênero *Polynucleobacter* na biblioteca do rio Negro e rio Solimões e para ambos os rios a predominância do gênero *Pseudomonas* e *actinobactérias*.

Dos gêneros apresentados pelos autores Neves (2013), Peixoto e colaboradores (2011) no isolamento de microrganismos na água do rio Negro e Solimões, os gênero *Acinetobacter* e *Pseudomonas* apresentam potencial como degradadores de hidrocarbonetos de petróleo e estão presente nesta pesquisa.

Dessa forma, recomenda-se uma análise aprofundada a ser feita na microbiota do rio Negro para elucidar o potencial de degradação apresentada, pois

Neves (2013), Peixoto e colaboradores (2011) apresentaram gêneros de microrganismos com potências degradadores, levando-nos a acreditar que a degradação ocorra possivelmente pelos microrganismos presente na microbiota nativa, cultivável e não cultivável. Vale destacar que os autores Neves (2013), Peixoto e colaboradores (2011) relatam a existência nesses rios de um grande número de espécies microbianas ainda desconhecidas pela ciência.

4.6.1 Análise da degradação dos compostos fenantreno e naftaleno por consórcios de microrganismos através da quantificação por cromatografia gasosa e espectrometria de massa

Os resultados da degradação de naftaleno pelos consórcios de fungos, bactérias e misto (F/B) estão descritos na tabela 20, com as respectivas concentrações de naftaleno nas amostras e nos controles, taxas de biodegradação das réplicas, taxa de biodegradação das médias e a média de desvio padrão.

Tabela 20: Somatória das concentrações do composto naftaleno, média das réplicas, porcentagem de biodegradação e desvio padrão dos consórcios de fungos, consórcios de bactérias e consórcios (misto F/B)

NAFTALENO									
	Σ (ug mL ⁻¹)			Médias Σ (ug mL ⁻¹)	Biodegradação (%)			Média Biodegradação %	Biodegradação ± Desvio Padrão (%)
	1	2	3		1	2	3		
CONSÓRCIO DE FUNGOS									
CTL MEIO – 40	45,3	31,1	73,1	49,8					
CTL AGUA – 40	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100	0,0
Cons. Fungos	0,0	0,9	0,0	0,3	100,0	98,2	100,0	99	1,0
CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS									
CTL MEIO – 40	45,3	31,1	73,1	49,8					
CTL AGUA – 40	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100	0,0
Cons. Bactéria	0,0	0,9	0,0	0,3	100,0	98,2	100,0	99	1,0
CONSÓRCIO MISTO (F/B)									
CTL MEIO – 80	99,6	95,9	55,8	83,8					
CTL AGUA – 80	1,3	0,0	0,8	0,7	98,4	100,0	99,0	99	0,8
Cons. Misto	8,3	0,0	12,5	6,9	90,1	100,0	85,0	91	7,6

A Figura 43 apresenta a comparação dos controles e dos resultados dos três experimentos para avaliação da degradação do composto naftaleno pelos consórcios de fungos, bactérias e consórcios misto (F/B).

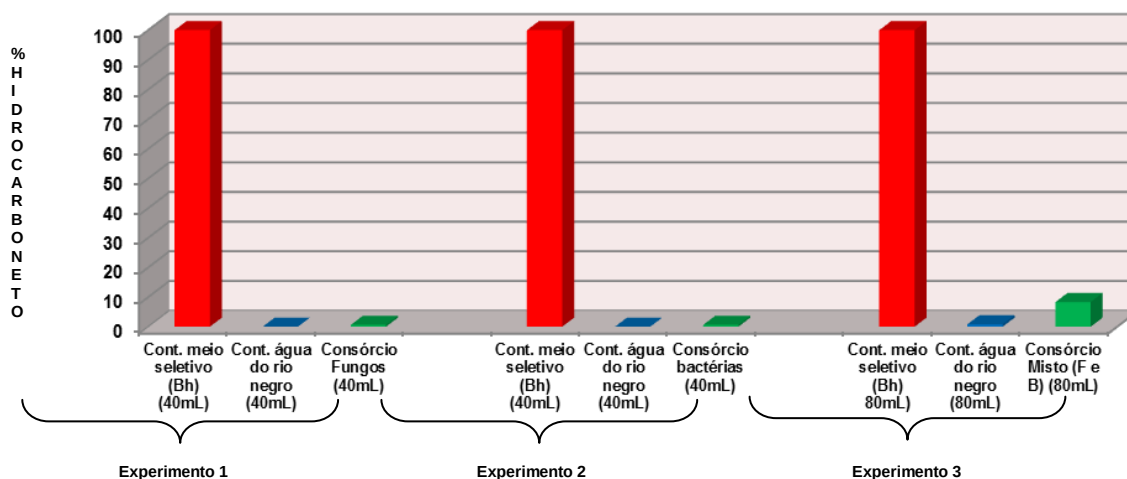


Figura 43: Porcentagem do composto naftaleno nos controles, dos ensaios com água do Rio Negro e dos consórcios microbianos dos experimentos 1, 2 e 3.

No experimento 1, figura 43 o naftaleno foi 100% degradado tanto no controle com água do rio Negro quanto pelo consórcio de fungos. No experimento 2, o naftaleno foi 100% degradado tanto no controle com água do rio Negro quanto pelo consórcio de bactérias.

No experimento 3, ao ser comparado o controle com 100% do composto de naftaleno, 99,2% foram degradados no controle com a água do rio negro, e 91,7% foram degradados pelo consórcio misto (F/B).

De acordo com os resultados dos ensaios dos consórcios de fungos, bactérias e misto (F/B) conclui-se que os consórcios não apresentaram potencial de degradação do composto de naftaleno frente ao controle com água do rio Negro. Dessa forma necessita-se de estudos detalhados no que se refere à água utilizada.

Outro composto analisado foi o fenantreno, os resultados dos consórcios de fungos, bactérias e misto (F/B) estão descritos na tabela 21, com as respectivas concentrações totais do composto de fenantreno nas amostras e nos controles, taxas de biodegradação das réplicas, taxa de biodegradação das médias e a média de desvio padrão da biodegradação.

Tabela 21: Somatória das concentrações do compoto fenantreno, média das réplicas, porcentagem de biodegradação e desvio padrão do consórcio de fungos, consórcio de bactérias e consórcio (misto F/B)

FENANTRENO									
	Σ (ug mL ⁻¹)			Médias Σ (ug mL ⁻¹)	Biodegradação (%)			Média Biodegradação %	Biodegradação ± Desvio Padrão (%)
	1	2	3		1	2	3		
CONSÓRCIO DE FUNGOS									
CTL MEIO – 40	55,43	53,21	54,04	54,2					
CTL AGUA – 40	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100	0,0
Cons. Fungos	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100	0,0
CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS									
CTL MEIO – 40	55,43	53,21	54,04	54,2					
CTL AGUA – 40	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100	0,0
Cons. Bactéria	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0	100	0,0
CONSÓRCIO MISTO (F/B)									
CTL MEIO – 80	99,3	92,3	85,3	92,3					
CTL AGUA – 80	2,65	25,47	0,0	14,6	97,1	72,4	0,0	84	17,5
Cons. Misto	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	100	0,0

A figura 44 ilustra o comportamento de degradação dos microrganismos na degradação do composto de fenantreno.

