



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS
(HPA) POR RIZOBACTÉRIAS EM SOLO DE VÁRZEA DA AMAZÔNIA
CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL**

LÍVIA ANTÔNIA DE MELLO SARAIVA

MANAUS

2018



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MÉTODOS ANALÍTICOS E ESTUDOS AMBIENTAIS

LÍVIA ANTÔNIA DE MELLO SARAIVA

BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

(HPA) POR RIZOBACTÉRIAS EM SOLO DE VÁRZEA DA AMAZÔNIA

CONTAMINADO COM ÓLEO DIESEL

ORIENTADORA: PROFA. DRA. TEREZA CRISTINA SOUZA DE OLIVEIRA

COLABORADORA: MSC. LUANA MONTEIRO DA SILVA

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Química, área de concentração Métodos Analíticos e Estudos Ambientais.

MANAUS

2018

Ficha Catalográfica

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

S243b Saraiva, Livia Antônia de Mello
Biodegradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)
por rizobactéria em solo de várzea da Amazônia contaminado com
óleo diesel. / Livia Antônia de Mello Saraiva. 2018
88 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Tereza Cristina Souza de Oliveira
Dissertação (Mestrado em Química - Analítica) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. rizobactérias. 2. biorremediação. 3. consórcio microbiano. 4.
várzea. I. Oliveira, Tereza Cristina Souza de II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

"Biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) por Rizobactérias em solo de Várzea da Amazônia contaminado com óleo diesel"

Livia Antônia de Mello Saraiva

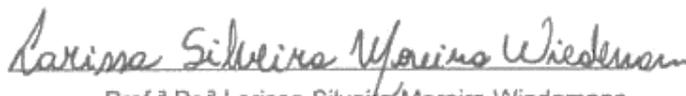
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 21 de maio de 2018.

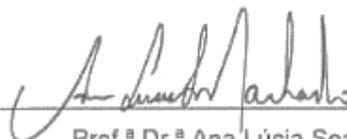
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Tereza Cristina Souza de Oliveira
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Prof.^a Dr.^a Larissa Silveira Moreira Wiedemann
Membro UFAM



Prof.^a Dr.^a Ana Lúcia Soares Machado
Membro Externo/IFAM

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 21 de maio de 2018.

A DEUS,

Minha mãe, Maria José, e minha irmã, Iasmina.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por ter me agraciado com a oportunidade de realizar mais este sonho, por não ter me abandonado em nenhum momento e por ter escolhido com tanto amor as pessoas incríveis que tive a oportunidade de conhecer e fizeram parte dessa caminhada.

À minha mãe, Maria José de Mello, por ser minha maior inspiração, por todo o esforço que fez pela minha criação, pelo incentivo às minhas conquistas acadêmicas, profissionais e pessoais, e, principalmente por todo amor e dedicação à nossa família; ao meu pai, Antônio Monteiro Saraiva, por acreditar em mim e sempre me incentivar a ser alguém melhor; e à minha irmã, Iasmina de Mello Saraiva, por todo apoio e palavras de motivação. Vocês são tudo para mim!

Ao Renato, por acreditar em mim, e por ter me apoiado todo esse tempo! Por me incentivar a alcançar meus sonhos e objetivos, por toda paciência, por todo amor e compreensão. Você é e sempre será muito importante na minha vida!

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina, pela oportunidade de realização desta pesquisa, pela amizade e carinho, pela orientação, por todo apoio, paciência, dedicação, compreensão e incentivo para a realização desta conquista.

À MsC. Luana Monteiro da Silva, por ter sido uma grande amiga, por ter me apresentado à Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina, por ter me dado a oportunidade de conhecer esta linha de pesquisa, pelos ensinamentos e por todo apoio, compreensão e incentivo para a realização deste sonho.

Ao Prof. Dr. Jamal, e ao Projeto Rede-CT PETRO – a partir do qual foi possível a aquisição de equipamentos para a realização dos projetos orientados pela Prof^a. Dr^a. Tereza, pelo apoio e pelo incentivo para a realização desta pesquisa.

Aos meus professores, que fizeram parte dessa trajetória e contribuíram para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

À banca, composta pelas importantes contribuições dadas a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Luís Antônio, coordenador do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA, pelo apoio à pesquisa, pela estrutura concedida para realização da secagem do solo e pela disponibilização das bactérias utilizadas nesta pesquisa.

À UFAM, pela estrutura proporcionada e incentivo à realização de pesquisas e pela formação profissional.

Ao IFAM, pelo apoio à pesquisa e por apoiar meu crescimento acadêmico.

À PETROBRAS, por ceder o diesel utilizado nesta pesquisa.

À Central Analítica da UFAM, pelo suporte e apoio à pesquisa.

Aos alunos de iniciação científica do LAQUA, em especial à Heloísa e à Evelyn por toda paciência e apoio nas análises. Vocês foram incríveis! Obrigada de coração!

Aos meus amigos do mestrado, em especial ao André, Milton e Wagner, pela amizade, por toda parceria nas disciplinas, pela paciência, pelo apoio, incentivo e palavras de motivação. Vocês foram muito importantes!

Ao Erickson, por todos os seus ensinamentos, por toda paciência, apoio e auxílio nas análises.

Ao LAQUA, ao LAMESP e à técnica Carmem, pela dedicação e suporte no laboratório, por toda paciência e apoio. Você foi muito importante!

Ao LABCG e ao técnico Felipe, pela dedicação e suporte no laboratório, pela paciência e apoio nas análises com o CG-EM.

Aos meus amigos, em especial Amandda, Ana Nirla e Vanio, por todo apoio que me deram, por acreditarem em mim e por todas as palavras de motivação.

E, por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse sonho, pois conforme eu já disse, todos foram enviados por Deus! E não chegamos a lugar nenhum sozinhos! Obrigada de coração! Se cheguei até aqui, foi porque vocês estiveram comigo!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Volume em m ³ dos tipos de produtos envolvidos nos acidentes ambientais pertencentes a Classe de Risco 3 – Líquidos inflamáveis. Fonte: (IBAMA, 2015).....	25
Figura 2. HPA prioritários, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA 1987).....	29
Figura 3. Proposta do caminho microbiano de degradação de HPA. Fonte: adaptado de HARITASH e KAUSHIK (2009).	34
Figura 4. Concentração individual de HPA durante o período experimental de 129 dias para os tratamentos de LF, BS e BSBA. Adaptado de CHAGAS-SPINELLI et al., 2012.	36
Figura 5. Local de Coleta do solo (3° 18' 32.130" S; 60° 36' 27.529" W).....	45
Figura 6. Esquema descrevendo o experimento de biodegradação utilizando como fonte de carbono o óleo diesel.....	47
Figura 7. Ultrassom Limp Sonic (a) e Evaporador Rotativo de Fluxo Contínuo da marca Tecnal (modelo TE-211) utilizados para Extração das Amostras do Experimento de Biodegradação. Fonte: Arquivo Pessoal.....	48
Figura 8. Realização do Fracionamento das amostras (a); coluna preparada para recebimento da amostra (b) e coluna contendo amostra em processo de fracionamento (c). Fonte: Arquivo Pessoal.....	49
Figura 9. Cromatógrafo Gasoso Acoplado ao Espectrometro de Massas (CG-EM) – Thermo Scientific (Trace CG Ultra e o ISQ Single Quadrupole MS). Central Analítica – Laboratório de Cromatografia Gasosa (Lab-CG) – UFAM.	51
Figura 10. Curvas de Calibração do Acenafteno. (a) Faixa Baixa (50; 100; 250; 500; 750 e 1000 ng mL ⁻¹). (b) Faixa Alta (750; 1000; 5000; 7500; 10000 e 15000 ng mL ⁻¹).....	53

Figura 11. Cromatograma do fenantreno, antraceno, e fenantreno dos padrões deuterados (a), e seus respectivos fragmentogramas com os íons m/z 178 – referente ao fenantreno e antraceno (b); e m/z 188 – referente ao fenantreno deuterados (c).....	57
Figura 12. Cromatograma demonstrando a predominância do fenantreno sob processo de biodegradação em amostra de solo contendo diesel e o consórcio de 5 Rizobactérias.....	58
Figura 13. Concentração do Σ HPA nos tempos inicial (0), 2 e 21 dias para o consórcio das 5 espécies de bactéria, a espécie INPA R574, a INPA R598 e o Controle A.	59
Figura 14. Percentual de degradação individual dos HPA encontrados no experimento de degradação pela atuação do consórcio de bactérias e pelo isolado INPA R574 após 2 (a) e 21 dias (b).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de alguns HPA.....	30
Tabela 2. Estudos de biodegradação de solos contaminados por óleo diesel.....	33
Tabela 3. Estudos de biodegradação rizobactérias.	39
Tabela 4. Locais de coleta e espécies de plantas de obtenção das rizobactérias.	40
Tabela 5. Espessura da camada emulsificante (em cm), de estirpes de rizobactérias usando duas soluções de sais diferentes e tolueno e petróleo como fontes de carbono.....	41
Tabela 6. Identificação Taxonômica das espécies de bactéria utilizadas no experimento.	46
Tabela 7. Lista de HPA determinados indicados pela USEPA com suas respectivas abreviaturas, peso moleculares, íon prioritário, número de anéis, tempo de retenção e padrão interno para quantificação.	51
Tabela 8. Parâmetros para Linearidade.	53
Tabela 9. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do método em ng mL ⁻¹ .55	
Tabela 10. Percentual de degradação do Σ HPA nos tempos de 2 a 21 dias.	60
Tabela 11. Taxas de degradação dos HPA nas amostras provenientes da degradação microbiana após 2 dias de experimento.....	64
Tabela 12. Taxas de degradação dos HPA nas amostras provenientes da degradação microbiana após 21 dias de experimento.....	65
Tabela 13. Identificação taxonômica das espécies de rizobactérias por ordem decrescente de potencial de degradação de HPA.....	66
Tabela 14. Tabela de análise dos efeitos de interação ANOVA para a degradação do Σ HPA pela atuação das 5 bactérias e do consórcio nos tempos de 2, 5, 10, 15 e 21 dias.	68

LISTA DE ABREVIACOES

Acenafteno	Ace
Acenaftileno	Acet
ANOVA	Análise de Variância
ANP	Agência Nacional de Petróleo
Antraceno	Ant
Benzo(a)antraceno	BaA
Benzo(a)pireno	BaP
Benzo(a,h)antraceno	BahAntra
Benzo(b)fluoranteno	BbFluo
Benzo(ghi)perileno	BghiPeri
Benzo(k)fluoranteno	BkFluo
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada  Espectrometria de Massas
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Criseno	Cri
Fenantreno	Fen
Fluoranteno	Fluo
Fluoreno	Flu
GEQUAM	Grupo de Estudos Químicos Analíticos e Ambientais da Amazônia
GLP	Gás liquefeito de petróleo
HPA	Hydrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IARC	Agência Internacional de Investigao sobre o Câncer
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

	Renováveis
Indeno(1,2,3-cd)pireno	IPi
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
M/Z	Relação Massa-Carga
Naftaleno	Naf
Pireno	Pi
QAV	Querosene de Aviação
SIN	Sistema Interligado Nacional
Sindarma	Sindicato das Empresas de Navegação Fluvial no Amazonas
USEPA	Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

RESUMO

O vazamento ou derramamento de óleo diesel em solo e corpos hídricos, devido sua composição por compostos tóxicos como os hidrocarbonetos policíclicos aromático (HPA), pode levar à alteração da qualidade ambiental das matrizes atingidas. Nesse sentido a biorremediação tem sido uma técnica bastante estudada, considerando a existência de muitos microrganismos que apresentam eficiência na degradação de tais contaminantes. As rizobactérias, que possuem alto poder de produção de biossurfactantes, tornam-se uma alternativa viável por serem microrganismos não patogênicos e, assim, seguros a plantas e animais. Diante disso, considerando que os solos de várzea são regiões sujeitas à contaminação por derivados de petróleo e considerando que as rizobactérias são espécies que estão presentes nesse tipo de solo e podem auxiliar no processo de degradação, o presente estudo propôs-se a determinar o potencial individual de biodegradação de HPA de cinco isolados de rizobactérias e do consórcio das cinco espécies em amostras de solo de várzea da Amazônia contaminado com óleo diesel. Para isso, foi realizado um experimento utilizando suspensão microbiana com 1×10^7 UFC.mL⁻¹ de cada espécie e do consórcio entre elas, em 500 g de solo autoclavado e óleo diesel como fonte de carbono. Além disso, foram feitas duas amostras controle: (A) 500 g de solo autoclavado e óleo diesel e (B) 500 g de solo natural e óleo diesel. Após a montagem do experimento foram realizadas coletas para determinação dos HPA nos tempos 0, 2, 5, 10, 15 e 21 dias. Após os 21 dias do experimento, as bactérias INPA R574 e INPA R598 degradaram 57,37% e 41,53%, respectivamente, do Σ HPA, enquanto as demais apresentaram aumento na concentração do Σ HPA. Após 2 dias, onde observaram-se as melhores taxas de degradação, a espécie INPA R574 foi o microrganismo que mais se destacou. Em se tratando do Σ HPA, essa bactéria degradou 62,15%, enquanto que, de maneira individual, reduziu as concentrações de acenafteno, fenantreno e benzo(a)pireno em 86,47%,

44,65% e 79,72%, respectivamente. No mesmo tempo, o consórcio apresentou taxa de 64,36%, valor superior, no entanto bem próximo à taxa individual da espécie INPA R574. O microrganismo INPA R548 foi o que não contribuiu de maneira significativa para a degradação de nenhum dos contaminantes estudados, bem como do Σ HPA. A amostra controle A apresentou taxas de degradação relevantes, sugerindo que os nutrientes adicionados ao controle favoreceram o crescimento de bactérias nativas do solo que foram capazes de degradar os HPA do diesel adicionado às amostras.

Palavras-chave: Rizobactérias, biorremediação, consórcio microbiano, várzea.

ABSTRACT

The leakage or release of diesel oil in soil and in hydric bodies, due to its composition by toxic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), may lead to changes in the environmental quality of the affected matrices. In this sense, bioremediation has been a well studied technique, considering the existence of many microorganisms that present a degradation capacity of such contaminants. The rhizobacterias, which have a high production capacity for biosurfactants, become a viable alternative because they are non-pathogenic microorganisms and thus safe to plants and animals. Therefore, considering that floodplain soils are regions that are subject to the petroleum derivatives contamination, and considering that rhizobacteria are species that are present in this soil type and can aid in the degradation process, the aim study proposed the determination of the individual PAH biodegradation potential of five isolates of rhizobacteria, and of the consortium of this five species, in samples of floodplain of amazon contaminated with diesel oil. For this, an experiment was carried out using the microbial suspension with 1×10^7 UFC.mL⁻¹ of each bacterial type and the consortium in 500 g of autoclaved soil and diesel oil as carbon source. In addition, were done two samples control: (A) 500 g of autoclaved soil and diesel oil and (B) 500 g of natural soil and diesel oil. After the experiment was set up, the samples were collected for PAH determination at the times zero, 48 hours, 5, 10, 15 and 21 days. After 21 days of the experimentation, the bacteria INPA R574 and INPA 598 degraded 57.37% and 41.53%, respectively, of Σ PAH, while the others had an increase in concentration of Σ PAH. After 2 days, when the best degradation rates were observed, the specie INPA R574 was the microorganism that most stood out. In the treatment of Σ PAH, this bacterium degraded 62.15%, while, individually, it reduced the concentrations of acenaphtene, phenanthrene and benzo(a)pyrene in 86.47%, 44.65% and 79.72% respectively. In the same time, the

consortium presented rates of degradation of 64.36%, higher value, however close to the individual rate of INPA R574. The INPA R548 microorganism did not significantly contribute to the degradation of any of the contaminants studied, as well as Σ PAH. The control sample (A) showed relevant degradation rates, suggesting the nutrients added to the control favored the growth of native soil bacteria that were able to degrade the PAH of the diesel added to the samples.

Key words: *Rhizobacteria*, bioremediation, microbial consortium, floodplain.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 ÓLEO DIESEL.....	25
2.1.1 COMPOSIÇÃO DO ÓLEO DIESEL.....	26
2.2 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA).....	28
2.2.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS HPA.....	30
2.2.2 FONTES DE EMISSÃO.....	31
2.3 BIODEGRADAÇÃO EM SOLOS CONTAMINADOS POR ÓLEO DIESEL.....	32
2.3.1 BIORREMEDIAÇÃO.....	35
2.3.1.1 RIZOBACTÉRIAS.....	38
3. OBJETIVOS.....	44
3.1 OBJETIVO GERAL.....	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
4.1 AMOSTRA AMBIENTAL.....	45
4.2 DELINEAMENTOS DOS PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO.....	46
4.2.1 ATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS.....	46
4.2.2 EXPERIMENTO DE BIORREMEDIAÇÃO.....	47
4.3 DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS.....	48
A) EXTRAÇÃO DA FASE ORGÂNICA.....	48
B) FRACIONAMENTO.....	49
C) CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM).....	50
D) PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO DO MÉTODO.....	52
4.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS NAS AMOSTRAS DO EXPERIMENTO.....	57
5.1.1 IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS HPA.....	57
5.1.1.1 EXPERIMENTO DE BIORREMEDIAÇÃO.....	59
5.1.2 DEGRADAÇÃO DO Σ HPA DAS AMOSTRAS DE BIODEGRADAÇÃO.....	60
5.1.3 DEGRADAÇÃO INDIVIDUAL DOS HPA DAS AMOSTRAS DE BIODEGRADAÇÃO.....	63
5.2 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	67
6. CONCLUSÕES.....	70

7. REFERÊNCIAS	72
8. ANEXOS	81
ANEXO I. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS 16 HPA DETERMINADOS PELA USEPA COMO POLUENTES PRIORITÁRIOS.	81
ANEXO II. DADOS PARA CÁLCULO DE LD E LQ.....	85
ANEXO III. CONCENTRAÇÃO DOS HPA NAS AMOSTRAS DO EXPERIMENTO DE BIODEGRADAÇÃO	86
ANEXO IV. TRATAMENTO ESTATÍSTICO	88

1. INTRODUÇÃO

A bacia hidrográfica do rio Amazonas é constituída pela mais extensa rede hidrográfica do globo terrestre, ocupando uma área total da ordem de 6.110.000 km², desde suas nascentes, nos Andes Peruanos, até sua foz no oceano Atlântico (na região norte do Brasil). Essa região é caracterizada pelo transporte fluvial de petróleo e derivados, granéis sólidos (grãos e minérios), de carga geral e de passageiros, além de desempenhar alta função social de abastecimento e comunicação entre as comunidades ribeirinhas (ANA, 2016; FILIZOLA; GUYOUT, 2011).

Em toda a Amazônia o transporte de escoamento de insumos é predominantemente realizado pelas hidrovias, tendo em vista a pequena malha rodoviária e as características físicas e geográficas da região – que levam à dependência do transporte hidroviário para a manutenção de suas atividades (ANTAQ, 2011).

De acordo com o Sindarma (Sindicato das Empresas de Navegação Fluvial no Amazonas), o transporte de granéis líquidos conta, atualmente, com uma frota de 250 balsas com capacidade para transportar 3 bilhões de litros de derivados de petróleo ao ano, que asseguram sua distribuição para consumo e para geração de eletricidade na quase totalidade dos municípios da Amazônia.

Além da combustão incompleta da matéria orgânica e queima da vegetação (SAMANTA et al., 2002) – processos que podem ocorrer naturalmente no meio, o transporte de derivados de petróleo e a utilização de óleo diesel e gasolina como combustíveis das embarcações que circulam na região são possíveis fontes de contaminação de ecossistemas terrestres e aquáticos. Relatórios de órgãos ambientais e matérias veiculadas pela mídia registram vazamento de combustíveis em meio aquático, principalmente por causas acidentais.

Em março 2013, uma balsa tombou na orla do Rio Negro, em Manaus, e provocou o vazamento de 15 mil litros de óleo. Ainda no mesmo ano, tanques que transportavam CAP20 - composto de derivado de petróleo utilizado na composição do asfalto - tombaram no Rio Negro, nas proximidades do Porto do São Raimundo, Zona Oeste de Manaus, causando o vazamento de aproximadamente 60 mil litros do óleo no local, segundo o Corpo de Bombeiros. Já em outubro de 2016, por conta do travamento de uma válvula de transferência, houve o vazamento de óleo durante a permuta de derivados de petróleo entre duas balsas pertencentes a um porto privado na capital do Amazonas (G1, 2018a; G1, 2018b; D24am, 2018).

Mais recentemente, em março de 2018, uma balsa transportando óleo diesel se chocou com uma pedra submersa na região de Santa Isabel do Rio Negro e, conforme a tripulação, 3 mil litros de combustível vazaram na água (ACRÍTICA, 2018).

O Brasil possui uma matriz hidrotérmica de geração de eletricidade, desta forma, as usinas hidroelétricas e termoeletricas são responsáveis pela maior parte do suprimento de eletricidade nacional. Na região Norte, as usinas abastecidas por óleo diesel estão instaladas para atender os sistemas isolados que ainda não foram conectados ao Sistema Interligado Nacional (SIN), e, os maiores são Acre-Rondônia, Manaus e Macapá. (IEMA, 2016; LIMA, SOUZA, 2014).

Segundo o Balanço Nacional Energético, em 2014, 63,2% da demanda total de eletricidade (590 TWh) foi suprida por hidroeletricidade seguido pela termoeletricidade de origem fóssil com 24,2% (4,5% por carvão mineral, 6% óleos diesel e combustível e 13,7% por gás natural) (IEMA, 2016).

A utilização do óleo diesel para a geração de eletricidade nas termelétricas da região e, consequentemente, o transporte fluvial deste óleo na bacia amazônica pode ser considerado uma possível fonte de contaminação de ecossistemas amazônicos.

Outra possível fonte de contaminação são os tanques subterrâneos de armazenamento de combustível. O vazamento de tanques subterrâneos contendo derivados de petróleo pode acarretar problemas à população, oferecendo riscos à saúde pública e aos ecossistemas. Em casos de vazamento, o lençol freático pode ser atingido por substâncias perigosas, em grande parte dos casos, carcinogênicas e depressoras do sistema nervoso central (ALMEIDA et al., 2007; FOGAÇA, 2015).

