



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

**BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POR RIZOBACTÉRIAS EM SOLO
DE VÁRZEA DA AMAZÔNIA CONTAMINADO COM PETRÓLEO E ÓLEO
DIESEL.**

Luana Monteiro da Silva

MANAUS

2018



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

Luana Monteiro da Silva

**BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POR RIZOBACTÉRIAS EM SOLO
DE VÁRZEA DA AMAZÔNIA CONTAMINADO COM PETRÓLEO E ÓLEO
DIESEL.**

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina de Souza Oliveira/UFAM
Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio de Oliveira/INPA

Tese apresentada à
Coordenação do Programa de
Pós-graduação em Química da
Universidade Federal do
Amazonas, como requisito para
obtenção do Título de Doutora.

MANAUS

2018

Ficha Catalográfica

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

S586b Silva, Luana Monteiro da
Biodegradação de hidrocarbonetos por rizobactérias em solo de várzea da Região Amazônica contaminado com petróleo e óleo diesel / Luana Monteiro da Silva . 2018
113 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Tereza Cristina de Souza Oliveira
Coorientador: Luiz Antonio de Oliveira
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Solo. 2. Biorremediação . 3. Hpa. 4. Poluentes tóxicos . 5. Hidrocarbonetos alifáticos. I. Oliveira, Tereza Cristina de Souza. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

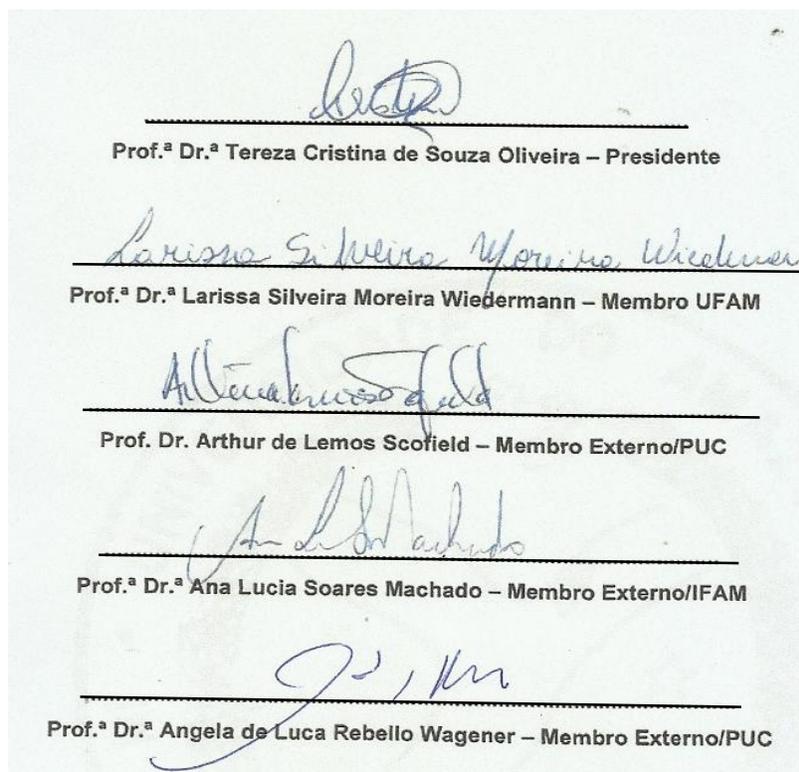
**"Biodegradação de hidrocarbonetos por
rizobactérias em solo de várzea da Região Amazônica
contaminado com petróleo e óleo diesel"**

Luana Monteiro da Silva

Tese de Doutorado 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 Doutora em Química.

Aprovado, em 23 de maio de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA



Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 23 de maio de 2018

Dedico esta tese de doutorado ao meu amado avô Nadilson da Silva Santino (*in memoriam*) que sempre me incentivou e motivou.

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus, pois sem Ele nada é possível.

À minha orientadora profa. Dra. Tereza Cristina Souza de Oliveira pela amizade, pela oportunidade, por acreditar no meu trabalho, pelas palavras de incentivo sempre, e por guiar este trabalho com carinho, dedicação e profissionalismo.

Ao meu co-orientador prof. Dr. Luiz Antonio de Oliveira que desde o momento que ingressou neste projeto deu todo o apoio necessário, que cedeu o espaço do laboratório para possibilitar a realização das análises

À central analítica de apoio multidisciplinar – CAM por disponibilizar o espaço e os equipamentos necessários à realização do trabalho.

Aos amigos de CAM Elzalina, Bruna, Richardson e todos que apoiavam sempre nas dificuldades do dia-a-dia e que sempre tinham uma palavra de apoio e de ânimo, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao meu querido amigo Erickson Oliveira que foi um apoio imprescindível na realização das análises sem os quais jamais seria possível a realização deste trabalho.

Aos colegas do LAQUA Heloísa, Evelin, Milton, Livia, Bárbara e Wagner que nunca me negaram uma ajuda quando a dificuldade chegava.

Aos amigos do trabalho (IFAM) Geisy Anny Venâncio, Adriano Frutuoso, Ivan Nogueira e Gabriel Guerreiro sem o apoio deles eu jamais teria dado conta de trabalhar e finalizar esta tese.

À minha querida amiga de longa data Tainã pela amizade e por sempre ouvir os desabafos.

Às minhas tias e tios que sempre deram uma palavra de incentivo nos momentos mais difíceis.

Às minhas irmãs Luciana, Laís e Larissa que dão alegria à minha vida e que vibram com todas as minhas conquistas.

À toda minha família pelas boas vibrações que sempre me enviam.

À minha mãe que fez todos os sacrifícios necessários para que eu tivesse uma boa educação, meu muito obrigada.

Ao meu esposo Adriano Jorge que sempre torceu por mim, me apoiou e até fez um doutorado junto, sem o ele eu jamais conseguiria.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo de cromatograma que (a) apresenta e (b) não apresenta MCNR.	22
Figura 2. Processos que influenciam a remoção de HPA no ambiente.	26
Figura 3. Exemplos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (a) Benzo[a] pireno; (b) Benzo[a] antraceno (c) 1 – metil fenantreno.	27
Figura 4. Mecanismo de eliminação/ativação metabólica do BaP e representação esquemática do aduto formado pela interação com o DNA.....	28
Figura 5. Reação de transesterificação de triglicerídeos.....	32
Figura 6. Catecol, substância marcadora de biodegradação por bactérias.....	34
Figura 7. Proposta do caminho microbiano de degradação de HPA..	35
Figura 8. Rota de biodegradação aeróbica de n-alcenos.	36
Figura 9. Representação genérica de compostos surfactantes.....	40
Figura 10. Mapa da região de coleta de solo na cidade de Manacapuru-AM (S 3.308925; W 60.607647).....	43
Figura 11. (a) revolvimento; (b) coleta; (c) armazenamento do solo.	43
Figura 12. Riscagem das Rizobactérias em meio YM.....	45
Figura 13. Pesagem da amostra de solo e autoclavagem para garantir sua total esterilização.	46
Figura 14. (a) Hemacitômetro tipo Neubauer: lâmina retangular em forma de H com compartimentos e subcompartimentos. (b) Microscópio para leitura da lâmina.....	46
Figura 15. Esquema descrevendo o experimento de biodegradação utilizando como fonte de carbono (a) petróleo e (b) óleo diesel.....	47
Figura 16. Coleta das amostras provenientes dos experimentos de biodegradação para determinação de hidrocarbonetos (totalizando 56 amostras).	48
Figura 17. Fracionamento e limpeza dos extratos realizados em colunas cromatográficas.....	49
Figura 18. Cromatógrafo Trace GC Ultra, acoplado ao espectrômetro ISQ Single Quadrupole MS da Thermo Scientific.....	51
Figura 19. Espécie vegetal no local de coleta de solo de várzea. Fonte: a própria autora.	55
Figura 20. (a) Cromatograma de identificação dos HPA na amostra de solo natural (b) Concentração de HPA na amostra de solo de natural.	58
Figura 23. Cromatograma da fração 1 (a) óleo diesel; (b) petróleo utilizado o experimento. .	59
Figura 24. Abundância relativa do somatório dos n-alcenos $\leq C_{20}$ e $> C_{20}$ no experimento com óleo diesel nos tempos zero, 48 horas e 21 dias.	61

Figura 25. Abundância relativa do somatório dos n-alcenos $\leq C_{20}$ e $> C_{20}$ no experimento com petróleo nos tempos zero, 48 horas e 21 dias.	62
Figura 26. Cromatograma de íons total nos tempos inicial e final de incubação do experimento (a) isolado INPA R677- potencial de degradação 88,89 %; (b) controle 2 – potencial de degradação 25,21% no experimento com óleo diesel.	63
Figura 27. Cromatograma de íons total nos tempos inicial e final de incubação do experimento (a) isolado INPA R677- potencial de degradação 97,74 %; (b) controle 2 – potencial de degradação 29,21% no experimento com Petróleo.	64
Figura 28. Cromatograma da fração 2 (a) amostra do experimento de biodegradação; (b) óleo diesel; (c) petróleo.	65
Figura 29. Concentração do somatório de HPA [$\sum HPA = \text{Acenafteno} + \text{Fluoranteno} + \text{Fenantreno} + \text{Criseno} + \text{Benzo(a)pireno}$] nos experimentos com óleo diesel.	67
Figura 30. Concentração do somatório de HPA [$\sum HPA = \text{Acenafteno} + \text{Fluoranteno} + \text{Fenantreno} + \text{Criseno} + \text{Benzo(a)pireno}$] nos experimento com petróleo nos tempos zero, após o período de 48h, 10 dias e 21 dias.	68
Figura 31. Concentração de fenantreno no experimento com óleo diesel nos tempos zero, após o período de 48h e após 21 dias no experimento com óleo diesel.	69
Figura 32. Concentração de fenantreno no experimento com petróleo nos tempos zero, após o período de 48h, após 10 dias e 21 dias.	70
Figura 33. Concentração dos HPA Acenafteno (Ace), Fluoreno (F), Criseno (Cris) e Benzo(a)pireno (B(a)P nos isolados (a) INPA R 560; (b) INPA R631; (c) INPA R557; (d) INPA R677; (e) INPA R674; e no, (f) Consórcio; (g) controle 1; (g) controle 2 no experimento utilizando como fonte de carbono o óleo diesel.	71
Figura 34. Concentração dos HPA Acenafteno (Ace), Fluoreno (F), Criseno (Cris) e Benzo(a)pireno (B(a)P nos isolados (a) INPA R 560; (b) INPA R631; (c) INPA R557; (d) INPA R677; (e) INPA R674; e no, (f) Consórcio; (g) controle 1; (g) controle 2 utilizando como fonte de carbono o petróleo.	72
Figura 35. Razão (HPA 4,5,6 anéis/THPA) para as amostras do experimento de biodegradação utilizando como fonte de carbono (a) óleo diesel e; (b) petróleo.	78
Figura 36. Cromatograma do íon m/z 231 (a) no petróleo; (b) no diesel utilizado no experimento e (c) na amostra de solo natural (d) espectro de massa do íon m/z 231.	80
Figura 37. Abundância relativa do fragmento m/z 231 que corresponde ao composto metil-esterano nos tratamentos, (a) que demonstraram; (b) que não demonstraram, potencial de biodegradação no experimento com óleo diesel.	82

Figura 38. Abundância relativa do fragmento m/z 231 que corresponde ao composto metil-esterano nos tratamentos, (a) que demonstraram; (b) que não demonstraram, potencial de biodegradação no experimento com petróleo.....	84
Figura 39. Proposta do caminho da formação do C31 diaromático 8(14)- sec-hopanóide. Fonte: Peters et al (2005b).	85
Figura 40. (a) Cromatogramas do solo natural, do petróleo e do diesel utilizado no experimento; (b) Espectro apresentado para o pico no tempo de retenção 53,15 minutos.....	86
Figura 41. (a) Cromatogramas no tempo zero/ (b) Cromatograma do pico no tempo de retenção de 53,10 minutos com seu respectivo espectro de massa no tempo de 48 horas; (c) Cromatograma do pico no tempo de retenção de 53,12 minutos com seu respectivo espectro de massa no tempo de 21 dias para a Rizobactéria INPA R677 no experimento com petróleo.	88
Figura 42. (a) Cromatogramas no tempo zero, 48 horas e 10 dias; (b) Cromatograma do tempo de retenção 53,16 minutos com seu respectivo espectro de massa para o controle 4 no experimento com petróleo.....	89
Figura 43. (a) Cromatograma no tempo zero; (b) Cromatograma do pico no tempo de retenção de 53,17 minutos com seu respectivo espectro de massa no tempo de 48 horas; (c) Cromatograma do pico no tempo de retenção de 53,21 minutos com seu respectivo espectro de massa no tempo de 21 dias para a Rizobactéria INPA R677 no experimento com óleo diesel.	91
Figura 44. (a) Cromatograma no tempo zero; (b) Cromatograma do pico no tempo de retenção de 52,29 minutos com seu respectivo espectro de massa no tempo de 48 horas; (c) Cromatograma do pico no tempo de retenção de 53,20 minutos com seu respectivo espectro de massa no tempo de 21 dias para o controle 2 no experimento com óleo diesel.	92
Figura 45. Variação da abundância relativa dos n-alcanos individuais no experimento com óleo diesel para a espécie INPA R560	113
Figura 46. Variação da abundância relativa dos n-alcanos individuais no experimento com petróleo para a espécie INPA R560.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química de um petróleo típico.....	21
Tabela 2. Propriedades químicas de alguns HPA.....	24
Tabela 3. Algumas relações índices diagnósticos para indicar fonte de Hidrocarbonetos.	25
Tabela 4. Estudos de biodegradação por rizobactérias.	37
Tabela 5. Locais de coleta e espécies de plantas de obtenção dos rizóbios.	39
Tabela 6. Espessura da camada emulsificante (em cm), de estirpes de rizóbios usando duas soluções de sais diferentes e tolueno e petróleo como fontes de carbono.	40
Tabela 7. Critérios para quantificação de atividade emulsificante.	41
Tabela 8. Metodologias empregadas na determinação das propriedades químicas do solo. ...	44
Tabela 9. Identificação das Rizobactérias.	45
Tabela 10. Lista de HPA determinados indicados pela EPA-US com seus respectivos pesos moleculares, íon prioritário e secundário.	50
Tabela 11. Principais propriedades da amostra de solo de Manacapuru.....	53
Tabela 12. Resultados da análise granulométrica da amostra de solo.	56
Tabela 13. Concentrações de metais na amostra de solo de Manacapuru.	56
Tabela 14. Taxas de degradação dos hidrocarbonetos n-alcanos nas amostras provenientes da degradação microbiana nos períodos de 48 horas e 21 dias no experimento com óleo diesel e com petróleo.	60
Tabela 15. Taxas de degradação dos HPA nas amostras provenientes da degradação microbiana nos períodos de 48 horas e 21 dias no experimento com óleo diesel.	74
Tabela 16. Taxas de degradação dos HPA nas amostras provenientes da degradação microbiana nos períodos de 48 horas e 21 dias no experimento com petróleo.	76
Tabela 17. Classificação do teor de pH em solo.....	106
Tabela 18. Classificação das concentrações de cátions em solo.	106
Tabela 19. Classificação da concentração de fósforo em solo.	106
Tabela 20. Classificação das concentrações dos metais Fe, Mn, Zn e Cu em solo.	106
Tabela 21. Classificação da fertilidade do solo em relação às concentrações de M.O. e N. .	107
Tabela 22. Linearidade das curvas de calibração para quantificação de HPA.....	109
Tabela 23. Concentrações dos HPA determinados nas amostras com experimento com óleo diesel.	110
Tabela 24. Concentrações dos HPA determinados nas amostras com experimento com petróleo.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

Ace	Acenafteno
Alc	Alcanos
An	Antraceno
B(a)A	Benzo(a)antraceno
B(a)P	Benzo(a)pireno
BghiP	Benzo(g,h,i)Pireno
APM	Soma dos compostos de alto peso molecular
BPM	Soma dos compostos parentais de baixo peso molecular
C	Carbono
Ca	Cálcio
CEQG	Canadian Environmental Quality Guidelines
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
Cris	Criseno
Cu	Cobre
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
F	Fluoreno
Fe	Ferro
Fen	Fenantreno
GLP	Gás Liquefeito de Petróleo
HPA	Hidrocarboneto Policíclico Aromático
HPAT	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos totais
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
IP	Indeno pireno
MCNR	Mistura Complexa Não Resolvida
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
M.O	Matéria orgânica
N	Nitrogênio
US - EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
P	Fósforo
PCBs	Bifenilas policloradas
Pi	Pireno
ppm	partes por milhão
Ym	Yeast manitol
Zn	Zinco

RESUMO

Devido ao grande impacto ambiental causado por acidentes envolvendo atividades petrolíferas e pela dificuldade do seu tratamento, os processos de biorremediação vêm sendo largamente estudados e com isso, são cada vez mais utilizados microrganismos capazes de degradar óleo. Este trabalho avaliou o potencial de biodegradação de cinco rizobactérias, identificadas como INPA R560 (*Bradyrhizobim* sp), R631 (*Bradyrhizobim* sp), R557(*Bradyrhizobim* sp), R677 (*Rhizobium* sp) e R674 (*Alicyclobacillus* sp) e a mistura delas em amostras de solo de várzea contaminadas com 1% de óleo diesel e petróleo. Para tal, foi realizado um experimento utilizando suspensão microbiana de cada rizobactéria e do consórcio com as cinco bactérias em 500 g de solo autoclavado e usado óleo diesel em um experimento e petróleo em outro experimento como fonte de carbono. Foram ainda utilizadas duas amostras controle para cada experimento, uma contendo solo esterilizado e outra não esterilizado, utilizando as mesmas condições das amostras, sem adição de microrganismos. Para avaliação do potencial de degradação de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, foram realizadas coletas nos tempos zero, 48 horas e após o período de 21 dias no experimento com óleo diesel. No experimento com petróleo, foram feitas as avaliações nos mesmos tempos, porém com avaliação adicional no período de 10 dias. Dentre as cinco rizobactérias avaliadas, com exceção do isolado INPA R631, os valores de remoção de n-alcenos pelos demais isolados testados foram acima de 80 % após o período de 21 dias. Os consórcios, com a mistura as cinco espécies, também apresentou taxas de remoção consideráveis de n-alcenos com valor de 67,57 % no experimento com óleo diesel e 67,80 % no experimento com petróleo. Em relação à HPA as bactérias apresentaram alto potencial de degradação nas primeiras 48 horas, destacando-se a espécie INPA R557, INPA 677 e consórcio com os cinco isolados com taxas de degradação de 71,57 %, 38,18% e 41,84%, respectivamente. Dos isolados testados, dois apresentaram taxa de degradação de HPA total de 85,85% e 75,53% após o período de 21 dias, respectivamente, o consórcio com as cinco espécies apresentou taxa de biodegradação de 63,61%, valor abaixo da taxa de um dos isolados individualmente. Com alto potencial de biodegradação os isolados INPA R557 e INPA R677 podem ser utilizados para técnica de bioaugmentação em solo de ambiente de várzea para biorremediação de petróleo e seus derivados, pois durante o período de 21 dias reduziram os teores de n-alcenos, HPA e compostos mais complexos, como metil-estirano.

Palavras – chave: solo, biorremediação, HPA, poluentes tóxicos, hidrocarbonetos alifáticos.