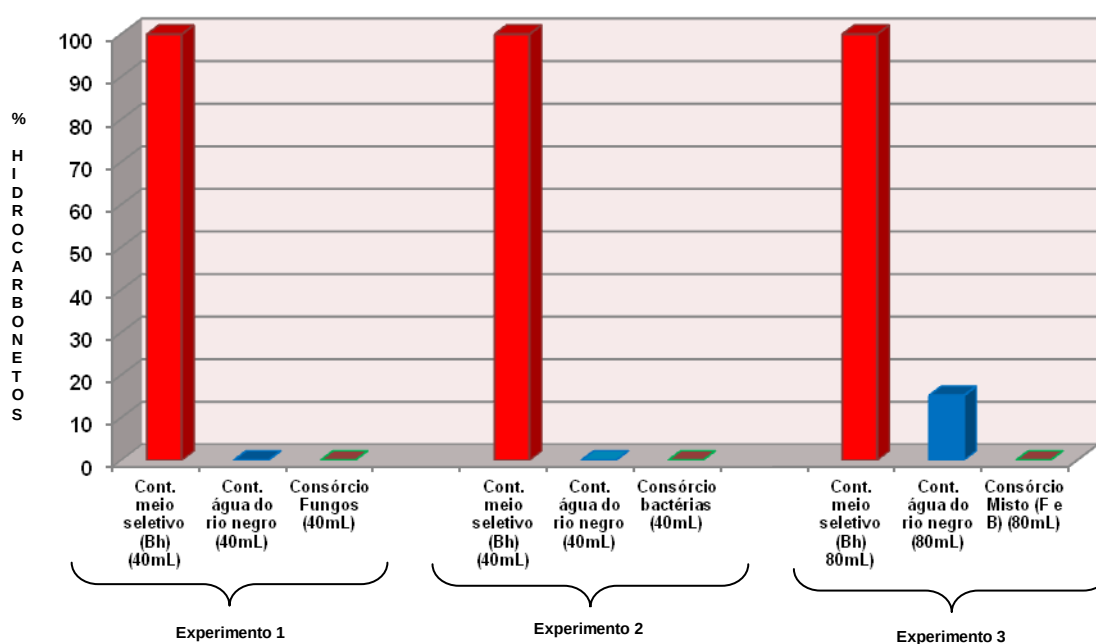


Figura 44: Porcentagem do composto fenantreno nos controles, dos ensaios com água do rio Regro e dos consórcios microbianos dos experimentos 1, 2 e 3.

No experimento 1, figura 44 o fenantreno foi 100% degradado tanto no controle com água do rio Negro quanto pelo consórcio de fungos. No experimento 2, o fenantreno foi 100% degradado tanto no controle com água do rio Negro quanto pelo consórcio de bactérias.

No experimento 3, ao ser comparado o controle com 100% do composto de fenantreno, 84,8% foram degradados no controle com a água do rio negro, e 100% foram degradados pelo consórcio misto (F/B).

Frente aos resultados observa-se que para o composto fenantreno o consórcio misto (F/B) apresenta maior potencial de degradação, apresentando-se como fator positivo para a degradação deste composto.

Jacques (2005) isolou, identificou e caracterizou microrganismos degradadores e mineralizadores de antraceno, fenantreno e pireno e avaliou a influência do pH, a disponibilidade de água, e nutrientes (N, P, Fe, S) para biorremediação de solo contaminado com antraceno. Ao final das análises ele verificou que o consórcio microbiano de 6 bactérias (*Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium sp.*, *Gordonia polyisoprenivorans*, *Microcateriaceae bacterium* e *Naphthaleneutilizing bacterium*) e um fungo (*Fusarium oxysporum*) degradou 48, 67 e 22% do antraceno, fenantreno e pireno respectivamente; e em solo degradou 92% e mineralizou mais de 78% desses hidrocarbonetos em diferentes concentrações.

Na Tailândia, Charoenchang e colaboradores (2003) encontraram um potente consórcio de microrganismos degradadores de fenantreno, fluoranteno e pireno. As bactérias foram isoladas de folhas de árvores tropicais e foram utilizadas na bioaumentação de solo contaminado com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Através dos resultados, os autores sugerem que os microrganismos associados as folhas tropicais possuem potencial para preparo de consórcio para ser usado na biorremediação.

Em sua pesquisa Jacques (2005) isolou, identificou e caracterizou microrganismos degradadores e mineralizadores de antraceno, fenantreno e pireno, e avaliou fatores físico-químicos para biorremediação. Utilizou uma contaminação laboratorial, e incubou neste solo contaminado, um solo de landfarming (com diversas espécies de microrganismos) utilizado para biorremediação de resíduos petroquímicos, objetivando uma posterior identificação dos microrganismos

degradadores destes HPAs. Através dos resultados comprovou degradação de antraceno, fenantreno e pireno de 48, 67 e 22% respectivamente, analisados por cromatografia gasosa. A mineralização foi avaliada via respirometria, obtendo mais de 78%.

Clemente e colaboradores (2001), utilizaram 13 deuteromicetos lignolíticos cultivados em meio contendo HPAs por 6 e 10 dias, e com adição de HPAs diretamente aos inóculos no primeiro dia e terceiro dia de cultivo, e selecionou a melhor linhagem de acordo com a melhor degradação de HPAs. Esta seleção foi monitorada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) onde se verificou que a melhor degradação do naftaleno foi de 69% obtida pela linhagem 984, tendo a atividade de Mn-peroxidase determinada por oxidação do fenol seguida pela linhagem 870 com 17% de degradação a qual apresentou atividades de lignina peroxidase determinada pela medida da oxidação do álcool veratril e lacase determinada via oxidação da H_2O_2 independente da oxidação da siringaldazina. A melhor porcentagem de degradação de fenantreno foi de 12% observada pela linhagem 870 contendo atividades de Mn-peroxidase e lacase. Outro exemplo de estudo envolvendo degradação de HPAs foi realizado por Silva e colaboradores (2003) que ao efetuarem isolamentos de microrganismos em sedimentos de estuário com o intuito de identificar os fungos com capacidade de degradar HPA isolaram o *Cyclothyrium sp.*, que degradava simultaneamente 70% de fenantreno, 74% pireno, 59% antraceno e 38% benzo[a]pireno. Em trabalho desenvolvido para a verificação do potencial de biorremediação de um consócio dos fungos *Trametes versicolor*, *Bjerkandera sp.* e *lopharia spadicea* obteve-se como resposta 70% de degradação do naftaleno (ANASTASI et al., 2008).

4.7 Análise estatística

A análise estatística apresenta a média do desvio padrão, necessária no diagnóstico da manipulação dos experimentos para avaliar o percentual de erros e acertos na execução destes.

O teste de biodegradabilidade utilizando o consócio de fungos foi o que melhor apresentou acerto na manipulação do experimento com a média de 0,1% para o desvio padrão, seguido pelo consócio de bactérias com 2,4 e consócio

misto com 2,7. A Tabela 22 apresenta a análise de variância do experimento como um todo, aonde P significa os consórcios (Tratamento 1: consórcio bactérias x fungos; Tratamento 2: consórcio de bactérias e Tratamento 3: consórcio de fungos) e S significa o meio sintético esterilizado contendo diesel e o controle com água comparados com os respectivos consórcios.

Tabela 22: Quadro de análise de variância do experimento na degradação do diesel

C. Variação	G.L.*	S. Q.**	Q. M.***	Fc****
Tratamentos (P)	2	197,3119	98,6559	25,43
Resíduo (A)	6	23,2778	3,8796	
(Parcelas)	(8)	220,5896		
Tratamentos (S)	2	54735,4585	27367,7293	8097,85
Interação P x S	4	293,9593	73,4898	21,74
Resíduo (B)	12	40,5556	3,3796	
TOTAL	26	55290,5630		

*G.L.: Grau de liberdade; **S. Q.: Soma de quadrados; ***Q.M.: Quadrados médios; ****Fc: Valor da estatística.

Nota-se pela tabela que houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre os consórcios, isto é, houve diferenças quanto à eficiência de degradação, bem como entre os controles quando comparados entre si e com os consórcios. Diante dos dados, constata-se que o consórcio misto (F/B) apresentou maior poder de degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

Na medida em que houve diferença significativa ao nível de 1% entre os consórcios apresentados pela análise de variância, foi realizado o teste Tukey ($p < 0,01$) (Tabela 23) para a comparação entre as médias de cada consórcio.