Em um derramamento de óleo diesel, uma das principais preocupações, além da contaminação do ecossistema do solo, é também, a de aquíferos, sobretudo aqueles utilizados para o abastecimento humano. Após atingir a água subterrânea, os contaminantes derivados do petróleo são transportados com a fase líquida e podem atingir os rios e as captações através de poços rasos e profundos (CORSEUIL; MARINS, 1997; ANDRADE et al., 2010).

Em casos de derramamento de petróleo e seus derivados em meio aquático, o produto derramado flutua e extensas manchas são formadas, denominadas marés negras, as quais são altamente destruidoras, podendo ocorrer efeitos imediatos ou a longo prazo. Quando essas manchas atingem as zonas costeiras, bem como as áreas de várzea da Amazônia, a fauna e flora recebem grande carga de substâncias hidrofóbicas e tóxicas, representando um perigo para a cadeia trófica e alimentar, além de acarretar consequências econômicas e sociais (SILVA et al., 2009).

A grande preocupação com os riscos que o vazamento do petróleo e seus derivados pode acarretar é compreendida quando se estuda sua composição química. Dentre as substâncias que constituem o petróleo e seus derivados, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, HPA, são destacados, pela Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), como de relevância em relação à toxicidade, pois são compostos muito estudados devido ao potencial mutagênico e carcinogênico que as substâncias do grupo e seus derivados

apresentam e por serem considerados uma ameaça à vida da fauna e da flora de um ambiente impactado (AYED et al., 2015; LEE; KNON, 2016).

As queimadas, a queima do óleo – como, por exemplo, em motores a diesel, o intenso fluxo de pequenas e grandes embarcações na orla de Manaus, a poluição doméstica e industrial das principais bacias que entrecortam a cidade são as principais fontes antrópicas de contaminantes na região amazônica (LOPES, 2010).

A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), a partir de dados existentes na literatura internacional, publicou, em 2001, a primeira lista de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo com concentração de substâncias químicas para subsidiar ações de prevenção e controle da poluição, visando à proteção da qualidade dos solos e das águas subterrâneas e o gerenciamento de áreas contaminadas. Na lista vigente, publicada em 2014, o benzo[a]pireno, que é um dos 16 HPA sinalizados pela USEPA, apresenta o valor de prevenção de $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ em solos. O que significa dizer que concentrações acima desse valor podem acarretar em alterações prejudiciais à qualidade do solo e da água subterrânea (SÃO PAULO, 2014).

A Resolução nº 420 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), que dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas, estipula o valor de prevenção de $0,025 \text{ mg Kg}^{-1}$ para o benzo[a]antraceno em solos, que também se encontra na lista dos 16 HPA sinalizados pela USEPA (BRASIL, 2009).

A Resolução Conama 357/05, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento e estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, estipula o valor limite máximo em águas doces de $0,05 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para

os HPA: Benzo[a]antraceno; Criseno; Benzo[a]pireno; Benzo[b]fluoranteno; Benzo[k]fluoranteno; Dibenzo[a,h]antraceno; Indeno[1,2,3-cd]pireno (BRASIL, 2005).

Considerando os riscos que os HPA podem gerar à fauna e flora de um ambiente por eles impactados, tem sido dada uma atenção maior ao desenvolvimento e implementação de tecnologias que procuram degradar tais contaminantes. A biorremediação, processo que envolve o uso de microrganismos para degradar constituintes orgânicos complexos, tem sido proposta como uma tecnologia mais efetiva, econômica e ambientalmente amigável (AYED et al., 2015; WU et al., 2016; CERQUEIRA, et al, 2011).

Muitos estudos têm sido realizados utilizando a biorremediação como técnica para a degradação de HPA no ambiente. Cerqueira et al. (2011) mostraram que o consórcio microbiano composto por cinco bactérias (*S. acidaminiphila*, *B. megaterium*, *B. cibi*, *P. aeruginosa* e *B. cereus*) foi capaz de degradar, em meio líquido, alta concentração de compostos saturados e aromáticos contidos nas amostras de lodo e solo produzindo biosurfactante eficientemente. Luz et al. (2011) verificaram que o processo de degradação por um consórcio com cinco espécies levou à produção de emulsificantes, característica que facilita o processo de biodegradação de derivados de petróleo.

Dentre as bactérias que são capazes de degradar tais contaminantes, destacam-se as rizobactérias. Brito (2013) verificou que as rizobactérias estudadas – obtidas através da coleta dos nódulos presentes nas raízes de plantas leguminosas da região amazônica, apresentaram-se como alternativa viável e segura para a biorremediação de solos contaminados com petróleo, pois apresentaram alta atividade emulsificante. WEI et al. (2008) verificaram que o isolado de rizobactéria CCNWTB701 a partir de *A. chrysopteru* apresentou habilidade de degradação de 99.5 a 78.3% dos contaminantes presentes nas amostras estudadas.

Dessa forma, considerando que os solos de várzea da Amazônia são regiões suscetíveis à contaminação por petróleo e seus derivados, e considerando a carência de estudos no que diz respeito ao potencial de degradação de HPA por rizobactérias – espécies que estão presentes nesse tipo de solo e possuem alto poder de produção de biossurfactantes, podendo contribuir na degradação de contaminantes –, constata-se a relevância de pesquisas, como a desta dissertação, que avaliem essa temática.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O petróleo é uma mistura complexa, incluindo hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, que são conhecidos por terem efeitos negativos sobre a saúde humana e do ambiente (WU et al., 2016). Nas refinarias, a partir do petróleo bruto, são produzidos os derivados como diesel, gasolina, nafta, querosene de aviação, gás liquefeito de petróleo, lubrificantes, entre outras substâncias que servem de matéria prima para diversos outros produtos (PETROBRAS, 2018).

O óleo diesel é o principal combustível comercializado no mercado brasileiro, utilizado no transporte de cargas e de passageiros, em embarcações, na indústria, na geração de energia, nas máquinas para construção civil, nas máquinas agrícolas e locomotivas, atendendo as necessidades dos consumidores e as mais avançadas tecnologias em motores e combustão (PETROBRAS, 2018).

De acordo com dados da Agência Nacional de Petróleo (ANP), existem mais de 40 mil vendas varejistas de combustível em território Nacional. Em Manaus, há registro de pouco mais de 500 postos de venda. Levantamentos realizados por agências ambientais indicam que as áreas, onde estão localizados estes postos, são frequentemente atingidas por vazamentos oriundos de tanques de armazenamento subterrâneos, que podem causar

contaminação do solo e águas subterrâneas, além de contribuírem para o risco de explosões e incêndios (ANP, 2016).

Dentre os danos causados por acidentes ambientais, aqueles que afetam o solo e a atmosfera apareceram com valores expressivos, atingindo 166 (cento e sessenta e seis) e 161 (cento e sessenta e uma) ocorrências, respectivamente em 2014 (IBAMA, 2015).

Em 2015, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) divulgou o Relatório de Acidentes Ambientais – referente ao ano de 2014. Para possibilitar o levantamento do volume dos produtos que atinge o meio ambiente, eles foram separados por classes de risco e também pelas principais instalações ou empreendimentos responsáveis.

Existem 09 (nove) classes de risco que podem ser subdivididas, de acordo com a característica do produto: Classe 1 – Explosivos; Classe 2 – Gases; Classe 3 – Líquidos Inflamáveis; Classe 4 - Sólidos inflamáveis; substâncias sujeitas à combustão espontânea, substâncias que, em contato com água, emitem gases inflamáveis; Classe 5 – Substâncias Oxidantes, peróxidos orgânicos; Classe 6 – Substâncias Tóxicas e substâncias infectantes; Classe 7 – Materiais radioativos; Classe 8 – Substâncias corrosivas; Classe 9 – Substâncias e artigos perigosos diversos.

Dentre os produtos perigosos lançados no meio ambiente, a Classe 3 – Líquidos Inflamáveis foi a que apresentou maior volume dentre as demais, havendo um registro de 10083,012 m³ de produtos vazados. Em 2014, ano em que foi realizado o relatório, o óleo diesel foi o produto com maior volume vazado (533,37 m³); em segundo lugar aparece o vazamento de gasolina (160 m³) e em terceiro o etanol (120 m³) (Figura 1).

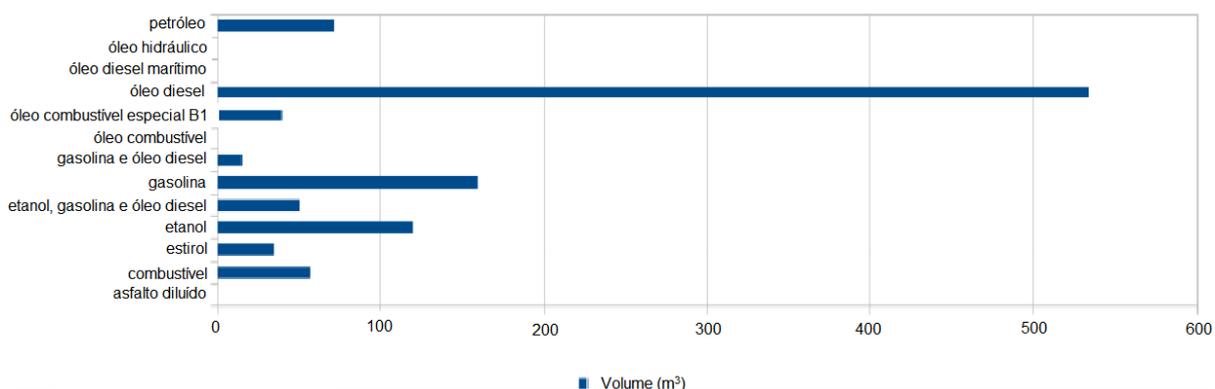


Figura 1. Volume em m³ dos tipos de produtos envolvidos nos acidentes ambientais pertencentes a Classe de Risco 3 – Líquidos inflamáveis. Fonte: (IBAMA, 2015).

Diante disso, estudos que tratem da remediação de ambientes impactados por esse derivado do petróleo são bastante relevantes, pois se trata do produto com maior registro de vazamento no ambiente nas últimas pesquisas e daquele que possui grande importância para o país, tanto pelo volume consumido quanto pela importância e dispersão entre os setores da economia.

2.1 ÓLEO DIESEL

O gás liquefeito de petróleo (GLP), gasolina, nafta, óleo diesel, querosene de aviação (QAV) e de iluminação, óleo combustível, asfalto, lubrificante, combustível marítimo, solventes, parafinas e coque de petróleo são os mais conhecidos derivados do petróleo. Entre eles, o mais representativo é o óleo diesel.

O óleo diesel recebeu esse nome em homenagem ao engenheiro mecânico alemão Rudolf Christian Karl Diesel (1858-1913), que, a partir da exploração dos efeitos da combustão provocada pela reação química do óleo de amendoim injetado num recipiente com oxigênio presente no ar, inventou um motor de combustão de pistões capaz de movimentar máquinas. Por ser simples e de fácil aplicação, o motor ficou conhecido por todo o mundo, substituindo os dispendiosos sistemas mecânicos a vapor usados em locomotivas e transportes marítimos na época (CNT, 2011).

A produção de derivados do petróleo, como o óleo diesel, ocorre nas refinarias, e basicamente envolve três processos principais:

- A. A destilação: onde o petróleo é aquecido em altas temperaturas até evaporar. Esse vapor volta ao estado líquido conforme resfria em diferentes níveis dentro da torre de destilação. Em cada nível há um recipiente que coleta um determinado subproduto do petróleo.
- B. A conversão: processo que transforma as partes mais pesadas e de menor valor do petróleo em moléculas menores (gasóleos e resíduos), dando origem a derivados mais nobres (GLP, querosene, diesel).
- C. E os tratamentos, que são processos voltados para adequar os derivados à qualidade exigida pelo mercado (PETROBRAS, 2018).

A distribuição por todo o país de óleo diesel provém, em quase sua totalidade, das refinarias da Petrobras. No Amazonas, atualmente, a Refinaria Isaac Sabbá (Reman), localizada à margem esquerda do Rio Negro, em Manaus, atua com capacidade de processamento de 46 mil barris de combustível/dia (PETROBRAS, 2018).

O óleo diesel é um produto inflamável, tóxico, volátil e denso (ANP, 2016). Sua composição específica depende da fonte de petróleo, do método de produção e dos processos de destilação.

2.1.1 COMPOSIÇÃO DO ÓLEO DIESEL

O óleo diesel, formado por meio da mistura de diversas correntes como gasóleos, nafta pesada, diesel leve e diesel pesado, contém de 2000 a 4000 hidrocarbonetos que compõem uma mistura de compostos de cadeias lineares e ramificadas, cicloalcanos e compostos aromáticos obtidos da destilação da fração média do petróleo. É um produto composto por hidrocarbonetos e, em menor proporção, nitrogênio, enxofre e oxigênio. A faixa de destilação comumente é entre 220-380 °C. E, sua utilização principal é feita nos motores ciclo Diesel (de

combustão interna e ignição por compressão) em veículos rodoviários, ferroviários e marítimos e em geradores de energia elétrica (MARIANO, 2006; FERREIRA et al., 2008; ANP, 2016).

O óleo diesel se caracteriza por apresentar, em sua composição química, frações leves de querosene e naftas com concentração de 5% a 10% e frações mais pesadas, como o óleo leve, com temperatura de destilação entre 160 °C e 380 °C – obtidos após o craqueamento catalítico do petróleo. Essa mistura complexa de n-parafinas, parafinas ramificadas, cicloalcanos de um a três anéis, aromáticos mono e polinucleados são complementados com aditivos, como anticorrosivos, antioxidantes, antiespumantes, desemulsificante, que melhoram o desempenho deste combustível (LAURO, 2006 & SOUZA, 2008 apud. AGUIAR, 2013).

Para atender às diversas aplicações do produto, vários tipos de classificações dele são encontradas. Uma delas é a classificação por tipo de uso: óleo diesel rodoviário, marítimo, agropecuário, industrial e de geração elétrica. Em território nacional, a Resolução ANP N° 65, de 9 de dezembro de 2011 classifica os óleos diesel de uso rodoviário em dois tipos:

I - Óleo diesel A: combustível produzido por processos de refino de petróleo, centrais de matérias-primas petroquímicas ou a partir de matéria-prima distinta do petróleo, previamente autorizado pela ANP para comercialização, destinado a veículos dotados de motores do ciclo Diesel, de uso rodoviário, sem adição de biodiesel;

II - Óleo diesel B: óleo diesel A adicionado de biodiesel no teor estabelecido pela legislação vigente.

A lei n° 13.263, de 23 de março de 2016 regulamenta a adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado com o consumidor final em território brasileiro. Este percentual deve chegar a 10% até 2019. Isso porque o biodiesel apresenta benefícios tais como redução das emissões de dióxido de carbono em 78%, quando comparado ao diesel convencional, além do

seu processo de produção tender a ser mais limpo, apresentando significativas vantagens ambientais (PELETEIRO et al., 2016).

Muitos estudos referentes à composição do óleo diesel já foram realizados. Em 2003, Kaipper obteve a composição de uma amostra de óleo diesel: 72,2% em massa dos hidrocarbonetos alifáticos, dentre eles, 0,4% com duplas ligações em suas cadeias (compostos oleofínicos), os outros 24,8% correspondiam a hidrocarbonetos aromáticos: 17,7% monoaromáticos e 7,1% policíclicos aromáticos. Dos HPA detectados, 79% correspondiam a naftalenos, 19% de poliaromáticos de 3 anéis e os 2% restantes, eram policíclicos de maior peso molecular (4 a 6 anéis).

Na composição do óleo diesel, a maior ameaça para o meio ambiente e a saúde humana são os hidrocarbonetos monoaromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) e os HPA. Esses compostos, em caso de derramamentos, podem levar à contaminação de ecossistemas aquáticos e terrestres. Em vista disso, os HPA são uma classe de compostos bastante estudada.

2.2 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA)

Os HPA são compostos orgânicos formados por dois ou mais anéis benzênicos condensados em arranjos lineares, angulares ou agrupados (BAIRD; CANN, 2011; AZEVEDO et al., 2013). A ocorrência desses compostos deve-se à sua geração a partir da combustão incompleta ou pirólise de inúmeros materiais orgânicos, como carvão, petróleo, gás de petróleo e madeira (KADRI et al., 2016).

Atualmente, mais de 100 HPA são reconhecidos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). No entanto, a USEPA classificou 16 dos HPA (Figura 2) como

poluentes prioritários com base na toxicidade, potencial de exposição humana, frequência de ocorrência em locais de resíduos perigosos, e a extensão das informações disponíveis.

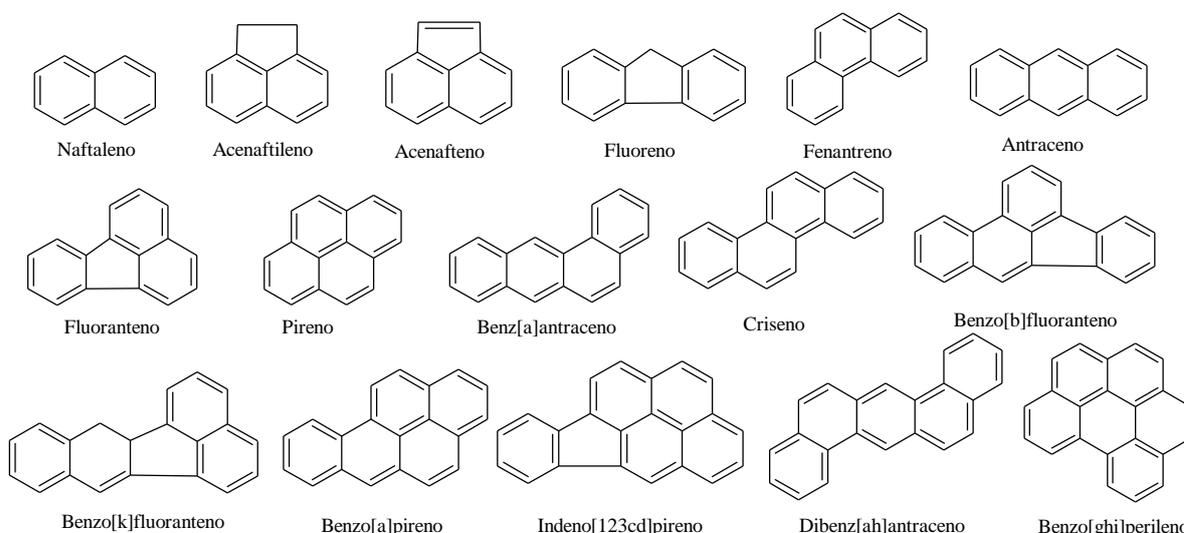


Figura 2. HPA prioritários, de acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA 1987).

Os HPA e seus derivados estão associados à incidência de câncer, inclusive alguns deles, como o benzo[a]pireno, são destacados como substâncias relevantes pela Agência Internacional de Investigação sobre o Câncer (IARC). Por esse motivo, tais compostos constituem uma ameaça potencial para a saúde de toda a população. No entanto, aqueles grupos populacionais constituídos por pessoas que residem ou trabalham em ambientes diretamente influenciados por essas fontes estão submetidos a um risco maior (NETTO et. al, 2000; BERNARDO et al., 2016).

Esses compostos não interagem diretamente com o material genético, pois, devido ao seu caráter lipofílico, os HPA e seus derivados podem ser absorvidos pela pele, por ingestão ou por inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo onde, posteriormente, passam por processos de ativações enzimáticas através do citocromo P450, formando metabólitos com elevada natureza eletrofílica denominados carcinógenos efetivos. Após esse processo, os compostos resultantes interagem com o DNA e RNA e possibilitam o surgimento de tumores (NETTO et al., 2000; BERNARDO et al., 2016).

Os riscos à contaminação humana, bem como às diferentes matrizes ambientais, por HPA é significativo, o que se justifica em virtude das propriedades físico-químicas dessas substâncias e da grande distribuição no meio ambiente.

2.2.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS HPA

As propriedades físico-químicas dos HPA são de fundamental importância para a compreensão de seu comportamento biológico e ambiental. Algumas dessas propriedades são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de alguns HPA.

HPA	N.º de anéis	PM (g.mol ⁻¹)	S (mg.L ⁻¹)	PV (Pa, 25° C)	Log K (o/a)	Tempo de meia vida no solo (dias)
✓ Naftaleno	2	128	31	36,8	3,37	<125
✓ Acenafteno	3	152	16,1	4,14	4,00	40–60
✓ Fluoreno	3	166	1,9	0,71	4,18	60
✓ Fenantreno	3	178	1,1	0,113	4,57	16–200
✓ Antraceno	3	178	0,045	0,0778	4,54	16–200
✓ Pireno	4	202	0,132	0,0119	5,18	199–1870
✓ Benzo[a]pireno	5	252	0,0038	2,13.10 ⁻⁵	6,04	229–530
✓ Benzo[ghi]perileno	6	276	0,00026	2,25.10 ⁻⁵	6,5	74–650

Nota de Avaliação: PM, peso molecular (g.mol⁻¹); S, solubilidade (mg.L⁻¹); PV, pressão de vapor (Pa – Pascal, 25°C); Log K(o/a), coeficiente de partição (octanol/água). Fonte: Adaptado de Netto et al., 2000 e KUPPUSAMY et al., 2016.

Os HPA são substâncias pouco solúveis em água e, em geral, sua solubilidade diminui com o aumento do número de anéis. Apresentam coeficientes de partição octanol-água (log K_{oa}) que variam entre 3,37 e 6,75, demonstrando grande afinidade lipofílica, a qual aumenta com o número de anéis aromáticos da molécula (MEIRE et al., 2007).

São compostos difíceis de degradar em matrizes naturais e a sua persistência aumenta com o seu peso molecular (KADRI et al., 2016), o qual está inversamente relacionado com a solubilidade dos HPA. A volatilidade destes compostos diminui com o aumento do peso molecular e, conseqüentemente, HPA de pesos moleculares mais baixos são mais voláteis e

apresentam maiores pressões de vapor que os mais pesados, o que conseqüentemente acarreta uma ampla dispersão ambiental (NETTO et al. 2000; MEIRE, 2007).