ABSTRACT

Due to the great environmental impact caused by accidents involving petroleum activities and the difficulty of its treatment, bioremediation processes have been widely studied and, with this, microorganisms capable of degrading oil are increasingly used. This work evaluated the biodegradation potential of five rhizobacteria, identified as INPA R560 (*Bradyrhizobium sp.*), R631 (*Bradyrhizobium sp.*), R557 (*Bradyrhizobium sp.*), R677 (*Rhizobium sp.*) and R674 (*Alicyclobacillus sp.*) and the mixture of them in samples of floodplain soil contaminated with 1% diesel oil and petroleum. For this purpose, an experiment was carried out using microbial suspension of each rhizobacterium and the consortium with the five bacteria in 500 g of autoclaved soil and diesel oil in one experiment and oil in another experiment as a carbon source. Two control samples were also used for each experiment, one containing sterile soil and the other non-sterile, using the same conditions as the samples, without the addition of microorganisms. To evaluate the degradation potential of aromatic and aliphatic hydrocarbons, collections were carried out at zero times, 48 hours and after the 21-day period in the experiment with diesel oil. In the oil experiment, evaluations were made at the same times, but with an additional evaluation in the period of 10 days. Among the five rhizobacteria evaluated, with the exception of the INPA R631 isolate, the removal values of n-alkanes by the other tested isolates were above 80% after the 21-day period. The consortia, with the mixture of the five species, also showed considerable removal rates of n-alkanes with a value of 67.57% in the experiment with diesel oil and 67.80% in the experiment with oil. Regarding PAH, the bacteria showed a high potential for degradation in the first 48 hours, especially the species INPA R557, INPA 677 and a consortium with the five isolates with degradation rates of 71.57%, 38.18% and 41.84 %, respectively. Of the tested isolates, two showed a total HPA degradation rate of 85.85% and 75.53% after the 21-day period, respectively, the consortium with the five species showed a biodegradation rate of 63.61%, below rate of one of the isolates individually. With high potential for biodegradation, the INPA R557 and INPA R677 isolates can be used for bio-augmentation techniques in soil in a clearing environment for the bioremediation of oil and its derivatives, since during the 21-day period, the levels of n-alkanes, HPA and compounds were reduced more complex, such as methyl styrene.

Keywords: soil, bioremediation, PAH, toxic pollutants, aliphatic hydrocarbons.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Hidrocarbonetos alifáticos.....	21
2.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPA.....	23
2.2.1 HPA e atividade carcinogênica	27
2.2.2 Fontes de HPA.....	29
2.2.3 Quantificação de HPA.....	30
2.3 Óleo diesel	30
2.4 Biorremediação.....	32
2.5 Rizobactérias.....	37
3. OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo Geral.....	42
3.2 Objetivos Específicos	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Amostra ambiental.....	43
4.2 Propriedades químicas do solo	44
4.3 Análise granulométrica.....	44
4.4 Ativação de Rizobactérias.....	44
4.5 Delineamentos dos processos de biorremediação	45
4.6 Determinação de hidrocarbonetos	48
4.6.1 Extração.....	48
4.6.2 Fracionamento.....	48
4.6.3 Hidrocarbonetos saturados	49
4.6.4 Hidrocarbonetos aromáticos.....	50
4.7 Tratamento dos dados	52
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1 Caracterização química do solo.....	53
5.2 HPA no solo.....	57
5.3 Biodegradação de n-alcenos	59
5.4 Biodegradação de HPA.....	64
5.5 Marcadores de biodegradação	79
6. considerações finais.....	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
ANEXO I.....	106

ANEXO II	108
ANEXO III.....	109
ANEXO IV	110
ANEXO V.....	113

1. INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos pertencem ao grupo de compostos usados como traçadores na avaliação da evolução de transformações da matéria orgânica no ambiente. A identificação e quantificação individual de hidrocarbonetos saturados e aromáticos se tornam um meio de estabelecer níveis de controle de qualidade ambiental, sendo usados vários índices e relações de diagnóstico para identificação das diferentes origens de hidrocarbonetos (PRINCE, 1996; SOCLO *et al.*, 2000).

Dentre eles destacam-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, HPA, que devido as suas propriedades tóxicas foram listadas como contaminantes prioritários indicados pela Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA-US, 2001). Assim, o monitoramento da concentração desses compostos no solo, no meio aquático subterrâneo e superficial mesmo em concentrações muito pequenas se torna necessário.

A biota do solo de regiões tropicais representa um dos componentes mais ricos em espécies. Os organismos do solo desempenham distintas funções como: decomposição da matéria orgânica; otimização do ciclo de nutrientes; manutenção do estoque de carbono; melhoria da fertilidade do solo e atuação na degradação de poluentes do solo. Portanto, mudanças que causem impacto na biodiversidade do solo também impedirão que ocorram nele as funções importantes para o ecossistema (DEZORDI e TEIXEIRA, 2008).

A poluição por petróleo e seus derivados constitui um grande risco ambiental e sanitário e, conseqüentemente, a degradação microbiana de hidrocarbonetos é um tema que permanece em destaque (SEO *et al.*, 2009).

Devido ao grande impacto ambiental causado por acidentes envolvendo atividades de exploração, refino e transporte de petróleo no mundo, e pela dificuldade do seu tratamento e despoluição do ambiente, os processos de biorremediação vêm sendo largamente estudados e com isso, cada vez mais são utilizados microrganismos capazes de degradar óleo (BIACHE *et*

al., 2017; CRAMPONA *et al.*, 2017; MANSOURI *et al.*, 2017; MARCHAND *et al.*, 2017, KONG *et al.*, 2018).

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, 2006).

Os biossurfactantes são metabólitos produzidos por uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos e possuem características de detergência, emulsificação, solubilização, diminuição das tensões superficial e interfacial, e dispersão de fases (DISAI e BANAT 1997; MANIASSO, 2001; RON e ROSENBERG, 2001; NITSCHKE e PASTORE, 2002; YAKUBU, 2007), e conseqüentemente aumenta a biodegradação de compostos orgânicos hidrofílicos e insolúveis (XIA *et al.*, 2014), sendo determinantes para o processo de biodegradação.

Muitos microrganismos destacam-se na degradação do petróleo e seus derivados, no entanto, devem ser levados em consideração os riscos de patogenicidade desses microrganismos. Rizobactérias além de possuírem alto poder de produção de biossurfactantes, tornam-se uma alternativa viável para biorremediação por serem seguros a plantas e animais (BRITO, 2013).

Biodegradação de hidrocarbonetos pode ser entendida como a quebra de ligações destes componentes do petróleo para componentes de menor peso molecular ou mais polares por ação de microrganismos (ROSATO, 1997), é um processo biotecnológico capaz de recuperar solos contaminados com menores impactos ambientais quando comparados com métodos não biológicos (MARTÍNEZ-ALVAREZ *et al.*, 2015).

São muitos os microrganismos conhecidos que apresentam eficiência na biodegradação de compostos derivados de petróleo como *Alcaligenes denitrificans*,

Mycobacterium sp., *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. paucimobilis*, *P. vesicularis*, *P. cepacia*, *P. testosteroni*, *Rhodococcus sp.*, *Corynebacterium venale*, *Bacillus cereus*, *Moraxella sp.*, *Streptomyces sp.*, *Vibrio sp.* e *Cyclotrophicus sp.* (SAMANTA *et al.*, 2002; SEO *et al.*, 2009).

Alguns hidrocarbonetos apresentam grande relevância em relação à toxicidade, pois tais compostos são considerados ameaça à vida da fauna e da flora de um ambiente impactado. Segundo LÜCHMANN *et al.* (2011) espécies de ostras de ambiente de manguezal brasileiro ao serem expostas a concentrações subletais de óleo diesel são capazes de bioacumularem tanto hidrocarbonetos aromáticos quanto alifáticos em um curto período de tempo o que leva a efeitos tóxicos em suas ações enzimáticas. Solos contaminados com óleo diesel podem levar ainda a alterações morfoanatômicas nas raízes de certas espécies de plantas (BONA *et al.*, 2011).

Para aplicação da técnica de biorremediação os microrganismos utilizados devem ser adequados e adaptados ao ambiente, por isso a obtenção de bactérias da mesma área a ser remediada torna-se fundamentalmente importante (SUN *et al.*, 2012). Nesse sentido, nota-se carência de trabalhos que testem a capacidade de degradar compostos de petróleo por microrganismos indígenas da região de várzea, por onde ocorre intensa atividade de transporte fluvial e zonas portuárias.

Assim o presente trabalho visa determinar e quantificar compostos hidrocarbonetos de petróleo que predominam após determinado tempo de exposição à atuação de cinco Rizobactérias, com alto poder de produção de biossurfactantes, em amostras de solo Amazônico de várzea contaminado com petróleo e óleo diesel; a fim de avaliar o potencial de degradação desses microrganismos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os solos de várzea são desenvolvidos nas planícies de inundação, sobre sedimentos depositados pelas águas dos rios. Estes sedimentos proporcionam composição granulométrica e mineralógica diversificada, com variação de características entre um local e outro, causando alterações na paisagem (MAGALHÃES e GOMES, 2013). O ambiente de várzea da região amazônica é totalmente dependente da sazonalidade, passando anualmente pelas fases hidrológicas de cheia, vazante, seca e enchente. Durante esta dinâmica fluvial, em áreas alagáveis que abrangem um total de ocupação em torno de 10% do Estado do Amazonas (150.000 km²), ou 35% da área total da Bacia Amazônica (BARTHEM e FABRÉ, 2003), o que carrega para as margens dos grandes rios da região uma grande quantidade de compostos, como nutrientes e matéria orgânica, que se depõe nos solos circundantes.

É de longa data a ocupação das regiões de várzea, pois as enchentes e inundações periódicas que ocorrem nessa região acarretam fertilização de grande parte das terras e da floresta; com a sua extensa rede líquida, permite a circulação, o comércio e a sociabilidade; que preside, enfim, à condensação e distribuição do elemento humano na paisagem, a grande quantidade de recursos naturais nessa região atrai a ocupação humana (SOUZA, 2012), formando comunidades aos longos dos rios.

Segundo BINSZTOK *et al.* (2008) o abastecimento de combustíveis para a região Amazônica está totalmente adaptado às suas condições fluviais e, devido à deficiência de distribuição de energia elétrica para essas populações a demanda de combustíveis transportados pelos rios da região aumenta e o transporte do mesmo pode ocasionar problemas ambientais.

Ensaio de biodegradação e toxicidade permitem a elaboração de um diagnóstico quanto à viabilidade da utilização dessa prática como técnica de remediação em caso de eventual derramamento de óleo (DEZORDI e TEIXEIRA, 2008).

Poluição por hidrocarbonetos é de grande importância de modo a promover a conservação dos recursos naturais e a degradação do ecossistema pode produzir impactos sociais e econômicos (COMMENDATORE *et al.*, 2012). Hidrocarbonetos são comumente encontrados no meio ambiente como uma mistura complexa de fontes múltiplas: petrogênica, pirogênicas, biogênicos e diagenéticos (YUNKER *et al.*, 1993).

Os processos de separação do petróleo produzem várias frações com aplicações comerciais definidas (Tabela 1). Essas frações são distinguidas pelo número de átomos de carbono e do ponto de ebulição, como gasolina, óleo diesel, nafta, solventes e querosenes, GLP (gás liquefeito de petróleo) e parafinas. Sua composição e aspecto variam segundo o histórico geológico e a natureza da matéria orgânica de cada depósito. Os hidrocarbonetos compreendem classes de compostos orgânicos como alcanos, alcenos, alcinos, cicloalcanos (naftênicos) e aromáticos.

Tabela 1. Composição química de um petróleo típico.

Parafinas normais	14 %
Parafinas ramificadas	16%
Parafinas cíclicas (naftênicas)	30%
Aromáticos	30%
Resinas e asfaltenos	10%

Fonte: Thomas (2001).

2.1 Hidrocarbonetos alifáticos

Os hidrocarbonetos alifáticos são considerados um dos componentes mais abundantes do material orgânico e é uma das principais classes de compostos orgânicos encontrados em sedimentos no ambiente e essa abundância é uma fonte potencial de poluição dependendo da origem destes compostos (MAIOLI *et al.*, 2010; MACIAS-ZAMORA, 1996).

Os hidrocarbonetos saturados constituem o maior grupo, formado por alcanos normais (n-parafinas), isoalcanos (isoparafinas) e cicloalcanos (naftenos). No petróleo são encontradas parafinas normais e ramificadas, que vão do metano até 45 átomos de carbono. As parafinas

normais usualmente representam cerca de 15 a 20% do petróleo, variando, no entanto, entre limites bastante amplos – 3 a 35% – (THOMAS, 2001).

Os diferentes compostos do petróleo são obtidos através do processo de fracionamento utilizando solventes diferentes capazes de solubilizar os compostos de interesse, utilizando-se solventes apolares para obtenção da fase contendo hidrocarbonetos alifáticos.

Para hidrocarbonetos saturados a intensa predominância de n-alcanos ímpares de n-C₂₅ a n-C₃₅, apresentando n-C₂₉ como o n-alcano de maior concentração (C_{max}), e praticamente ausência de mistura complexa não resolvida – MCNR (Figura 1a) indica ausência de fontes petrogênicas em biodegradação. Enquanto a presença de MCNR (Figura 1b) indica presença de fonte petrogênica.

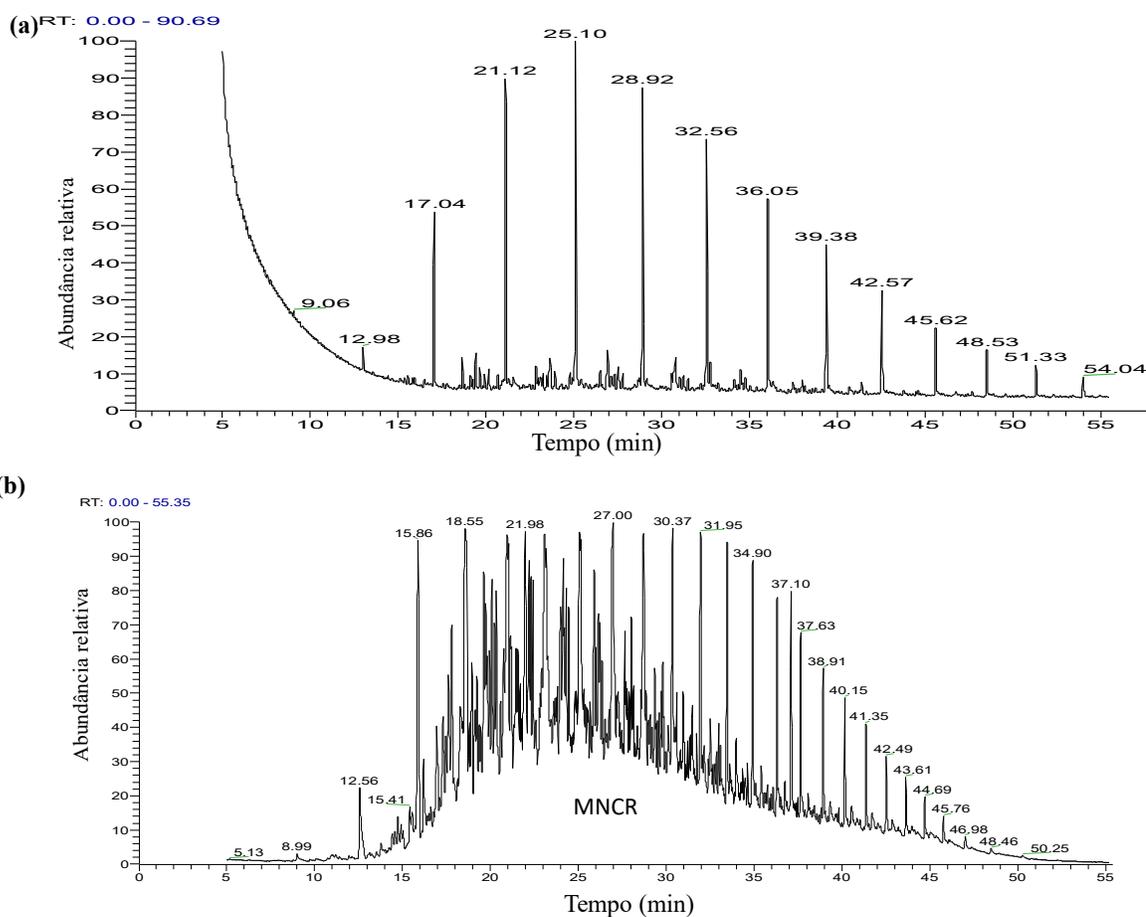


Figura 1. Exemplo de cromatograma que (a) apresenta e (b) não apresenta MCNR. *Fonte: a própria autora.*

São classificados como hidrocarbonetos de baixo peso molecular os que possuem vinte ou menos carbonos em sua composição ($\leq C_{20}$) e os que possuem mais de vinte átomos de carbono em sua composição são classificados como de alto peso molecular ($\geq C_{21}$). A relação ($\leq C_{20}/\geq C_{21}$) que correspondente ao somatório das concentrações de hidrocarbonetos de menor peso molecular com o somatório das concentrações de maior peso molecular com valores <1 , indica alta incidência de compostos segregados por bactérias e plantas terrestres. Essa razão indica um principal aporte de hidrocarbonetos de origem biogênica (OLIVEIRA, 2007).

A biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos é substancialmente maior na fase inicial do processo de degradação quando comparados com os grupos aromáticos e polares (LIU *et al.*, 2011). Segundo CRUZ e MARSAIOLI (2012) os compostos lineares são os primeiros a serem consumidos pelos microrganismos visto que são os mais abundantes em óleos não biodegradados.

2.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPA

Os HPA, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, são presentes no meio ambiente. Compreendem uma variedade de hidrocarbonetos compostos de dois a sete anéis benzênicos, compreendendo mais de 100 substâncias nas quais possuem diferentes características físicas e químicas.

Os HPA formam-se quando material que contém carbono é queimado de maneira incompleta. Sua ocorrência é dada em virtude de origens antropogênicas e naturais, incluindo origens pirogênicas e petrogênicas. São moléculas resistentes à oxidação, evaporação e redução, características essas que aumentam com o peso molecular. São divididos em dois grupos: os de baixa à média solubilidade e de baixa à média volatilidade, em consequência,

sua distribuição no meio ambiente é diferenciada devido a suas diferentes características físico-químicas (Tabela 2).

Tabela 2. Propriedades químicas de alguns HPA.

Molécula	Peso molecular	Pressão de vapor	Solubilidade em água (g/ml)	Tempo de meia vida no solo	Log K(o/a)
Naftaleno	128	36,8	31	<125 d	3,37
Acenafitileno	152	4,14	16,1	40-60 d	4,00
Fluoreno	166	0,71	1,9	~30 d	4,18
Fenatreno	178	0,113	1,1	2 d	4,57
Antraceno	178	0,0778	0,045	50 d – 1,3a	4,54
Pireno	202	0,0119	0,132	~200 d - 5 a	5,18
Benzo[a]pireno	252	$2,13 \times 10^{-5}$	0,0038	270 d – 8,2 a	6,04
Benzo[ghi]perileno	276	$2,25 \times 10^{-5}$	0,00026	~9 a	6,5

Em virtude de tais propriedades apresentadas, essas substâncias podem ser encontradas adsorvidas no material particulado. No solo geralmente são retidos nas camadas superiores e a degradação dos compostos de maior massa molecular é geralmente lenta e seu tempo de meia vida geralmente é alto (NETO *et al.*, 2000).

Tais substâncias são objetos de estudo, dada a sua importância geoquímica como marcadores moleculares em sedimentos, explicando a origem dos depósitos sedimentares, constituindo uma importante ferramenta na avaliação da evolução de transformações da matéria orgânica no ambiente. A maior fonte desses compostos se dá por inserção antropogênica, principalmente industriais (caldeiras industriais, incineradores industriais, produção de petróleo *off-shore* e transporte de petróleo), entretanto cada tipo de fonte, pirogênica, petrogênica e diagênese gera um grupo predominante de HPA, o que torna possível identificar a origem do HPA. Apresentam distribuições diferentes de acordo com suas fontes, entretanto existem dificuldades de se analisar uma amostra sedimentar que pode apresentar hidrocarbonetos de várias origens, sem contar que características físico-químicas de alguns HPA podem contribuir para a modificação da distribuição dessas moléculas a partir dos seus meios de emissão (SVERDRUP *et al.*, 2003).