Tabela 33: Teste Tukey ($p < 0,01$) para comparação de medias de degradação (%) entre os consórcios (f = fungos; B = bactérias e BF = bactérias x fungos)

TESTE DE TUKEY	
DMS (TUKEY) =	2,8495
Tratamento.	Média
Consórcio de Fungos (F)	65,6333 A
Consórcio de Bactérias (B)	65,3111 A
Consórcio Misto (F/B)	59,7444 B

A Tabela 23 demonstra que o consórcio misto (BF) proporcionou o menor valor quando comparado com os consórcios exclusivos de bactérias (B) e de fungos

(F), que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. Entretanto o consórcio misto (F/B) possui uma quantidade duplicada de composto com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e o valor obtido no teste de Tukey, não diminui o poder de degradação do consórcio misto (F/B).

Tabela 24 apresenta uma comparação dos resultados de degradação do diesel em cada consórcio (BF, B e F) comparando-os com os respectivos controles (CT meio e CT água).

Tabela 24: Teste Tukey ($p < 0,01$) para comparação de médias de degradação (%) entre os consórcios e os respectivos controles

Teste Tukey ($p < 0,01$)					
Consórcio F/B*	97,5 A	Consórcio B**	98,7 A	Consórcio F***	99,6 A
Controle Meio	81,7 B	Controle Meio	97,3 A	Controle Meio	97,3 A
Controle Água	0,0 C	Controle Água	0,0 B	Controle Água	0,0 B

*FB: fungos e bactérias; **B: bactérias, ***F: fungos

Para o consórcio misto (F/B), houve diferenças significativas quando se comparou com os controles, bem como, entre os controles em si. Isto é, embora o controle contendo água do rio negro tenha promovido degradação do diesel pela microbiota selvagem, esta degradação foi inferior e diferente estatisticamente do consórcio misto (F/B).

No entanto, os consórcios de fungos e bactérias foram os que apresentaram as maiores médias, mas não apresentaram diferenças estatísticas entre o controle contendo água do rio negro, o que está representado pela mesma letra quando da utilização do teste Tukey. Somente quando se comparou com o meio sintético é que houve diferenças significativas.

Os resultados mostram a necessidade de estudo sobre a água do rio negro com objetivo para uso na biorremediação, ou melhorar as condições reacionais que permitam a esses microrganismos selecionados nos consórcios de efetivarem a degradação do diesel com maior eficiência.

A Tabela 25 apresenta a análise de variância do experimento analisando a degradação do naftaleno.

Tabela 25: Tabela de análise de variância do experimento de degradação do naftaleno

C. Variação	G.L	S. Q.	Q. M.	Fc
Tratamentos (P)	2	45,4141	22,7070	2,76
Resíduo (A)	6	49,3178	8,2196	
(Parcelas)	(8)	94,7319		
Tratamentos (S)	2	57856,8674	28928,4337	4333,01
Interação P x S	4	65,2904	16,3226	2,44
Resíduo (B)	12	80,1156	6,6763	
TOTAL	26	58097,0052		

*G.L.: Grau de liberdade; **S. Q.: Soma de quadrados; ***Q.M.: Quadrados médios; ****Fc: Valor da estatística.

Não houve diferenças estatísticas significativas entre os consórcios na degradação do composto naftaleno, mas houve uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre os controles. Notadamente com relação ao controle com meio sintético que não promoveu degradação.

A Tabela 26 mostra a análise de variância do experimento analisando o fenantreno.

Tabela 26: Tabela de análise de variância do experimento de degradação do fenantreno

C. Variação	G.L	S. Q.	Q. M.	Fc
Tratamentos (P)	2	154,7030	77,3515	4,56
Resíduo (A)	6	101,6822	16,9470	
(Parcelas)	(8)	256,3852		
Tratamentos (S)	2	57108,0363	28554,0181	1684,90
Interação P x S	4	309,4059	77,3515	4,56
Resíduo (B)	12	203,3644	16,9470	
TOTAL	26	57877,1919		

*G.L.: Grau de liberdade; **S. Q.: Soma de quadrados; ***Q.M.: Quadrados médios; ****Fc: Valor da estatística.

Para o naftaleno, houve diferença significativa entre os consórcios, destacando-se o consórcio misto (F/B), em função da degradação do composto.

Estes dados corroboram com a análise anterior, principalmente para os consórcios exclusivos de bactérias e de fungos, que não apresentaram diferenças estatísticas na degradação do diesel, o que se reflete na decomposição semelhantes apresentada para o naftaleno e fenantreno entre os consórcios testados.

4.8 Avaliação da Toxicidade

Os testes de toxicidade com os microcrustáceos têm sido frequentemente utilizados devido ao seu baixo custo e simplicidade. Assim, o teste realizado com as larvas de *Artemia salina* auxiliou na avaliação da toxicidade dos extratos dos consórcios de fungos, bactérias e misto (F/B) permitindo observar os índices de mortalidade e as respectivas concentrações.

Em relação ao índice de mortalidade (Tabela 27), a concentração 50% do extrato, mostrou-se tóxica para os microcrustáceos, causando a mortalidade de larvas.

Tabela 27: **Teste de toxicidade com *Artemia salina* em concentrações de 1,56 a 50%**

Consórcios	100% Controle negativo	Água 0% Controle positivo	50%	25%	12,5%	6,25%	3,125%	1,56%
Consórcio de Fungos	- - -	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Consórcio de Bactérias	- - -	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Consórcio Misto (F/B)	- - -	+++	- - -	+++	+++	+++	+++	+++

(---) Triplicata: Microcrustáceos mortos; (+++) Triplicata: Microcrustáceos vivos.

O teste de toxicidade com *Artemia salina* nas concentrações propostas apresentou na concentração de 50% do extrato 10% de mortalidade dos microcrustáceos. Baseando-se na classificação de Harving e Scott (1971), que estabeleceram critérios para a classificação da toxicidade de extrato utilizando somente o número de microcrustáceos, classificou-se a mortalidade destes como ligeiramente tóxicos (LT), com uma proporção de 10 a 49% de mortalidade conforme classificação sugerida pelos referidos autores. Para a determinação da CL₅₀ (concentração letal média), nas concentrações apresentadas não ocorreram resultados suficientes para o cálculo da R², entretanto Dolabela (1997) estabeleceu outros critérios para a classificação da toxicidade de um composto, baseando-se em estudos de atividades antitumoral e anti-*Trypanossoma cruzi*, avaliou a toxicidade através das concentrações dos extratos constatando a CL₅₀. A concentração de

50% corresponde a 100 µg/mL, sendo classificada segundo o autor como toxicidade moderada (TM), para os valores entre 80 a 250 µg/mL.

Segundo Alves et al., (2000), extratos somente são considerados ativos quando CL₅₀ é alcançada em concentrações igual ou menor que 100 µg/g ou µg/mL.

Ensaio de letalidade com *Artemia salina* definem valores da dose letal média (DL50) em µg/mL de compostos ou extratos, sendo que dezenas de substâncias ativas conhecidas apresentam toxicidade ao realizar este teste (MEYER, 1982).

No trabalho realizado por Campos et al., (2002), os efluentes de uma refinaria de petróleo foram testados quanto à toxicidade frente a *Artemia salina* antes e após serem submetidos a tratamento primário associado a um secundário. Os autores obtiveram CL₅₀ média de 1,2% para o efluente e nenhuma mortalidade significativa observada para o efluente. No presente estudo não foi possível estimar a CL₅₀ do efluente em várias coletas, confirmando o sucesso do tratamento (remoção de toxicidade).

Os microrganismos isolados e identificados para o consórcio apresentaram resultados relevantes para a pesquisa, pois através da cromatografia foram classificados como potenciais degradadores de hidrocarbonetos de petróleo, destacando o consórcio misto (F/B), sendo este classificado quanto a toxicidade como ligeiramente tóxicos, não apresentando prejuízos ao meio ambiente e nem aos seres humanos.