No solo, os HPA encontram-se geralmente adsorvidos no material constituinte e ficam retidos nas camadas superiores. As meias vidas dos compostos de maior peso molecular são relativamente elevadas e indicam que sua degradação é lenta (NETTO et al., 2000).

Em virtude de suas propriedades físico-químicas, à presença generalizada no meio ambiente, à resistência à biodegradação, ao potencial de bioacumulação e aos efeitos mutagênicos e carcinogênicos, os HPA representam uma importante preocupação.

2.2.2 FONTES DE EMISSÃO

As fontes primárias de HPA, em várias matrizes ambientais (solo, água e atmosfera), incluem fontes naturais e processos antropogênicos (WANG et al., 2016; KUPPUSAMY et al., 2016). A formação desses contaminantes tem sua origem na combustão incompleta da matéria orgânica. Fontes naturais incluem diagênese, erupções vulcânicas, incêndios florestais e de campos. As fontes antrópicas incluem a combustão de biomassa (por exemplo, madeira e capim) e combustíveis fósseis (por exemplo, petróleo e carvão), derramamentos de petróleo bruto e de óleo refinado e emissões de gases de escape de veículos (XU et al., 2016; ANJOS, 2012; HARITASH; KAUSHIK, 2009; SAMANTA et al., 2002).

As maiores emissões provêm de processos industriais ligados à produção de aço e alumínio, da exaustão de incineradores de rejeito e por resíduos sólidos industriais. Atividades petroquímicas, como o processo e refino na produção de petróleo, assim como acidentes que envolvem o derramamento direto de seus produtos e derivados em corpos receptores (como lagos, rios e oceanos) também elevam consideravelmente os níveis ambientais de HPA (KUPPUSAMY et al., 2016; MEIRE et al., 2007; WANG et al., 2016).

Dessa forma, a maior parte da contaminação de solos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos trata-se de um típico efeito da atividade antropogênica. A contaminação de

ambientes naturais por petróleo e seus derivados pode provocar poluição orgânica de água subterrânea local, ameaçar a segurança da água potável, limitar o uso de água subterrânea, e provocar enormes perdas econômicas e desastres ecológicos (ANDRADE et al., 2010; JACQUES et al., 2007).

Trabalhos que envolvam o estudo de estratégias para reduzir o impacto causado a locais atingidos por substâncias tóxicas e prejudiciais ao meio ambiente como petróleo, gasolina, óleo diesel e outros derivados, são fundamentais para tentar restabelecer a biota de ambientes contaminados.

2.3 BIODEGRADAÇÃO EM SOLOS CONTAMINADOS POR ÓLEO DIESEL

O óleo diesel é um poluente ambiental bem conhecido que pode facilmente contaminar o solo e as águas subterrâneas através de sua intrusão por várias vias, como vazamentos em tanques de armazenamento subterrâneo, derramamentos acidentais, locais de perfuração, práticas inadequadas de descarte de lixo e lixiviação de aterros sanitários (LAHEL et al., 2016).

Diversas técnicas que envolvem métodos físicos e químicos podem ser empregadas para remover os contaminantes do solo ou reduzir a concentração destes poluentes como, por exemplo: diluição, dispersão, sorção, bombeamento, incineração e biorremediação (COSTA, 2011 apud. OLIVEIRA; ALVES, 2013).

De todas as técnicas de remediação natural, a biorremediação vem sendo bastante documentada na recuperação de ambientes impactados por hidrocarbonetos de petróleo por utilizar o potencial metabólico de certos microrganismos e diminuir o caráter tóxico de determinados compostos (OLIVEIRA; MANFIO, 2006).

Técnicas de bioestimulação e/ou bioaugmentação aumentam a eficiência da biorremediação de solos contaminados com diesel. A bioestimulação é o processo no qual o fósforo e o nitrogênio são introduzidos no solo para iniciar o crescimento de microrganismos

a fim de se obter taxas de biodegradação mais rápidas do diesel. E a bioaugmentação é o processo no qual os microrganismos potenciais são inoculados em solo contaminado para facilitar os processos de biodegradação (LAHEL et al., 2016).

Nos trabalhos descritos na tabela 2, a seguir, observam-se estudos recentes que englobam o estudo da biodegradação de solos contaminados por óleo diesel.

Tabela 2. Estudos de biodegradação de solos contaminados por óleo diesel.

Referência	Resultados
Lin et al. (2009)	Após 28 dias do processo, o óleo diesel foi degradado até 70%, utilizando bioaugmentação e bioestimulação.
Lebkowska et. al (2011)	A bioaugmentação por estirpes bacterianas isoladas (duas espécies de <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas mendocina</i> e <i>Acinetobacterl woffii</i>) resultou numa redução global de cerca de 80,53% do hidrocarbonetos total do diesel em solos poluídos após 65 dias.
Chagas-Spinelli et. al (2012)	O consórcio microbiano utilizado para bioaugmentação foi derivado do solo original e, após o período experimental, observou-se uma eficiência de remoção de 87% dos HPA encontrados na amostra quando utilizada a técnica de bioestimulação associada à bioaugmentação.
Guarino et. al (2016)	O processo de <i>landfarming</i> associado à bioaugmentação permitiu atingir maior taxas de biodegradação. Apresentando redução de cerca de 86% do total de hidrocarbonetos.

Mesmo com todos os estudos realizados sobre processos para biorremediação de solos contaminados, as rotas de biodegradação, promovidas por bactérias, ainda não são totalmente conhecidas, no entanto há inúmeros trabalhos que sugerem as vias metabólicas de degradação de HPA, que são os compostos que, na composição do óleo diesel, são de maior ameaça para o meio ambiente e a saúde humana (Figura 3).

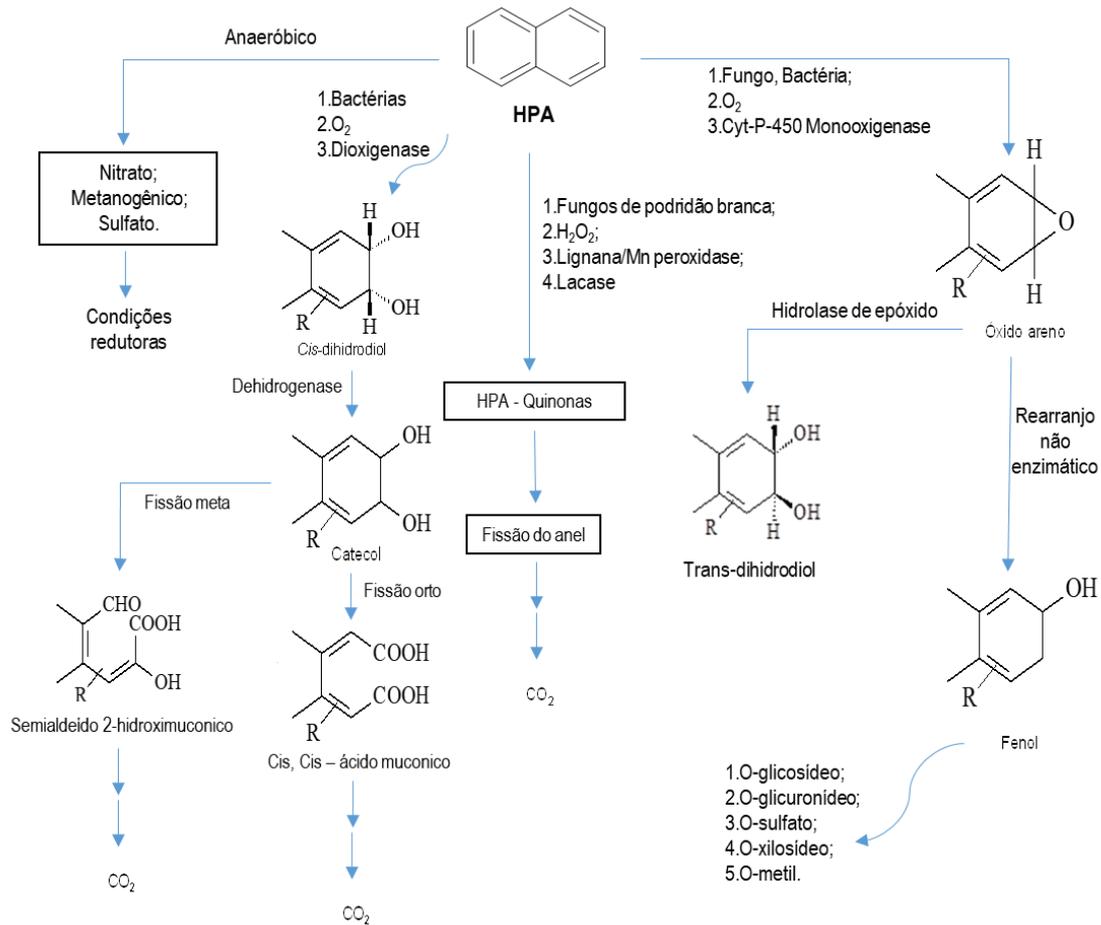


Figura 3. Proposta do caminho microbiano de degradação de HPA. Fonte: adaptado de HARITASH e KAUSHIK (2009).

A biodegradação de HPA normalmente acontece em três fases. Na primeira etapa, o composto aromático é transformado em um metabólito intermediário central da via de degradação dos HPA, normalmente um catecol – que é o intermediário central mais comum.

Na segunda, as enzimas de fissão convertem os intermediários centrais em compostos que são utilizados nas vias comuns de geração de carbono e energia da bactéria. Ocorre, então, a abertura do anel do catecol por di-oxigenases, que catalisam a adição de oxigênio molecular ao anel. Isso pode acontecer em duas posições: entre os grupos hidroxila (clivagem intradiol ou orto), ou adjacente a um dos grupos hidroxila (clivagem extradiol ou meta) (HEIDER e FUCHS, 1997; BUGG e WINFIELD, 1998; KANALY e HARAYAMA, 2000; SCRAMIN et al. 2003, DÍAZ, 2004; JACQUES et al., 2007). As di-oxigenases intradiol

possuem como cofator o Fe^{3+} e produzem o ácido cis-cis-mucônico. Enquanto as di-oxigenases extradiol dependem do Fe^{2+} , produzindo o semialdeído 2-hidroximucônico e podem ser subdivididas em proximais e distais, para caracterizar a posição da clivagem do anel em relação ao radical (BUGG e WINFIELD, 1998; KANALY e HARAYAMA, 2000; SCRAMIN et al., 2003; DÍAZ, 2004; JACQUES et al., 2007).

Por fim, o produto resultante da abertura do anel é convertido em produtos que entram no ciclo de Krebs. O ácido cis-cis-mucônico será convertido em succinato e acetil-Co-A e o semialdeído 2-hidroximucônico, será transformado em ácido pirúvico e acetaldeído (KANALY e HARAYAMA, 2000; SCRAMIN et al., 2003; DÍAZ, 2004; JACQUES et al., 2007).

2.3.1 BIORREMEDIAÇÃO

A biorremediação pode ser definida como um processo de tratamento que utiliza microrganismos que degradam e transformam compostos orgânicos, como o petróleo, existentes nos solos contaminados, aquíferos, lodos e resíduos sólidos, em compostos menos complexos e geralmente facilmente degradáveis (TONINI et al., 2010; CERQUEIRA et al., 2011; WANG et al., 2016).

As estratégias usadas para a biorremediação dos HPA podem ser divididas entre as técnicas *in situ*, sem necessidade de remoção do substrato contaminado, realizando-se as atividades no próprio local poluído; e as técnicas *ex situ*, onde se faz necessária a remoção do substrato, procedendo-se a biorremediação em instalações apropriadas, fora do local contaminado (WETLER-TONINI et al., 2010).

Chagas-Spinelli et. al (2012) mostraram o comportamento individual de 11 HPA encontrados em uma amostra de solo contaminado por diesel em um período experimental de

129 dias utilizando três tratamentos de biorremediação: *landfarming* (LF), bioestimulação (BS) e bioestimulação associada à bioaumentação (BSBA) (Figura 4).

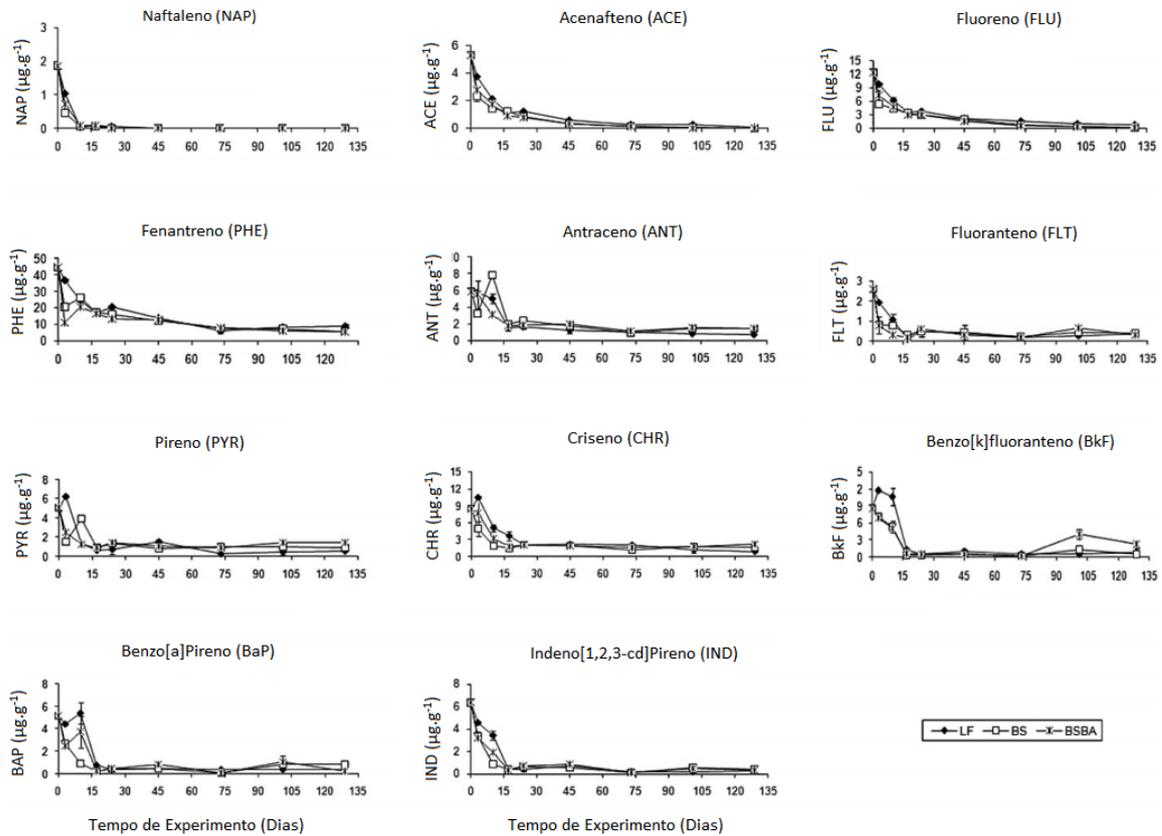


Figura 4. Concentração individual de HPA durante o período experimental de 129 dias para os tratamentos de LF, BS e BSBA. Adaptado de CHAGAS-SPINELLI et al., 2012.

O *Landfarming* é uma técnica *ex-situ* utilizada para tratamento de uma ampla gama de hidrocarbonetos, consiste na degradação de resíduos na camada superior do solo. A bioestimulação e a bioaumentação são necessárias se as condições dos solos contaminados não forem adequadas para os processos de *landfarming*, quer devido à falta de nutrientes, oxigênio, substratos ou bactérias degradantes de contaminantes. A bioaumentação é uma técnica na qual os microrganismos degradantes do petróleo são adicionados à matriz do solo e na bioestimulação, ocorre a introdução de nutrientes essenciais ou biossurfactantes para estimular a degradação microbiana do contaminante (WANG et. al, 2016; GUARINO et. al., 2016; JACQUES et. al, 2007; TONINI et. al, 2010).

Dois dos hidrocarbonetos com dois anéis aromáticos, NAP e ACE, foram completamente removidos depois de 10 e 60 dias, respectivamente. Enquanto que, FLU, com também dois anéis aromáticos, foi quase completamente removido após completos 129 dias. Em geral, observou-se que os três tratamentos apresentaram eficiências de remoção final muito elevadas e semelhantes para todos os compostos de dois anéis e com pequenas variações nos demais compostos. O tempo necessário para remoção foi o mais curto para NAP, seguido de ACE e, posteriormente, de FLU. (CHAGAS-SPINELLI et. al, 2012). Além disso, na pesquisa realizada foi possível observar que a taxa de biodegradação de todos HPA estudados foi maior nos 15 primeiros dias de experimento.

O processo de biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos depende da capacidade de assimilação desses compostos pelos microrganismos. Muitos crescem na presença de contaminantes oleosos, levando à produção de biossurfactantes, produzidos por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, que são importantes nos processos de biorremediação de resíduos oleosos (DEON et al., 2012).

Dentre as vantagens que tornam a biorremediação uma opção atraente na degradação de petróleo, frente a outros métodos de tratamentos, pode-se destacar que se trata de um processo natural, algumas técnicas podem ser aplicadas in situ com perturbação ambiental mínima, sendo muitas vezes mais baratas e mais seguras. Além disso, muitos microrganismos degradam vários poluentes permanentemente, podendo, ainda, ser associados a métodos de tratamento físicos ou químicos (TONINI et al., 2010).

Levando em consideração esse tipo de tratamento e suas vantagens, bem como os riscos de patogenicidade de determinados microrganismos, faz-se um destaque para rizobactérias, em se tratando da degradação do petróleo e seus derivados, pois, além de possuírem alto poder de produção de biossurfactantes, tornam-se uma alternativa viável para

biorremediação por serem não patogênicos e assim seguros a plantas e animais (BRITO, 2013).

2.3.1.1 RIZOBACTÉRIAS

As rizobactérias são microrganismos conhecidos por atuarem como fixador simbiótico primário de nitrogênio. Estas bactérias podem infectar as raízes de plantas leguminosas, levando à formação de caroços ou nódulos, onde a fixação de nitrogênio ocorre (AL-MUJAHIDY1 et. al, 2013; CAUWENBERGHE et al., 2015).

Algumas estirpes são capazes de solubilizar fosfatos pouco solúveis do solo e disponibilizam o fósforo tanto para si como para a planta hospedeira, promovendo o crescimento das mesmas (HARA; OLIVEIRA, 2005). Além disso, são bactérias não patogênicas, podendo possuir aplicabilidade para serem utilizadas na limpeza de áreas contaminadas com compostos de petróleo, uma vez que não são prejudiciais ao meio ambiente e aos seres humanos (BRITO, 2013).

Os HPA, aromáticos clorados e herbicidas clorados, persistentes em solos contaminados por petróleo e seus derivados, estão sujeitos ao ataque microbiano, principalmente de *Pseudomonas* – espécie de rizobactéria – que colonizam a rizosfera e produzem várias enzimas (dioxigenase, aril acilamidase) que clivam o anel aromático, formando intermediários alifáticos, sendo, portanto, capazes de degradar naftaleno, fenantreno, fluoranteno e benz[a]antraceno (MELO, 2017).

Existem pesquisas que mostram a biodegradação de compostos tóxicos por rizobactérias. Ahmad et. al (1997) mostraram evidências da presença de uma variedade de cepas de *Rhizobium Meliloti* em solos contaminados por um longo tempo com hidrocarbonetos aromáticos/cloroaromáticos – demonstrando assim a tolerância desses

microrganismos à compostos tóxicos. Além disso, as estirpes de bactérias encontradas nas amostras de solo coletadas foram eficazes para a fixação simbiótica de N₂. A tabela 3, a seguir, mostra outros trabalhos realizados que englobam estudos sobre biodegradação de solos contaminados por compostos tóxicos como os HPA utilizando rizobactérias.

Tabela 3. Estudos de biodegradação rizobactérias.

Referência	Resultados
WEI et al. (2008)	O isolado de rizobactéria CCNWTB701 a partir de <i>A. chrysoptera</i> apresentou habilidade de degradação de 99.5 a 78.3%.
TENG et al. (2010)	Indicaram que <i>alfalfa-rhizobium</i> pode desempenhar um importante papel na dissipação dos HPA em solos e inoculação com <i>R. melioli</i> para uma degradação melhorada do solo.
YESSICA et al. (2013)	Mostrou, pela primeira vez, que <i>R. Tropici</i> CIAT 899 é capaz de tolerar e crescer em meio líquido contaminados com Fen ou BaP; e, além disso, <i>R. tropici</i> contribuiu em degradar 50 % de Fen, e 45 % de BaP, após 120 h.

Os microrganismos que serão utilizados neste trabalho serão provenientes do estudo realizado por BRITO (2013) que concluiu que 15 bactérias pertencentes ao filo *alpha-Proteobactéria*, conhecidas genericamente como rizobactéria, apresentaram habilidade de degradar petróleo e tolueno quando usados como fontes de carbono. A codificação das bactérias, assim como o local de coleta, estabelecido dentro do projeto Rede CT-Petro/Rede-03, e as espécies de plantas das quais foram obtidas, estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Locais de coleta e espécies de plantas de obtenção das rizobactérias.

Rizobactéria	Local da coleta	Planta
INPA R546, INPA R548.	Ramal do Caldeirão, Terra firme, km 3	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)
INPA-R598	Estrada de terra para Jandira; Beira do Rio Solimões, Várzea	<i>Inga edulis</i> (Ingá)
INPA R568, INPA-R574.	Ramal do Caldeirão km3	<i>Pueraria phaseoloides</i> (Feijão Bravo)

Fonte: Adaptado de BRITO, 2013.

Os isolados utilizados para o experimento realizado neste trabalho, adquiridos da coleção do Laboratório de Microbiologia de solo do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), possuem alto poder de produção de biossurfactantes (BRITO, 2013).