Entretanto, índices moleculares baseados na co-variabilidade do comportamento físico-químico foram desenvolvidas para acessar as várias origens de tais poluentes (SOCLO, 1989; BAUMARD *et al.*, 1998). Com a associação de vários índices moleculares é possível identificar a fonte de origem de hidrocarboneto na matriz de estudo.

Alguns índices diagnósticos utilizados para identificar as fontes de hidrocarbonetos estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Algumas relações índices diagnósticos para indicar fonte de Hidrocarbonetos.

Índice Diagnóstico	Petrogênico	Queima de Petróleo	Combustão de Carvão	Combustão de Madeira	Referências
An/(An+Fen)	< 0,10	> 0,10	> 0,10	> 0,10	a, b
Fl/(Fl+Pir)	< 0,40	0,40 – 0,50	> 0,50	> 0,50	a, b
B(a)A/(B(a)A+Cris)	< 0,20	> 0,35	> 0,35	> 0,35	a, b
C0/(C0+C1)178	< 0,50	> 0,50	> 0,50	> 0,50	a, b
C0/(C0+C1)202	< 0,50	> 0,50	> 0,50	> 0,50	a, b
IP/(IP+B(ghi)P)	< 0,20	0,20 – 0,50	> 0,50	> 0,50	a, b
Par/(Par+Alc)	< 0,30	> 0,50	> 0,50	> 0,50	b
Anel 4,5,6/THPA	< 0,40	> 0,50	> 0,50	> 0,50	b
1,7(1,7+2,6)DMP	-	< 0,45	> 0,70	> 0,70	a

CO – homólogos metilados. Fonte: a-YUNKER *et al.* (2002); b - COLOMBO *et al.* (1989) [apud a BIACHE *et al.*, 2014].

No entanto, a aplicação dos índices pode indicar sobreposição de fontes de origem o que dificulta o diagnóstico. OLIVEIRA (2007) ao avaliar ambiente remoto na Amazônia aplicando a razão BPM/APM, que representa a soma dos compostos parentais de baixo peso molecular (Fen, An, F, Pi) sobre a soma dos compostos de alto peso molecular (BaA, Cri, BbFl, BkFl, BaPi, IPi, DbahA, BghiPe), encontrou valores ≥ 1 , quando compostos mais leves prevalecem em relação aos mais pesados, indicando a presença de aporte petrogênico, no entanto, sugere que o diagnóstico tenha apresentado um indicação errônea, visto que para as amostras do trecho avaliado os valores das concentrações de alguns dos compostos envolvidos na construção do índice, apresentam níveis baixos, menores inclusive do que o limite de detecção do método, o que conclui que para correto emprego do índice o ambiente avaliado deve ser conhecido.

BIACHE *et al.* (2014) sugerem ter cautela ao utilizar índices diagnóstico para avaliar a fonte de HPA pois estes podem ser modificados drasticamente durante os processos de transporte e deposição desses compostos.

Dependendo da origem dos HPA, a maior parte, em torno de 60 % a 90 % são biodegradáveis, e a menor parte, de 10 % a 40% são classificados como recalcitrantes, ou seja, não biodegradáveis, apresentando longos tempos de meia vida (SANTOS e MARANHO, 2018).

A remoção de HPA do solo é definida pelos processos e condições ambientais (Figura 2) sendo a principal por meio de degradação microbiana, no entanto outros fatores como volatilização, foto-oxidação, oxidação química, bioacumulação, adsorção e adesão ao solo são relevantes (CERNIGLIA, 1992).

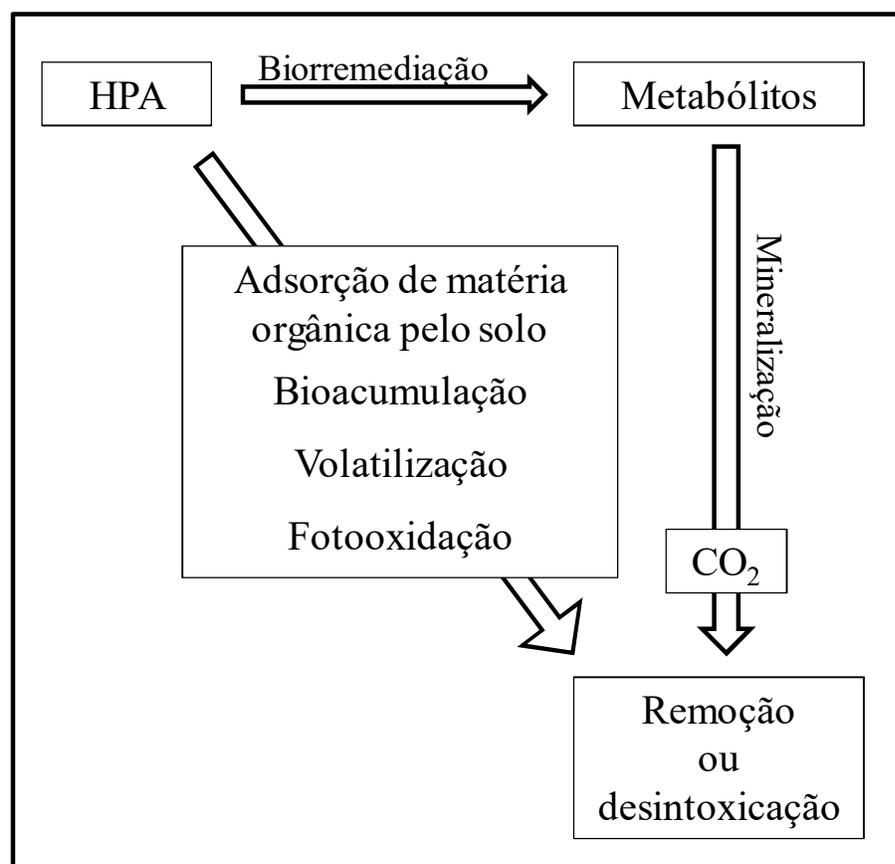


Figura 2. Processos que influenciam a remoção de HPA no ambiente. Fonte: adaptado de CERNIGLIA, 1992.

2.2.1 HPA e atividade carcinogênica

Os HPA formam uma classe especial de poluentes químicos, pois apresentam atividades carcinogênica e mutagênica. O hidrocarboneto carcinogênico mais comum é o benzo[a]pireno (Figura 3a), que contém cinco anéis de benzeno. É tido como um derivado do pireno, cuja diferença se dá pelo acréscimo de mais um anel aromático. Um segundo exemplo de HPA conhecido como carcinogênico é o hidrocarboneto de quatro anéis benzo[a]antraceno (Figura 3b), que consiste em um antraceno com outro anel benzênico condensado à ligação “a”. HPA com grupos metila (Figura 3c) são mais carcinogênicos que os hidrocarbonetos originais (BAIRD, 2002).

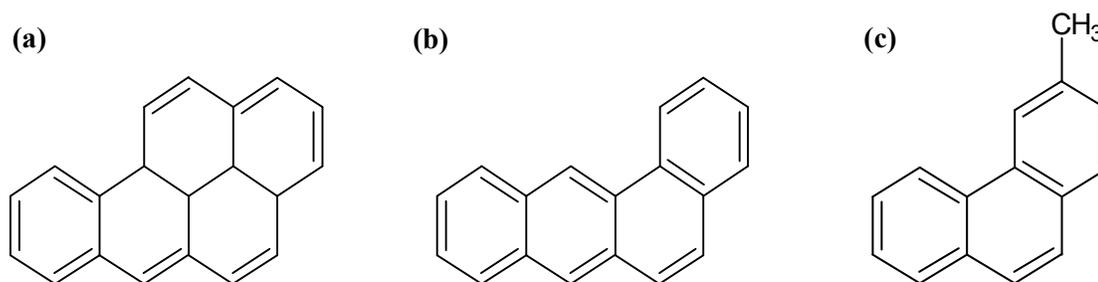


Figura 3. Exemplos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (a) Benzo[a] pireno; (b) Benzo[a] antraceno (c) 1 – metil fenantreno.

As portas de entradas desses compostos no organismo humano são através das vias respiratórias, dérmicas e gastrointestinais. A Agência internacional em pesquisas de câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*) classificou alguns HPA em classes: carcinogênicos aos humanos (Grupo 1) possivelmente carcinogênico aos humanos (Grupo 2A) e probabilidade de ser carcinogênico aos humanos (Grupo 2B) (ABDEL-SHAFY e MANSOUR, 2016). DOMINGO e NADAL (2015) afirmam que dependendo da forma de preparação ou das características da comida o consumo de alguns alimentos podem ser porta de entrada de HPA no organismo humano.

No organismo esses hidrocarbonetos são biotransformados por uma série de enzimas que catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise (oxigenases de função mista, citocromo P450, NADPH-citocromo-c-redutase) e de enzimas que catalisam reações de

conjugação (sulfotransferase, epóxido hidrolase, glutation-S-transferase e UDP-glicotransferase) as quais se distribuem por todos os tecidos. A primeira transformação que ocorre é a formação de um anel epóxido através da formação de uma ligação dupla do anel. Monoxigenases dependentes do citocromo P450 (CYP1A) são responsáveis pela oxidação enzimática dos HPA. Elas agem principalmente sobre a região de elevada densidade eletrônica formando os epóxidos. Uma fração de moléculas sofre a adição de água por ação das epóxido hidrolases produzindo dihidrodíóis vicinais. A ligação dupla remanescente que se encontra no mesmo anel dos grupos OH sofre uma subsequente epoxidação (epóxidos secundários ou di-hidróxido epóxido), formando moléculas que são carcinógenos ativos (BOUCHEZ *et al.*, 1996), já que o aduto formado (Figura 4) pode forçar a célula a erros de reparação que, subseqüentemente, pode resultar em tumoração (LOPES e ANDRADE, 1996).

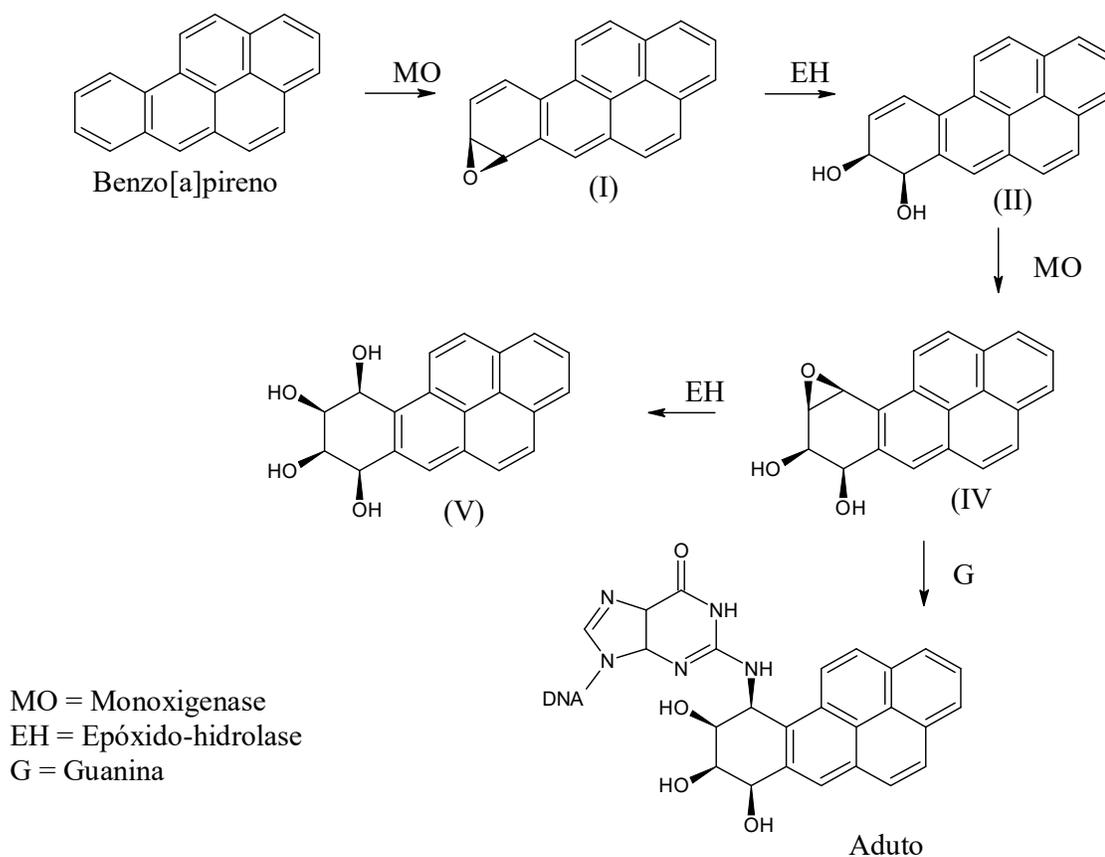


Figura 4. Mecanismo de eliminação/ativação metabólica do BaP e representação esquemática do aduto formado pela interação com o DNA. *Fonte: LOPES e ANDRADE (1996).*

2.2.2 Fontes de HPA

Os HPA apresentam características predominantes conforme sua origem. Quando formados através de processos de combustão incompleta de matéria orgânica natural e fóssil, em altas temperaturas, são denominados pirogênicos. Estes são caracterizados pela predominância de compostos não substituídos em relação aos seus homólogos alquilados, assim como pela predominância dos compostos de maior peso molecular, de 4 a 6 anéis aromáticos. Quando ocorre presença petrogênica, ou seja, os compostos são originados de maturação lenta da matéria orgânica, ocorre predominância de HPA de 2 a 3 anéis. Os HPA produzidos por degradação de precursores biogênicos são de origem de diagênese recente da matéria orgânica e se caracterizam pela apresentação do grupo de hidrocarbonetos oleínicos de origem biogênica. Também é encontrada a presença de perileno como o HPA de maior intensidade (ABOUL-KASSIM e SIMNEIT, 2001).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de maior predominância no petróleo e seus derivados são os de menor peso molecular, assim como as series homologas dos isômeros alquilados. Os HPA presentes no carvão e asfalto podem ter biodisponibilidade mais limitada (BOEHM *et al.*, 2001).

Os HPA pirogênicos produzidos pela combustão de biomassa e de combustível fóssil geralmente estão associados a partículas ricas em fuligem carbonizada. A matriz de carbono resultante é rica em HPA de maior peso molecular, muitos dos quais são resistentes à degradação na atmosfera, na coluna d'água e no sedimento, e dessa forma são considerados potencialmente tóxicos à biota.

Diante da sua ocorrência no meio ambiente e das atividades carcinogênica e mutagênica, os HPA foram incluídos na agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (US EPA) e na União Europeia como poluentes prioritários. A US EPA fixou 16 HPAs como

os mais perigosos: naftaleno (Naf), metil-naftaleno (mNaf), dimetil-naftaleno (dNaf), acenaftileno (Acf), acenafteno (Ace), fluoreno (F), fenantreno (Fen), antraceno (A), fluoranteno (Fl), pireno (Pi), criseno (Cri), benzo[a]antraceno (BaA), benzo[b]fluoranteno (BbFl), benzo[k]fluoranteno (BkFl), benzo[a]pireno (BaPi), benzo[g,h,i]perileno (B[ghi]Pe) e dibenzo[a,h]antraceno (dB[ah]An).

2.2.3 Quantificação de HPA

A quantificação de HPA em matrizes ambientais como ar, água, solo e sedimento é bastante complexa e dispendiosa, por este motivo diversas pesquisas se dedicam a otimizar os métodos clássicos a fim de diminuir o tempo de análise e o alto custo (CRISTALE *et al.*, 2008; CAVALCANTE *et al.*, 2008; FERREIRA, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2010; EMÍDIO e DÓREA, 2010), além de buscar diminuir os interferentes nesse tipo de análise (KRÜGER *et al.*, 2014). O método clássico para determinar HPA (EPA-US 3550) pode ser problemático subestimando a concentração de HPA, dificultando trabalhos de monitoramento ambiental, principalmente quando o número de amostras é muito grande (GUERIN, 1998) por este motivo, há uma faixa aceitável para o padrão de recuperação que varia de 60 a 120 %.

As várias etapas do processo de extração, “*clean up*” e análise cromatográfica contribuem para a alta complexidade e o alto custo deste tipo análise. De acordo com o método clássico para 3540C da EPA-US (1996), uma das etapas principais para quantificação de HPA, o processo de extração, pode levar de 16 a 24 horas para sua obtenção, utilizando grandes quantidades de solventes.

2.3 Óleo diesel

O óleo diesel é uma mistura complexa proveniente da primeira etapa do refino do petróleo, a destilação primária, com hidrocarbonetos variando de C₈ a C₃₀, sendo composto de aproximadamente 40% de n-alcanos, 40% de isoalcanos e cicloalcanos e 20% de hidrocarbonetos aromáticos (LEE *et al.*, 1992). É o principal petroderivado 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 (PETROBRAS, 2012).

Como o fornecimento de energia elétrica é deficiente nas comunidades isoladas ao longo dos rios da região do estado do Amazonas, a grande maioria do fornecimento é realizada pela própria comunidade ou pelo poder municipal local. Normalmente os comunitários adquirem um grupo gerador com recursos dos moradores. Uma alternativa encontrada pelas prefeituras para atendimento às comunidades isoladas é o sistema de quotas mensais de óleo diesel, distribuídas entre os moradores. Ultrapassando essa quota, os moradores assumem os custos adicionais, elevando o custo médio para acima da tarifa média praticada pelas concessionárias (ELETROBRAS) e, devido à importância do óleo para essas comunidades o transporte do mesmo pode ocasionar problemas ambientais (BINSZTOK *et al.*, 2008).

O consumo total de óleo diesel/biodiesel para suprir os 101 sistemas isolados do Amazonas, previsto para o ano de 2014, era de 326.965 m³, para produzir 1.213,32 GWh, correspondendo ao consumo específico médio de 0,27 l/kWh (SOUZA, 2014). Segundo relatório da companhia de distribuição de energia ELTROBRAS (2016), foram necessários 602.115.051 litros de diesel para essas populações em um período de 10 meses, essa grande demanda de combustíveis transportados aumenta o risco de problemas ambientais.

De acordo com a legislação brasileira atual (LEI Nº 13.263, DE 23 DE MARÇO DE 2016) a adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado deve chegar a 10% até 2019.

O biodiesel é uma mistura de alquilésteres de cadeia linear, obtida da transesterificação dos triglicerídeos de óleos e gorduras com álcoois de cadeia curta (Figura 5) esta reação tem como coproduto o glicerol (LOBO *et al.*, 2009).