5 CONCLUSÕES

A biorremediação é uma prática que tem alcançando importância mundial, uma vez que o aumento da atividade industrial está degradando, cada vez mais, os ecossistemas naturais. O emprego de microrganismos autóctones para o tratamento de ambientes contaminados necessita de maior atenção, apresentando-se como uma alternativa viável e de baixo custo;

As macrófitas aquáticas apresentaram-se como indicadores positivos para isolamento de microrganismos com potencial degradador de hidrocarbonetos, a espécie vegetal *Eichornia crassipes* (Mart.) Solms, destacou-se no isolamento de bactérias, enquanto que *Cyperus ligularis* L. (Cyperaceae) destacou-se no isolamento de fungos. A espécie *Ichnanthus calvescens* Döll (Poaceae), não apresentou nenhum microrganismo com potencial degradador de hidrocarbonetos de petróleo;

A identificação molecular de gêneros e espécies confirmou através da literatura o potencial dos microrganismos como degradadores de hidrocarbonetos;

Os testes propostos de seleção utilizando petróleo como fonte de carbono e o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP) como aceptor de elétrons apresentaram confiabilidade na seleção primária dos microrganismos;

Para o teste de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina* nas concentrações propostas, somente a concentração de 50% do extrato foi a que apresentou 10% de mortalidade dos microcrustáceos, sendo classificada como ligeiramente tóxicos (LT), e na determinação da CL₅₀ (concentração letal média),

como toxicidade moderada (TM), para o consórcio misto composto por fungos e bactérias, os consórcios de fungos e consórcios de bactérias não apresentaram toxicidade;

Os resultados indicam que a eficiência dos consórcios é relativa, pois na medida em que não são diferentes estatisticamente dos controles, há de se considerar que a microbiota selvagem também apresenta capacidade de degradação e que as populações de bactérias e de fungos selecionadas e inoculadas não são mais eficientes do que estes quando comparadas. Entretanto, quando se associa o consórcio de fungos aos de bactérias estes apresentam potencial degradador significativo, quando comparado aos controles;

Na degradação dos compostos de naftaleno e fenantreno, o composto fenantreno foi o que melhor foi degradado pelo consórcio misto composto por fungos e bactérias, entretanto o naftaleno foi mais degradado pelo controle com água do rio Negro, destacando o potencial dos microrganismos selvagens que merecem atenção nas futuras pesquisas, no isolamento destes em águas do rio Negro;

Assim, a pesquisa consolida o estudo quando compara estatisticamente que o consórcio misto composto por fungos e bactérias apresentaram melhores resultados para degradação de hidrocarbonetos de petróleo e derivados, tornando as linhagens promissoras para possíveis tratamentos na biorremediação;

Os resultados obtidos estão proporcionando a equipe do Laboratório de Biodegradação da Universidade Federal do Amazonas conhecimentos e informações para aperfeiçoar técnicas e desenvolver processos para a biorremediação utilizando as culturas de microrganismos oriundos da região amazônica, identificadas na presente pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABBAS, M. Z. M. **A biorremediação como ferramenta para a minimização de problemas ambientais**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola de Agricultura, 2003.

ABDEL- EL- HALEEM, D. 2003. Acinetobacter: Enviromental and Biotechnological Applications. **Afr. J. Biotechnol.** 2:71-74.

AFUWALE, C; MODI, H. A. Study of bacterial diversity of crude oil degrading bacteria isolated from crude oil contaminated sites. **Life sciences leaflets**, v. 6, p.13-23, 2012.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (Brasil). **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis** (ANP), Rio de Janeiro: Copyright ©: 2012.

AHMED, I., YOKOTA, A., YAMAZOE, A., FUJIWARA, T. (2007) Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and Transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 5, 57:1117-1125.

AISLABIE, J.M.; BALKS, M.R.; FOGHT J.M. & WATERHOUSE, E.J. **Hydrocarbon spills on Antarctic soils: effects and management**. Environment Science Technology, [S.n.].[S.l], 2004.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2^a ed. p. 453. San Diego, U.S.A: Academic Press, 1999.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A. SMÂNIA JUNIOR, AZANI, C. L. Biological Screening of Brazilian Medical Plants. **Memória do Instituto Osvaldo Cruz**. V. 95. N. 3. P. 367-373. 2000.

ANASTASI, A.; VARESE, G. C.; BOSCO, F.; CHIMIRRI, F.; MARCHISIO, V. F. Bioremediation potential of basidiomycetes isolated from compost. **Bioresource Technology**. v. 99, p. 6626–6630, 2008.

ANDERSON, A.J.; KWON, S.; CARNICERO, A.; FALCO, M.A. Two isolates of *Fusarium proliferatum* from diferente habitats and global locations have similar abilities to degrade lignina. **Microbiology Letters**, v.249, p. 149-155, 2005.

ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO M.A.; NOCERINO, G.; BERNASCONI, S.; DELL_AMICO E.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. (2004): Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. **Chemosphere**. V.57 p.401-412.

ARRUDA, F. V. F. **Degradação de óleo diesel por *Aspergillus tereus*, *Cunninghamella echinulata* e *Penicillium commune***. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco. 56p. 2011.

ATAYDE, H. M. **Potencial de toxicidade de microfungos isolados de ração para peixes fabricadas no Estado do Amazonas**. Dissertação – (Mestrado em Ciências de Alimento) – Faculdades de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2008.

ATLAS, R. M. Stimulated petroleum biodegradation. **Critical Review in Microbiology**, v. 5, p. 371-386. [S.n.].[S.l], 1977.

_____. **Bioremediation of Petroleum Pollutants**. International Biodeterioration & Biodegradation. p. 317- 327. 1995.

AZEVEDO, J. L. **Botânica: uma Ciência básica ou aplicada?** **Revista brasileira de Botânica**. v. 22, nº 2 (suplemento), p. 225-229, out., 1999.

AZEVEDO, J.L, MACCHERONI-JÚNIOR, W.M, PEREIRA, J.O, and ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v. 3, <http://www.ejb.org/content/vol3/isse1/full/3/4>. acesso em 20/jul/2014.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. São Paulo: Ed. Bookman, 2002.

BALBA, M. Bioremediation of oil-contaminated desert soil; the Kuwait experience. **Environmental International**, Kuwait, v. 24, n. 1-2, p. 163-173, 2001.

BANERJI, S. K.; ZAPPI, M. E.; TEETER, C. L.; GUNNISON, D.; CULLINANE, M. J.; **Bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons using bioslurry reactors**. Washington, DC: U.S. Army Corps of Engineers. 1995.

BAPTISTA, S. J; CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. D, C. **Avaliação da Bioestimulação em Solos Argilosos Contaminados com Petróleo**. In: II CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO E GÁS, 2003, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro, 2003.

BARBOSA, A.P.A; GONDIM, A.L.N; PAZ, M.C.F. **Remoção do corante preto pirazol por *Pseudomonas aeruginosa***. I Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. João Pessoa - PB – 2007.

BASUKI, W.; SYAHPUTRA, K.; SURYANI, A.T.; PRADIPTA, I. Biodegradation of used engine oil by *Acinetobacter junii*TBC 1.2. **Indonesia Journal of Biotechnology**, 16: 132-138. 2011.

BATISTA, I. H. **Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: Um estudo com bactérias isoladas de *Eichornia Crassipes* na Amazônia**. Tese de doutorado (Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, 2009. 184p

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKE, B.C.; FRANKENBERGER, JR. W.T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. **Microbiological Reserch**, v. 160, p. 249-255, 2005.

Becker, B. **Amazônia: Crise Mundial, Projetos Globais e Interesse Nacional**, 2012.

BIANCHINI, J. I. Modelos de crescimento e decomposição de macrófitas aquáticas. In: **Ecologia e Manejo de Macrófitas Aquáticas**. Eds. Thomaz, S. & Bini, L.M. Nupélia, 2003.

BIDOIA, E. D, MONTAGNOLLI, R. N., LOPES, P.R.M. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. A. Méndez-Vilas (Ed.), p: 1277-1288. 2010.

BRITO, L. F. F. **Estudo de gases em aterros de resíduos sólidos urbanos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

BURNS, K.; CODI, S.; DUKE, N. C. **Gladstone, Austrália Fields Studies: Weathering and degradation of hydrocarbon in oiled mangrove and salt marsh sediments with and without the application of an experimental bioremediation protocol**. **Marine Pollution Bulletin**, [S.,I], 2000, v. 41, n. 712, p. 395-402. 2000.

BUSHNELL and HASS, 1941, J. Bact., 41;653.