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica, produzidos extra ou intracelularmente por microrganismos - bactérias, fungos ou leveduras - durante o processo de fermentação, com a finalidade de facilitar a difusão passiva de substâncias insolúveis em água, como por exemplo, hidrocarbonetos, para o interior da célula (MONTEIRO, 2007; SILVA et al., 2009) aumentando o potencial de biodegradação. Além disso, possuem características benéficas ao meio ambiente e ocorrem naturalmente no solo (DEON et al., 2012).

Os biossurfactantes ou surfactantes microbianos são utilizados nos processos de biorremediação, por apresentarem capacidade para degradar substratos insolúveis em água como hidrocarbonetos sólidos e líquidos, gorduras, óleos e graxas, auxiliando, assim, o processo de despoluição (SILVA et. al, 2009).

A tabela 5 mostra a espessura da camada emulsificante formada pelos isolados de rizóbios que serão utilizados nesta pesquisa. O teste de emulsificação verifica a biodegradabilidade de microrganismos: quanto mais espessa a camada emulsificante, maior a quantidade de biossurfactantes hidrofóbicos produzidos (BRITO, 2013).

Tabela 5. Espessura da camada emulsificante (em cm), de estirpes de rizobactérias usando duas soluções de sais diferentes e tolueno e petróleo como fontes de carbono.

Bactéria	Solução salina SYM				Solução Salina INPA			
	Petróleo		Tolueno		Petróleo		Tolueno	
	Água em Óleo							
----- cm -----								
Controle	0,32	B	0,42	B	0,41	B	0,46	B
INPA R546	7,72	A	7,77	A	9,72	A	13,37	A
INPA R548	6,61	A	8,76	A	9,31	A	10,56	A
INPA R598	8,62	A	3,34	A	5,77	A	4,60	A
INPA R568	7,38	A	8,61	A	6,62	A	3,91	A
INPA R574	10,88	A	8,75	A	6,55	A	7,97	A

Nota de Avaliação - Atividade Emulsificante: A (Alta), M (Moderada) e B (Baixa), segundo Matsuura (2004, apud Moura 2012), Fonte: Adaptada de BRITO, 2013.

Os isolados de rizobactérias estudados por Brito (2013) produziram camadas significativas desses emulsificantes, conforme pode se observar pela comparação com a camada formada pelo tratamento controle. As camadas emulsificantes formadas pelos isolados testados são classificadas como altas (bem espessas).

O estudo de microrganismos com capacidade para degradação, ou que auxiliem na solubilização de hidrocarbonetos de petróleo, são extremamente significativos, pois é uma estratégia para reduzir a alteração da qualidade do meio ambiente quando contaminado e, conseqüentemente, à população que está intrinsecamente ligada a ela.

2.3.1.2 RIZOBACTÉRIAS EM SOLOS DE VÁRZEA DA AMAZÔNIA

Na Amazônia, existem áreas denominadas de várzeas, que são extensões de baixo relevo banhadas pelos rios – planícies de inundação. Essas áreas são caracterizadas por apresentarem alta fertilidade e pH, em sua maioria, levemente ácidos (MELO et al., 2014).

Apesar de apresentarem um solo fértil, em virtude do processo de sedimentação, existem fatores limitantes nos solos de várzea como: a sazonalidade das águas (enchente e vazante) e as Terras Caídas – processo de erosão no longo dos rios, onde há o transporte de

sedimentos, materiais orgânicos e nutrientes, os quais são depositados ao longo de seu trajeto, ampliando as dimensões das terras. Por esse motivo, as atividades desenvolvidas para sobrevivência dos moradores da região são realizadas junto a processos naturais. (MAGALHÃES e GOMES, 2013; SILVA; NODA, 2016).

Os solos de várzea estão susceptíveis à contaminação por derivados de petróleo, e conseqüentemente por substâncias tóxicas, como os HPA, devido aos possíveis vazamentos no transporte nos rios, bem como por meio dos tanques de armazenamento de combustíveis localizados nas proximidades de zonas fluviais.

Apesar de vários trabalhos com diversas espécies de microrganismos degradadores, existe a necessidade de maior conhecimento dos potenciais existentes de bactérias indutoras de nódulos: rizobactérias (BRITO, 2013).

As rizobactérias toleram a presença de compostos tóxicos como os HPA (WEI et al., 2008; TENG et al., 2010; YESSICA et al., 2013) e os solos da região amazônica são propícios à presença desses microrganismos, pois o pH ácido, as altas temperaturas e a alta umidade, em decorrência das inundações frequentes nos solos de várzea, favorecem seu crescimento (CAMPOS et al., 2010; ZILLI et al., 2013).

Chagas Junior et al. (2016), que estudaram 26 rizobactérias nativas isoladas de solos de várzea da Amazônia, observaram que todos os isolados e estirpes-referência, em sua pesquisa, apresentaram um alto crescimento no meio com pH 6,5, apresentando o mesmo comportamento no pH 4,5, aos 15 dias de avaliação.

Ainda em sua pesquisa, Chagas Junior et al. (2016) descreveram que os microrganismos estudados contribuíram de forma significativa para o aumento da biomassa, nodulação e eficiência do feijão-caupi – espécie de leguminosa que possui grande áreas de cultivo no Amazonas, tanto na várzea como na terra firme.

As rizobactérias fazem parte da população microbiana do solo, o que tornam importantes estudos e testes mais aprofundados para detectar ou selecionar estirpes ou um consórcio desses microrganismos de grande valor econômico para serem utilizados como inoculantes, visto que são adaptados ao ambiente local, bem como podem mostrar maiores eficiências, habilidade competitiva e tolerância às condições de estresses e capacidade de degradar compostos de petróleo (BRITO, 2013).

Atualmente pouco se conhece sobre o potencial de degradação de HPA por bactérias em solos de várzea da Amazônia. Assim, a fim de avaliar o potencial de degradação desses microrganismos, a presente pesquisa propõe-se a determinar compostos individuais de HPA para observar a eliminação, diminuição ou permanência após determinado tempo de exposição pela atuação de rizobactérias em amostras de solo de várzea amazônico contaminado por óleo diesel.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o potencial individual de biodegradação de HPA de cinco isolados de rizobactérias, e do consórcio das cinco espécies, em amostras de solo de várzea da Amazônia contaminadas por óleo diesel.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Quantificar 16 HPA utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM);
2. Identificar e quantificar HPA em solo de várzea contaminado com óleo diesel em diferentes tempos de atuação de cinco isolados de rizobactérias, bem como do consórcio entre elas;
3. Avaliar o potencial de biodegradação do óleo diesel pela atuação de cinco isolados de rizobactérias, bem como de seu consórcio, a partir do estudo das concentrações individuais dos HPA identificados no experimento de biodegradação;
4. Identificar o isolado de rizobactérias com maior potencial para degradar os HPA presentes no solo de várzea contaminado com óleo diesel.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA AMBIENTAL

As amostras ambientais foram provenientes de solo de várzea localizado no município de Manacapuru no estado do Amazonas (Figura 5). Foram realizadas coletas de solo superficial de 0 – 20 cm, em cinco pontos amostrais determinados aleatoriamente. Essas amostras coletadas foram peneiradas na casa de vegetação do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) a fim de se obter uma amostra homogênea. O óleo diesel utilizado no experimento de biodegradação foi cedido pela empresa PETROBRAS, provenientes da refinaria de URUCU, no município de Coari – Amazonas.



Figura 5. Local de Coleta do solo (3° 18' 32.130" S; 60° 36' 27.529" W).
Fonte: Arquivo do Grupo de Estudos Químicos Analíticos e Ambientais da Amazônia (GEQUAM)

4.2 DELINEAMENTOS DOS PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO

4.2.1 ATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Os microrganismos adicionados ao solo de várzea contaminado com óleo diesel foram cinco espécies de rizobactérias provenientes de solo da região Amazônica, que segundo BRITO (2013), possuem alto poder de produção de biossurfactantes. As espécies isoladas utilizadas no experimento – INPA R574, INPA R598, INPA R568, INPA R546 e INPA R548, cuja identificação taxonômica consta na Tabela 6, foram adquiridas da coleção do Laboratório de Microbiologia de Solo do INPA. Para sua reativação as bactérias foram pressionadas com uma pinça e feitas as riscagens em placas de Petri contendo meio YM - *yeast manitol* conforme descrito por VINCENT (1970). As placas foram incubadas a 28°C até o crescimento de colônias de bactérias e então foram mantidos em tubos de ensaio contendo o meio YM, inclinado, segundo descrito por VINCENT (1970) e (SOMASEGARAN e HOBEN, 1985).

Tabela 6. Identificação Taxonômica das espécies de bactéria utilizadas no experimento.

CÓDIGO	ESPÉCIE
INPA R574	
INPA R568	<i>Bradyrhizobium</i>
INPA R548	
INPA R598	<i>Lysinibacillus/Bacillus</i>
INPA R546	<i>Paenibacillus</i>

Após a reativação das cinco espécies de bactérias com alto poder para produção de biossurfactantes, foi realizada a contagem de colônias de bactérias por hemacitômetro Neubauer, em seguida foram preparadas diluições das soluções obtidas para se atingir a concentração de 1×10^7 células mL⁻¹ de cada espécie.

4.2.2 EXPERIMENTO DE BIORREMEDIAÇÃO

Para avaliação do potencial de biodegradação das bactérias foi montado um experimento onde foram pesadas sete amostras de 500 g de solo de várzea em recipiente de vidro, em seguida o solo foi submetido à autoclave, para garantir sua total esterilização.

Em cada amostra do solo autoclavado foram adicionados 5 mL da solução de cada espécie de bactéria e como fonte de carbono o óleo diesel (totalizando cinco amostras). Na sexta amostra de solo foram adicionados um *mix* das cinco espécies e óleo diesel, o experimento foi realizado com o solo na capacidade de campo de 80%. Para controle do experimento foram feitas mais duas amostras: uma com 500g de solo natural e a fonte de carbono (Controle A), e outro com 500g de solo autoclavados e a fonte de carbono (Controle B) (Figura 6).

Com o intuito de avaliar as concentrações e o potencial de biodegradação dos HPA no decorrer do experimento, foram realizadas seis coletas para avaliação das concentrações de hidrocarbonetos, no tempo zero, após o período de 2, 5, 10, 15 e 21 dias, resultando em 48 amostras. As coletas foram realizadas em fluxo laminar, para evitar contaminação das amostras, que foram armazenadas em recipientes de alumínio, para evitar contaminação e congeladas até a realização das etapas para identificação e quantificação dos HPA (extração da fase orgânica, fracionamento e análise por cromatografia gasosa).

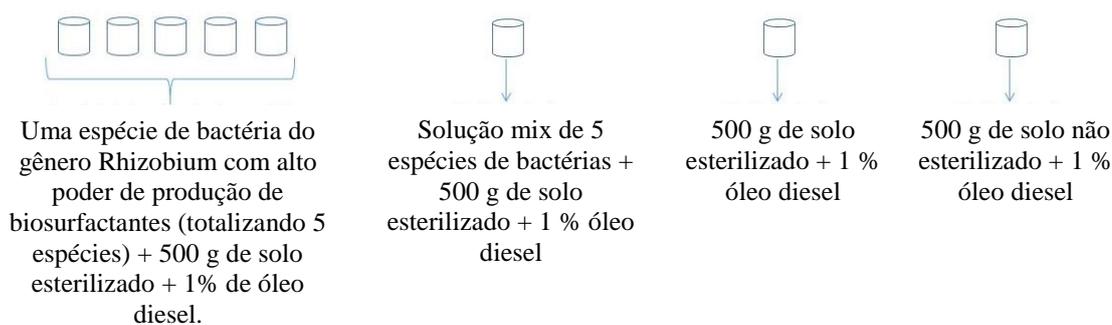


Figura 6. Esquema descrevendo o experimento de biodegradação utilizando como fonte de carbono o óleo diesel.

4.3 DETERMINAÇÃO DE HIDROCARBONETOS

A) EXTRAÇÃO DA FASE ORGÂNICA

As amostras de solo provenientes do experimento de biodegradação (10 g) – armazenadas em recipiente de alumínio e congeladas até a presente etapa–, foram homogeneizadas com 10 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), previamente submetido à descontaminação em forno mufla a $400\text{ }^\circ\text{C}$ por 4 horas. A extração foi realizada por ultrassom (Figura 7a), de acordo com o método USEPA 3550C, utilizando-se 20 mL de diclorometano com 3 repetições. Para controlar a eficiência do método foram adicionados os padrões de recuperação p-terfenil 250 ng L^{-1} para HPA. A redução dos extratos foi realizada em evaporador rotativo e fluxo contínuo de nitrogênio (Figura 7b), e após sua secagem total, estes foram constituídos com hexano até o volume final de 1,0 mL.



(a)



(b)

Figura 7. Ultrassom Limp Sonic (a) e Evaporador Rotativo de Fluxo Contínuo da marca Tecnal (modelo TE-211) utilizados para Extração das Amostras do Experimento de Biodegradação. Fonte: Arquivo Pessoal.

B) FRACIONAMENTO

Após extração e concentração do extrato, o processo de fracionamento foi realizado em coluna de cromatografia líquida de vidro com 1,4 cm de diâmetro interno, com 3 g de sílica gel ativada, 0,5 g de alumina 5% desativada (p/v) e cobre ativado (Figura 8b). A primeira fração contendo os compostos saturados foi eluída com 10 mL de hexano, e a segunda fração contendo os compostos aromáticos com 10 mL de mistura (1:4) de hexano e diclorometano (Figura 8c). As amostras foram reduzidas por fluxo contínuo de nitrogênio até o volume final de 1,0 mL.

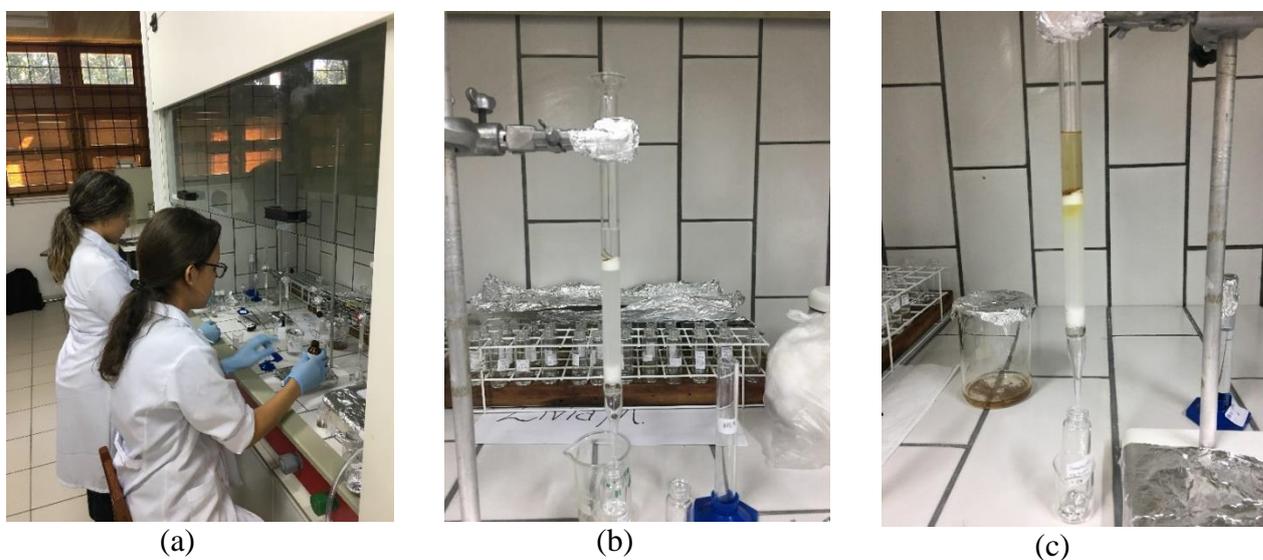


Figura 8. Realização do Fracionamento das amostras (a); coluna preparada para recebimento da amostra (b) e coluna contendo amostra em processo de fracionamento (c). Fonte: Arquivo Pessoal.

C) CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

A fração de HPA obtida na etapa do fracionamento foram transferidas para vials de 1,5 mL, que receberam a adição de 25 μL do padrão interno (Solução *mix* de naftaleno – d8, fenantreno – d10, criseno – d12, acenafteno – d10 e perileno – d12, na concentração de 250 ng L^{-1}).

A determinação dos compostos aromáticos (Descritos pela USEPA (Tabela 7)) foi realizada por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), utilizando um cromatógrafo gasoso e um espectrômetro de massas da marca Thermo Scientific, modelos foram, respectivamente: *Trace CG Ultra* e o *ISQ Single Quadrupole MS* (Figura 9), a coluna capilar utilizada foi uma DB5/MS (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm) de acordo com o método EPA 8270 D. As condições instrumentais de análise foram as que seguem:

- ✓ Gás carreador Hélio a 2,0 mL min^{-1} ;
- ✓ Injetor a 250°C;
- ✓ Condições de temperatura da coluna capilar:

Programação de temperatura em 50°C inicial, permanecendo por 5 min para, então, atingir 80°C a 5°C min^{-1} , elevando-se a uma temperatura final de análise de 280°C a 6°C min^{-1} , e permanecendo isoterma por 20 min.

- ✓ Fonte de ionização a 200°C;
- ✓ Full scan: 55-450 u.m.a.;
- ✓ Scan time: 0,45 seg
- ✓ Energia do feixe de elétrons: 70 eV;
- ✓ Corrente de emissão: 250 A



Figura 9. Cromatógrafo Gasoso Acoplado ao Espectrometro de Massas (CG-EM) – Thermo Scientific (Trace GC Ultra e o ISQ Single Quadrupole MS). Central Analítica – Laboratório de Cromatografia Gasosa (Lab-CG) – UFAM.

A quantificação destes HPA foi baseada na padronização interna – que consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um composto chamado padrão interno (RIBANI et. al, 2004). A Tabela 7 apresenta a lista dos compostos aromáticos quantificados, bem como seus respectivos tempos de retenção e padrões internos utilizados para a quantificação de cada HPA.

Tabela 7. Lista de HPA determinados indicados pela USEPA com suas respectivas abreviaturas, peso moleculares, íon prioritário, número de anéis, tempo de retenção e padrão interno para quantificação.

HPA	Abreviatura	Peso Molecular (g/mol)	Íon prioritário (m/z)	Nº Anéis	Tempo de Retenção	Padrão Interno (PI)
Naftaleno	Naf	128,17	128	2	15,14	Naftaleno-d ₈
Acenaftileno	Acet	152,20	152	3	21,78	Acenafteno-d ₁₀
Acenafteno	Ace	154,21	154	3	22,54	Acenafteno-d ₁₀

Fluoreno	Flu	166,22	166	3	24,55	Acenafteno-d ₁₀
Fenantreno	Fen	178,23	178	3	28,19	Fenantreno-d ₁₀
Antraceno	Ant	178,12	178	3	28,37	Fenantreno-d ₁₀
Fluoranteno	Fluo	202,26	202	4	32,78	Criseno-d ₁₂
Pireno	Pi	202,26	202	4	33,56	Criseno-d ₁₂
Benzo(a)antraceno	BaA	228,29	228	4	38,32	Criseno-d ₁₂
Criseno	Cri	228,29	228	4	38,45	Criseno-d ₁₂
Benzo(b)fluoranteno	BbFluo	252,32	252	5	42,22	Acenafteno-d ₁₀
Benzo(k)fluoranteno	BkFluo	252,32	252	5	42,30	Acenafteno-d ₁₀
Benzo(a)pireno	BaP	252,31	252	5	43,24	Perileno-d ₁₂
Benzo(ghi)perileno	BghiPeri	276,23	276	6	46,83	Perileno-d ₁₂
Benzo(a,h)antraceno	BahAntra	278,35	278	6	47,01	Perileno-d ₁₂
Indeno(1,2,3-cd)pireno	IPi	276,23	276	6	47,69	Perileno-d ₁₂

Fonte: Adaptação EPA – US 8270.

A identificação dos compostos se deu por meio da razão entre as áreas dos analitos e as áreas dos padrões internos deuterados, verificando seus respectivos tempos de retenção e massa do íon molecular.

D) PARÂMETROS DE CALIBRAÇÃO DO MÉTODO

Para a calibração do método, foram preparadas, em triplicata, 11 soluções com concentrações conhecidas, que foram utilizadas para a construção de curvas analíticas ao longo de duas faixas de trabalho (descritas a seguir), preparadas, em diclometano grau HPLC, a partir de duas soluções-mãe (2 e 200 mg mL⁻¹), resultando em duas curvas de calibração para o padrão de referência certificado contendo os 16HPA analisados, conforme exemplificado na Figura 10, a seguir.

- ✓ Faixa baixa: 50; 100; 250; 500; 750 e 1000 ng mL⁻¹
- ✓ Faixa alta: 1000; 5000; 7500; 10000 e 15000 ng mL⁻¹

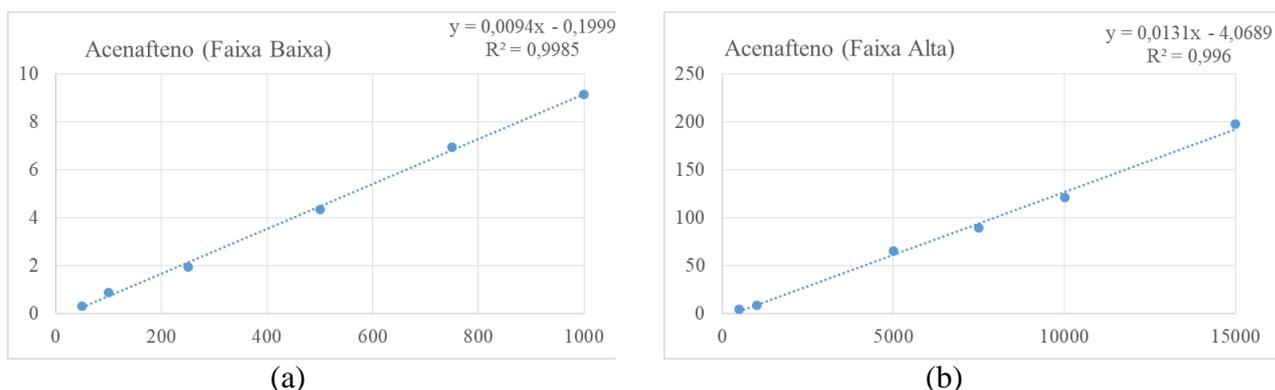


Figura 10. Curvas de Calibração do Acenaftheno. (a) Faixa Baixa (50; 100; 250; 500; 750 e 1000 ng mL⁻¹). (b) Faixa Alta (750; 1000; 5000; 7500; 10000 e 15000 ng mL⁻¹).