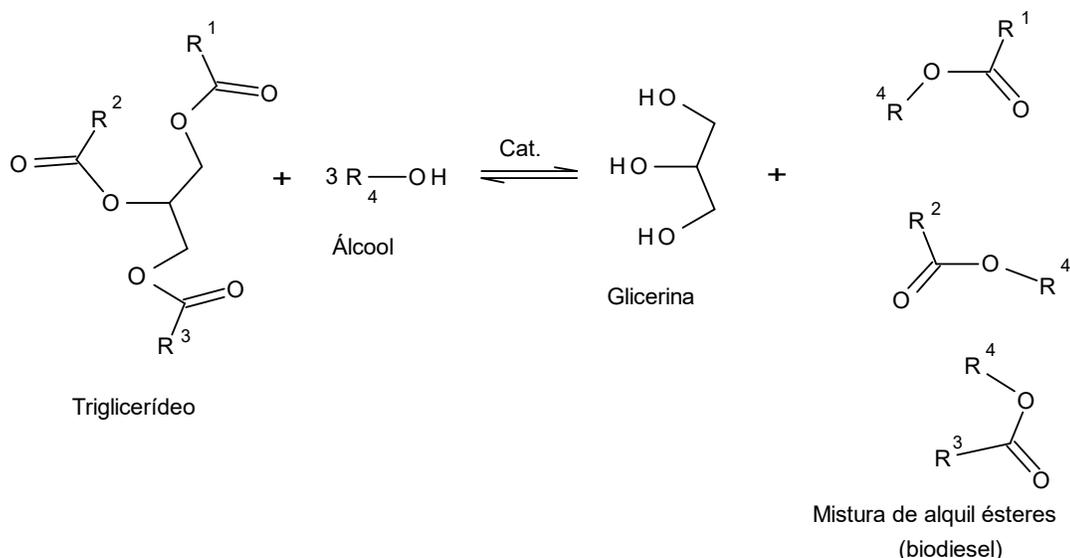


Figura 5. Reação de transesterificação de triglicerídeos. *Fonte: adaptado de Ferreira e Cruz (2009).*

BRAGA *et al.* (2014) que avaliaram a degradação de biodiesel em solo por biorreatores, verificaram remoção acima de 80% do óleo. No entanto a presença de biodiesel no diesel pode ser afetada pela origem do biodiesel, por exemplo, de acordo com GOMES (2008) o biodiesel de derivados de soja é de mais fácil assimilação por microrganismos que os de mamona.

2.4 Biorremediação

O processo de biorremediação envolve o uso de microrganismos para degradar constituintes orgânicos complexos e perigosos em substâncias inofensivas e simples, tais como dióxido de carbono e água. O processo de degradação pode ser melhorado alterando as condições químicas ou físicas do solo, tais como: o pH do solo, umidade e arejamento, e também pela adição de nutrientes (WILSON e JONES, 1993).

Esta biotecnologia vem sendo utilizada há vários anos e, em certos casos, apresenta menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas (como incineração e lavagem do solo), sendo atualmente utilizada em escala

comercial no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas contaminadas (BANFORTH e SINGLETON, 2005).

Existem alguns tipos de tecnologias de biorremediação, dois dos mais comuns são a bioaumentação que consiste na adição de microrganismos com capacidade degradadora; e a bioestimulação que consiste na adição de nutrientes ou biossurfactantes no solo para estimular a ação dos microrganismos autóctones (WHANG *et al.*, 2008).

Segundo SUN *et al.* (2012) as técnicas de bioaumentação e bioestimulação utilizadas em conjunto podem aumentar a degradação de HPA em solo, principalmente os de maior peso molecular com 4 a 6 anéis, onde a degradação chega a ser 20 a 40 % maior que quando as técnicas são utilizadas separadamente.

A toxicidade de hidrocarbonetos de petróleo é diminuída em solo natural devido à degradação destes compostos por microrganismos (GARCIA *et al.*, 2005). KONG *et al.* (2018) **ao avaliar a adição de microrganismos no solo demonstra que a adsorção desses microrganismos com os HPA do solo levam ao aumento da biodegradação desses poluentes.**

Os compostos encontrados no petróleo são removidos preferencialmente na sequência: n-alcenos, alquilcicloexanos, isoprenoides acíclicos, alcenos bicíclicos, esteranos e hopanos, com produção de novos compostos como produtos de biodegradação, tais como 17a, 25-nor-hopanos a partir da desmetilação de hopanos em níveis severos de degradação (HEAD *et al.*, 2003; WALTERS, 1999).

O primeiro passo da via de degradação bacteriana aeróbica de hidrocarbonetos aromáticos é sua transformação em um intermediário central, geralmente o catecol (Figura 6) através da introdução de grupos hidroxila por enzimas periféricas (KANALY e HARAYAMA, 2000). Por este motivo a determinação desse composto pode funcionar como marcador do estágio de biodegradação.

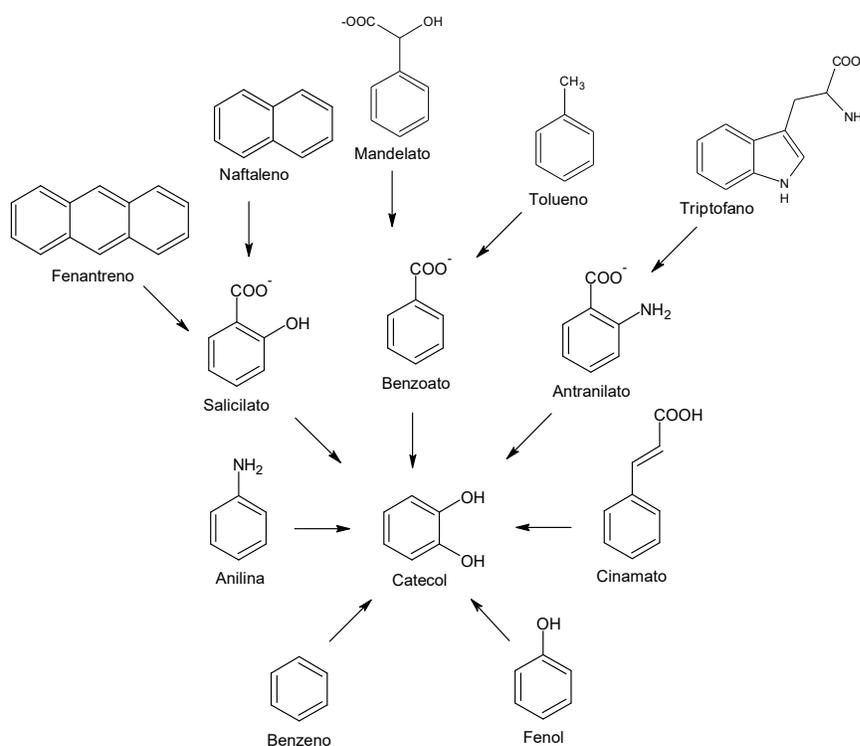


Figura 6. Catecol, substância marcadora de biodegradação por bactérias. *Fonte: adaptado de (LEMOS et al., 2008).*

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

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. Esta abertura pode ocorrer 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).

Na terceira etapa 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).

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 (Figura 7) e de n-alcenos (Figura 8).

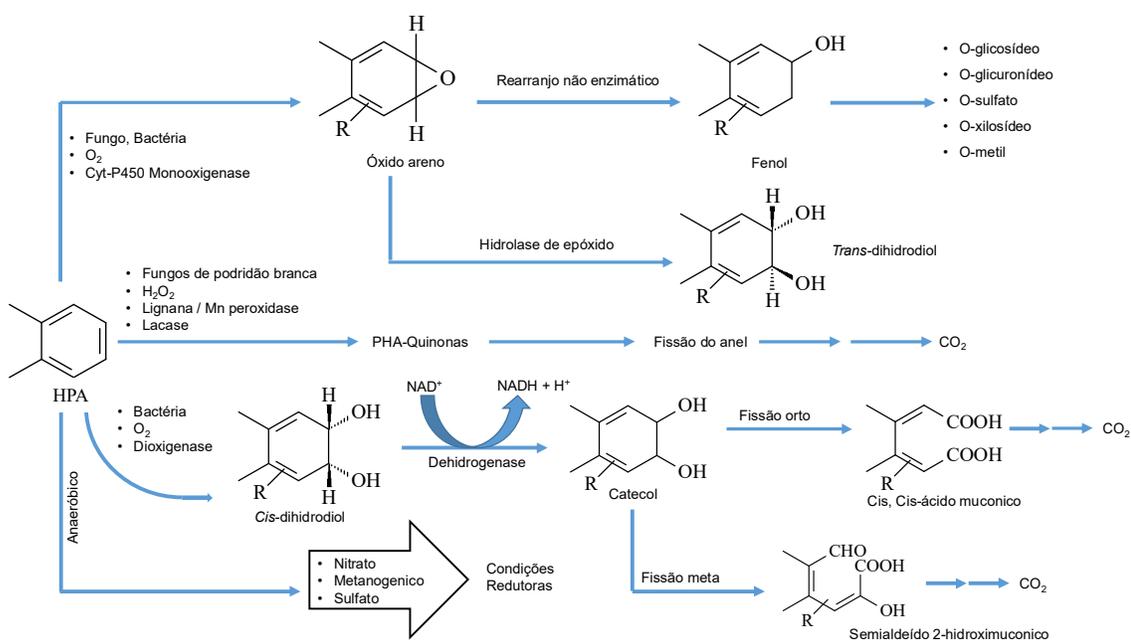


Figura 7. Proposta do caminho microbiano de degradação de HPA. Fonte: adaptado de HARITASH e KAUSHIK (2009).

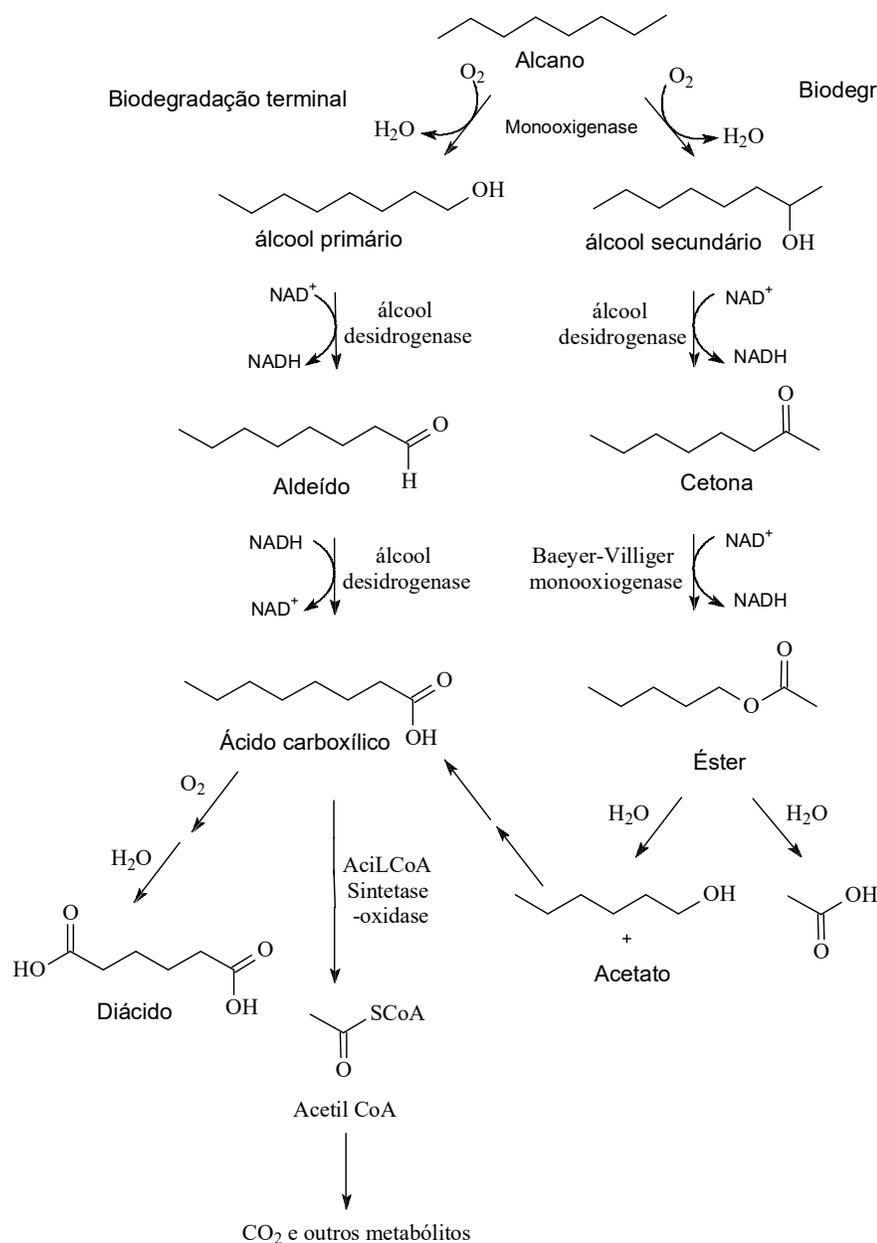


Figura 8. Rota de biodegradação aeróbica de n-alcenos. *Fonte: Adaptado de: CRUZ e MARSAIOLI (2012).*

Os n-alcenos de cadeias menores são oxidados subterminalmente (1º carbono secundário da cadeia do n-alceno), formando álcool secundário, cetona, éster e ácidos carboxílicos, que são posteriormente biodegradados pelo processo de β -oxidação (CRUZ e MARSAIOLI, 2012).

2.5 Rizobactérias

Rizobactérias é um grupo de bactérias que formam nódulos em raízes de plantas leguminosas por interação simbiótica, auxiliando na fixação biológica de nitrogênio (N) nas raízes das plantas (GOURION *et al.*, 2015) nutriente essencial em solos agrícolas. A utilização desse grupo leva, então, diminuição da adição de N por fertilizantes químicos, que em grandes quantidades pode trazer prejuízos à qualidade do produto, sendo assim de alta importância agronômica (SOARES *et al.*, 2006).

Esses microrganismos podem ser selecionados e testados individualmente ou na forma de consórcios para avaliar seu potencial de degradação de petróleo e seus derivados, ou mesmo medir o uso de biossurfactantes por eles produzidos como ferramentas para o desenvolvimento de estratégias de recuperação ambiental e aplicação biotecnológica (SANTOS e MARANHO, 2018).

Os solos da região amazônica são propícios à presença desses microrganismos, pois seu crescimento é favorecido em pH ácido e em altas temperaturas (CAMPOS *et al.*, 2010), além de sua reprodução ser aumentada devido a alta umidade do solo (ZILLI *et al.*, 2013) o que ocorre periodicamente com inundações frequentes nos solos de várzea.

Os rizóbios tornam-se uma boa alternativa para biorremediação de compostos do petróleo e seus derivados, pois eles toleraram a presença de compostos tóxicos como PCBs e HPA (AHMAD *et al.*, 1997). Segundo KAKSONEN *et al.* (2005) plantas leguminosas aumentam a diversidade bacteriana em solos contaminados com óleo. Na Tabela 4 estão descritos trabalhos utilizando rizobactérias para biodegradação de compostos tóxicos.

Tabela 4. Estudos de biodegradação por rizobactérias.

Referência	Resultados
SUOMINEN <i>et al.</i> (1999)	As espécies de rizóbios foram sensíveis às concentrações m - toluato superiores a 1.000 ppm.
JOHNSON <i>et al.</i> (2003)	Sugeriram que <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>Trifolli</i> é um inoculante viável em solos contaminados com altas concentrações de

	HPAs.
KAKSONEN <i>et al.</i> (2005)	Sugeriram que a rizoremediação parece funcionar de tal maneira que a leguminosa estimula a proliferação bacteriana e degradação do m-toluato, o que pode facilitar o crescimento mais profundo das raízes nos solos contaminados.
JOHNSON <i>et al.</i> (2005)	Reforçam a hipótese de que a dissipação de HPAs na rizosfera ocorreu devido a estimulação da comunidade microbiana do solo.
WEI <i>et al.</i> (2008)	O isolado de Rizóbio CCNWTB701 a partir de <i>A. chrysopteru</i> apresentou habilidade de degradação de 99,5 a 78,3%.
TENG <i>et al.</i> (2010)	Indicaram que <i>alfalfa-rhizobium</i> pode desempenhar um importante papel na dissipação dos HPAs em solos e inoculação com <i>R. melioli</i> para uma degradação melhorada no solo.
YESSICA <i>et al.</i> (2013)	Mostraram, 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.
BISTH <i>et al.</i> (2014)	A rizobactéria <i>Bacillus sp.</i> SBER3 demonstrou potencial para biodegradação, ao reduzir em torno de 84,4 % e 75,1% do antraceno e do naftaleno, respectivamente após seis dias de incubação.

É essencial conhecer o habitat natural de degradação das populações microbianas antes de se afirmar que determinado plano de biorremediação é rentável, ecologicamente seguro e saudável para o ambiente, dessa forma a experimentação com amostras ambientais se torna necessária para afirmar que determinado microrganismo será satisfatório para determinado ambiente.

Dados preliminares do projeto “Rede CT-Petro/Rede-03: tecnologias para a recuperação de ecossistemas e conservação da biodiversidade na Amazônia brasileira” indicam a atuação de microrganismos dos solos na degradação do petróleo e como pode ser

intensificada adicionando-se nutrientes necessários para acelerar seu metabolismo. Os microrganismos utilizados nesse trabalho foram provenientes do estudo realizado por BRITO (2013) que concluiu que 15 Rizobactérias pertencentes ao filo alpha-Proteobactéria, apresentaram habilidade de degradar petróleo e tolueno quando usados como fontes de carbono.

A codificação das bactérias utilizadas assim como o local de coleta estabelecido dentro projeto Rede CT-Petro/Rede-03 e as espécies de plantas das quais foram obtidas estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Locais de coleta e espécies de plantas de obtenção dos rizóbios.

Rizobactérias	Local da coleta	Planta
INPA R546, INPA R548	Ramal do Caldeirão, Terra firme, km 3	Pueraria phaseoloides (Feijão Bravo)
INPA R560, INPA-R574	Ramal do Caldeirão km3	Pueraria phaseoloides (Feijão Bravo)
INPA-R677	Viveiro de Urucu	Cedrelinga catenaeformis (Cedrorana)

Fonte: BRITO, 2013 adaptada.

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. Estes compostos são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica (Figura 9). A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes (NITSCHKE e PASTORE, 2002; DISAI e BANAT, 1997; CAMEOTRA, 1998).

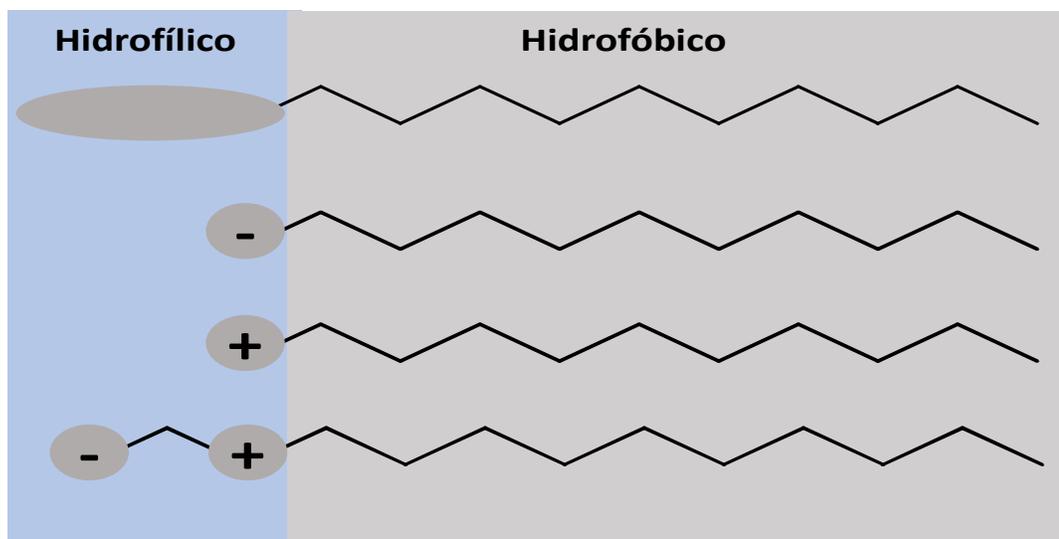


Figura 9. Representação genérica de compostos surfactantes.

Os surfactantes microbianos são moléculas complexas e compreendem compostos de uma grande variedade de classes químicas, incluindo os peptídeos, ácidos graxos, fosfolipídeos, glicolipídeos e lipopeptídeos (BATISTA, 2002).