CALVO, C.; TOLEDO, F.L.; GONZÁLEZ-LÓPES, J. Surfactant activity of a naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. **Journal of Biotechnology**, v. 109, ed. 3, p. 255-262, 2004.

CAMARGO, A. M. F. **Estudo ecológico de três espécies de macrófitas aquáticas tropicais: macroinvertebrados associados e decomposição de biomassa**. 1984. 171 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

CAMPOS, J. C., BORGES, R. M. H., OLIVEIRA FILHO, A. M., NÓBREGA, R. & SANT'ANNA Jr., G. L. **Oilfield wastewater treatment by combined microfiltration and biological processes.** Water Res., 36:95-104. doi:10.1016/S0043-1354(01)00203-2. 2002

CARDOSO, A. M. **Sistema de informações para planejamento e resposta a incidentes de poluição marítima por derramamento de petróleo e derivados.** Dissertação (Mestrado em Ciências), COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

CARVALHO, D. F.; MARCHI, D. D.; DURRANT, L. R. **XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Santos – SP, 2005.

CASTRO, R. A. **Otimização do sistema de Landfarming da RPBC. Refinaria Presidente Bernardes.** Cubatão: Instituto para o Desenvolvimento do Meio Ambiente, Paraná, 2005.

CERNIGLIA, C. E. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.19, n. 5-6, p.324-333, 1997.

CERNIGLIA, C. E.; HEITKAMP, M.A. Microbial degradation of PAH in the aquatic environment In: CRANASI, U. **Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic environment.** Boca Raton, Florida, CRC Press, 1989.

CETESB: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Relação de áreas contaminadas, 2006. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>. Acesso em 10 de novembro. 2013.

CETESB: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Decisão de Diretoria nº 103/2007/C/E, de 22 de junho de 2007a. 40p. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>. Acesso em 5 de dezembro. 2013.

CETESB: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Avaliação do Uso de Produtos Biotecnológicos para Tratamento de Efluentes Líquidos, Resíduos Sólidos e Remediação de Solos e Águas – L1.022, 2007b. 21p. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/>. Acesso em 20 mar. 2014.

CHAPELLE, F.H. **Ground - water Microbiology and geochemistry.** 2 Ed. 2001.

CHAROENCHANG, N.; PINPHANICHAKARN, P.; PATTARAGULWANIT, K.; THANIYAVARN, S.; JUNTONGJIN, K. Utilization of agricultural materials to enhance microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. **Journal Science Research Chulalongkorn University**, v. 28,p. 1-13, 2003.

CHEON, J. Y.; LEE, J. Y.; LEE, K. K. Characterization of the hydrogeologic environment at a petroleum hydrocarbon contaminated site in Korea. **Environmental Geology**, v. 45, p. 869-883, 2004.

CLEMENTE, Andrea R.; ANAZAWA, Tania A.; DURRANT, Lucia R. **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by soil fungi. Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.4, p. 255-261, 2001.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, ANDREIZA L.; LIMA, M. DE.; BERTOLIN, T. E.; VIEIRA, J. A. C. Isolation and screening of fungi to bioremediation from triazine herbicide contaminated soil. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 32, n. 3, p. 809-813. 2007.

COLLINS C. H.; BRAGA G. L.; BONATO P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp, 2006.

CORMACK, W. P. M.; FRAILE, E. R. Characterization of a hydrocarbon degrading psychrotrophic Antarctic bacterium. **Antarctic Science**, v.9, n.2, p.150-155, 1997.

CORSEUIL, H. X.; KULKAMP, M. S. **Simultaneous Spills of diesel and ethanol – a controlled release experiment**. IN: 7TH INTERNATIONAL IN SITU AND ON-SITE BIOREMEDIATION SYMPOSIUM, Orlando, FL. Columbus-Richland: Battele Press, p.1-5, 2003.

COSTA, A. F. **Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHS): 1-Hidroxipireno Urinário**. 2001. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública), Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana da Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001.

COSTA, A. F. de S.; SILVA, J. R. R. da; SANTOS, R. C. M. M. dos; FARIAS, C. B. B.; SARRUBO, L. A.; JORDÃO, R.C. C.; SALGUEIRO, A. A. Obtenção de consórcio de microrganismos a partir de amostra de petróleo. *Revista Ciências e Tecnologia*, v. 1, n. 1, 2007.

COSTA, A. H. R.; NUNES, C. C.; CORSEUIL, H. X. **Biorremediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina e etanol com o uso de nitrato**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

COUTINHO, H. L. C.; ABOIM, M.C.R.; BARBOSA, J.C.; ROSADO, A. S. Diversidade microbiana em amostras ambientais. In: GARAY, I.; DIAS, B. (Eds.). **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais**. [S. l.]: Vozes, 2001. p. 215-232.

CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F.; ROSADO, A. S.. **Biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente**. Rio de Janeiro, RJ: CETEM/MCT, 2008.

CUSTANCE, S.R.; MCCAWE, P.A.; KOPF, A.C. & SULLIVAN, M.J. **Environmental fate of the chemical mixtures: crude oil, jp-5, mineral spirits, and diesel fuel**. *J. Soil Contam.*, 1:379-386, 1992.

D'ESPOSITO, M. **Cognitive aging: new answers to old questions**. *Current Biology*, 9(24): R939-R941. 1999.

DAS, K. & MUKHERJEE, A.K. (2007): Crude petroleum-oil biodegradation eYciency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-

oil contaminated soil from North-East India. **Bioresource Technology**. V. 98, pp.1339–1345.

DELILLE, D. et al. Influence of daylight on potential biodegradation of diesel an crude oil antartic seawater. **Marine Environmental Research**, [S.l], v. 45, n. 3, p. 249-258. 1998.

DESAI, J. D.; DESAI, A. J. **Biosurfactants: production, properties, applications**. Ed. NainKosaric, University of Western Ontario: London, Canada, 1993.

DEUEL, L. E.; HOLLIDAY, G. H. **Soil remediation for the petroleum extraction industry**. 2 ed., p. 242Tulsa, U.S.A.: PennWell, 1997.

DHIR, B.; SHARMILA, P.; SARADHI, P. P. Potential of aquatic macrophytes for removing contaminants from the environment. **Critical Reviews in Envir. Sci. and Tech.**, v. 39, p. 754-781, 2009.

DIAS, G. F. **Educação ambiental: princípios e práticas**. São Paulo, Gaia, 1992.

DIAS, G. F. **Utilização de consórcio microbiano para biorremediação do meio ambiente contaminado com derivados de petróleo**. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. p. 106 SÃO PAULO, 2007.

DÍAZ-RAMIREZ, I.J.; ESCALANTE-ESPINOSA, E.; FAVELA-TORRES, E.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; RAMÍREZ-SAAD, H. Design of Bacterial Defined Mixed Cultures for Biodegradation of Specific Oil Frctions, Using Population Dynamics Analysis by DGGE. Int. **Biodt. And Biodeg.** (2007).

DOLABELA, M. F. **Triagem *in vitro* para atividade antitumoral e ati *Trypanossoma cruzi* de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas**. Dissertação – (Mestrado no Departamento de Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 1997.

ELIAS, E. P.; BATISTA, I. H.; PEREIRA, J. O.; SOUZA, A. D.L.; VEIGA, V. F. Fungos com potencial de biorremediação isolados da macrófita aquática *Eichornia crassipes*. **32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. Fortaleza, CE. 2009.

EPA: ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, UNITED STATES. **How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers**. Chapter XII – Enhanced Aerobic Bioremediation, EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007 and EPA 510-R-04-002, 2004. 73p.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos da Limnologia**. Rio de janeiro: Ed. Interciência/FINEP, 1998.

FAHEY, J. W. Endophytic Bacteria for the Delivery of Agrochemicals to Plants. In: Cutler, H. O. (Ed.) **Biologically Active Natural Products**. Potential Use in

Agriculture. American Chemical Society Symposium Ser, Washington. p.120-128, 1988.