Destaca-se: para quantificação do fenantreno – HPA que esperava-se uma concentração maior que os demais, a curva alta foi realizada utilizando seis soluções nas concentrações de 1000; 5000; 7500; 10000, 15000 e 30000 ng mL⁻¹. Os HPA de maior peso molecular – benzo(ghi)perileno, benzo(a,h)antraceno e indeno(1,2,3-cd)pireno, tiveram sua curva baixa com as seguintes concentrações: 100; 250; 500; 750 e 1000 ng mL⁻¹. A regressão linear das retas obtidas foi realizada, e os parâmetros identificados foram listados na tabela 8. As curvas de calibração estão no Anexo I.

Tabela 8. Parâmetros para Linearidade.

HPA	Faixa Baixa		Faixa Alta	
	Equação da Reta	R ² *	Equação da Reta	R ² *
Naftaleno	0,0038x - 0,014	0,9951	0,005x - 2,2583	0,9905
Acenaftileno	0,0093x - 0,2427	0,9955	0,0134x - 5,5734	0,9952
Acenaftheno	0,0094x - 0,1999	0,9985	0,0131x - 4,0689	0,996
Fluoreno	0,006x - 0,2451	0,9931	0,0097x - 2,4882	0,9904
Fenantreno	0,0071x - 0,1247	0,9975	0,0091x + 6,9327	0,9925
Antraceno	0,0043x - 0,1703	0,9928	0,0081x - 4,8535	0,9889
Fluoranteno	0,005x - 0,2027	0,9948	0,0082x - 3,3431	0,9881
Pireno	0,0121x + 0,1434	0,9903	0,0135x - 2,2774	0,9924
Benzo(a)antraceno	0,0053x - 0,1058	0,9971	0,0093x - 6,7798	0,9906
Criseno	0,0073x - 0,0246	0,9991	0,0082x + 0,974	0,9948

Benzo(b)fluoranteno	0,0021x - 0,1121	0,9934	0,0057x - 4,7526	0,9864
Benzo(k)fluoranteno	0,0025x - 0,1835	0,9859	0,0064x - 3,9435	0,9926
Benzo(a)pireno	0,0059x - 0,4261	0,9903	0,0125x - 7,7581	0,9948
Benzo(ghi)perileno	0,0059x - 0,4261	0,9903	0,0125x - 7,7581	0,9948
Benzo(a,h)antraceno	0,0089x - 0,6541	0,9904	0,0179x - 8,8878	0,9948
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,0087x - 0,5433	0,9984	0,0165x - 8,2467	0,9929

*R²: Coeficiente de Correlação.

Um coeficiente de correlação maior que 0,999 - como observado na Faixa Baixa do Criseno (Tabela 9) é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão (RIBANI et. al, 2004). A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e, a grande maioria das curvas analíticas obtidas apresentaram coeficiente de correlação quadrado (R²) superior a 0,99, indicando, dessa forma, um ajuste ideal dos dados.

A exatidão do método foi determinada por meio do ensaio de tendência/recuperação conforme INMETRO-DOQCGCRE-008 (2010) utilizando o padrão p-terfenil na concentração de 250 ng mL⁻¹, com o intuito de verificar as perdas do analito que ocorrem na extração. Os resultados variaram de 69,93% a 142,88%, e apresentaram média de 113,54%, sendo considerado aceitável para o método. O cálculo foi obtido através da equação a seguir (1), expresso em recuperação analítica:

$$\%Recuperação = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor esperado}} \times 100 \quad (1)$$

Foram feitos os cálculos do limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), que consistem, respectivamente, na menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas; e na menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas (BRITO et al., 2003).

Para determinação do LD do método foram analisadas sete amostras preparadas com material branco com menor quantidade de analito. O mesmo foi calculado a partir da equação

(2). O valor de 3,143 é obtido a partir da distribuição de *Student* (unilateral), e corresponde a 99% de confiança e 6 graus de liberdade. O DP_a corresponde ao desvio padrão do intercepto com o eixo Y.

$$LD = Média_{B.A.} + (Dpax3,143) \quad (2)$$

O cálculo do LQ do método utilizou-se o primeiro ponto da curva. O mesmo foi calculado a partir da equação (3).

$$LQ = Média_{1^{\circ}Ponto} + Dpax10 \quad (3)$$

Os valores de LD e LQ encontrados para cada HPA estão descritos na Tabela 9. Os dados utilizados para o cálculo do LD e LQ constam no Anexo I.

Tabela 9. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) do método em ng mL⁻¹

HPA	LQ	LD
	ng mL ⁻¹	
Naftaleno	13,66	2,55
Acenaftileno	14,08	0,88
Acenafteno	16,71	4,65
Fluoreno	16,62	2,68
Fenantreno	13,57	2,80
Antraceno	48,08	1,65
Fluoranteno	55,46	2,14
Pireno	12,79	3,46
Criseno	16,68	2,08
Benzo(b)fluoranteno	55,10	2,24
Benzo(k)fluoranteno	61,60	1,59
Benzo(a)pireno	56,06	2,10
Benzo(ghi)perileno	125,26	1,45
Benzo(a,h)antraceno	105,33	2,49
Indeno(1,2,3-cd)pireno	104,51	3,22

Os resultados de LD dos HPA variaram em torno de 0,88 ng mL⁻¹ para acenaftileno a 4,65 ng mL⁻¹ para acenafteno. Os valores de LQ, variaram entre 12,79 ng mL⁻¹ para pireno a

125,47 ng mL⁻¹ para benzo(ghi)perileno. E, a determinação desses parâmetros permitiu que se estabelecesse até que nível de concentração dos HPA o método utilizado é confiável.

4.4 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Diante da obtenção dos resultados, foi realizado teste estatístico ANOVA (Análise de Variância), utilizando o software ORIGIN PRO 2017, que é um método estatístico utilizado para comparar as médias de populações diferentes, a fim de verificar se existem diferenças significativas entre elas.

O objetivo da aplicação da ANOVA, para o tratamento de dados nesta pesquisa, é avaliar o potencial de remoção dos HPA nas amostras utilizadas, observando se existem diferenças significativas entre as médias dos potenciais de remoção dos HPA de cada bactéria e do consórcio entre elas com relação ao potencial médio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS NAS AMOSTRAS DO EXPERIMENTO

5.1.1 IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DOS HPA

A identificação dos HPA foi realizada através da comparação das áreas dos picos dos padrões internos (solução *mix* de naftaleno – d8, fenantreno – d10, criseno – d12, acenafteno – d10 e perileno – d12), com as áreas dos picos dos compostos presentes nas amostras, levando em consideração os a comparação com a biblioteca de dados do equipamento, bem como os espectros de massas de cada composto.

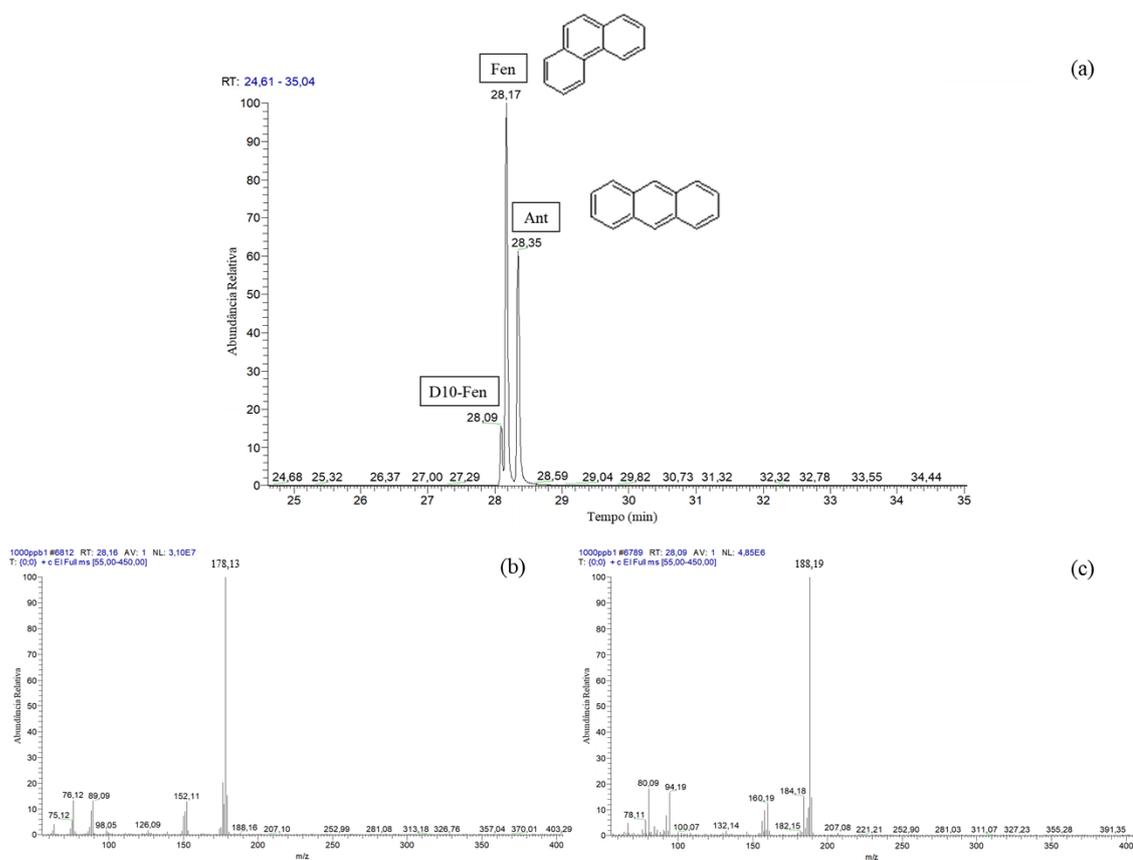


Figura 11. Cromatograma do fenantreno, antraceno, e fenantreno dos padrões deuterados (a), e seus respectivos fragmentogramas com os íons m/z 178 – referente ao fenantreno e antraceno (b); e m/z 188 – referente ao fenantreno deuterados (c).

A figura 11 – a título de exemplificação, mostra o cromatograma referente ao fenantreno e ao antraceno – que possuem íon primário comum (m/z 178), cujo fragmentograma está representado na figura 12a, e do fenantreno-D10 – padrão interno utilizado para quantificação dos referidos HPA, cujo íon primário é o m/z 188 – fragmentograma representado na figura 12c.

Foi realizada a análise da amostra de diesel utilizada para a realização desta pesquisa e, nela, foram identificados apenas 05 dos 16 HPA classificados pela USEPA como poluentes prioritários, quais foram: acenafteno, fluoreno, fenantreno, criseno e benzo(a)pireno.

Os mesmos HPA encontrados na amostra de óleo diesel também foram identificados nas amostras de biodegradação e, a partir da quantificação desses compostos nos seis tempos de experimento (0, 2, 5, 10 e 21 dias), foi possível apontar as taxas de degradação de cada um deles, bem como a de seu somatório nas amostras. Em todas as amostras analisadas o fenantreno apresentou maior concentração em relação aos demais HPA determinados (Figura 12).

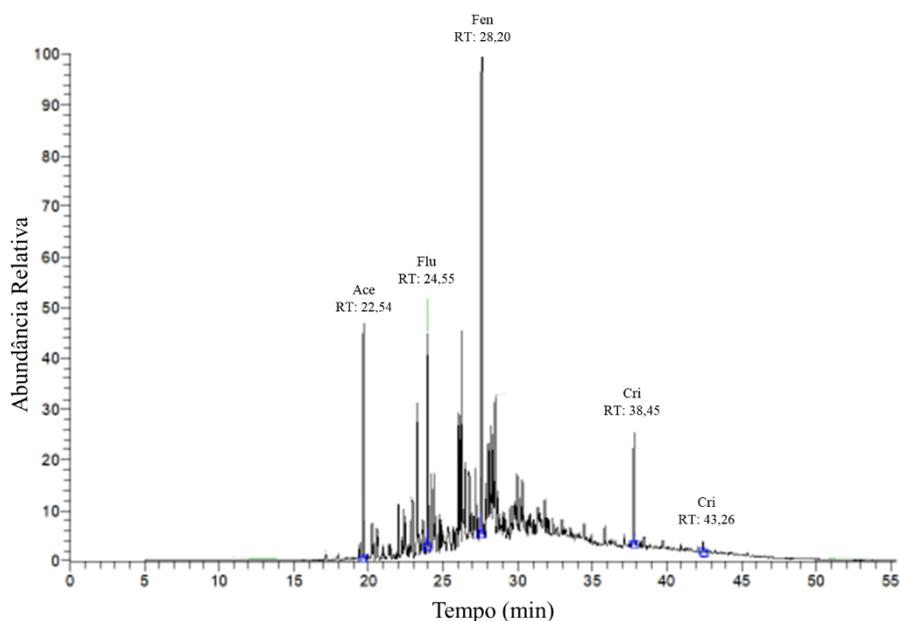


Figura 12. Cromatograma demonstrando a predominância do fenantreno sob processo de biodegradação em amostra de solo contendo diesel e o consórcio de 5 Rizobactérias.

A partir das concentrações dos individuais dos 5 HPA, bem como do seu somatório (Σ HPA), nas amostras de biodegradação, foi possível calcular as taxas de degradação (%) dos compostos, segundo a equação (4):

$$\%Degradação = \frac{Concentração\ Inicial - Concentração\ Final}{Concentração\ Inicial} \times 100 \quad (4)$$

5.1.1 EXPERIMENTO DE BIORREMEDIAÇÃO

Das cinco espécies de rizobactérias testadas neste experimento, duas apresentaram diminuição das concentrações do Σ HPA, a espécie INPA R574 diminuiu a concentração total de HPA de 5903,42 ng g⁻¹ para 2419,12 ng g⁻¹ – redução de 57,37% em relação à concentração inicial; a espécie INPA R598 apresentou concentração total de HPA de 4075,52 ng g⁻¹ no tempo zero e 2488,60 ng g⁻¹ – redução de 41,53% após o período de 21 dias. O consócio com as cinco espécies diminuiu a concentração inicial do Σ HPA de 4301,72 ng g⁻¹ para 2759,76 ng g⁻¹ no período final (Figura 13).

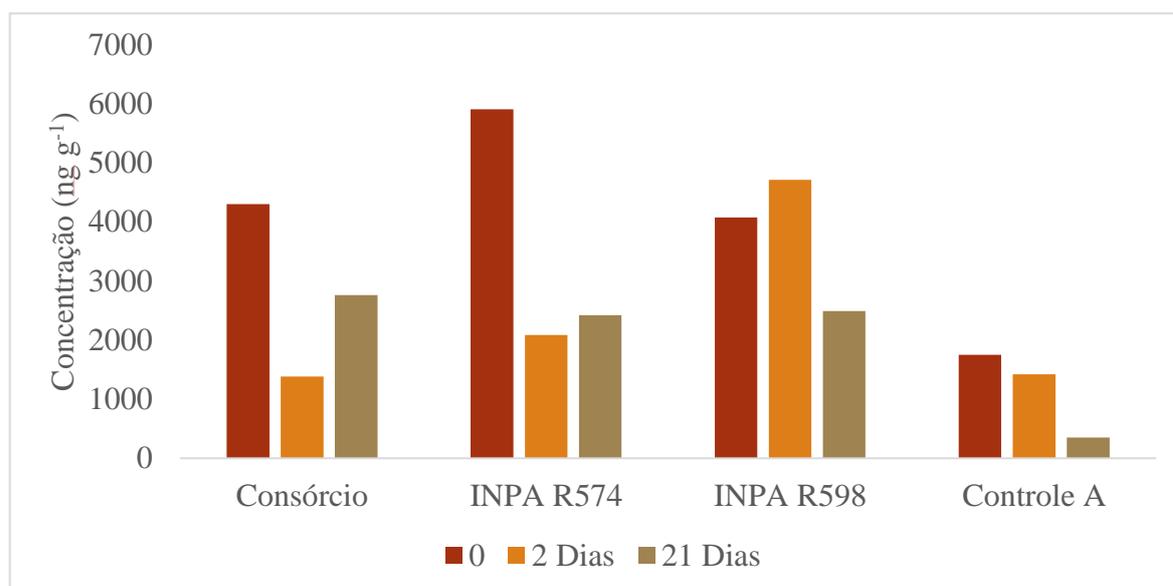


Figura 13. Concentração do Σ HPA nos tempos inicial (0), 2 e 21 dias para o consócio das 5 espécies de bactéria, a espécie INPA R574, a INPA R598 e o Controle A.

A amostra controle A – com 500g de solo natural e a fonte de carbono, também apresentou diminuição da concentração do Σ HPA de 1751,77 ng g⁻¹ para 353,94 ng g⁻¹ (79,80%), bem como na concentração individual dos HPA encontrados na amostra, sugerindo que os nutrientes adicionados ao controle favoreceram o crescimento de bactérias nativas do solo que foram capazes de degradar o óleo, sendo, dessa forma, aplicável ao ambiente em que foi coletado o solo, a técnica de bioestimulação, onde ocorre a introdução de nutrientes essenciais para estimular a degradação microbiana do petróleo (WANG et. al, 2016; GUARINO et. al., 2016; JACQUES et. al, 2007; TONINI et. al, 2010). A amostra controle B, que utilizou o solo autoclavado e o diesel, não apresentou taxa de degradação, conforme esperado.

5.1.2 DEGRADAÇÃO DO Σ HPA DAS AMOSTRAS DE BIODEGRADAÇÃO

Em relação à concentração inicial do Σ HPA (Tabela 10), os maiores percentuais de degradação se deram no tempo de 2 dias, onde as bactérias INPA R574 e INPA R546 apresentaram percentuais de 62,15% e 35,11%, respectivamente. A bactéria INPA R568 apresentou percentual de degradação de 9,55%. Apenas as bactérias INPA R598 e INPA R548 não apresentaram taxas de degradação no tempo de 2 dias.

Tabela 10. Percentual de degradação do Σ HPA nos tempos de 2 a 21 dias.

Tempo (dias)	Consórcio	INPA R574	INPA R598	INPA R546	INPA R548	INPA R568
		%				
2	64,44	62,15	-11,12	35,11	-38,76	9,55
5	40,84	61,95	-43,69	18,35	-36,19	-23,57
10	1,66	53,68	-21,04	14,46	-80,12	-17,55
15	38,42	50,82	-1,11	29,42	42,53	-64,52
21	35,20	57,37	41,53	7,88	-23,03	-48,04

*Valores negativos representam aumento na concentração dos HPA em relação ao tempo final.

Os valores negativos representam aumento na concentração dos HPA, quando comparado à concentração inicial (Tempo 0). Dentre os fatores que podem influenciar para tal fenômeno, destaca-se o processo de diagênese recente – pois é onde ocorre a transformação da matéria orgânica pela ação microbiana, portanto, aumento na concentração de HPA (SAMANTA et al., 2002).

A alta eficiência de degradação de compostos complexos por alguns microrganismos em pequenos intervalos de tempo – como observado nos primeiros 2 dias de experimento, acontece pelo fato de que certas espécies, quando submetidas a altas concentrações de HPA complexos e são desprovidos de fontes de carbono simples, tornam-se totalmente dependentes de compostos complexos, aumentando a especificidade e eficiência de degradação (PINHATI et al., 2014).

O percentual de degradação do Σ HPA encontrados no solo após dois dias, quando na atuação do consórcio de bactérias, foi de 64,44% – o maior, quando observadas as bactérias individualmente. Em comparação, Mao et al. (2012) observaram, após 56 dias de incubação, 20,2% e 35,8% de remoção do Σ HPA do solo com a adição de 10% e 20%, respectivamente, de uma suspensão de consórcio bacteriano.

No solo, há sempre uma mistura de HPA, e a aplicação de uma única bactéria pode não ser eficaz para a biorremediação do ambiente impactado. Para isso, o consórcio de vários microrganismos pode ser mais adequado (SHARMA et al., 2016).

A bactéria que apresentou maior potencial de degradação no Σ HPA foi a INPA R574, a qual se destacou em todos os tempos do experimento, apresentando taxas que variaram de 50,82% a 62,15%. Nos tempos de 5 e 10 dias, tal bactéria degradou 61,95% e 53,68% do Σ HPA. No entanto, as espécies INPA R598, INPA R548 e INPA R568 não o fizeram nesses dois últimos períodos mencionados de experimento.

Nem todas as espécies apresentaram taxas de degradação em todos os tempos estudados, com exceção da espécie INPA R574, no entanto todas demonstraram-se capazes de degradar tais compostos em determinado tempo de experimento. A bactéria INPA R548, apesar de demonstrar taxa de degradação somente após 15 dias, degradou 42,53% do Σ HPA. No tempo final do experimento (21 dias), a bactéria INPA R574 havia degradado 57,37% dos HPA presentes nas amostras, enquanto que a bactéria INPA R598 degradou 41,53%. As bactérias INPA R546, INPA R548 e INPA R568 não apresentaram taxas de degradação após 21 dias, influenciando desta forma no percentual de degradação do consórcio, que foi de 35,20%.

As bactérias INPA R574 e INPA R598 – que apresentaram as maiores taxas de degradação após os 21 dias de experimento – quando em atuação isolada – também foram espécies que apresentaram maior crescimento em meio YMA com petróleo como fonte de carbono, levando em consideração às demais estudadas (BRITO, 2013), mostrando com isso que essas bactérias são potenciais degradadoras de hidrocarbonetos.