O teste de emulsificação é um dos mais importantes para testar a biodegradabilidade de microrganismos, quanto mais espessa for a camada emulsificante, maior será a quantidade de biosurfactantes hidrofóbicos produzidos. Na Tabela 6 estão descritos as cinco espécies de bactérias que apresentaram maior atividade emulsificante dentre os testes realizados por BRITO (2013), e que serão utilizados neste estudo para avaliação do seu potencial de degradação por determinação das concentrações de hidrocarbonetos após determinados períodos de exposição a esses microrganismos.

Tabela 6. Espessura da camada emulsificante (em cm), de estirpes de rizóbios 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 R557	8,38	A	4,56	A	9,58	A	9,09	A
INPA R560	7,57	A	6,56	A	8,23	A	10,65	A
INPA R631	9,42	A	12,78	A	5,61	A	7,58	A

Bactéria	Solução salina SYM				Solução Salina INPA			
	Petróleo		Tolueno		Petróleo		Tolueno	
	----- cm -----							
INPA R674	11,08	A	15,52	A	10,98	A	17,90	A
INPA_R677	8,64	A	12,90	A	13,36	A	12,18	A

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

Os Rizóbios utilizados por BRITO (2013) foram obtidos de nódulos de plantas presentes nas raízes de plantas leguminosas provenientes de solos de várzea, podendo ser utilizados em ambientes nesses ambientes. A qualificação da atividade emulsificante foi feita de acordo com a convenção adotada por MATSUURA (2004, apud MOURA, 2012), Tabela 7.

Tabela 7. Critérios para quantificação de atividade emulsificante.

Atividade emulsificante	Altura da emulsão (tipo água em óleo)	Densidade óptica 610 nm (tipo óleo em água)
Alta	≥2 cm	≥1,2 U
Moderada	de 1 a 1,9 cm	de 0,7 a 1,1 U
Baixa	<1 cm	de 0,1 a 0,6 U

Fonte: MATSUURA (2004, apud MOURA, 2012).

Todos os isolados de rizóbios testados produziram camadas significativas desses emulsificantes, conforme se observa pela comparação com a camada formada pelo tratamento controle. Segundo MATSUURA (2004), as camadas emulsificantes formadas por todos esses isolados são classificadas como altas (bem espessas).

Segundo BEZZA e CHIRWA (2016) a produção de biosurfactantes *in situ* leva ao aumento da dessorção e emulsificação de contaminantes hidrofóbicos aumentando a sua biodisponibilidade o que leva ao aumento do potencial de biodegradação.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de biodegradação Rizobactérias em amostras de solo de várzea contaminadas por petróleo e óleo diesel.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar e quantificar os hidrocarbonetos aromáticos em solo de várzea da Amazônia central e identificar a origem predominante de matéria orgânica;
- Ativar cinco Rizobactérias e utilizar na biodegradação de petróleo e do óleo diesel em amostras de solo de várzea;
- Quantificação de propriedades físicas e químicas, que influenciam a ação de bactérias degradadoras, em amostras de solo de várzea;
- Quantificar espécies metálicas na amostra de solo de várzea;
- Identificar e quantificar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nas amostras provenientes do experimento de biodegradação em diferentes tempos de atuação;
- Identificar e avaliar a abundância relativa dos hidrocarbonetos saturados nas amostras provenientes do experimento de biodegradação em diferentes tempos de atuação;
- Identificar e avaliar a abundância relativa de substância marcadora de biodegradação;
- Avaliar o potencial de biodegradação de petróleo e diesel pela atuação de rizobactérias em amostras de solo de várzea.

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 - S 3.308925; W 60.607647 – (Figura 10). Foram realizadas coletas de solo superficial de 0 – 20 cm, em cinco pontos amostrais determinados aleatoriamente, peneirados na casa de vegetação do INPA para obtenção de uma amostra mista (Figura 11).

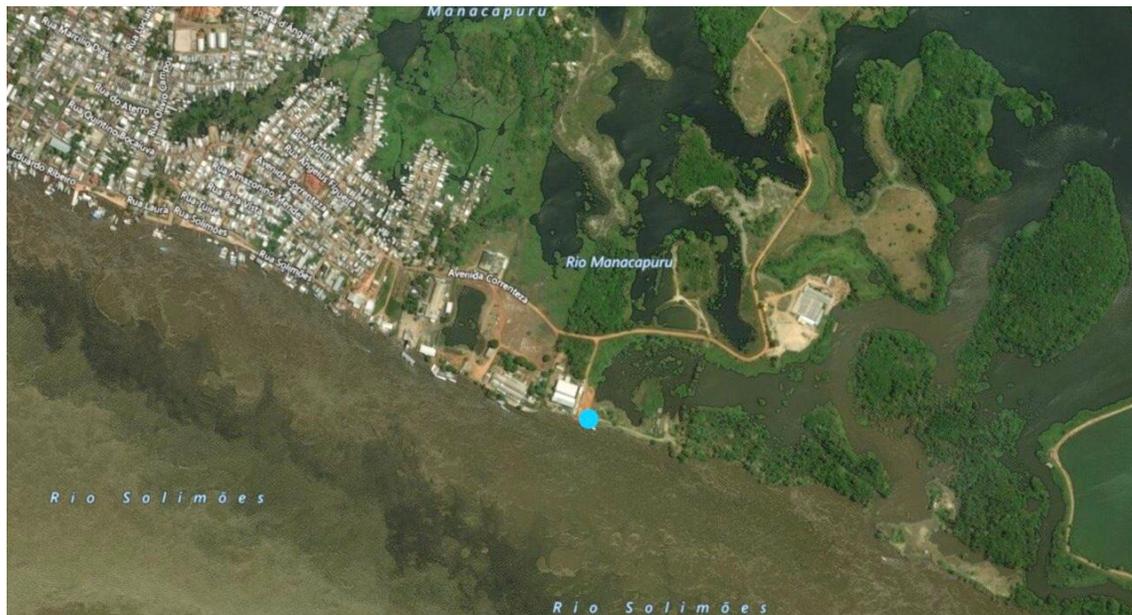


Figura 10. Mapa da região de coleta de solo na cidade de Manacapuru-AM (S 3.308925; W 60.607647). Fonte: Google maps.



Figura 11. (a) revolvimento; (b) coleta; (c) armazenamento do solo. Fonte: a própria autora.

4.2 Propriedades químicas do solo

A determinação das propriedades físicas e químicas do solo foi realizada de acordo com o manual de métodos de análise de solo da EMBRAPA (2011). O detalhamento do método específico utilizado para cada parâmetro está descrito na Tabela 8.

Tabela 8. Metodologias empregadas na determinação das propriedades químicas do solo.

Propriedades da amostra de solo	Metodologia
pH	Potenciometria
N (g kg⁻¹)	Kjeldahl
C (g kg⁻¹)	Titulometria com K ₂ Cr ₂ O ₇
M.O (g kg⁻¹)	Gravimetria
K (cmolc kg⁻¹)	Absorção atômica
Ca (cmolc kg⁻¹)	Absorção atômica
Mg (cmolc kg⁻¹)	Titulometria complexiométrica
Al (cmolc kg⁻¹)	Titulometria
P (mg kg⁻¹)	Titulometria
Fe (mg kg⁻¹)	Absorção atômica
Zn (mg kg⁻¹)	Absorção atômica
Mn (mg kg⁻¹)	Absorção atômica
Cu (mg kg⁻¹)	Absorção atômica
Metais Ba, Cd, Hg, Pb, Se, Cr e Sb	Fluorescência de raio X

4.3 Análise granulométrica

A análise granulométrica do solo foi realizada pelo método de espalhamento a Laser no equipamento Granulômetro Mastersizer 2000, este método compreende partículas de 0,2 a 2000 µm.

4.4 Ativação de Rizobactérias

Os microrganismos adicionados ao solo de várzea contaminado com petróleo e óleo diesel foram cinco espécies de Rizobactérias provenientes de solos da Amazônia, pertencentes à coleção do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Microrganismos da Amazônia - INPA, que segundo BRITO (2013), possuem alto poder de produção de biosurfactantes e estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Identificação das Rizobactérias.

Identificação	Sigla
<i>Bradyrhizobim sp</i>	INPA R560
<i>Bradyrhizobim sp</i>	INPA R631
<i>Bradyrhizobim sp</i>	INPA R557
<i>Alicyclobacillus sp</i>	INPA R674
<i>Rhizobim sp</i>	INPA R677

As espécies isoladas utilizadas no experimento 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 – (Figura 12) conforme descrito por VINCENTE (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 VINCENTE (1970) e (SOMASEGARAN e HOBEN, 1985).



Figura 12. Riscagem das Rizobactérias em meio YM. Fonte: a própria autora.

4.5 Delineamentos dos processos de biorremediação

Para avaliação do potencial de biodegradação das bactérias foi montado um experimento onde foram pesados 500 g de solo de várzea em recipiente de vidro, em seguida o solo foi submetido à autoclave, para garantir sua total esterilização (Figura 13).



Figura 13. Pesagem da amostra de solo e autoclavagem para garantir sua total esterilização. *Fonte: a própria autora.*

Após a reativação das cinco espécies de bactérias com alto poder para produção de biosurfactantes, foi realizada a contagem de colônias de bactérias por hemacitômetro Neubauer (Figura 14), em seguida foram preparadas diluições das soluções obtidas para se atingir a concentração de 1×10^7 UFC de cada espécie.



Figura 14. (a) Hemacitômetro tipo Neubauer: lâmina retangular em forma de H com compartimentos e subcompartimentos. (b) Microscópio para leitura da lâmina. *Fonte: a própria autora.*

Foram adicionados ao solo uma solução de cada espécie de bactéria e uma fonte de carbono, óleo diesel e petróleo (cinco amostras para cada fonte). Em duas outras amostras de solo foram adicionados um consórcio das cinco Rizobactérias usando como fonte de carbono o óleo diesel em um e o petróleo no outro. O experimento foi realizado com o solo na capacidade de campo de 80% (Figura 15). O petróleo e óleo diesel utilizados no experimento foram cedidos pela empresa PETROBRAS, provenientes da refinaria de URUCU, Coari –

AM.). O experimento foi instalado em condições de laboratório, onde a temperatura variou de 27 °C a 30°C.

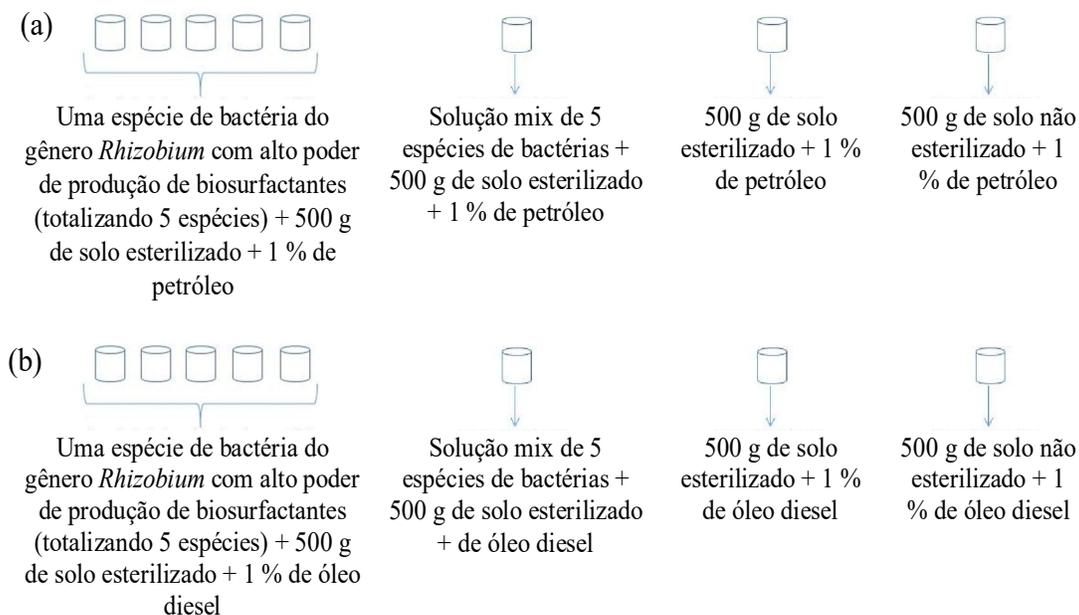


Figura 15. Esquema descrevendo o experimento de biodegradação utilizando como fonte de carbono (a) petróleo e (b) óleo diesel.

Foram realizadas três coletas para avaliação das taxas de remoção de hidrocarbonetos, nos tempos zero, 48 horas e 21 dias no experimento com óleo diesel; e no experimento com petróleo nos tempos zero, após os períodos de 48 horas, 10 e 21 dias, em fluxo laminar para prevenir contaminação das amostras (Figura 16). Após as coletas as amostras foram armazenadas em recipientes de alumínio, para evitar a contaminação por compostos orgânicos, e em seguida congeladas para realização das análises. A utilização de uma espécie de bactéria para teste busca mostrar como cada uma contribui para o processo de biodegradação, visto que é um processo complexo e diferentes fatores estão relacionados nesse sistema.



Figura 16. Coleta das amostras provenientes dos experimentos de biodegradação para determinação de hidrocarbonetos (totalizando 56 amostras). *Fonte: a própria autora.*

4.6 Determinação de hidrocarbonetos

4.6.1 Extração

As amostras de solo provenientes do experimento (10 g) foram homogeneizadas com 10 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), previamente descontaminado em forno mufla a 450 °C por 4 horas. A extração foi realizada por ultrassom, de acordo com o método EPA-US 3550C, utilizando-se uma mistura com 10 mL de diclorometano e 10 mL de acetona com 3 repetições durante 20 minutos cada. Para controlar a eficiência do método foram adicionados os padrões de recuperação certificados, obtidos da Sigma-Aldrich, triacontano ($\text{nC}_{30\text{d}}$) na concentração de 20 mg L^{-1} para hidrocarbonetos saturados, e p-terfenil 250 ng L^{-1} para HPA. A redução das frações foi realizada em evaporador rotativo e fluxo contínuo de nitrogênio, após a secagem total dos extratos, estes foram reconstituídos com hexano até o volume final de 1,0 mL.

4.6.2 Fracionamento

Após extração e concentração do extrato, os processos de limpeza do mesmo e fracionamento foram realizados em coluna de cromatografia líquida de vidro com 1,4 cm de diâmetro interno, com 2,5 g de sílica gel ativada, 0,5 g de alumina 5% desativada (p/v) e aproximadamente 0,5 g de cobre ativado (Figura 17). A primeira fração contendo os

compostos saturados (F1) foi eluída com 10 mL de hexano, e a segunda fração (F2) contendo os compostos aromáticos foi eluída com 10 mL de mistura de hexano e diclorometano (1:4). As amostras foram reduzidas por fluxo contínuo de nitrogênio até o volume final de 1,0 mL.



Figura 17. Fracionamento e limpeza dos extratos realizados em colunas cromatográficas. Fonte: a própria autora.

4.6.3 Hidrocarbonetos saturados

Os hidrocarbonetos saturados (F1) foram analisados segundo o método EPA-US 8270 D modificado. Para o cálculo de recuperação de F1, foi realizada a adição de padrão certificado no início da etapa de extração das amostras para teste de exatidão do método. A identificação de n-alcenos individuais em F1 foi obtida com base nos tempos de retenção obtidos pela injeção de padrão certificado de C₈ a C₄₀. A avaliação da biodegradação de alcanos foi realizada por meio da abundância relativa das áreas dos cromatogramas obtidos, proporcionais à taxa de recuperação de cada amostra.

A taxa de degradação de hidrocarbonetos saturados foi calculada segundo a Equação 1:

$$\text{Taxa de degradação} = \frac{(A_0 - A_f)}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde A_0 é relativo ao somatório das áreas dos n-alcenos no tempo zero e, A_f é relativo ao somatório das áreas dos n-alcenos no período final considerado.

4.6.4 Hidrocarbonetos aromáticos

Os hidrocarbonetos aromáticos foram determinados seguindo método EPA-US 8270 D modificado. (Tabela 10) A fase 2, obtida na etapa de fracionamento, recebeu adição de padrão interno solução mix de naftaleno – d₈, fenantreno – d₁₀, criseno – d₁₂, acenafteno – d₁₀ e perileno – d₁₂ na concentração de 250 ng mL⁻¹.

Tabela 10. Lista de HPA determinados indicados pela EPA-US com seus respectivos pesos moleculares, íon prioritário e secundário.

Composto	Abreviação	Número de anéis	Peso Molecular (g/mol)	Íon prioritário (m/z)	Íons secundário (m/z)
Naftaleno	Naf	2	128,17	128	129; 127
Acenaftileno	Aceftl	3	152,20	152	151; 153
Acenafteno	Ace	3	154,21	154	153; 152
Fluoreno	F	3	166,22	166	165; 167
Antraceno	A	3	178,12	178	176; 179
Fenantreno	Fen	3	178,23	178	179; 176
Pireno	Pi	4	202,26	202	200; 203
Fluoranteno	Fl	4	202,26	202	101; 203
Benzo(a)antraceno	B(a)A	4	228,29	228	229; 226
Criseno	Cris	4	228,29	228	226; 229
Benzo(a)pireno	B(a)Pi	5	252,31	252	253; 125
Benzo(b)fluoranteno	B(b)Fl	5	252,32	252	253; 125
Benzo(k)fluoranteno	B(k)Fl	5	252,32	252	253; 125
Perileno	Pe	5	252,32	252	253; 1,25
Benzo(ghi)perileno	B(ghi)Pe	6	276,23	276	138; 277
Indeno(1,2,3-cd)pireno	IPi	6	276,23	276	138; 227
Dibenzo(a,h)antraceno	D(a, h)A	5	278,35	278	139; 279

Fonte: EPA – US 8270.

Para o método analítico com padronização interna, a quantificação individual dos HPAs baseou-se em curvas de calibração contruídas com padrões certificados marca Supelco obtido do Sigma- Aldrich contendo uma mistura de 16 HPA, na faixa de 50 a 1000 ng L⁻¹, para a curva de baixa concentração; e de 1000 a 10.000 ng L⁻¹, para a curva alta concentração. Para o cálculo de recuperação de F2, foi realizada a adição de padrão certificado no início da etapa de extração das amostras. Os coeficientes de correlação variaram de 0,9810 a 0,9987 para a curva baixa dos 16 HPA; para o fenantreno e criseno foram utilizadas as curvas altas, devido a alta concentração desses compostos. Os graus de correlação foram de 0,9988 e 0,9986, respectivamente (Tabela 22 – ANEXO III). O limite de detecção e de quantificação do método foi de 0,13 a 27,27 µg L⁻¹ e de 0,90 a 50,03 ng g⁻¹(Tabela 22 – ANEXO III), respectivamente,

Os hidrocarbonetos policíclicos determinados são os descritos pela EPA-US (Tabela 10) e os saturados, foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (CG-EM) no equipamento Trace GC Ultra, acoplado ao espectrômetro ISQ Single Quadrupole MS da Thermo Scientific (Figura 18), utilizando coluna capilar DB5/MS (30 m × 0,25 mm × 0,25µm).



Figura 18. Cromatógrafo Trace GC Ultra, acoplado ao espectrômetro ISQ Single Quadrupole MS da Thermo Scientific.

A taxa de degradação de HPA foi obtida através da equação 2:

$$\text{Taxa de degradação} = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100 \quad (2)$$

Onde C_i = concentração inicial de HPA e C_f = concentração final de HPA.

4.7 Tratamento dos dados

Para obtenção dos dados, o tratamento dos espectros de massa obtidos foi realizado pelo software *THERMO XCALIBUR 2.2*, e o cálculo das concentrações de HPA e taxas de degradação por meio do *EXCEL 2010*.

Foi realizado o teste de normalidade (Shapiro – Wilk) para os dados ao nível de 95 % de confiança.