FATORELLI, L. **Proposta de avaliação de risco ecológico para contaminações de petróleo e derivados – estudo de caso**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

FERNANDES, F. M.; ALCÂNTARA, G. Z. **Biorremediação de solos Estado da arte**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

FERNANDES, F; SILVA, S. M. C. P. **Manual prático para a compostagem de bio sólidos**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 1999.

GALLEGO, J. L. R. Biodegradation of oil tank bottom sludge using microbial consortion. **Biodegradation**. v. 18, p. 269-281, 2007.

GALLEGO, J. L. R.; LOREDO, J.; LAMAS, J.F.; VAZQUEZ, F.; SANCHEZ, J.; 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation** 12: 325-335.

GARDES, M. & BRUNS T.D. **ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – Application to the identification of mycorrhizae and rust**. Mol. Ecol., 2:113- 118, 1993.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação – Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n.34, p.36-43, janeiro-junho, 2005.

GHAZALI, F.M.; ZALIHA, A.R.; SALLEH, A.B.; BASRI, M. **Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium**. International Biodeterioration; Biodegradation, 54:61-67, 2004.

GOGOU, A.; BOULOUBASSI, I.; STEPHANOU, E.G. Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: 1. Aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cretan Sea surficial sediments – **Marine Chemistry** – 68, 265 – 282, 2000.

GOUVÊIA, F. **Tecnologia nacional para extrair petróleo e gás do pré-sal**. Conhecimento & Inovação v.6 n.1 Campinas, 2010.

GRISCHENKO, V. G.; TOWNSEND, R. T.; McDONALD, T. J.; AUTENRIETH, R. L.; BONNER, J. S. e BORONIN, A. M. **Degradação of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions**. Process Biochemistry. v. 35(9), pp. 889-896, 2000.

GUIMARÃES, S. T. L. **Nas trilhas da qualidade: algumas idéias, visões e conceitos sobre qualidade ambiental e de vida**. p. 20(40). São Paulo: Geosul, 2005.

HAAS, M. J.; SCOTT, K. M.; ALLEMAN, T. L.; MCCORMICK, R. L. Engine Performance of Biodiesel Fuel Prepared from Soybean Soapstock: **A High Quality**

Renewable Fuel Produced from a Waste Feedstock, Energy Fuels, 2001, 15, 1207.

HALLMANN, J.; SIKORA, R.A. Toxicity of Fungal Endophyte Secondary Metabolites to Plant Parasitic Nematodes and Soil-Borne Plant Pathogenic Fungi. **European Journal of Plant Pathology**. p. 102: 155-162, 1996.

HAMME, J.D.V.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. p. 67(4):503-549, 2003.

HANSON, K. G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. **A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms**. Biotechnology Techniques, v. 7, p. 745-748, 1993.

HARWING, J.; SCOTT, P. M. Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) Larvae as a screening system for fungal toxins. **Applied Microbiology**. v.21, n. 6, p. 1011-06, 1971.

HENRIQUES, C. 2013. **Balsa tomba e causa vazamento de óleo no Rio Negro, no Amazonas**, (<http://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/2013/03/balsa-tomba-e-causa-vazamento-de-oleo-no-rio-negro-no-amazonas.html>). Acesso em 15/06/2014.

IRGANG, B. E.; GASTAL JR., C. V. S. **Macrófitas Aquáticas da Planície Costeira do RS**; Porto Alegre; Ed. dos Autores; 1996.

JACQUES, R. J. S. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge landfarming. **International Biodeterioration and Biodegradation**, London, v. 56, n. 3, p. 150-156, 2005.

JACQUES, R. J. S. BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I. & CAMARGO; F.A.O. **Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**. São Gabriel: UNIPAMPA, 2006.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, M. F.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**. v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

JACQUES, R.J.S; BENTO, F.M.; SELBACH, P. A.; GIANELLO, C.; TEDESCO, M. J.; CAMARGO, F. A. O. **Processo Biotecnológico e oportunidades na biorremediação de ambientes contaminados**. Boletim informativo da SBCS. [s/n]. Jan-abr. [s.l.] 2009.

JUNK, W. J. **The Central Amazon floodplain**: actual use and options for a sustainable management. Leiden: Backuys Publishers, 2000. 584 p.

KAO, C. M., WANG, C. C. **Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site**. Wat. Res. v. 34, n.13, p. 3413-3423, 2000.

KARAMALIDIS, A. K.; EVANGELOU, A. C; KARABIKA, E.; KOUKKOU, A. I.; DRAINAS, C.; VOUDRIAS, E. A.. Laboratory scale bioremediation of petroleum-

contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 6545-6552, 2010.

KOHN, L.M. **Developing new characters for fungal systematics: an experimental approach for determining the rank of resolution**. *Mycologia*, 84:139-153, 1992.

LATIMER, J.S.; ZHENG, J. **The sources, transport, and fate of PAHs in the marine environment**. In: **PAHs: An ecotoxicological perspective**. John Wiley & Sons, Ltd. 2003.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**. v. 54, p. 305-315, 1990.

LEMONS, J. L. **Fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs)**. Rio de Janeiro: ETEM/MCT, 2008.

LI, X. J.; LIN, X.; LI, P. J.; LIU, W.; WANG, L.; CHUKWUKA, K. S. Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. **Journal Hazard Mater**. v.172, p.601–605, 2009.

LOPES, A.; PIEDADE, M.T.F.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Efeito da dosagem do petróleo de Urucu (Coari-AM) sobre a sobrevivência de *Echinochloa polystachya* (Projeto Piloto). **Anais do I Congresso Internacional do PIATAM**. Universidade Federal do Amazonas / Centro de Pesquisas da Petrobrás, Manaus, Amazonas, 113-113, 2005.

LOUREIRO, C. F. B. **Pensamento complexo, dialética e educação ambiental**. São Paulo: Cortez, 2006.

LOVAGLIO, R. B. **Biodegradação de querosene por leveduras da região portuária de Suape-PE**. In: First Braziliam Symposium on Petroleum Biotechnology, Natal – RN, Brazil, 2005.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia**. 10 ed. [s.l.]: Pearson/Prentice Hall. p.624, 2004.

MAGNANI, G. S. **Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar**. 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MAI, B.X.; SHENG, G.Y.; KANG, Y.H.; LIN, Z.; ZHANG, G.; MIN, Y.S.; ZENG, E.Y. **Chlorinated and PAHS in riverine and estuarine sediments**. p. 117 (3) 457 – 474. Pearl River Delta, China: Environmental Pollution, 2002.

MAO, J.; LUO, Y.; TENG, Y.; LI, Z. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial community changes. **International Biodeterioration & Biodegradation**. N. 70, p.141-147. 2012.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2006.

MARIANO, A. P.; DE ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Monitoramento de Indicadores Geoquímicos e Avaliação de Biodegradação em Área Contaminada com Óleo Diesel. **Engenharia e Sanitarismo Ambiental** 12(3): 296-304, [S.e.], [S.I.], 2007.

MARIANO, A. P.; BONOTTO, D. M.; DE ANGELIS, D. F.; PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIERO, J. 2008. Biodegradability of Commercial and Weathered Diesel Oils. **Brazilian Journal of Microbiology** 39:133-142.

MARÍN, J.A.; MORENO, J.L.; HERNÁNDEZ, T. & GARCÍA, C. **Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions**. Biodegradation. 17:251-261, 2006.

MATSUURA, T. 1992. **Manual teórico e prático de Bacteriologia** (sistemática). Manaus.

McELROY, A.E.; FARRINGTON, J.W.; TEAL, J.M. **Bioavailability of PAH in the aquatic environment**, In: VARANASI, U., **Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic environment**. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1989.

MENEGHETTI, L. R. R. **Biorremediação na descontaminação de solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. Passo Fundo: UPF, 2007.

MEYER, N. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45, [s.n.], p.31, 1982.

MILLANI, E. J.; BRANDÃO, A. S. L.; ZALÁN, GAMBOA, P. **Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas**. Revista Brasileira Geofísica. v.18 n.3. São Paulo, 2000.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2 ed. p.729 [S.I.]: UFLA, 2006.