A bactéria INPA R574, que apresentou maior taxa de degradação em relação às demais e ao consórcio após 21 dias, segundo Brito (2013), foi a espécie – dentre as cinco estudadas, que apresentou maior espessura da camada emulsificante no teste para avaliar a atividade de emulsificação. Quanto mais espessa, maior a quantidade de biossurfactantes hidrofóbicos produzidos. Os biossurfactantes tornam o contaminante mais biodisponível, aumentando, dessa forma, a capacidade para degradá-los. Além disso, no teste utilizando indicador DCPIP realizado por Brito (2013), a espécie INPA R574 apresentou nota 5 (descoloração quase total), indicando que a mesma possui maior potencial em relação às demais analisadas para degradar HPA em locais contaminados, o que vai de acordo com os resultados obtidos nesta pesquisa.

5.1.3 DEGRADAÇÃO INDIVIDUAL DOS HPA DAS AMOSTRAS DE BIODEGRADAÇÃO

Considerando que os maiores percentuais de degradação se deram no tempo de dois dias, observou-se que a eficiência de degradação individual dos HPA do consórcio de bactérias foi bem semelhante à atuação do microrganismo INPA R574, destacando-se apenas no que diz respeito à degradação de Fen, Cri e BaP (Figura 14a). No entanto, após 21 dias, a atuação da bactéria INPA R574 foi bem mais relevante para a degradação individual dos cinco compostos analisados, bem como a do Σ HPA (Figura 14b).

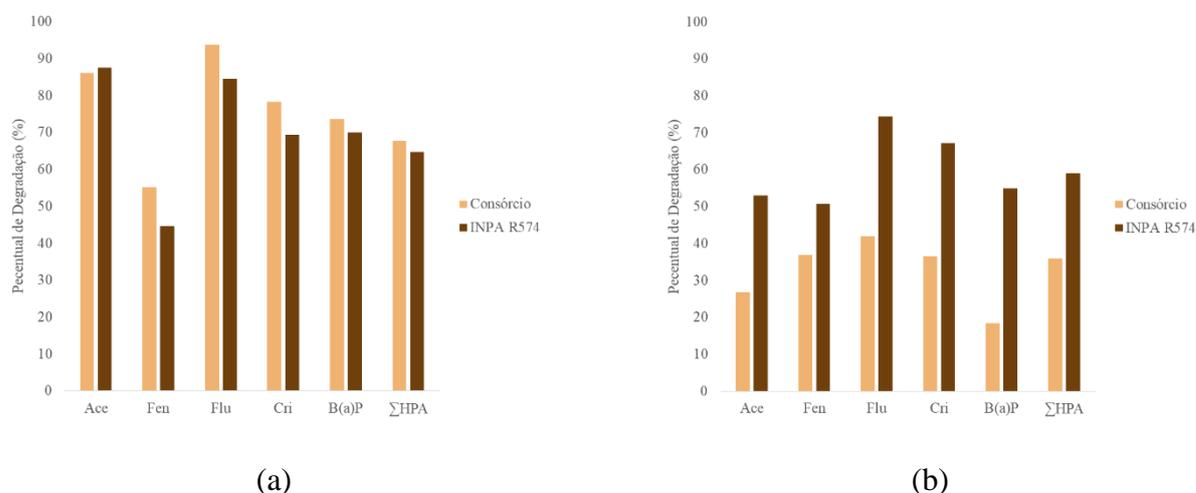


Figura 14. Percentual de degradação individual dos HPA encontrados no experimento de degradação pela atuação do consórcio de bactérias e pelo isolado INPA R574 após 2 (a) e 21 dias (b).

Após dois dias de experimento, o HPA que apresentou maior taxa de degradação pela atuação da espécie INPA R574 e pelo consórcio foi o ACE – aromático de menor peso molecular dentre os cinco observados no experimento, seguido de FLU, CRI, FEN e BaP.

Acenafteno e Fluoreno foram os HPA que apresentaram maior percentual de degradação dentre aqueles que foram encontrados no experimento do diesel. Após o segundo dia de experimento, bactéria INPA R574 foi capaz de degradar 86,47% de Ace e 79,72% de Flu e o consórcio de bactérias degradou 84,11% e 78,39% de Ace e Flu, respectivamente – valores abaixo da bactéria INPA R574, que também apresentou destaque na

degradação desses HPA. Os resultados foram relevantes quando comparados aos de Alegbeleye, Opeolu e Jackson (2016) que observaram a atuação da bactéria *P. aeruginosa*: capaz de degradar 70,90% de Flu e 48,89 de Ace, após 14 dias de experimento.

Tanto nos períodos de dois e após 21 dias, em se tratando da degradação de Ace e Flu, o maior desempenho deu-se pela bactéria INPA R574. Após dois dias de experimento, a maioria das bactérias – com exceção da INPA R548, apresentaram potencial para a degradação de acenafteno. Em se tratando degradação do fluoreno, além da INPA R548, a espécie INPA R598 também não apresentou taxa de degradação. No entanto, apesar de as demais espécies terem apresentado potencial para degradação no tempo de dois, não o fizeram após 21 dias, onde apenas o consórcio e as bactérias INPA R574 e INPA R598 (sendo esta apenas para Ace) apresentaram taxas de degradação relevantes para estes HPA.

O fenantreno, um dos principais componentes dos derivados do carvão e dos combustíveis fósseis, não apresenta risco para a saúde humana, mas é tóxico para peixes e algas. Sua toxicidade e persistência o tornam crucial nos estudos de biorremediação. (WAIGI et al., 2015; SUPAKA et al., 2000). Após dois dias de experimento, esse HPA foi degradado 55,19% no consórcio e 44,65% pelo isolado INPA 574 (Tabela 11), o qual após 21 dias, atuou na degradação de 50,73% deste HPA (Tabela 12).

Tabela 11. Taxas de degradação dos HPA nas amostras provenientes da degradação microbiana após 2 dias de experimento.

Isolado	Ace	Fen	Flu	Cri	B(a)P	∑HPA
				%		
INPA R574	87,50	44,58	84,40	69,36	69,97	64,67
INPA R598	56,96	-75,42	-28,90	-111,15	-171,47	-15,53
INPA R546	34,78	26,14	42,58	55,52	26,96	36,24
INPA R548	-15,57	-24,45	-75,95	-72,27	-105,31	-41,77
INPA R568	-2,18	9,31	0,46	28,15	29,73	10,34
Consórcio	86,10	55,12	93,68	78,24	73,66	67,80
Controle A	62,64	37,88	11,14	17,95	29,75	18,77
Controle B	51,89	23,45	-108,53	-480,35	-314,53	-130,00

*Valores negativos representam aumento na concentração dos HPA em relação ao tempo final.

Em se tratando de pesquisas que verificaram a degradação de Fen por bactérias, destaca-se: Pinhati et al. (2014), que observaram a remoção de 47% do fenantreno após 30 dias de experimento, pela atuação do isolado por *B. flexus*, e Yessica et al. (2013) verificaram que o isolado *R. tropici* CIAT 89 contribuiu para a degradação de 50% de Fen, além de 45% de BaP após 120h de experimento.

Tabela 12. Taxas de degradação dos HPA nas amostras provenientes da degradação microbiana após 21 dias de experimento.

Isolado	Ace	Fen	Flu	Cri	B(a)P	Σ HPA
INPA R574	52,95	50,68	74,32	67,09	54,84	59,02
INPA R598	92,91	11,14	-83,86	25,41	9,88	38,94
INPA R546	-150,00	-48,50	-51,17	6,95	-24,64	-46,49
INPA R548	-188,14	4,44	-45,51	-17,41	-33,52	-24,90
INPA R568	-3,17	-34,29	-129,40	-42,48	-33,18	-52,05
Consórcio	26,82	36,94	42,02	36,49	18,32	35,85
Controle A	97,87	60,19	76,82	85,82	84,21	79,80
Controle B	-89,17	-16,75	-185,19	-232,78	-64,18	-162,06

*Valores negativos representam aumento na concentração dos HPA em relação ao tempo final.

Em se tratando do BaP – HPA de alto peso molecular e poluente orgânico persistente, de grande interesse ambiental devido à sua conhecida carcinogenicidade e pelo seu potencial de bioacumulação (RENTZ; ALVAREZ; SCHNOOR, 2007), as duas espécies que apresentaram potencial de degradação no Σ HPA após 21 dias de experimento: INPA R574 e INPA R598, também reduziram de maneira significativa a concentração de BaP (Tabela 12). A espécie INPA R574 degradou 33,35% de BaP após os 21 dias de experimento, o isolado INPA R598 32,35%, enquanto o consórcio com as 5 bactérias degradou 19,74%. Em dois dias de experimento, a taxa de degradação de BaP foi de 37,31% e 31,21% quando na atuação do consórcio e da bactéria INPA R574 respectivamente.

Os resultados da degradação do BaP encontrados no experimento realizado foram bastante relevantes quando em comparação aos de Hui et al. (2012) que verificaram a redução de 31,8% desse HPA pela bactéria *A. oxydans* após 5 dias de degradação e o de Baldantoni et.

al (2017) que observaram a redução de aproximadamente 36% deste HPA após 36 dias de experimento.

Em se tratando da degradação do Criseno, o consórcio obteve destaque, com 75,21% de Cri degradado após 2 dias de experimento, seguindo da bactéria INPA R 574 (67,19%) e INPA R546 (54,01%). Apenas as bactérias INPA R598 e INPA R548 não apresentaram taxa de degradação para este HPA. No entanto, após 21 dias de experimento a bactéria INPA R574 continuou se destacando apresentando taxa de degradação para o CRI de 65,45%. Em comparação, Hadibarata, Tachibana e Itoh (2008) observaram a degradação de 65% de criseno, no entanto pela atuação da espécie de fungo *Polyporus sp. S133*.

Ao considerar a identificação taxonômica das rizobactérias utilizadas para a realização desse estudo: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Bacillus* – todas com potencial para uso em processos de biorremediação (ANDREONI et. al, 2004; AZEVEDO, 2008; SUN et al., 2014), destaca-se que: as duas bactérias que apresentaram maior potencial após 21 dias de experimento (INPA R574 e INPA R598) não possuem a mesma identificação taxonômica e a única espécie que não apresentou potencial para degradação dos HPA estudados (INPA R548) possui a mesma identificação taxonômica daquela que se destacou das demais (INPA R574) (Tabela 13).

Tabela 13. Identificação taxonômica das espécies de rizobactérias por ordem decrescente de potencial de degradação de HPA.

POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO	CÓDIGO	ESPÉCIE
<p>Maior Potencial</p> <p>↑</p> <p>Menor Potencial</p>	INPA R574	<i>Bradyrhizobium</i>
	INPAP2 R598	<i>Lysinibacillus/Bacillus</i>
	INPA R546	<i>Paenibacillus</i>
	INPA R568	<i>Bradyrhizobium</i>
	INPA R548	<i>Bradyrhizobium</i>

Isso ocorre porque cada população microbiana necessita de condições ambientais específicas para realizar a biodegradação de um contaminante, caso contrário, tal população entra em estado de latência até que as condições ideais sejam disponibilizadas (AZEVEDO, 2008).

O estudo da degradação dos HPA pela atuação individual das bactérias utilizadas nesta pesquisa mostrou que as bactérias INPA R574 e INPA R598 foram as únicas capazes de degradar o Σ HPA após o tempo final de experimento, no entanto, após dois dias, além dessas, os microrganismos INPA R548, INPA R598 e INPA R546 também apresentaram potencial, possibilitando, dessa forma, considerar que é necessário o estudo individual de cada microrganismo para ser possível verificar aqueles que mais se adequam para a atuação na degradação de cada grupo de compostos aromáticos. O que pode possibilitar – a longo prazo, a criação de um banco de dados dessas espécies para a utilização das mesmas em processos de biorremediação tanto em casos acidentais, como para a remediação de matrizes contaminadas gradualmente (AZEVEDO, 2008).

5.2 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Diante da obtenção dos resultados, foi realizado o teste estatístico ANOVA (Análise de Variância), que é um método estatístico utilizado para comparar as médias de populações diferentes a fim de verificar se existem diferenças significativas entre elas.

No entanto, para a realização desse teste, seria necessário que os erros tivessem distribuição normal e que existisse uma homocedasticidade entre os tratamentos, ou seja, as variâncias precisariam ser homogêneas.

Para verificar a homogeneidade das variâncias foi utilizado o teste de Levene. Como o p-valor foi maior que 5% ($p = 0,2243$) não temos evidência significativa para rejeitar a hipótese nula de homogeneidade, ou seja, nossos dados possuem homogeneidade de variância.

Para verificar a normalidade dos resíduos, utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk cuja hipótese nula é a de que os dados seguem uma distribuição normal. Como o p-valor foi superior ao limite de 5% ($p= 0,000106$), aceita-se a hipótese nula e considera-se os dados normais.

Portanto, considerando que os pressupostos para a realização da ANOVA foram atendidos (ANEXO IV), procedeu-se a realização da mesma por meio do software ORIGIN e os resultados mostram que o valor de p foi menor que o nível de significância estabelecido de 0,05 (Tabela 14) – possibilitando a interpretação da veracidade da existência de uma diferença significativa, no que diz respeito à atuação individual das bactérias e do consórcio para a degradação dos HPA, e tem-se evidências de ao menos uma bactéria se diferenciar das demais.

Tabela 14. Tabela de análise dos efeitos de interação ANOVA para a degradação do Σ HPA pela atuação das 5 bactérias e do consórcio nos tempos de 2, 5, 10, 15 e 21 dias.

Fonte de Variação	gl	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	Valor P
Tratamentos	5	30974,78	6194,96	8,39	1,06E-04
Resíduos	24	17725,34	738,6		
Total	29	48700,12			

Sabe-se que muitas bactérias são capazes de metabolizar diferentes poluentes orgânicos, no entanto, uma única bactéria pode não possuir a capacidade enzimática para degradar todos, ou mesmo a maioria dos compostos orgânicos em um ambiente poluído (PINHATI, 2014), porque mesmo que pertençam à mesma família, as bactérias podem atuar de forma diferente na degradação de um mesmo contaminante.

Os resultados obtidos através da análise estatística vão de acordo com aqueles obtidos no experimento de biodegradação, pois observou-se que a atuação individual das espécies INPA R574 e INPA R598, após o tempo final do experimento de biodegradação, foi mais significativa, no que se refere às taxas de degradação dos HPA, em relação aos demais

microrganismos estudados: INPA R546, INPA R548 e INPA R568 – os quais apresentaram aumento na concentração dos HPA identificados nas amostras de solo contaminado com óleo diesel quando observado o tempo inicial do experimento.

Dessa maneira, a estatística aplicada corrobora com fato de que a atuação de cada rizobactéria para a degradação dos HPA detectados se deu de maneira diferente para a degradação do Σ HPA presentes nas amostras de solo contaminado por diesel.

6. CONCLUSÕES

Através da quantificação dos 16 HPA, foi possível fazer a identificação de cinco HPA presentes nas amostras de solo contaminado por diesel nos diferentes tempos de zero, 2, 5, 10, 15 e 21 dias, e, dessa forma, foi possível avaliar o potencial de biodegradação dos cinco isolados de rizobactérias utilizados para a realização desta pesquisa.

As maiores taxas de biodegradação dos HPA, identificados no experimento, apareceram nas amostras coletadas com dois dias de experimento. A amostra com adição do consórcio com os cinco isolados de bactérias obteve maior potencial de degradação nesse período (64,03%), quando sua atuação superou as taxas de degradação do Σ HPA daquelas com atuação individual das bactérias.

A análise do potencial de biodegradação das bactérias de maneira individual permitiu a identificação do isolado com maior potencial de biodegradação e a identificação daquele que apresentou maior influência no potencial do consórcio.

Dentre as bactérias estudadas, após dois dias de experimento, o microrganismo INPA R574 foi o que apresentou maiores taxas de degradação tanto para o Σ HPA (62,15%), quanto para os 5 HPA individuais identificados (86,4% para Ace; 79,92% para Flu; 67,19 para Cri), e o microrganismo INPA R548 foi o que não contribuiu de maneira significativa para a degradação de nenhum dos contaminantes estudados, bem como do seu somatório.

A amostra controle A – com 500g de solo natural e diesel, apresentou taxas de degradação bem relevantes, sugerindo que os nutrientes adicionados ao controle favoreceram o crescimento de bactérias nativas do solo que foram capazes de degradar os HPA do diesel adicionado às amostras, e a amostra controle B, que utilizou o solo autoclavado e o diesel, não apresentou taxa de degradação conforme esperado.

A espécie INPA R574, que apresentou maiores taxas de degradação, é uma estirpe que pode ser estudada e possui um potencial de grande valor econômico para ser utilizada

como inoculante, visto que, além de ser uma espécie adaptada ao ambiente local, também demonstrou maiores eficiências, habilidade competitiva e tolerância às condições de estresses e capacidade de degradar os HPA presentes no diesel.

Além disso, trata-se de uma espécie que apresenta um grande potencial para gerar bons resultados caso seja utilizada na técnica de bioaugmentação em solos de várzea da Amazônia, considerando os resultados do controle A.

Tendo em vista as poucas pesquisas realizadas sobre a biodegradação de HPA em solos de várzea e considerando as taxas de degradação dos rizobactérias utilizados nesta pesquisa, sugere-se o estudo específico das bactérias que apresentaram maior potencial para a degradação do Σ HPA – INPA R574 e INPA R598, com o intuito de verificar possível contribuição dessa bactéria para técnicas de bioaugmentação em solo de várzea da Amazônia contaminado – tendo em vista que somente com nutrientes adicionados ao controle, tais bactérias foram capazes de degradar os HPA do diesel.

Por fim, a análise estatística realizada permitiu a conclusão que foi diferente a atuação das bactérias, bem como do consórcio, para a degradação do Σ HPA presente nas amostras de solo, pois cada bactéria possui suas peculiaridades e características específicas que contribuem para os fatores que influenciam no processo de degradação.

7. REFERÊNCIAS

ACRÍTICA. Ipaam faz levantamento de dano ambiental após vazamento de óleo no Rio Negro. Disponível em: < <https://www.acritica.com/channels/governo/news/ipaam-faz-levantamento-de-dano-ambiental-apos-vazamento-de-oleo-no-rio-negro> > Acesso em: 05 mai. 2018.

AGUIAR, Rebeca Tibau. Avaliação física, química e microbiológica do diesel, biodiesel e suas misturas durante a logística de distribuição. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.

AHMAD, D.; MEHMANNAVAZ, R. & DAMAJ, M. Isolation and Characterization of Symbiotic N₂-Fixing Rhizobium meliloti from Soils Contaminated with Aromatic and Chloroaromatic Hydrocarbons: PAHs and PCBs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 39. N. I, p. 33-43. 1997.

ALEGBELEYE, O. O.; OPEOLU, B. O.; JACKSON, V. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds:(acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers, Western Cape, South Africa. *Brazilian Journal Of Microbiology*, v. 48, n. 2, p. 314-325, 2017.

ALMEIDA, F. M.; SOUZA, D. M.; LUIZ, J. G. Estudo da contaminação por hidrocarbonetos em postos de serviços de Abaetetuba-PA utilizando georadar. In: *10th International Congress of the Brazilian Geophysical Society*. 2007.

AL-MUJAHIDY, S. M. J., HASSAN, M. M., RAHMAN, M. M., & MAMUN-OR-RASHID, A. N. M. Isolation and characterization of Rhizobium spp. and determination of their potency for growth factor production. *International Research Journal of Biotechnology*. Vol. 47. p. 117-123, 2013.

ANA. Agência Nacional das Água. <<http://www.ana.gov.br/>>. Acesso em: 10 out. 2016.

ANDRADE, Juliano de Almeida; AUGUSTO, Fabio; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética química*, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.

ANDREONI, V., CAVALCA, L., RAO, M. A., NOCERINO, G., BERNASCONI, S., DELL'AMICO, E., GIANFREDA, L. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere*, v. 57, n. 5, p. 401-412, 2004.

ANJOS, Raoni Batista dos. *Avaliação de HPA e BTEX no solo e água subterrânea, em postos de revenda de combustíveis: estudo de caso na cidade de Natal-RN*. 2012. Dissertação (Ciência e Engenharia de Petróleo). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal.

ANP. Agência Nacional de Petróleo. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/>>. Acesso em: 10 out. 2016.

ANTAQ. Agência Nacional de Transportes Aquaviários. Transporte de cargas nas hidrovias Solimões-Amazonas em 2010. Brasília, 2011.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.

AYED, H. B., JEMIL, N., MAALEJ, H., BAYOUDH, A., HMIDET, N., & NASRI, M. Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 99, p. 8-14, 2015.

AZEVEDO, João Luicio et al. Microbiologia ambiental. Embrapa Meio Ambiente-Livro científico (ALICE), 2008.

AZEVEDO, Julie Anne Holanda; ARAÚJO, R. S.; SILVA, Glória Maria Marinho. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Atmospheric From Automotive Sources: A Brief Review. *Holos*, v. 29, n. 1, p. 102, 2013.

BAIRD, Colin; CANN, Michael. *Química ambiental*. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.

BALDANTONI, Daniela; MORELLI, R., BELLINO, A., PRATI, M. V., ALFANI, A.; DE NICOLA, F. Anthracene and benzo(a)pyrene degradation in soil is favoured by compost amendment: Perspectives for a bioremediation approach. *Journal of hazardous materials*, v. 339, p. 395-400, 2017.

BERNARDO, D. L., BARROS, K. A., SILVA, R. C., & PAVÃO, A. C. Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Química Nova*, v. 39, n. 7, p. 789-794, 2016.

BRASIL. Agência Nacional De Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. ANP. Resolução nº. 65, de 9 de dezembro de 2011.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº420, de 28 de dezembro de 2009.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.

BRITO, L.L. Degradação de petróleo por isolados de rizóbios da amazônia. 2013. Dissertação (Programa de pós-graduação em biotecnologia e recursos naturais da Amazônia – Escola de ciências da saúde). Universidade estadual do Amazonas, Manaus.

BRITO, N. M., JUNIOR, O. P. D. A., POLESE, L., & RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, 2003.

BUGG, T.D.H.; WINFIELD, C.J. Enzymatic cleavage of aromatic rings: mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. *Natural Product Reports*. p. 513-530. 1998.