Ao ser avaliada a não normalidade dos dados, realizou-se a normalização logarítmica dos dados segundo as equações 3 e 4:

$$x^\lambda = \log(x + 1), \text{ para } x \geq 0 \quad (3)$$

$$x^\lambda = -\log(1 - x), \text{ para } x < 0 \quad (4)$$

Com os dados normalizados, foi utilizado o software *ORIGIN 8.0* para realização das análises estatísticas. Foi realizado teste estatístico ANOVA de uma variável para avaliar o potencial de remoção de hidrocarbonetos de petróleo em cada fonte de carbono utilizada. Foi realizado teste pelo método Turkey para comparar e avaliar a diferença entre a remoção pelas Rizobactérias em petróleo e diesel, a fim de identificar para qual fonte de carbono o experimento de biodegradação é mais eficiente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química do solo

Os critérios utilizados para interpretação dos resultados encontram-se descritos no ANEXO I.

As análises químicas da amostra de solo de várzea estão descritos na Tabela 11, que constam no ANEXO I. Segundo MARCHI (2008) a qualidade do solo está altamente relacionada à sua produtividade. Segundo os métodos agronômicos, que avaliam as análises para avaliação da fertilidade do solo, o valor encontrado de pH (5,78) é classificado como médio (Tabela 17 – ANEXO I). De acordo com HARA e OLIVEIRA (2005) a maioria de rizóbios isolados é tolerante à acidez. De acordo com estes autores na presença de acidez esses microrganismos apresentaram maior crescimento em menor período de tempo.

Tabela 11. Principais propriedades da amostra de solo de Manacapuru.

Propriedades da amostra de solo	Quantificação das propriedades
pH	5,78
N (g kg ⁻¹)	15,4
C (g kg ⁻¹)	166,6
C/N	10,81
M.O (g kg ⁻¹)	287,22
K (cmol _c kg ⁻¹)	0,50
Ca (cmol _c kg ⁻¹)	10,92
Mg (cmol _c kg ⁻¹)	2,86
Al (cmol _c kg ⁻¹)	0,05
P (mg kg ⁻¹)	125
Fe (mg kg ⁻¹)	1139
Zn (mg kg ⁻¹)	14,40
Mn (mg kg ⁻¹)	241,50
Cu (mg kg ⁻¹)	6,60

De acordo com a classificação agronômica, Tabela 18, Tabela 19 e Tabela 20 (ANEXO I), os parâmetros P, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu apresentaram valores muito altos. Os altos valores de Cu, Zn e Mn corroboram com os resultados de MAGALHÃES e GOMES

(2013) que também encontraram altos valores para esses nutrientes. A concentração de Fe (1139 mg kg^{-1}) foi 24 vezes acima do nível considerado alto de 45 mg kg^{-1} , fato também observado por FAJARDO *et al.* (2009) que encontraram valores de 794 a 2.104 mg kg^{-1} . Segundo LIMA *et al.* (2005) os teores de ferro sempre são mais elevados na área superficial do solo de várzea, esse comportamento está relacionado aos teores mais elevados de matéria orgânica, tendo conseqüentemente formas menos cristalinas de óxidos de Fe nos horizontes superficiais, as quais são mais facilmente reduzidas.

A concentração de P na região foi alta (125 mg kg^{-1}) segundo FAJARDO *et al.* (2009) níveis mais elevados desse elemento são encontrados nas camadas superficiais do solo.

A matéria orgânica (M.O) do solo refere-se a todo material orgânico contido no solo, incluindo a liteira, as frações leves, a biomassa microbiana, substâncias orgânicas solúveis em água e a matéria orgânica estabilizada, comumente denominada húmus (STEVENSON, 1994). A M.O é referida como indicadora da qualidade do solo em virtude de sua suscetibilidade de alteração em relação às práticas de manejo e por correlacionar-se com a maioria das propriedades do solo (MIELNICKZUK, 1999). Os valores de M.O e N classificam a amostra de solo avaliada como fértil (Tabela 21 – ANEXO I), diferindo dos resultados encontrados por FAJARDO *et al.* (2009), que caracterizaram as baixas concentrações desses parâmetros como limitantes para a produção agrícola na área de várzea da Amazônia.

O alto teor de nitrogênio na amostra ($15,4 \text{ g kg}^{-1}$) difere dos normalmente encontrados na região de várzea que são geralmente baixos (FAJARDO *et al.*, 2009), no entanto o valor encontrado sugere atividade de microrganismos presentes no solo atuando na fixação desse nutriente. Durante o trabalho de campo foram encontradas na região espécies vegetais com nódulos que sugerem presença desses microrganismos (Figura 19). O teor de N encontrado é

9 vezes o valor que classifica o solo muito bom em termos de fertilidade que é de $1,7 \text{ g kg}^{-1}$ (Tabela 21 – ANEXO I).



Figura 19. Espécie vegetal no local de coleta de solo de várzea. *Fonte: a própria autora.*

Os valores de Al e K apresentaram-se muito baixo e médio, respectivamente. A baixa concentração do alumínio ($0,05 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$) apresenta aspecto positivo para o experimento de biodegradação, já que sua presença no solo é classificada como fitotóxica. HARA e OLIVEIRA (2005) ao avaliarem a tolerância de rizóbios, isolados de nódulos de espécies vegetais, ao alumínio notou-se a alta sensibilidade desses microrganismos. Baixas concentrações de Al também foram observadas por FAJARDO *et al.* (2009) com valores de 0,0 a $4,1 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$.

O teor de C na amostra de solo foi bastante alto de $166,6 \text{ g kg}^{-1}$, valor bem acima do encontrado por MAGALHÃES e GOMES (2013) que foi de 6,38 a $9,34 \text{ g kg}$ nas camadas superficiais do solo de várzea (10 – 30 cm). A baixa razão C/N indica alta incorporação de N no solo.

Os resultados de análise granulométrica (Tabela 12) do solo mostram predominância das frações mais finas argila e silte, mostrando menor contribuição da fração mais grossa (areia), segundo GUIMARÃES *et al.* (2013) essa distribuição granulométrica reflete a natureza sedimentar recente das partículas minerais que constituem o ambiente de várzea, fato

comprovado pela razão silte/argila com valor de 5,53, de acordo REBOUÇAS *et al.*, (2014) razão silte/argila > 1,0 indica solos jovens e pouco intemperizados.

Tabela 12. Resultados da análise granulométrica da amostra de solo.

Análise granulométrica	(%)
Areia	14,07 ± 4,26
Silte	68,50 ± 3,00
Argila	12,39 ± 1,37

A presença de metais pesados no solo pode ser inibitória para biodegradação de compostos orgânicos por exercer toxicidade para microrganismos (MEGHARAJ e NAIDU, 2008). As concentrações de metais na amostra de solo estão descritos na Tabela 13. Os valores de metais avaliados na amostra de solo foram, em geral, abaixo do recomendado pela Canadian Environmental Quality Guidelines (CEQG). As concentrações de Ba, Cd e Se apresentaram valor acima do recomendado pela CEQG. ROANE *et al.* (2001) avaliaram que valores de 60 mg kg⁻¹ de Cd no solo mostram ação inibitória das enzimas ácido 2,4 fenol acético de bactérias *Alcaligenes eutrophus*.

Tabela 13. Concentrações de metais na amostra de solo de Manacapuru.

Metal	Sb	Ba	Cd	Cr	Pb	Hg	Se
Concentração (mg kg ⁻¹)	N.d.	1210,1	58,3	0,5	15,0	N.d.	20,0
Valor de recomendação CEQG (mg kg ⁻¹)	12	750	1,4	64	70	6,6	1,0

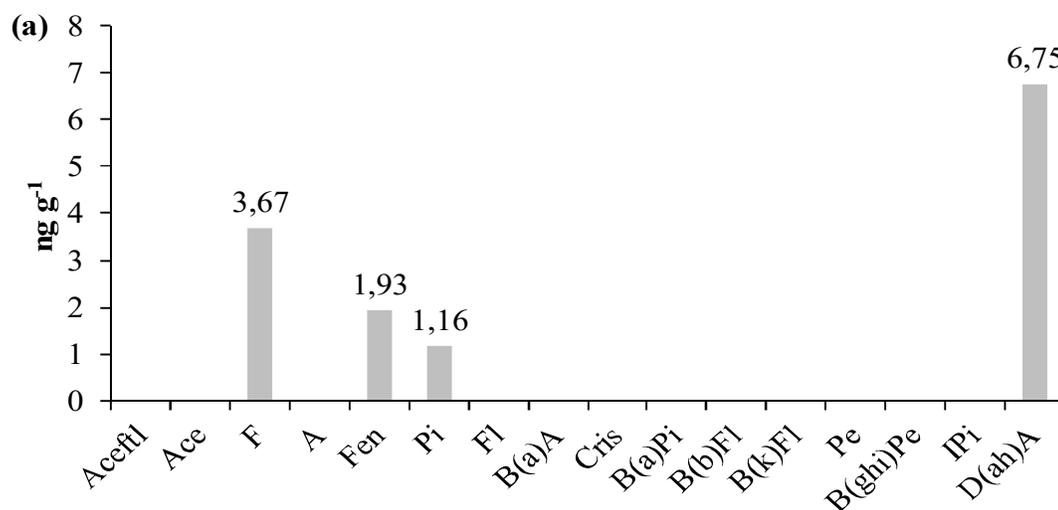
N. d. = abaixo do limite de detecção do equipamento, CEQG: Canadian Environmental Quality Guidelines

Não foi identificado desvio padrão entre as replicatas das análises de metais.

Os microrganismos diferem em relação aos seus mecanismos de tolerância em relação a contaminantes metálicos específicos (MEGHARAJ e NAIDU, 2008). GILLER *et al.* (1998) demonstraram que *Rhizobium meliloti* foi menos sensível a metais pesados que *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium loti*.

5.2 HPA no solo

A recuperação dos compostos variou entre 60 e 130%. A avaliação das concentrações de HPA na amostra de solo apresentou a maior concentração de fenantreno (Fen) com 3,67 ng g⁻¹ e a menor de pireno com 1,16 ng g⁻¹ (Figura 20a). A amostra de solo apresentou baixas concentrações em relação a HPA, dos 16 considerados foram identificados na amostra de solo de várzea a presença de 3 HPA, Fenantreno (Fen), Fluoranteno (Fl) e Pireno (Pi) (Figura 20b), diferenciando dos resultados de WILCKE *et al.* (2003), que ao avaliar solo de várzea em região próximo a Manaus, encontrou predominância de naftaleno, fenantreno e perileno.



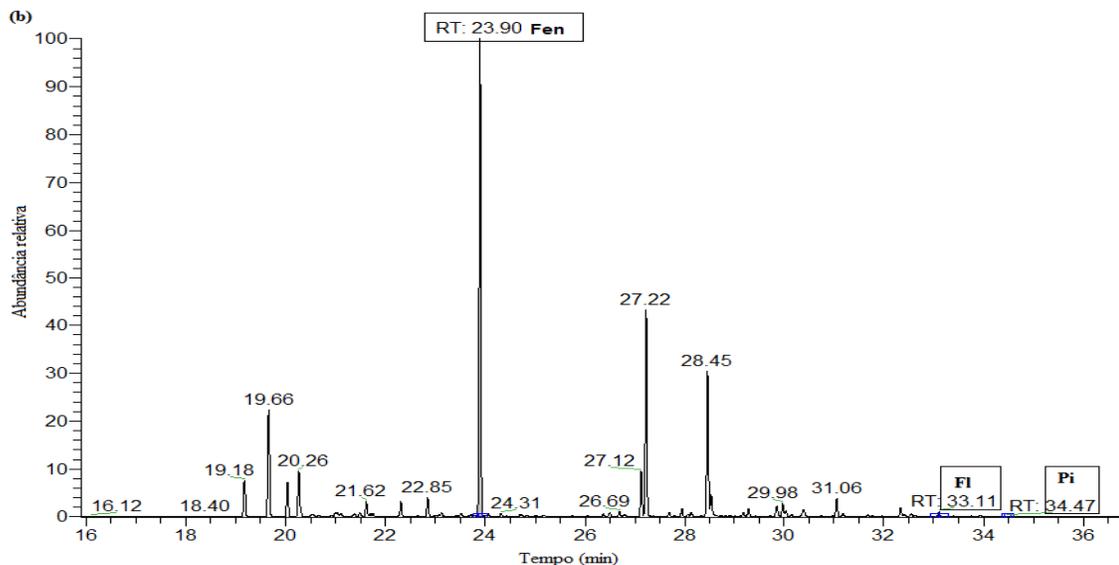


Figura 20. (a) Cromatograma de identificação dos HPA na amostra de solo natural (b) Concentração de HPA na amostra de solo de natural. (trocar a figura, filtrando apenas os compostos detectados)

O \sum HPA ($6,75 \text{ ng g}^{-1}$) foi abaixo do valor indicado para limite ambiental internacional para os 16 HPA indicados pela US-EPA (2005), que é de 766 ng g^{-1} em relação ao TEL (Threshold Effects Level), nível ao qual não se observam efeito nocivo à comunidade biológica, e de $7070,90 \text{ ng g}^{-1}$ em relação ao PEL (Probable Effects Level) nível ao qual, frequentemente, há efeito nocivo à comunidade biológica.

Estudos sobre concentrações de hidrocarbonetos de petróleo são escassos na região da Amazônia Central. Registros pioneiros podem ser visto por OLIVEIRA *et al.*, 2007a e OLIVEIRA *et al.*, 2007b, apresentaram níveis basais de HPAs e outros marcadores moleculares em sedimentos do rio Solimões e lagos associados.

Os autores observaram baixas concentrações para o somatório de 37 HPAs de 52 a 1110 ng g^{-1} e os índices diagnóstico calculados apresetaram além da forte origem biogênica a forte presença de hidrocarbonetos de fontes pirogênicas.

SOUZA *et al.* (2015) estudou os sedimentos da orla do Rio Negro da cidade de Manaus que é a cidade mais populosa do estado do Amazonas, com cerca de 2,1 milhões de habitantes, esta região apresenta fortes indícios de impactos por poluição antrópica e os níveis de HPA encontrados foram de $6,5$ a 5348 ng g^{-1} .

Estudos relacionados a níveis de HPA e outros hidrocarbonetos de petróleo em solo da região Amazônica não foram encontrados.

5.3 Biodegradação de n-alcenos

Ao se avaliarem os cromatogramas referentes à fração de n-alcenos do diesel e do petróleo utilizado para o experimento nota-se presença de série homóloga de C10 a C30 (Figura 21a) no diesel e no petróleo a presença de C9 a C35 (Figura 21b), o petróleo por ser mais complexo possui compostos de maior peso molecular.

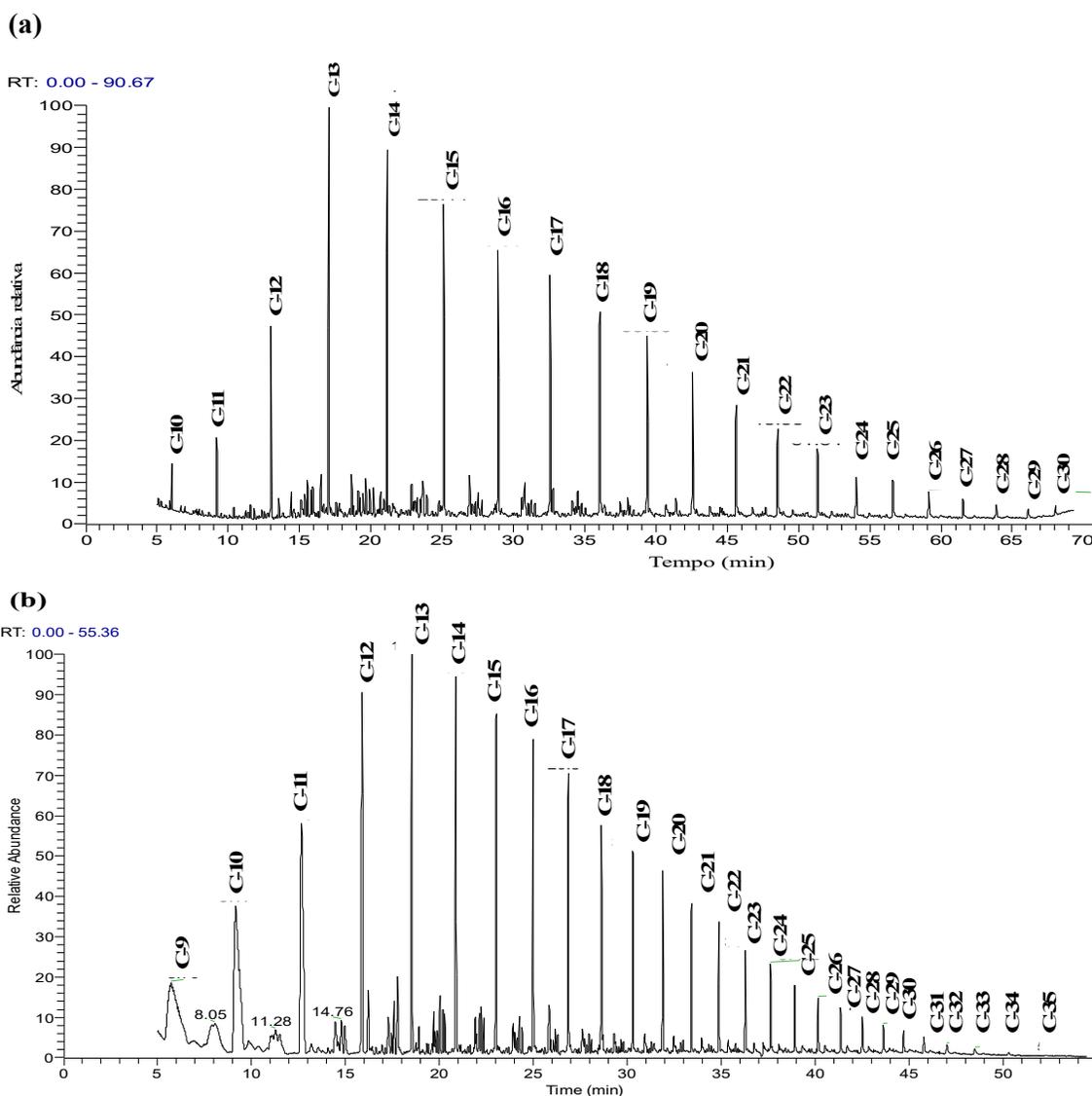


Figura 21. Cromatograma da fração 1 (a) óleo diesel; (b) petróleo utilizado o experimento.

Segundo LIU *et al.* (2011) a decomposição de hidrocarbonetos saturados é dominante em relação aos aromáticos, os n-alcenos (C₁₄ - C₃₀) são preferencialmente consumidos por bactérias e mais suscetíveis à biodegradação (DAS e MUKHERJEE, 2007). As taxas de degradação de n-alcenos mostram que as bactérias foram mais eficientes na remoção destes compostos no petróleo, todas as espécies levaram diminuição dos níveis de n-alcenos totais.

Os consórcios apresentaram taxa de remoção próximas nos dois experimentos, no óleo diesel a taxa de remoção foi de 67,57 % e no petróleo foi de 67,80 % (Tabela 14). A espécie INPA R677 apresentou 47,38 % de remoção no óleo diesel e 68,33 % no petróleo no período de 48 horas. No período de 21 dias as taxas foram de 88,89 % de remoção de n-alcenos no óleo diesel e 97,74 % de remoção no petróleo, sendo, assim, a espécie com maior potencial de degradação de n-alcenos.

Tabela 14. Taxas de degradação dos hidrocarbonetos n-alcenos nas amostras provenientes da degradação microbiana nos períodos de 48 horas e 21 dias no experimento com óleo diesel e com petróleo.