MURRAY, F. R.; LATCH, G. C. M.; SCOTT, D. B. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. **Molecular General Genetics**. p. 233: 1-9, [s.e], [s.I], 1992.

MUTNURI, S. 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.

NAHAS, M.V. **Atividade física, saúde e qualidade de vida**. Londrina: Midiograf, 2003.

NEFF, J. M. **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment – Sources, Fates and Biological Effects**. London: Applied Science Publishers LTD, 1979. 261 p.

NEOH, C.H.; LAM, C.Y.; LIM, C.K.; YAHYA, A.; IBRAHIM, Z. Decolorization of palm oil mill effluent using growing cultures of *Curvularia clavata*. **Environmental Science and Pollution Research**, v, 21, n. 6, p. 4397-4408, 2014.

NEVES, R. O. **Caracterização da microbiota bacteriana da água do Rio Negro em diferentes períodos sazonais**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Amazonas, 2013.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quim. Nova**, 25, 772-776, 2002.

NUNES, G. **Contaminação do solo e água subterrânea por hidrocarbonetos de petróleo e o caso da gasolina brasileira**. Santa Maria: UFSM , 2008.

OLIVEIRA, F. J. S. O. **Biorremediação de solo arenoso contaminado por óleo cru**. Dissertação (Mestrado). p. 101. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P. Molecular approaches for the screening of novel enzymes. In: REYMOND, Jean-Louis (Ed.). **Enzyme Assays: Highthroughput screening, genetic selection and fingerpriniting**. Berne, Switzerland: University of Berne, Department of Chemistry & Biochemistry, 2006. p. 221-238.

OLLIVIER, B.; MAGOT, M. **Petroleum Microbiology**. Washington, DC: ASM press, 2005.

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; PDLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**, n. 92, p. 287-294, 2002.

PASSARINI, M. R. Z.; SETTE, L. D.; RODRIGUES, M. V. N. Improved Extraction Method to Evaluate the Degradation of Selected PAHs by Marine Fungi Grown in Fermentative Medium. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 22, No. 3, 564-570, 2011.

PEIXOTO, J. C. C.; LEOMIL, L.; SOUZA, J. V.; PEIXOTO, F. B. S.; ASTOLFI-FILHO, S. 2011. **Comparison of bacterial communities in the Solimões and Negro River tributaries of the Amazon River based on small subunit rRNA gene sequences**. *Genetics and Molecular Research*. 10 (4): 3783-3793.

PEIXOTO, R. M.; VIEIRA, J. D. G. **Determination of the degrading potential of bacteria isolated from an environment impacted by petroleum and derivatives using 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP)**. In: First Braziliam Symposium on Petroleum Biotechnology, Natal – RN, Brasil, 2005.

PEREIRA J. O; AZEVEDO J. L.; PETRINI O. **Endophytic Fungi of *Stylosanthes*: A First Report**. *Mycologia*. v. 85, p. 362-364, 1993.

- PEREIRA Jr., N. **Biodegradação de Hidrocarbonetos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ; FAPERJ; CNPq; PETROBRAS, 2009.
- PERIN, M.. **Estudo da Fotodegradação de Pireno e Fenantreno**. 2010. 46p. Monografia apresentada como pré-requisito para obtenção do grau Bacharel em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- PETRINI, L. E.; MULLER, E. Haupt-Und Nebendfruchtformen europaischer Hypoxylon-Arten (Xylariaceae, Sphaeriales) and verwandter Pilze. **Mycology Helvetica**, 1: 501-627. 1986.
- PETROBRAS. **Características do petróleo de Urucu**. CNPES: SEPESQ: DIQUIM: SETAV. 1997.
- POMPÊO, M. L. M.; MOSCHINI-CARLOS, V. **Macrófitas Aquáticas e Perifíton: Aspectos Ecológicos e Metodológicos**. São Carlos: Rima Editora e FAPESP, p.134, 2003.
- POTT, V. J.; POTT, A. 2000. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Brasília: EMBRAPA, 404p.
- PROVIDENTI, M. A.; LEE, H. E.; TREVORS, J. T.; Selected Factors Limiting the Microbial Degradation of Recalcitrant Compounds. **Journal of industrial Microbiology**, 12: 379-395, 1993.
- READMAN, J.W.; FILLMANN, G.; TOLOSA, I.; BARTOCCI, J.; VILLENEUVE, J.P.; CATINNI, C.; LEE, L.D. **Petroleum and PAH contamination of the Black Sea**. Marine Pollution Bulletin. 44 (1) 48 – 62, 2002.
- RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 44, n. 2-3, p. 93-100, 1999.
- RISER-ROBERTS, E. **Bioremediation of petroleum contaminated sites**. Boca Ratón, FL. CRC Press, 1992.
- RODRIGUES, K.F.; DIAS-FILHO, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. **Pesq. Agropec. Bras**, 31(12): 905-909, 1996.
- RODRIGUES, R. **Indicadores geoquímicos moleculares (biomarcadores) aplicados à exploração de petróleo**. In: Geoquímica do petróleo, CENPES-Petróbras. p. 157-190. 1984.
- ROGERS, S. O.; YAN, Z. H.; SHINOHARA, M.; LOBUGLIO, K. F. WANG, C. J. **Messenger RNA intron in the nuclear 18S ribosomal RNA gene of deuteromycetes**. Current Genetics, 23(4):338-342, 1993.
- RÖLING, W. F. M.; VERSEVEL, H. W. **Natural attenuation: What does the subsurface have in store?** Biodegradation, v.13, p. 53–64, 2002.

ROLING, W. F.M.; HEAD, Y. M.; LATER, S. R. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. **Research in Microbiology**, p. 321-328, 2003.

ROSENBERG, E. & RON, E. Z. Bioremediation of petroleum contamination. CRAWFORD, R.L. & CRAWFORD, D.L. **Bioremediation: principles and applications**. Great Britain: Cambridge University Press, 1996.

ROY, S. **Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve**. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 18, p. 575-581, 2002.

SAKAYROJ, J.; PREEDANON, S.; PHONGPAICHIT, S.; BUATONG, J.; CHAOWALIT, P.; RUKACHAISIRIKUL, V. Diversity of endophytic and marine derived fungi associated with marine plants and animals. In: JONES, E.B.G.; PANG, K.L. **Marine fungi and fungal-like organisms**. Germany: Walter de Gruyter, 2012, p. 291-228.

SAMBROOK, J., RUSSEL. D. W. Molecular cloning: a Laboratory manual, 3. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York : CSHL, 2001.

SANTOS, J. E. **Universidade e Ambientalismo – Encontros não são despedidas**. In: Contribuição da Educação Ambiental à esperança de Pandora. São Paulo: RIMA, 2003

SANTOS, R. M.; RIZZO, A. C. L; SOBRAL, L. G.S. **Remediação de solo contaminado por petróleo em biopilhas escala piloto**. Campinas: Centro de tecnologia mineral CETEM, 2007.

SCHIRMER, K., DIXON, D.G., GREENBERG, B.M., BOLS, N.C. **Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill**. Toxicology 127, 129–141. 1998.

SCHOCH, C. L.; SHOEMAKER, R. A.; SEIFERT, K.A.; HAMBLETON, S.; SPATAFORA, J. W.; CROUS, P. W. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, v. 98, n.6, p. 1041-1052, 2006.

SCHRECKENBERGER, P.C.; DANESHVAR, M.I.; HOLLIS, D.G. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxela* and other nonfermentative gram-negative rods. In: Murray, P.R. **Manual of Clinical Microbiology**, 9 ed. Washington: ASM Press, 2007, cap.50, p.770-802.

SCULTHORPE, C. D. **The biology of aquatic vascular plants**. New York: St. 1967.

SEMPLE, K.T.; REID, B.J.; FERMOR, T.R. **Impact of composting strategies on treatment fo soils contaminated with organic pollutants**. Environmental Pollution, 112:269-283, 2001.

SHARMA, S. Bioremediation: Features, strategies and applications. **Asian Journal**

of **Pharmacy and Life Science**, v. 2, n.2, p. 202-213, 2012.