CAMPOS, L. L., MARTINS, M. E., ELIAS NETO, N. e LOUREIRO, M.F. Caracterização fisiológica de rizóbios isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* spp. *Scientia Agraria Paranaensis*. v. 9, n. 3, p 75-84. 2010.

Van Cauwenberghe, J., Verstraete, B., Lemaire, B., Lievens, B., Michiels, J., & Honnay, O. Population structure of root nodulating *Rhizobium leguminosarum* in *Vicia cracca* populations at local to regional geographic scales. *Systematic and applied microbiology*, v. 37, n. 8, p. 613-621, 2014

CERQUEIRA, V. S., HOLLENBACH, E. B., MABONI, F., VAINSTEIN, M. H., CAMARGO, F. A., MARIA DO CARMO, R. P., & BENTO, F. M. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresource technology*, v. 102, n. 23, p. 11003-11010, 2011.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbios nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi- DOI: 10.4025/actasciagron. v32i1. 900. *Acta Scientiarum. Agronomy*, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2009.

CHAGAS-SPINELLI, A. C., KATO, M. T., DE LIMA, E. S., & GAVAZZA, S. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. *Journal of environmental management*, v. 113, p. 510-516, 2012.

CNT. Confederação Nacional do Transporte. Procedimentos para a preservação da qualidade do óleo diesel B – Brasília: CNT, 2011. Disponível em: <http://www.cntdespoluir.org.br/Documents/PDFs/Diesel_B_01jun2012.pdf> Acesso em: 07 jan. 2017.

CORSEUIL, Henry Xavier; MARINS, Marcus Dal Molin. Contaminação de águas subterrâneas por derramamentos de gasolina: o problema é grave. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 2, n. 2, p. 50-54, 1997.

D24am. Comboio com nove balsas se choca e provoca vazamento de óleo no rio Amazonas. Disponível em: <<http://new.d24am.com/noticias/amazonas/comboio-nove-balsas-choca-provoca-vazamento-oleo-amazonas/134973>> Acesso em: 10 jan. 2016.

DEON, M. C., DEROSI, A., DAL'MAGRO, C., REINEHR, C. O., & COLLA, L. M. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaugmentação e atenuação natural. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 33, n. 1, p. 73-82, 2012.

DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*. n. 7, p. 173-180. 2004.

FERREIRA, S. L., SANTOS, A. M. D., SOUZA, G. R. D., POLITO, W. L., & MÓDOLO, D. L. Análise por cromatografia gasosa de BTEX nas emissões de motor de combustão interna alimentado com diesel e mistura diesel-biodiesel (B10). *Química Nova*, v. 31, n. 3, p. 539-545, 2008.

FILIZOLA, Naziano; GUYOT, Jean Loup. Fluxo de sedimentos em suspensão nos rios da Amazônia. *Revista Brasileira de Geociências*, v. 41, n. 4, p. 566-576, 2011.

FOGAÇA, Paulo Henrique de Campos. *Contaminação do lençol freático por hidrocarbonetos na região de Avaré-SP*. 2015. 174 f. Dissertação (Engenharia Civil e Ambiental) Universidade Estadual Paulista. Bauru.

G1. Balsa tomba no rio negro e provoca vazamento de 15 mil litros de óleo. Disponível em: <<http://g1.globo.com/jornal-nacional/noticia/2013/03/balsa-tomba-no-rio-negro-e-provoca-vazamento-de-15-mil-litros-de-oleo.html>> Acesso em: 9 mar. 2018a.

__. Balsa tomba e causa vazamento de óleo no Rio Negro, no Amazonas. Disponível em: <<http://g1.globo.com/am/amazonas/noticia/2013/03/balsa-tomba-e-causa-vazamento-de-oleo-no-rio-negro-no-amazonas.html>> Acesso em: 09 mar. 2018b.

GUARINO, C., SPADA, V., & SCIARRILLO, R. Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioaugmentation–Assisted Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Chemosphere*, v. 170, p. 10-16, 2016.

HARA, F. A. dos S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Acta Amazônica*, Manaus, v. 34, n. 3, p. 343-357, 2005.

HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*, v. 169, n. 1, p. 1-15, 2009.

HEIDER, J.; FUCHS, G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *European Journal of Biochemistry*, n. 243, p. 577-596. 1997.

HUI, P. E. N. G.; HUA, Y. I. N.; JUN, D. E. N. G.; JIN-SHAO, Y. E.; SHUO-NA, C. H. E. N.; BAO-YAN, H. E.; ZHANG, N. Biodegradation of benzo[a]pyrene by *Arthrobacter oxydans* B4. *Pedosphere*, v. 22, n. 4, p. 554-561, 2012.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Relatório de Acidentes Ambientais de 2014. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/documentos/publicacoes>> Acesso em: 20 nov. 2016.

IEMA. Instituto de Energia e Meio Ambiente. Geração Termoelétrica e emissões atmosféricas: poluentes e sistemas de controle. 2016. Disponível em: <<http://www.energiaambiente.org.br/wp-content/uploads/2016/11/IEMA-EMISSOES.pdf>> Acesso em 30 mai. 2018.

INMETRO Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOC-CGCRE-008 Orientação sobre validação de métodos analíticos, Revisão 04, jul. 2011. Disponível em: . Acesso em: 02 abr. 2016

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

KADRI, T., ROUISSI, T., BRAR, S. K., CLEDON, M., SARMA, S., & VERMA, M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 2016.

KAIPPER, B. I. A Influência do etanol na solubilidade de Hidrocarbonetos Aromáticos em Aquíferos contaminados por óleo diesel. 2003. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

KANALY, R.A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of bacteriology*, v. 182, n. 8, p. 2059-2067, 2000.

KUPPUSAMY, S., THAVAMANI, P., VENKATESWARLU, K., LEE, Y. B., NAIDU, R., & MEGHARAJ, M. Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. *Chemosphere*, v. 168, p. 944-968, 2016.

LAHEL, A., FANTA, A. B., SERGIENKO, N., SHAKYA, M., LÓPEZ, M. E., BEHERA, S. K., ... & PARK, H. S. Effect of process parameters on the bioremediation of diesel contaminated soil by mixed microbial consortia. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 113, p. 375-385, 2016.

ŁEBKOWSKA, M., ZBOROWSKA, E., KARWOWSKA, E., MIAŚKIEWICZ-PĘSKA, E., MUSZYŃSKI, A., TABERNACKA, A., NAUMCZYK, J. & JĘCZALIK, M. Bioremediation of soil polluted with fuels by sequential multiple injection of native microorganisms: field-scale processes in Poland. *Ecological Engineering*, v. 37, n. 11, p. 1895-1900, 2011.

LEE, J. Y., & KWON, T. S. Application of a two-liquid-phase system for the remediation of diesel oil-contaminated soil. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2016.

LIMA, Maria Thereza da Silva Lopes; SOUZA, Marina Corrêa. Discorrendo Sobre o Uso das Termelétricas no Brasil. *Ciência e Natura*, v. 37, p. 17, 2015.

LIN, T. C., PAN, P. T., & CHENG, S. S. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, v. 176, n. 1, p. 27-34, 2010.

LOPES, Alcinei Pereira. Estudo de Hidrocarbonetos e Metais em Sedimentos de Fundo do Rio Negro na Orla Urbana de Manaus. 2010. Dissertação (Química Analítica). Universidade Federal do Amazonas. Manaus.

LUZ, C. C., SANTOS, E. A., SANTOS, M. O. S., MUSSY, M. Y., YAMASHITA, M., BASTOS, W. R., ... & REIS, M. G. Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho-RO, Amazônia. *Quim. Nova*, v. 34, n. 5, p. 775-779, 2011.

MAGALHÃES, R. C.; GOMES, R. C. M. Mineralogia e química de solo de várzea e suas susceptibilidades no processo de terras caídas na comunidade do Divino Espírito Santo-AM. *Soc. & Nat.*, Uberlândia, v. 25, 3, p. 609 -621, 2013.

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*, v. 70, p. 141-147, 2012.

MARIANO, Adriano Pinto. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 2006. / Adriano Pinto Mariano. – Rio Claro: [s.n.], 2006 162 f.: il.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Oecologia brasiliensis*, v. 11, n. 2, p. 188-201, 2007.

MELO, I. S. Rizobactérias na biodegradação. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTA_G01_62_210200792814.html> Acesso em 23 jan. 2017.

MELO, N. C., DE SOUZA, L. C., DA COSTA, C. A. S., COELHO, R., COVRE, W. P., & COSTA, D. L. P. Caracterização química de diferentes sistemas de uso do solo. *Revista Agroecossistemas*, v. 5, n. 2, p. 8-13, 2014.

MONTEIRO, Safi Amaro. Caracterização molecular e estrutural de biosurfactantes produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614. 2007. Tese. Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade Federal do Paraná.

NETTO, A. D. P., MOREIRA, J. C., DIAS, A. E. X. O., ARBILLA, G., FERREIRA, L. F. V., OLIVEIRA, A. S., & BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. *Química nova*, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.

OLIVEIRA, Rosiane Martins; ALVES, Fabiana. Diversidade microbiana utilizada na biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. *Acervo da Iniciação Científica*, n. 1, 2013.

OLIVEIRA, V. M., MANFIO, G.P. Molecular approaches for the screening of novel enzymes. *Enzyme Assays: High-throughput screening, genetic selection and fingerprinting*. p. 221-238, 2006.

PELETEIRO, T. S.; ROCHA, A.; SOUZA-MACHADO, A. Biodiesel: benefícios ao meio ambiente e possíveis danos à saúde—um paradoxo?. *Diálogos & Ciência*, v. 1, n. 37, 2016.

PETROBRAS. Disponível em: <<http://www.petrobras.com.br/pt/>>. Acesso em: 10 out. 2018.

PINHATI, F. R.; DEL AGUILA, E. M.; TÔRRES, A. P. R., DE SOUSA, M. P., SANTIAGO, V. M. J., SILVA, J. T.; PASCHOALINB, V. M. F. Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. *Quim Nov*, v. 37, p. 1269-1274, 2014.

RENTZ, Jeremy A.; ALVAREZ, Pedro JJ; SCHNOOR, Jerald L. Benzo[a]pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02. *Environmental pollution*, v. 151, n. 3, p. 669-677, 2008.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., & MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química nova*, 2004.

SAMANTA, Sudip K.; SINGH, Om V.; JAIN, Rakesh K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology*, v. 20, n. 6, p. 243-248, 2002.

SÃO PAULO. Decisão de diretoria 045/2014/E/C/I, de 20-02-2014. Diário Oficial de São Paulo. São Paulo. 2014.

SCRAMIN, S.; DENTZIEN, A.F.M.; MELO, I.S. Indução da enzima pirocatecase por *Acinetobacter baumannii* envolvida na biodegradação do herbicida Diuron. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, n. 13, p. 113-118. 2003.

SHARMA, Smiley; MALAVIYA, Piyush. Bioremediation of tannery wastewater by chromium resistant novel fungal consortium. *Ecological Engineering*, v. 91, p. 419-425, 2016.

SILVA, S. H.; NODA, S. N. A Dinâmica entre as águas e terras na Amazônia e seus efeitos sobre as várzeas/The effects on Amazon floodplains of the dynamics between the water and land. *Revista Ambiente & Água*, v. 11, n. 2, p. 377, 2016.

SILVA, T. A. L.; ARAÚJO, H. W. C.; TAMBOURGI, E. B.; SILVA, C. A. A.; TAKAKI, G. M. C. Potencial biotecnológico de uma nova linhagem de *Pseudomonas fluorescens* na produção de biossurfactante utilizando petróleo como substrato. *Exacta*, v. 7, n. 1, p. 31-37, 2009.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. Methods in legume-Rhizobium technology. *NifTAL Project and MIRCEN*, Hawaii, 365p. 1985.

SUN, R., BELCHER, R. W., LIANG, J., WANG, L., THATER, B., CROWLEY, D. E., WEI, G. Effects of cowpea (*Vigna unguiculata*) root mucilage on microbial community response and capacity for phenanthrene remediation. *Journal of Environmental Sciences*, v. 33, p. 45-59, 2015.

SUPAKA, N., PINPHANICHAKARN, P., PATTARAGULWANIT, K., THANİYAVARN, S., OMORI, T., & JUNTONGJIN, K. Isolation and characterization of a phenanthrene-

degrading *Sphingomonas* sp. strain P2 and its ability to degrade fluoranthene and pyrene via cometabolism. *Sci. Asia*, v. 27, n. 2, 2001.

TENG, Y.; SHEN, Y.; LUOA, Y.; SUNA, X.; SUNA, M.; FUA, D.; LI, Z.; CHRISTIE, P. Influence of *Rhizobium meliloti* on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil. *Journal of hazardous materials*, v. 186, n. 2, p. 1271-1276, 2010.

TONINI, R. M. C. W., REZENDE, C. E., & GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia Australis*, v. 14, p. 1027-1035, 2010.

USEPA. Environmental Protection Agency. 1986. Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods; Method 8270D – Semivolatile organic compounds by gas chromatography / massspectrometry – CD-ROM Internet. Edition, Disponível em: <www.epa.gov/SW-864/main.htm> Acesso em: 25 set. 2016.

USEPA. Environmental Protection Agency. 2007. Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods; Method 3550C – Ultrasonic extraction – CD-ROM Internet. Edition, www.epa.gov/SW-864/main.htm.

VINCENT, J. M. A manual for practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook N. 15. *Blackwell Scient. Publ.* 140p. 1970.

WAIGI, M. G., KANG, F., GOIKAVI, C., LING, W., & GAO, Y. Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 104, p. 333-349, 2015.

WANG, J., ZHANG, X., LING, W., LIU, R., LIU, J., KANG, F., & GAO, Y. Contamination and health risk assessment of PAHs in soils and crops in industrial areas of the Yangtze River Delta region, China. *Chemosphere*, v. 168, p. 976-987, 2016.

WEI, G.; YU, J.; ZHU, Y.; CHEN, W.; WANG, L. Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chrysopteru* in mining tailing region. *Journal of Hazardous Materials*, v. 151, n. 1, p. 111-117, 2008.

WU, M., LI, W., DICK, W. A., YE, X., CHEN, K., KOST, D., & CHEN, L. Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination. *Chemosphere*, v. 169, p. 124-130, 2016.

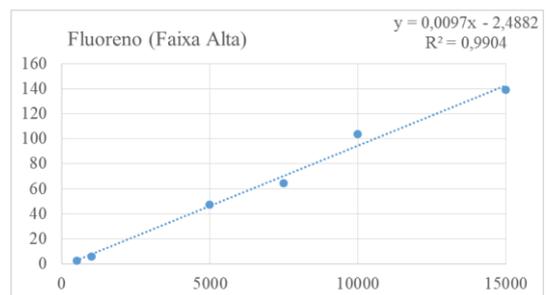
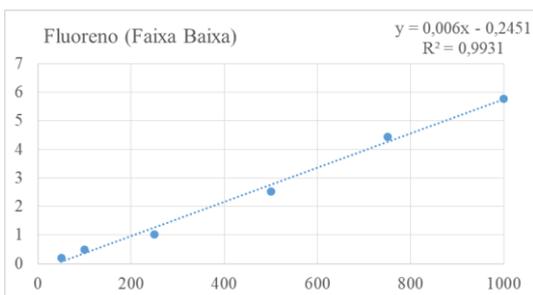
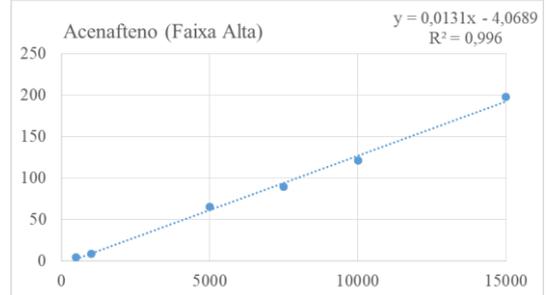
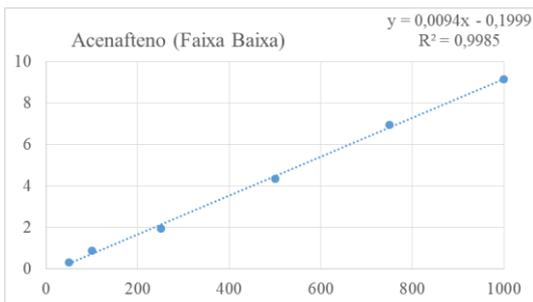
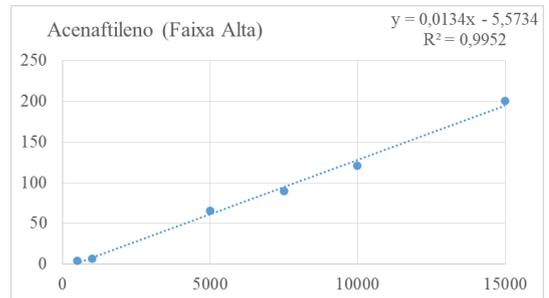
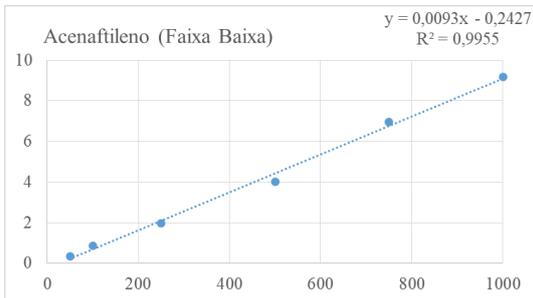
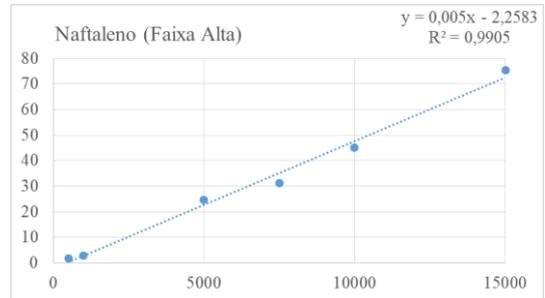
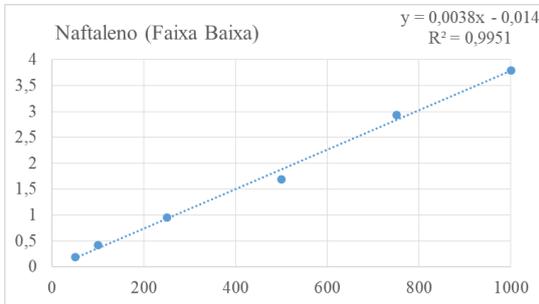
XU, P., TAO, B., YE, Z., ZHAO, H., REN, Y., ZHANG, T., HUANG, Y. & CHEN, J. Polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations, compositions, sources, and associated carcinogenic risks to humans in farmland soils and riverine sediments from Guiyu, China. *Journal of Environmental Sciences*, v. 48, p. 102-111, 2016.

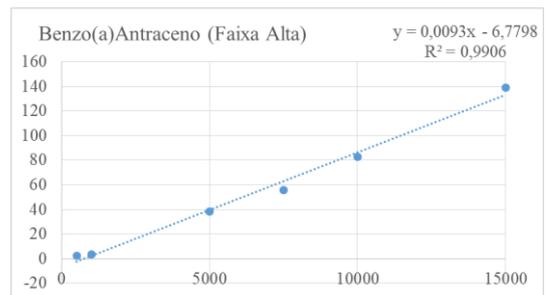
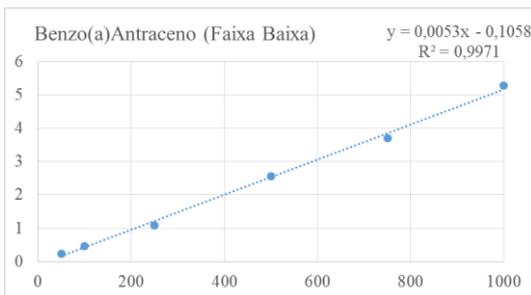
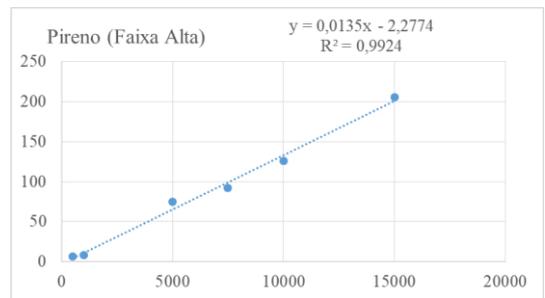
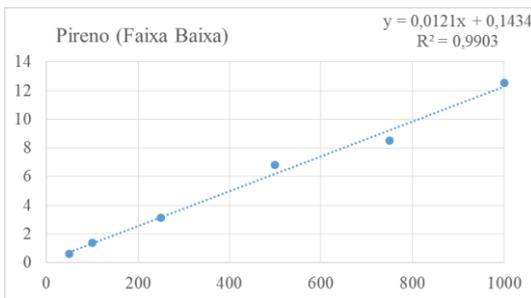
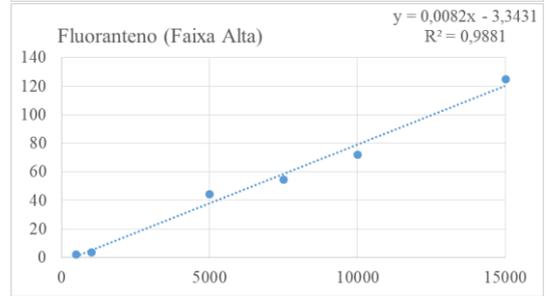
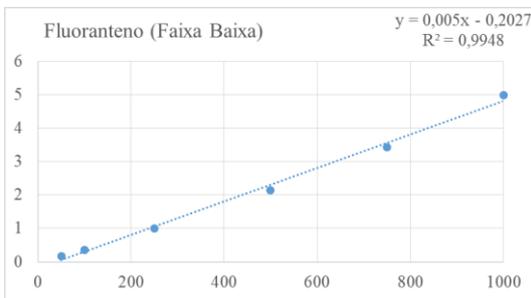
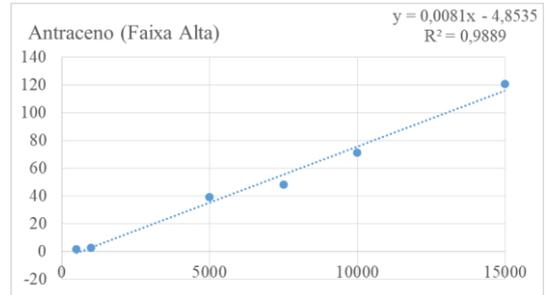
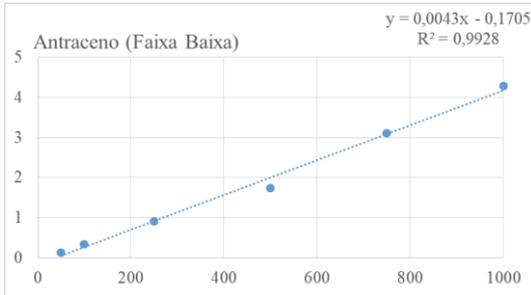
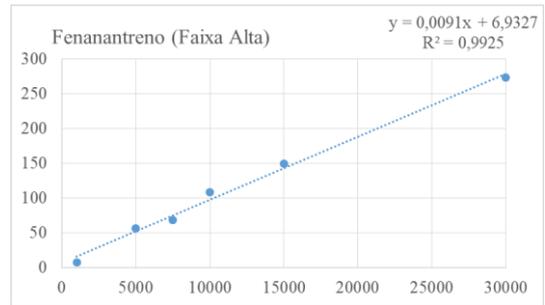
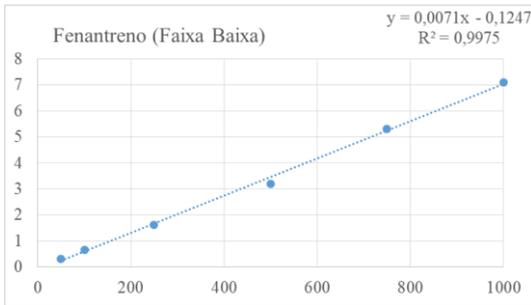
YESSICA, G.P.; ALEJANDRO, A.; RONALD, F.C.; JOSE, J. A.; ESPERANZA; M.R.; SAMUEL; C.S. J.; REMEDIOS, M. L. M.; ORRILLO, E.O. Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzo [a] pyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture medium. *Applied soil ecology*, v. 63, p. 105-111, 2013.