Óleo diesel								
ISOLADOS	INPA R560	INPA R631	INPA R557	INPA R677	INPA R674	CONSÓRCIO	CONTROLE 1	CONTROLE 2
.....%.....								
48 HORAS	46,04	43,40	62,61	47,38	34,61	18,63	27,03	12,95
21 DIAS	62,02	49,09	63,19	88,89	65,87	67,57	38,37	25,21
Petróleo								
ISOLADOS	INPA R560	INPA R631	INPA R557	INPA R677	INPA R674	CONSÓRCIO	CONTROLE 3	CONTROLE 4
.....%.....								
48 HORAS	48,32	33,17	30,24	68,33	41,84	50,68	1,49	0,32
21 DIAS	84,96	33,24	84,89	97,74	90,65	67,80	77,14	29,21

A espécie INPA R631 apresentou as menores taxas de degradação de n-alcenos com valores de 43,40 % e 33,17 % para os experimentos com óleo diesel e petróleo, respectivamente, no período de 48 horas. E, no período de 21 dias, as taxas foram de 49,09 % no óleo diesel e 33,24 % no petróleo.

BRITO (2013) avaliou a produção de biossurfactantes por estes isolados através do teste de medição da espessura da camada emulsificante (Tabela 6), de acordo com este teste a

espécie INPA R631 apresentou valor de 5,61 cm de espessura, enquanto o isolado INPA R677 apresentou um valor 13,36 cm sendo esta, portanto, capaz de produzir mais biossurfactantes, que facilita a degradação de hidrocarbonetos por bactérias.

Os controles 2 e 4, apresentaram taxa de biodegradação de 25,21 % no óleo diesel e de 29,21 % no petróleo após o período de 21 dias, comprovando que ocorre uma perda destes compostos por volatilização.

A abundância de n-alcenos $\leq C20$ foi maior tanto no diesel (Figura 22) quanto no petróleo (Figura 23), no período de 21 dias de incubação os teores dessa fração de hidrocarbonetos foram os que diminuíram em todos os tratamentos do experimento com óleo diesel. Os hidrocarbonetos alifáticos de menor peso molecular são os compostos prioritários na remoção por microrganismos (HEAD et al, 2003; PETER et al, 2005a, ELSHAFIE, 2007).

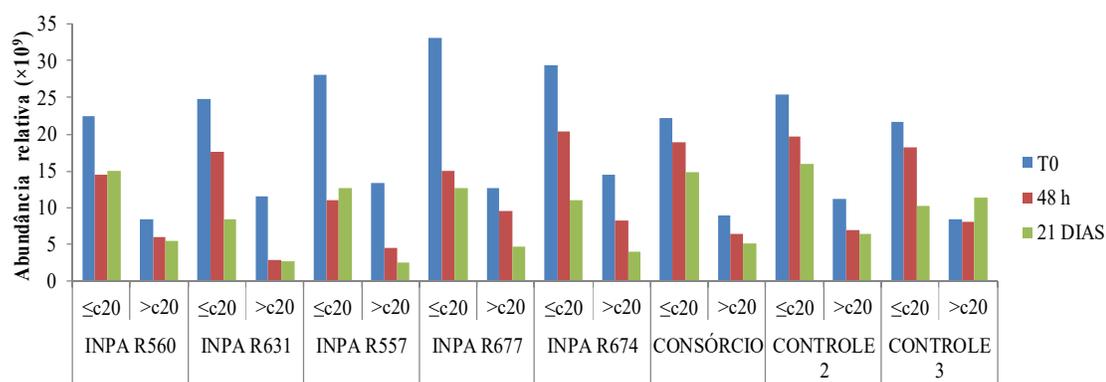


Figura 22. Abundância relativa do somatório dos n-alcenos $\leq C20$ e $> C20$ no experimento com óleo diesel nos tempos zero, 48 horas e 21 dias.

Em relação aos n-alcenos de maior peso molecular ($C > 20$), obteve-se maior remoção em relação aos tempos inicial e final do experimento para os tratamentos INPA R631, 557, 677 e 674 no experimento com o óleo diesel, demonstrando que estes isolados individualmente, atuaram satisfatoriamente na remoção de n-alcenos de maior peso molecular.

No experimento usando como fonte de carbono o petróleo, com exceção do tratamento controle 4, todos apresentaram alta remoção, tanto de n-alcenos $C \leq C_{20}$ quanto os de maior peso molecular $>C_{20}$.

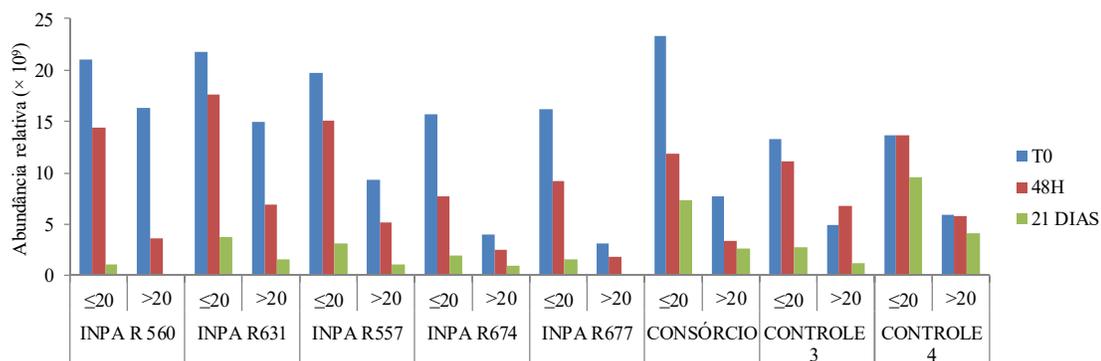
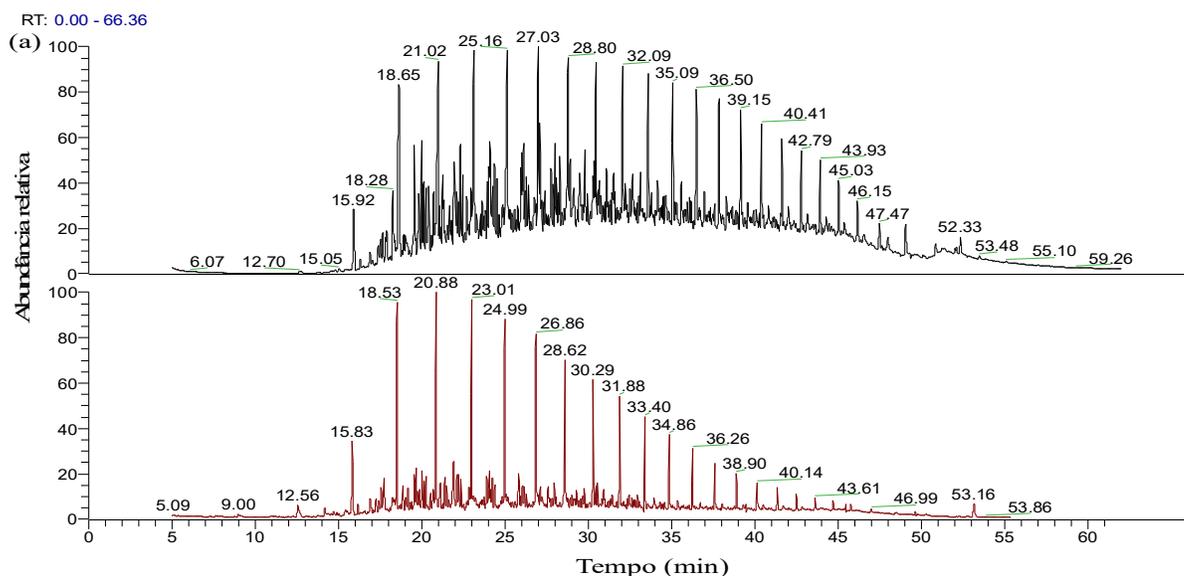


Figura 23. Abundância relativa do somatório dos n-alcenos $\leq C_{20}$ e $>C_{20}$ no experimento com petróleo nos tempos zero, 48 horas e 21 dias.

Ao avaliar o cromatograma de íons total nota-se diminuição da MNCR durante o período de incubação do experimento com óleo diesel. Essa diminuição foi bem mais expressiva do que o controle 2 entre os tempos inicial e final quando usada a espécie INPA R677 (Figura 24a), que teve taxa de remoção do somatório de n-alcenos de 97,74 % (Figura 24b) a diminuição de n-alcenos em relação ao tempo inicial foi de 25,21 %.



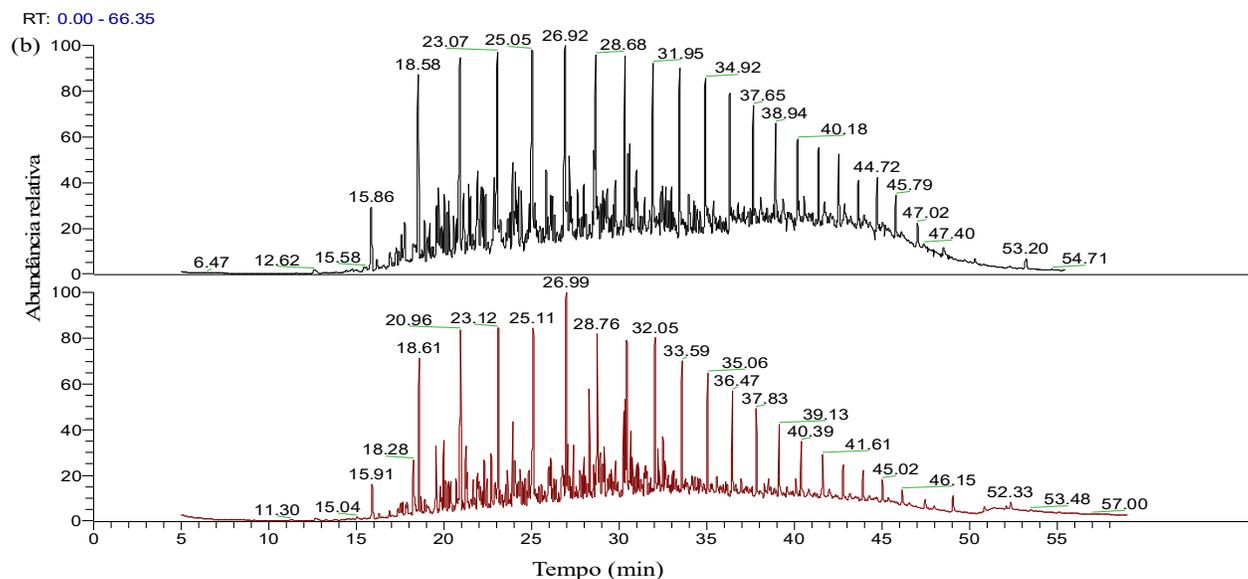
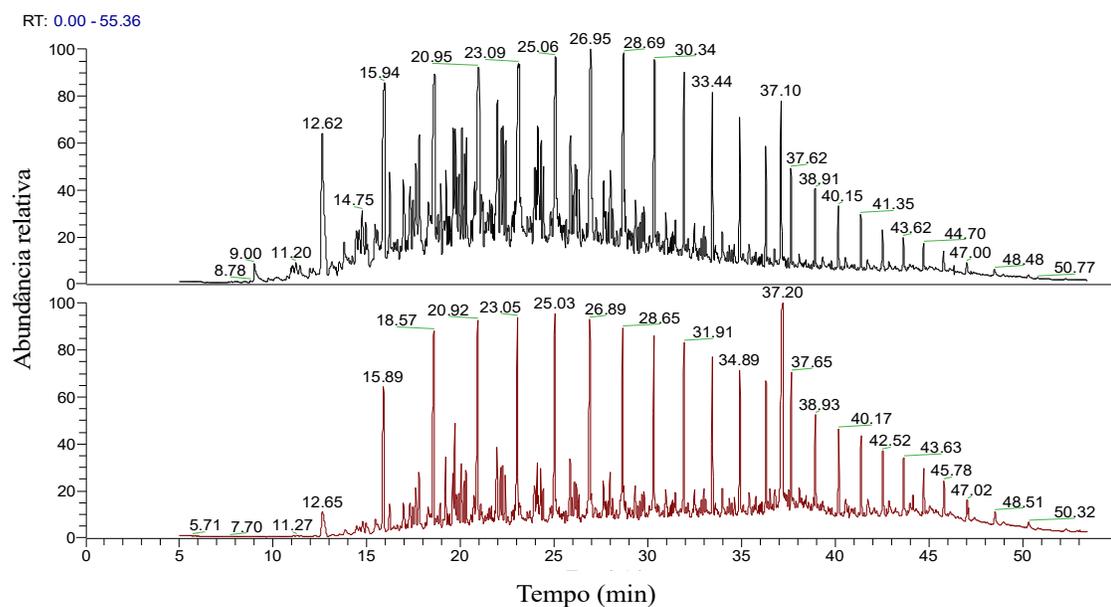


Figura 24. Cromatograma de íons total nos tempos inicial e final de incubação do experimento (a) isolado INPA R677- potencial de degradação 88,89 %; (b) controle 2 – potencial de degradação 25,21% no experimento com óleo diesel.

A grande quantidade de compostos de alto peso molecular são responsáveis pelo alto perfil de MNCR em petróleo e seus derivados (GUO *et al.*, 2011), logo a sua diminuição pode ser atribuída à conversão de moléculas mais complexas em compostos mais simples durante o processo de biodegradação.



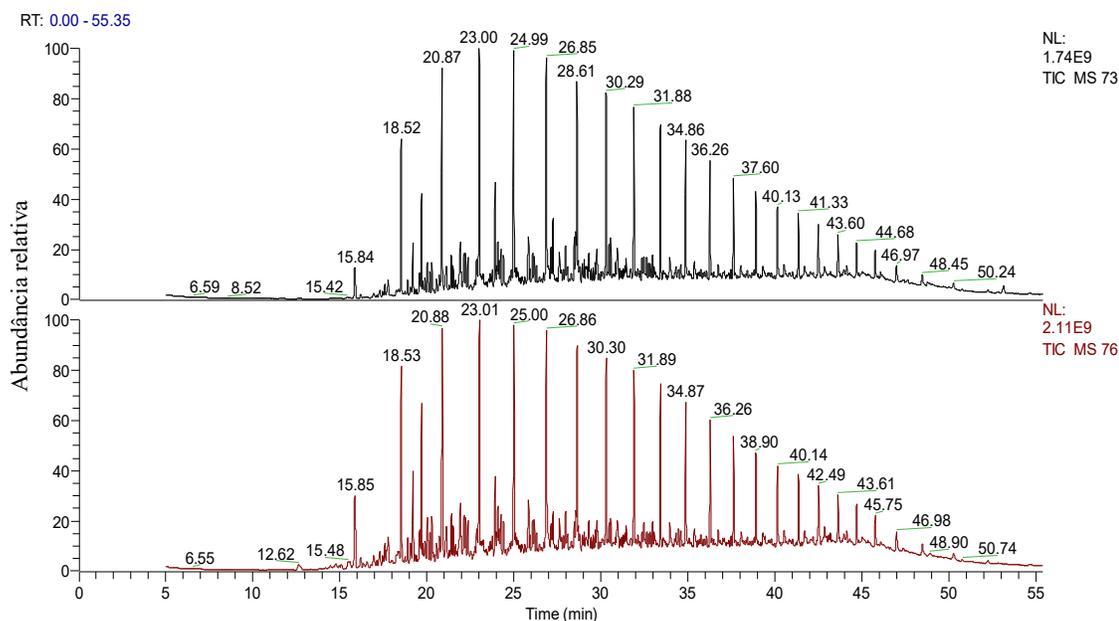


Figura 25. Cromatograma de íons total nos tempos inicial e final de incubação do experimento (a) isolado INPA R677- potencial de degradação 97,74 %; (b) controle 2 – potencial de degradação 29,21% no experimento com Petróleo.

A MNCR se comportou da mesma forma no experimento que utilizou o isolado INPA R677 (Figura 27a) como fonte de carbono o petróleo, quando comparada com o experimento com o óleo diesel. Houve alta taxa de remoção de n-alcenos e a diminuição da MNCR entre os tempos inicial e final de incubação do experimento. No controle havia somente o solo autoclavado e óleo diesel e observou-se pouca variação da MNCR (Figura 25b).

5.4 Biodegradação de HPA

Nas amostras provenientes do experimento de biodegradação foram identificados cinco HPA dos 16 avaliados (Figura 26a) foram eles naftaleno (Naf), acenafteno (Ace), fluoreno (F), fenantreno (Fen), criseno (Cris) e benzo(a)pireno (B(a)P), que, com exceção do naftaleno, coincidem com os mesmos hidrocarbonetos encontrados na caracterização do óleo diesel (Figura 26b) e no petróleo (Figura 26c) adicionados ao solo para os experimentos, sendo o Fenantreno encontrado em maior concentração em todas amostras.

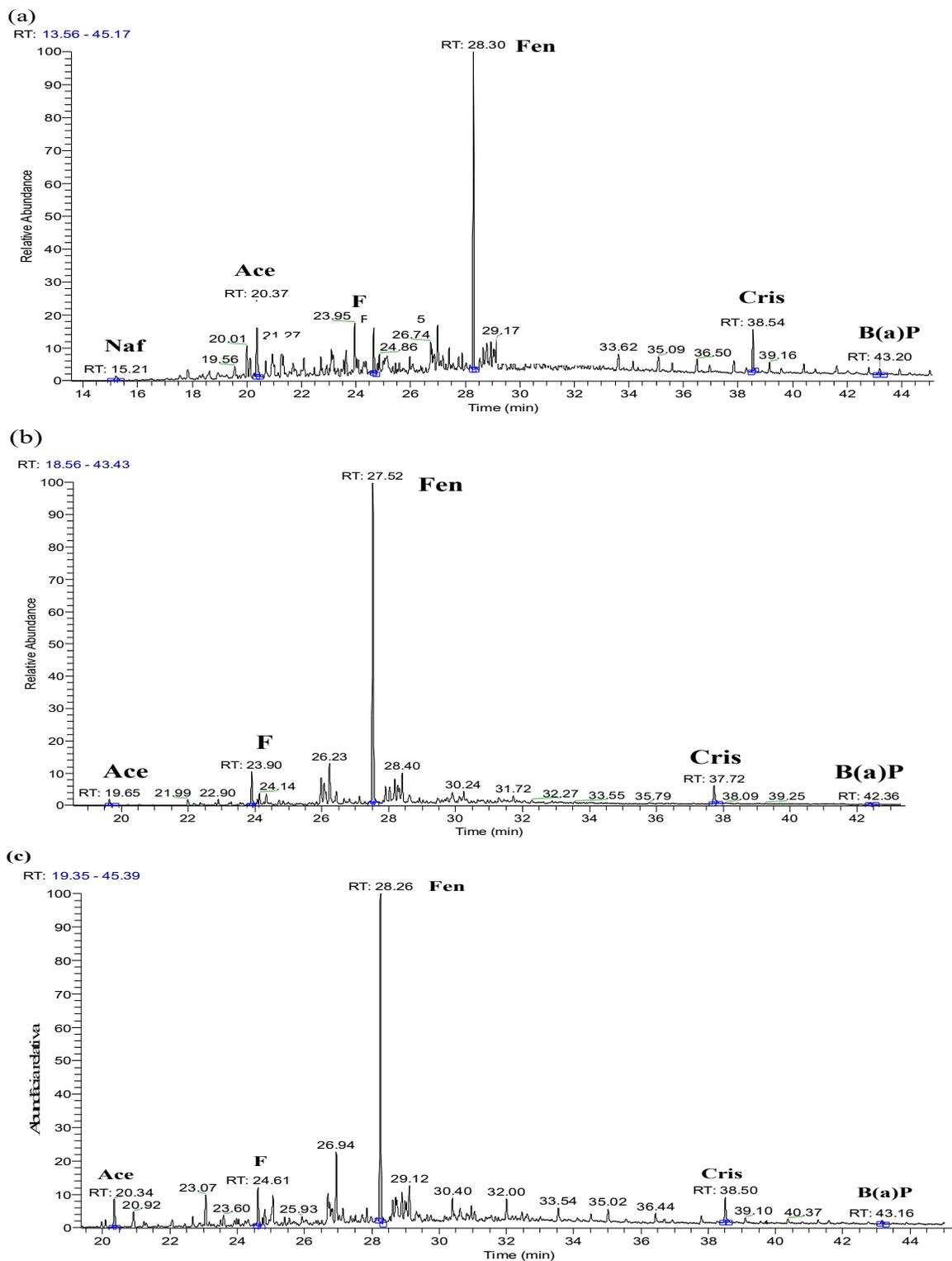


Figura 26. Cromatograma da fração 2 (a) amostra do experimento de biodegradação; (b) óleo diesel; (c) petróleo.