SHI, J.H.; SUZUKI, Y.; LEE, B.D.; NAKAI, S.; HOSOMI, M. Isolation and characterization of the ethynylestradiolbiodegrading microorganism *Fusarium proliferatum* strain HNS-1. **Water Science and Technology**, v. 45, n. 12, p. 175-179, 2002.

SHUHONG, Y.; LEICHANG, H.; LI, Y.O.; MING, D.; YINGYING, H. & DEWEEN, D. **Investigation on bioremediation of oil-polluted wetland at Liaodong Bay in northeast China**. *Appl. Microbiol. Biot.*, 71:543-548, 2006

SILVA, C. M. M. S.; VIEIRA, R.F.; FAY, E.F.; OLIVEIRA, C. DE S. Efeito do paclobutrazol sobre a microbiota do solo. In, C.M.M.S.; FAY, E.F. **Impacto ambiental do regulados de crescimento paclobutrazol**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003.

SILVA, M. A. B. **Sistema de Classificação Fuzzy para Áreas Contaminadas**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro – Departamento de Engenharia Civil – Rio de Janeiro. 2005.

SILVA, M. G. **Biorremediação de solo contaminado por petróleo por diferentes técnicas de bioestimulação**. Dissertação apresentada à Fundação Universidade do Rio Grande, 2007.

SILVA, J. S.; SANTOS, E. DA C. DOS, CRISTIANO, R. DE M. A, FARIA, A. F. DE. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. **Bioresource Technology**. v. 100 p.4669–4675, 2009.

SILVEIRA, A. C. da; SPAREMBERGER, R. F. L. **A relação homem e meio ambiente e a reparação do dano ambiental: reflexões sobre a crise ambiental e a teoria do risco na sociedade**. Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul UCS, 2004.

SMITH, R.S.; IGLEWSKI, B.H. *P.aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.6, n.1, p.56-60, 2003.

SOLANO-SERENA F, MARCHAL R, CASARE´GOLA S, VASNIER C, LEBEAULT JM, VANDECASTEELE JP 2000. A *Mycobacterium* Strain with Extended Capacities for Degradation of Gasoline Hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology** 66: 2392–2399.

SOUZA FILHO, A. M. **Planos Nacionais de Contingência para atendimento a derramamento de óleo: análise de países representativos das Américas para implantação no caso do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciências), COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

SOUZA, C. S. **Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo**. In: 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE P&D EM PETRÓLEO E GÁS. Salvador-BA-Brasil, 2005.

SOUZA, E. S. e TRIGÜIS, J. A. **Degradação do petróleo em derrames no mar – Intemperismo X Biorremediação**. 3º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás, Salvador, 2005.

SPILBORGHES, M. C. F. **Biorremediação de aquífero contaminado por hidrocarbonetos**. 147f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências / USP, São Paulo, 1997.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. 1998. **Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban)**. *Ciência de Tecnologia do Alimento*. n. 18(4): 382-385, 1998.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreane*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**, 260: 214-216, 1993.

STOUT, S.A.; UHLER, R.M.; MCCARTHY, K.J. **A strategy and methodology for defensibly correlating spilled oil to source candidates**. *Environmental Forensics* n. 2, p. 87 – 98, 2001.

STROBEL, G. A.; MILLER, R. V.; MARTINEZ-MILLER, C.; CONDRON, M. M.; TELOW, D. B.; HESS, W. M. Cryptocandin, a potent antimycotic from the Endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Microbiology**. v. 17: 417-423, 1999.

TEIXEIRA, A. S.; BENTO, F. M. **Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial**. Dissertação (Mestrado em faculdade de Agronomia) - Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2007.

THOMAS, J. E. **Fundamentos da Engenharia do Petróleo**. 2 ed. Interciência. p. 272, 2004.

THOMAZ, S. M., BINI, L. M., SOUZA, M. C., KITA, K. K. & CAMARGO, A. F. M. **Aquatic macrophytes of Itaipu reservoir, Brazil**: Survey of species and ecological considerations. *Braz. Arch. Biol. Tech.*, 42: 15-22, 1999.

THOMAZ, S.M.; BINI, L.M. **Ecologia e Manejo de Macrófitas Aquáticas**. Editora da Universidade Estadual de Maringá, p. 260, 2003.

TOCCHETTO, M. R. L. **Gerenciamento de resíduos sólidos**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2008.

TOLEDO, F.L.; CALVO, C.; RODELAS, B.; GONZÁLEZ-LÓPES, J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 244-252, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. 2008. **Microbiologia**. 6ª ed. Porto Alegre: Ed. Artmed. 827p.

UNEP (United Nations Environment Programme Chemicals). **Regionally Based Assessment of Persistent Toxic Substances. Antarctica Regional Report.** p. 86, 2002)

URURAHY, A. F. P.; PEREIRA Jr, N. & MARTINS, M. D. M. **Desempenho de um Biorreator do Tipo CSTR no Processo de Degradação de Borra Oleosa.** Boletim Técnico PETROBRÁS, Rio de Janeiro, 41 (3/4): 125-132, jul/dez, 1998.

VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. Effects of crude oil on respiratory aspects of some fish species of the Amazon. In: VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. (Ed.). **Biology of tropical fishes.** Manaus: INPA, 1999. p. 277-291.

VALLE, M. L. M. **Produtos do setor de combustíveis e de lubrificantes.** Rio de Janeiro: Publit, 2007.

VAN AKEN B, YOON JM, SCHNOOR JL. Biodegradation of Nitro-Substituted Explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a Phytosymbiotic *Methylobacterium* sp. Associated with Poplar Tissues (*Populus deltoides* X *nigra* DN34). **Applied and Environmental Microbiology** 70 (1): 508-517. 2004.

VASCONCELOS, U.; MEDEIROS, L.V.; ANDRADE, M.A.G. de; CALAZANS, G.M.T . Evidência do antagonismo entre *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias indicadoras de contaminação fecal em água, **Rev. Hig. Alim.** v.20, n.140, p.127-130, 2006.

VAZ, MARQUION JOSÉ. **Biodegradação Ex- Situ e Avaliação da atividade Biológica de Solos Contaminados por Hidrocarbonetos.** Dissertação do Mestrado em Tecnologia Ambiental, UNISC – Universidade de Santa Cruz do Sul – RS. Santa Cruz do Sul, 2009.

VERECKEN, H.; BAETENS, J.; VIAENE, P.; MOSTAERT, F. & MEIRE, P. Ecological management of aquatic plants: effects in lowland streams. **Hydrobiologia** 570: 205-210, 2006.

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

WADE, T. L.; CANTILLO, A. Y. **Use of standards and reference materials in the measuring of chlorinated hydrocarbon residues.** Chemistry Wordbook. National Oceanic and Atmospheric Administration Technical Memorandum NOS ORCA 77. National Status and Trends Program for Marine Quality. Silver Spring, Maryland, 1994.

WALKER, D. Oil in the sea: changes in the nature of sources and inputs since 1985. In: **International Oil Spill Conference British Columbia.** Canadá. Abril. 2003.

WANG, Z.; FINGAS, M. **Journal of Chromatography A.** 774, 51-78, 1997.

WANG, X.; YU. W.; BARTHA, R. **Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbons residues in soil**. Environmental & Science Technology, V. 24, p. 1086-1089, 1990.

WETZEL, R. G. **Limnologia**. Barcelona: Ediciones Omega S.A., 1981. 679p.

WONGSA P, TANAKA M, UENO A, HASANUZZAMAN M, YUMOTO I, OKUYAMA H. Isolation and Characterization of Novel Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* Possessing High Efficiency to Degrade Gasoline, Kerosene, Diesel Oil and Lubricating Oil. **Current Microbiology**, v. 49, p. 415–422, 2004.

ZANG, S.; LIAN, B. Synergistic degradation of 2-naphthol by *Fusarium proliferatum* na *Bacillus subtilis* in wastewater. **Jornal of Hazardous Materials**, v. 166, p. 33-38, 2009.

ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Archive of Bacteriological Reviews**, v. 10, p. 1-49, 1946.