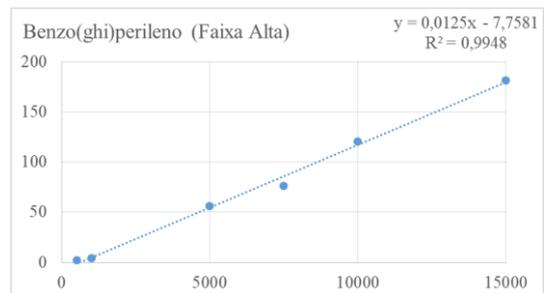
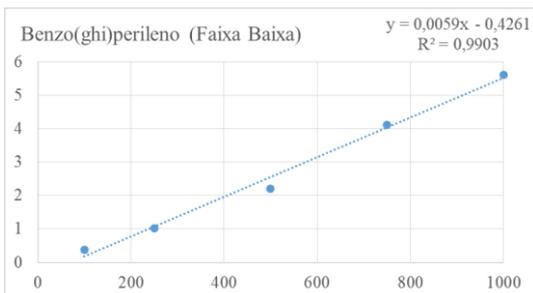
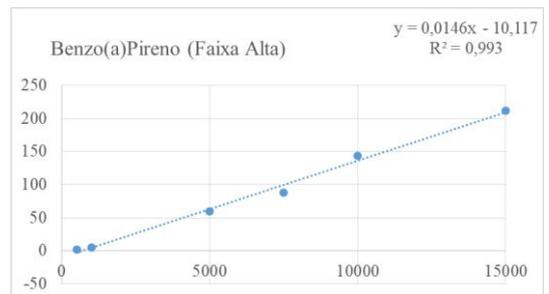
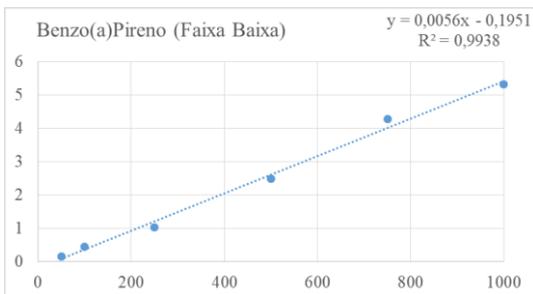
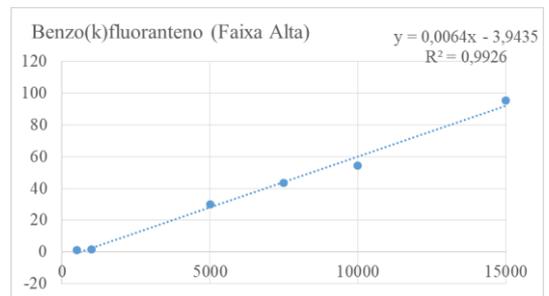
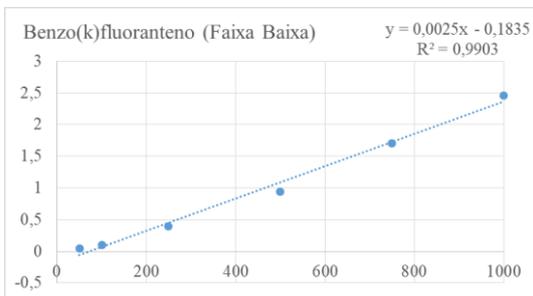
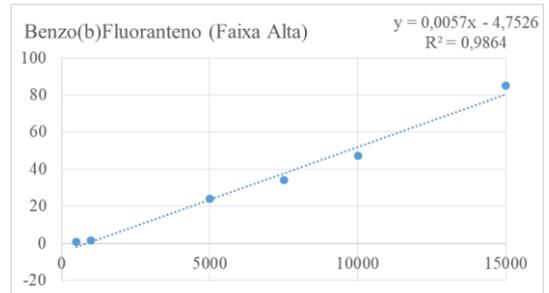
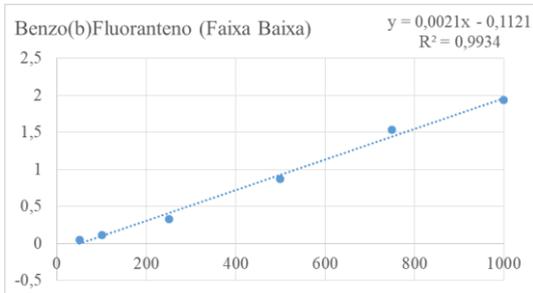
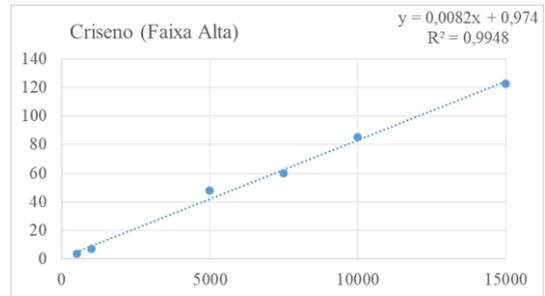
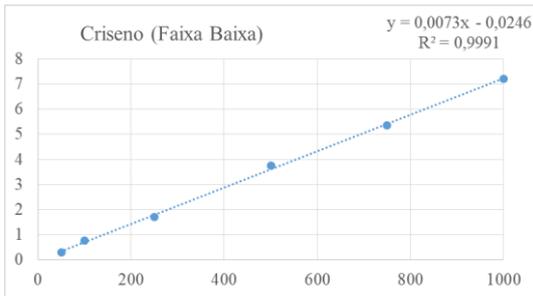
ZILLI, J. E.; PEREIRA, G. M. D.; FRANÇA JUNIOR, I.; SILVA, K.; HUNGRIA, M. ROUWS. Dinâmica de rizóbios em solo do cerrado de Roraima durante o período de estiagem. *Acta Amazonica*, v. 43, n. 2, 2013.

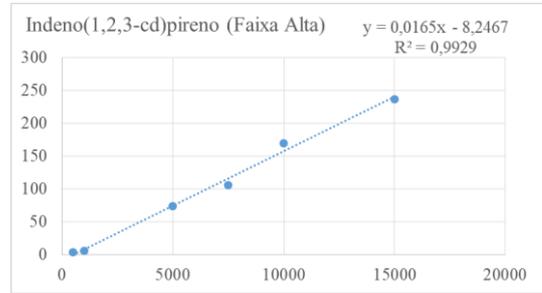
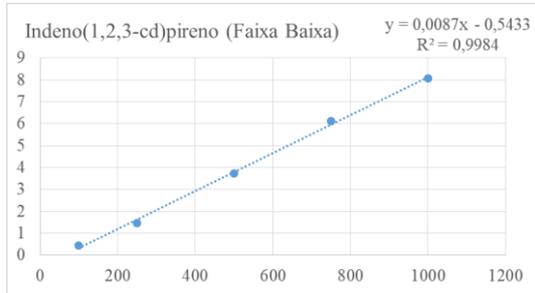
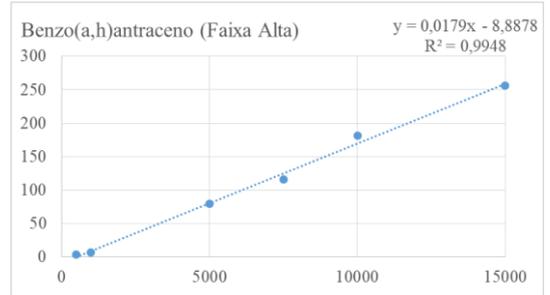
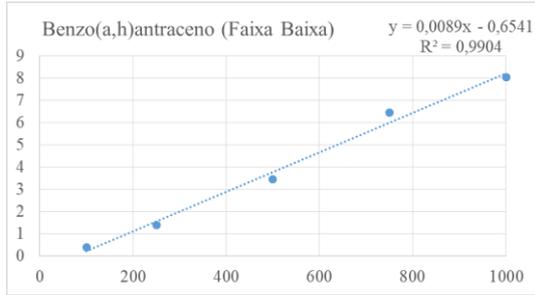
8. ANEXOS

ANEXO I. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS 16 HPA DETERMINADOS PELA USEPA COMO POLUENTES PRIORITÁRIOS.









ANEXO II. DADOS PARA CÁLCULO DE LD E LQ.

Tabela 1. Dados para cálculo do Limite de Detecção.

HPA	X	DP	LD
Naftaleno	10,06	0,85	2,55
Acenaftileno	10,50	0,28	0,88
Acenafteno	11,16	1,48	4,65
Fluoreno	10,10	0,85	2,68
Fenantreno	9,78	0,89	2,80
Antraceno	49,83	0,52	1,65
Fluoranteno	51,11	0,68	2,14
Pireno	10,70	1,10	3,46
Criseno	10,84	0,66	2,08
Benzo(b)fluoranteno	50,86	0,71	2,24
Benzo(k)fluoranteno	51,10	0,51	1,59
Benzo(a)pireno	50,48	0,67	2,10
Benzo(ghi)perileno	100,89	0,46	1,45
Benzo(a,h)antraceno	100,10	0,79	2,49
Indeno(1,2,3-cd)pireno	99,63	1,02	3,22

X= Média da concentração das soluções.

DP = Desvio Padrão

LD = Limite de Detecção.

Tabela 2. Dados para cálculo do Limite de Quantificação.

HPA	X	DP	LQ
Naftaleno	10,06	1,09	13,66
Acenaftileno	10,50	1,42	14,08
Acenafteno	11,16	1,51	16,71
Fluoreno	10,10	1,84	16,62
Fenantreno	9,78	1,37	13,57
Antraceno	49,83	0,75	48,08
Fluoranteno	51,11	1,12	55,46
Pireno	10,70	0,91	12,79
Criseno	10,84	1,73	16,68
Benzo(b)fluoranteno	50,86	0,86	55,10
Benzo(k)fluoranteno	51,10	1,94	61,60
Benzo(a)pireno	50,48	1,64	56,06
Benzo(ghi)perileno	100,89	1,46	125,26
Benzo(a,h)antraceno	100,10	1,52	105,33
Indeno(1,2,3-cd)pireno	99,63	1,96	104,51

X= Média da concentração das soluções.

DP = Desvio Padrão

LQ = Limite de Quantificação.

ANEXO III. CONCENTRAÇÃO DOS HPA NAS AMOSTRAS DO EXPERIMENTO DE BIODEGRADAÇÃO

	Tempo (Dias)	Naf	Acet	Ace	Flu	Fen	Ant	Fluo	Pi	BaA	Cri	BbFluo	BkFluo	BaP	BghiPeri	BahAntra	IPi	Σ HPA
ng g ⁻¹																		
INPA R574	0	nd	nd	915,26	1197,69	2518,51	nd	nd	nd	nd	1108,78	nd	nd	163,18	nd	nd	nd	5903,42
INPA R574	2	nd	nd	114,43	186,80	1395,83	nd	nd	nd	nd	339,76	nd	nd	49,00	nd	nd	nd	2085,82
INPA R574	5	nd	nd	154,98	172,93	1316,56	nd	nd	nd	nd	403,40	nd	nd	49,76	nd	nd	nd	2097,64
INPA R574	10	nd	nd	451,93	304,78	1423,08	nd	nd	nd	nd	355,88	nd	nd	56,43	nd	nd	nd	2592,10
INPA R574	15	nd	nd	199,22	267,22	1675,40	nd	nd	nd	nd	522,59	nd	nd	83,86	nd	nd	nd	2748,31
INPA R574	21	nd	nd	430,67	307,59	1242,23	nd	nd	nd	nd	364,92	nd	nd	73,70	nd	nd	nd	2419,12
INPA R598	0	nd	nd	1870,99	479,07	1193,83	nd	nd	nd	nd	417,39	nd	nd	114,25	nd	nd	nd	4075,52
INPA R598	2	nd	nd	805,20	617,51	2094,21	nd	nd	nd	nd	881,34	nd	nd	310,14	nd	nd	nd	4708,40
INPA R598	5	nd	nd	1262,44	1112,80	2476,90	nd	nd	nd	nd	979,17	nd	nd	286,46	nd	nd	nd	6117,77
INPA R598	10	nd	nd	790,26	376,18	2589,79	nd	nd	nd	nd	1043,92	nd	nd	310,10	nd	nd	nd	5110,24
INPA R598	15	nd	nd	197,00	288,71	2520,25	nd	nd	nd	nd	957,21	nd	nd	275,97	nd	nd	nd	4239,15
INPA R598	21	nd	nd	132,61	880,80	1060,89	nd	nd	nd	nd	311,34	nd	nd	102,96	nd	nd	nd	2488,60
INPA R546	0	nd	nd	556,77	734,28	2382,31	nd	nd	nd	nd	1147,55	nd	nd	206,17	nd	nd	nd	5027,08
INPA R546	2	nd	nd	363,11	421,64	1759,59	nd	nd	nd	nd	510,47	nd	nd	150,59	nd	nd	nd	3205,40
INPA R546	5	nd	nd	373,67	486,06	1979,03	nd	nd	nd	nd	1011,08	nd	nd	188,63	nd	nd	nd	4038,47
INPA R546	10	nd	nd	830,77	608,17	1962,80	nd	nd	nd	nd	650,40	nd	nd	173,80	nd	nd	nd	4225,94
INPA R546	15	nd	nd	201,44	402,31	1958,11	nd	nd	nd	nd	739,89	nd	nd	141,27	nd	nd	nd	3443,03
INPA R546	21	nd	nd	1391,94	1110,03	3537,64	nd	nd	nd	nd	1067,77	nd	nd	256,97	nd	nd	nd	7364,36
INPA R548	0	nd	nd	281,36	473,73	1805,63	nd	nd	nd	nd	496,94	nd	nd	114,77	nd	nd	nd	3172,44
INPA R548	2	nd	nd	325,16	833,52	2247,10	nd	nd	nd	nd	856,10	nd	nd	235,64	nd	nd	nd	4497,53
INPA R548	5	nd	nd	771,72	939,86	1955,89	nd	nd	nd	nd	615,37	nd	nd	154,07	nd	nd	nd	4436,92
INPA R548	10	nd	nd	275,09	1319,01	2986,39	nd	nd	nd	nd	1057,50	nd	nd	303,15	nd	nd	nd	5941,13

INPA R548	15	nd	nd	235,51	248,54	1023,88	nd	nd	nd	nd	160,15	nd	nd	58,96	nd	nd	nd	1727,04
INPA R548	21	nd	nd	810,69	689,31	1725,52	nd	nd	nd	nd	583,47	nd	nd	153,24	nd	nd	nd	3962,23
INPA R568	0	nd	nd	336,77	721,92	1747,11	nd	nd	nd	nd	570,36	nd	nd	153,26	nd	nd	nd	3529,43
INPA R568	2	nd	nd	344,13	718,59	1584,39	nd	nd	nd	nd	409,83	nd	nd	107,70	nd	nd	nd	3164,62
INPA R568	5	nd	nd	389,38	1110,10	1907,92	nd	nd	nd	nd	843,23	nd	nd	222,30	nd	nd	nd	4472,92
INPA R568	10	nd	nd	120,86	1361,20	1876,04	nd	nd	nd	nd	742,15	nd	nd	176,73	nd	nd	nd	4276,99
INPA R568	15	nd	nd	910,48	1321,30	2557,82	nd	nd	nd	nd	889,35	nd	nd	236,53	nd	nd	nd	5915,47
INPA R568	21	nd	nd	347,45	1656,12	2346,24	nd	nd	nd	nd	812,66	nd	nd	204,11	nd	nd	nd	5366,58
Consórcio	0	nd	nd	467,25	481,03	2401,22	nd	nd	nd	nd	842,61	nd	nd	109,61	nd	nd	nd	4301,72
Consórcio	2	nd	nd	64,94	30,38	1077,70	nd	nd	nd	nd	183,32	nd	nd	28,87	nd	nd	nd	1385,21
Consórcio	5	nd	nd	152,85	213,58	1609,90	nd	nd	nd	nd	440,73	nd	nd	70,80	nd	nd	nd	2487,86
Consórcio	10	nd	nd	582,37	422,07	2360,69	nd	nd	nd	nd	741,38	nd	nd	121,63	nd	nd	nd	4228,13
Consórcio	15	nd	nd	83,87	161,51	1596,63	nd	nd	nd	nd	626,88	nd	nd	121,52	nd	nd	nd	2590,42
Consórcio	21	nd	nd	341,93	278,90	1514,23	nd	nd	nd	nd	535,17	nd	nd	89,53	nd	nd	nd	2759,76
Controle A	0	nd	nd	169,73	62,49	1209,22	nd	nd	nd	nd	238,69	nd	nd	71,64	nd	nd	nd	1751,77
Controle A	2	nd	nd	63,41	38,82	1074,53	nd	nd	nd	nd	195,84	nd	nd	50,33	nd	nd	nd	1422,93
Controle A	5	nd	nd	50,92	50,1	100,6	nd	nd	nd	nd	150,55	nd	nd	45,03	nd	nd	nd	397,2
Controle A	10	nd	nd	10,3	23,05	350,05	nd	nd	nd	nd	50,03	nd	nd	30,08	nd	nd	nd	463,51
Controle A	15	nd	nd	10,21	23,9	200,5	nd	nd	nd	nd	30,08	nd	nd	28,08	nd	nd	nd	292,77
Controle A	21	nd	nd	3,62	24,88	280,28	nd	nd	nd	nd	33,85	nd	nd	11,31	nd	nd	nd	353,94
Controle B	0	nd	nd	26,4	20,3	168,69	nd	nd	nd	nd	27,64	nd	nd	10,05	nd	nd	nd	253,08
Controle B	2	nd	nd	12,7	15,54	351,77	nd	nd	nd	nd	160,41	nd	nd	41,66	nd	nd	nd	582,08
Controle B	5	nd	nd	30,99	10,05	400,81	nd	nd	nd	nd	200,01	nd	nd	27,54	nd	nd	nd	669,4
Controle B	10	nd	nd	34,05	24,03	300,08	nd	nd	nd	nd	191,1	nd	nd	30,05	nd	nd	nd	579,31
Controle B	15	nd	nd	40,08	28,05	398,67	nd	nd	nd	nd	150,09	nd	nd	25,28	nd	nd	nd	642,17
Controle B	21	nd	nd	49,94	23,7	481,09	nd	nd	nd	nd	91,98	nd	nd	16,5	nd	nd	nd	663,21

ANEXO IV. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A. TESTE DE LEVENE – HOMOGENEIDADE DAS VARIÂNCIAS

Fonte de Variação	DF	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	Valor P
Tratamento	5	2231,41417	446,28283	1,50878	0,2243
Resíduo	24	7098,98051	295,79085		

B. ESTATÍSTICA DESCRITIVA

	Tratamentos	Média	Desvio Padrão	EP da média
CONSÓRCIO	5	36,11204	22,45838	10,04369
INPA R574	5	57,193	5,00508	2,23834
INPA R598	5	-7,08555	31,42356	14,05304
INPA R546	5	21,04349	11,09054	4,95984
INPA R548	5	-27,1133	44,42684	19,86829
INPA R568	5	-28,8227	28,59581	12,78843

C. TESTE DE SHAPIRO-WILK – NORMALIDADE DOS RESÍDUOS

	gl	Estatística	Valor de P	Decisão a nível de (5%)
CONSÓRCIO	5	0,91999	0,5299	Não se rejeita a normalidade
INPA R574	5	0,90578	0,44265	Não se rejeita a normalidade
INPA R598	5	0,95596	0,77958	Não se rejeita a normalidade
INPA R546	5	0,95806	0,79443	Não se rejeita a normalidade
INPA R548	5	0,92194	0,54256	Não se rejeita a normalidade
INPA R568	5	0,97908	0,92961	Não se rejeita a normalidade

D. ANOVA – ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Fonte de Variação	gl	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Estatística F	Valor P
Tratamentos	5	30974,78	6194,957	8,38793	1,06E-04
Resíduos	24	17725,34	738,5556		
Total	29	48700,12			