O naftaleno é o hidrocarboneto mais simples dos 16 indicados pela EPA-US (2001), hidrocarbonetos de baixo peso molecular são produzidos durante o processo de biodegradação

de HPA de alto peso molecular (WAIGI *et al.*, 2015). Segundo QIN *et al.* (2017) hidrocarbonetos de 5 anéis ao serem degradados se abrem produzindo compostos aromáticos de um a quatro anéis que são mais biodisponíveis.

As concentrações iniciais de HPA no tempo zero apresentaram diferentes concentrações, o que não era esperado, pois foram adicionadas as mesmas quantidades de petróleo e óleo diesel no início do experimento (1 % m/m). No entanto observaram-se diferenças entre as amostras, visto que algumas apresentaram maior umidade que outras. Ao se avaliar o grau de correlação de Pearson ($p \leq 0,05$), entre as concentrações iniciais de HPA e as camadas emulsificantes produzidas por estes microrganismos (Tabela 6), nota-se correlação positiva com valor do coeficiente de regressão linear de 0,70 no experimento com óleo diesel; e 0,83 no experimento com petróleo, indicando que a produção de biossurfactantes influencia no processo de extração de HPA. CRAMPON *et al.* (2016) ao avaliarem a extração de HPA em solo com diferentes fases aquosas concluiu que biossurfactantes podem influenciar nas concentrações de HPA obtidas, indicando que a sorção de HPA ao solo controlam os processos de biodegradação, e que surfactantes aniônicos possuem boa capacidade de dessorção de HPA, de baixo e de alto peso molecular a partir do solo.

Das cinco espécies de rizobactérias testadas no experimento com óleo diesel duas delas, individualmente, apresentaram diminuição das concentrações de HPA total (HPAT), a espécie INPA R557 diminuiu a concentração de HPAT de 1668,72 ng g⁻¹ para 236,13 ng g⁻¹ (Figura 27), a espécie INPA R677 apresentou concentração total de HPA de 1590,95 ng g⁻¹ no tempo zero e 435,40 ng g⁻¹ após o período de 21 dias. O consórcio com as cinco espécies diminuiu a concentração inicial de HPA de 659,66 ng g⁻¹ para 240,08 ng g⁻¹ no período final.

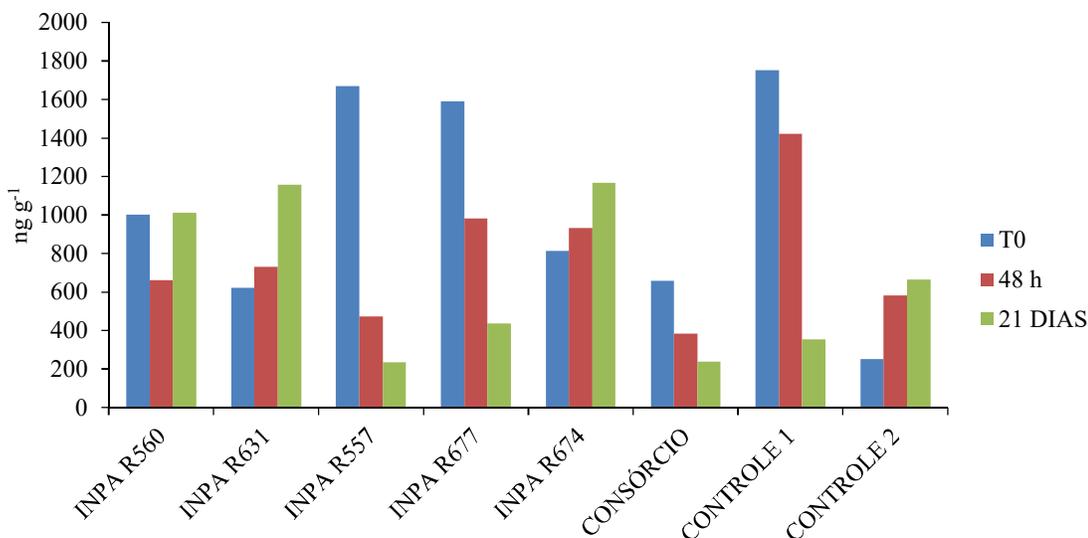


Figura 27. Concentração do somatório de HPA [\sum HPA = Acenafteno + Fluoranteno + Fenantreno + Criseno + Benzo(a)pireno] nos experimentos com óleo diesel.

O controle 1, em que foi utilizado o solo sem esterilizar também apresentou diminuição da concentração de HPAT de 1751,77 ng g⁻¹ para 353,94 ng g⁻¹, sugerindo que no próprio solo utilizado para o experimento ocorre atividade microbiana atuante na degradação do óleo, sendo, portanto aplicável a este ambiente a técnica de bioestimulação, que consiste na utilização da microbiota indígena estimulando suas condições de crescimento por meio da adição de nutrientes (SUN *et al.*, 2012).

As concentrações de HPA avaliadas foram menores no experimento com petróleo em relação ao experimento com diesel, isso se deve ao fato de produção de HPA estar relacionada a combustão incompleta da matéria orgânica (PETERS *et al.*, 2005a), e dessa forma nos próprios processos de refino do petróleo pode ocorrer formação de HPA levando ao aumento das concentrações desses compostos em seus derivados.

Entre os cinco isolados testados no experimento com petróleo três apresentaram diminuição na concentração de HPAT, sendo eles os microrganismos INPA 560, 557 e 677 (Figura 28).

INPA R557 diminuiu a concentração de 724,42 ng g⁻¹ para 167,57 ng g⁻¹, INPA R677 levou a diminuição da concentração de 586,14 ng g⁻¹ no tempo zero para 242,81 ng g⁻¹ após o período de 21 dias.

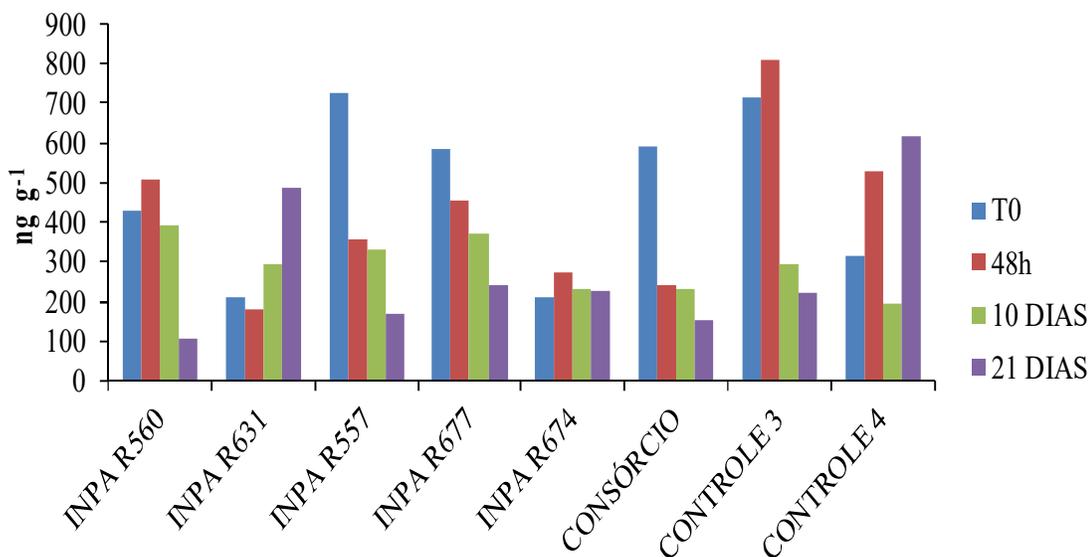


Figura 28. Concentração do somatório de HPA [Σ HPA = Acenafteno + Fluoranteno + Fenantreno + Criseno + Benzo(a)pireno] nos experimento com petróleo nos tempos zero, após o período de 48h, 10 dias e 21 dias.

O isolado INPA R560 não apresentou diminuição da concentração de HPAT no experimento com óleo diesel, no entanto no experimento utilizando como fonte de carbono o petróleo notou-se diminuição da concentração de 427,42 ng g⁻¹ para 104,69 ng g⁻¹, por este microrganismo.

O fenantreno é um HPA de baixo peso molecular, obtido da fusão de três anéis de benzeno em um arranjo angular, é formado através da transformação geológica térmica e por meio de queimadas que ocorrem naturalmente nas florestas. Os HPA de três anéis são os produtos primários da combustão de materiais orgânicos (PETERS *et al.*, 2005a). Segundo (OLIVEIRA, 2007) ao avaliar sedimento na região amazônica tanto em área remota quanto em área industrial o fenantreno apresentou os maiores teores em relação aos 16 HPA prioritários. As bactérias INPA R560, 631 e 674 levaram ao aumento da concentração desse

composto após o período de 21 dias, o mesmo foi observado no controle 2, sem a adição de microrganismos mostrando que em processos naturais de degradação da matéria orgânica esse composto é formado (Figura 29). A bactéria INPA R631 levou ao aumento da concentração de fenantreno em um período de 48h, no entanto ao período de 21 dias observa-se diminuição da sua concentração indicando início de degradação neste período. Os tratamentos INPA R557, INPA R677, consórcio e controle 1 ocorreu diminuição da concentração no fenantreno após o período de 21 dias, comprovando o potencial de degradação desses tratamentos.

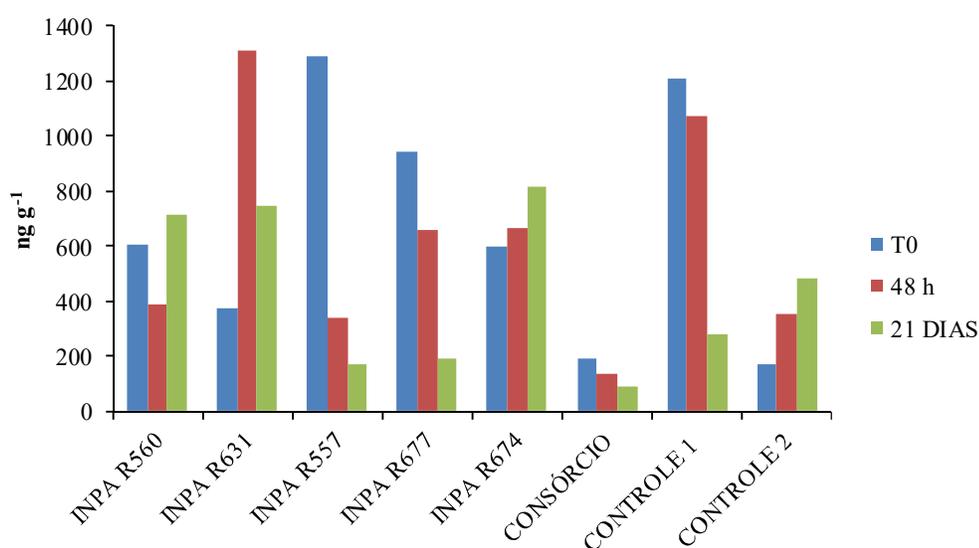


Figura 29. Concentração de fenantreno no experimento com óleo diesel nos tempos zero, após o período de 48h e após 21 dias no experimento com óleo diesel.

O fenantreno foi o composto que apresentou as maiores concentrações tanto no petróleo quanto no óleo diesel, no entanto no óleo diesel as concentrações deste composto foram duas vezes aquelas encontradas no petróleo. Os isolados INPA R631, 674 e controle 4 levaram ao aumento da concentração de fenantreno no tempo final de avaliação do experimento. As espécies INPA R560, 557, 677, o consórcio e controle 3 levaram à diminuição das concentrações do fenantreno após o período de 21 dias. O isolado INPA R560 destacou-se, no experimento com óleo diesel levou ao aumento da concentração final de fenantreno, no entanto, no experimento utilizando petróleo como fonte de carbono as

concentrações de fenantreno reduziram de 174,06 ng g⁻¹ no tempo zero para 104,56 ng g⁻¹ após o período de 21 dias de incubação (Figura 30).

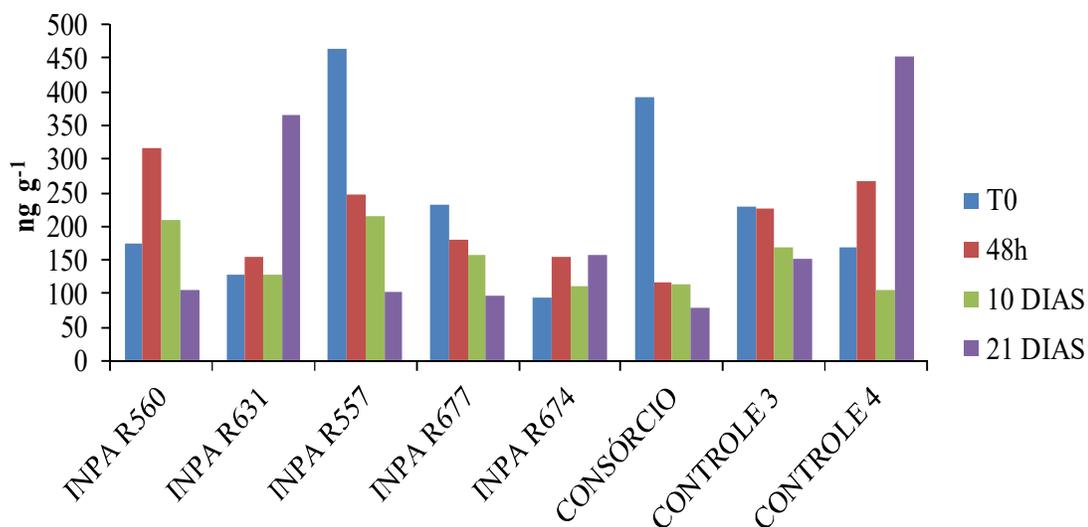


Figura 30. Concentração de fenantreno no experimento com petróleo nos tempos zero, após o período de 48h, após 10 dias e 21 dias.

O B(a)P foi classificado pela Agência Internacional em Pesquisa de Câncer (IARC) como grupo 1 na probabilidade carcinogênica aos humanos (ABDEL-SHAIFY e MANSOUR, 2016). As espécies INPA R 677 e 557, foram capazes de diminuir a concentração deste composto tanto no experimento com óleo diesel quanto no experimento com o petróleo, do decréscimo na concentração de diesel foi de 81,25 ng g⁻¹ no tempo zero para 12,07 ng g⁻¹ no tempo final, e no petróleo de 28,06 ng g⁻¹ no tempo zero para 10,48 ng g⁻¹ no tempo final (Figura 31 Figura 32). Os consórcios e os controles 1 e 3 também foram capazes de diminuir a concentração desse contaminante no solo de várzea. MANSOURI *et al.* (2017) ao avaliarem a degradação de B(a)P pela bactéria *M. maritypicum CB7*, notaram que ela foi capaz de diminuir a concentração de B(a)P de 10 mg L⁻¹ para 3,10 mg L⁻¹ (69 %) em um período de trinta dias, no entanto, sua avaliação se deu utilizando esse HPA individualmente.

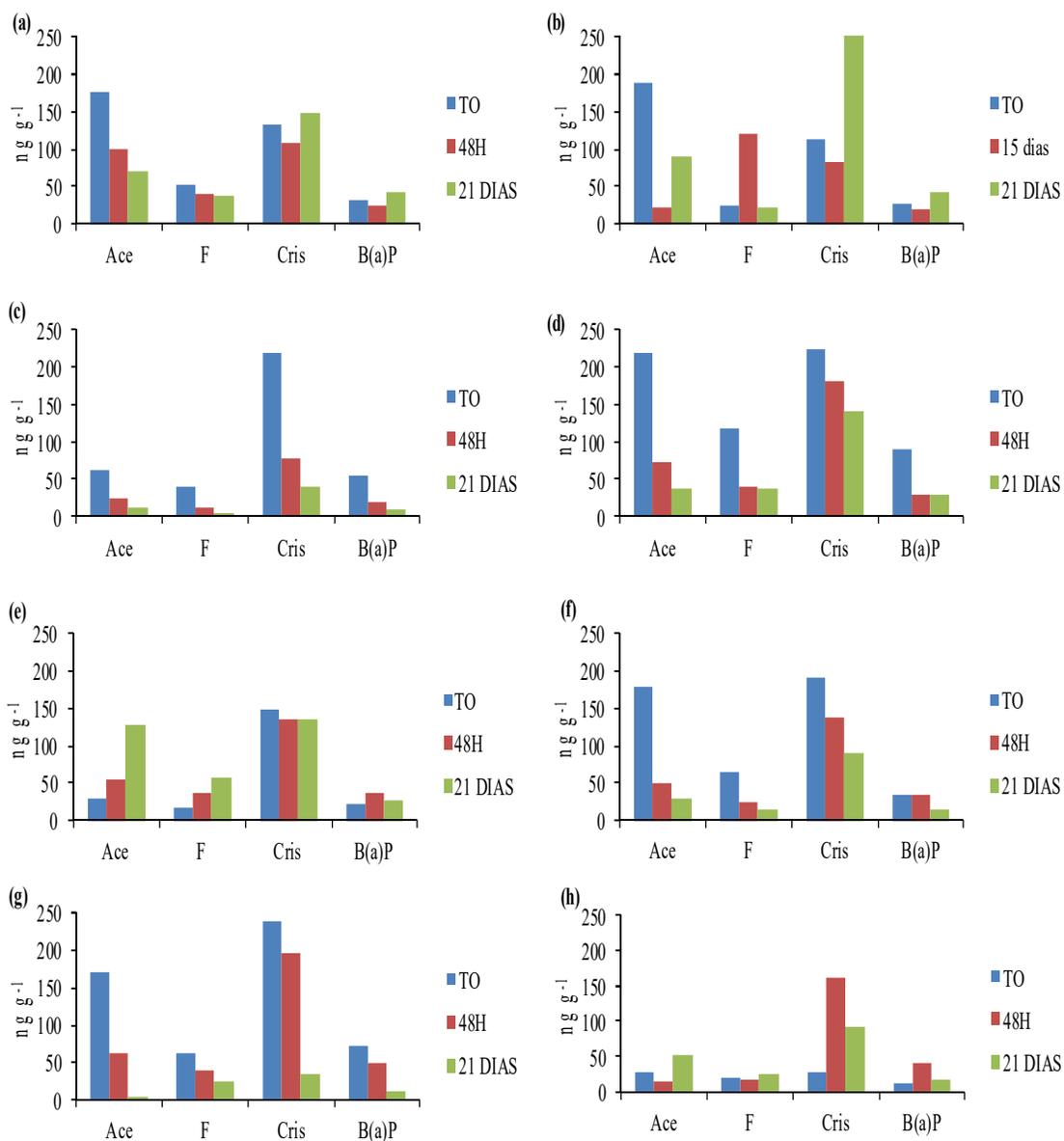


Figura 31. Concentração dos HPA Acenafeno (Ace), Fluoreno (F), Criseno (Cris) e Benzo(a)pireno (B(a)P) nos isolados (a) INPA R 560; (b) INPA R631; (c) INPA R557; (d) INPA R677; (e) INPA R674; e no, (f) Consórcio; (g) controle 1; (g) controle 2 no experimento utilizando como fonte de carbono o óleo diesel.

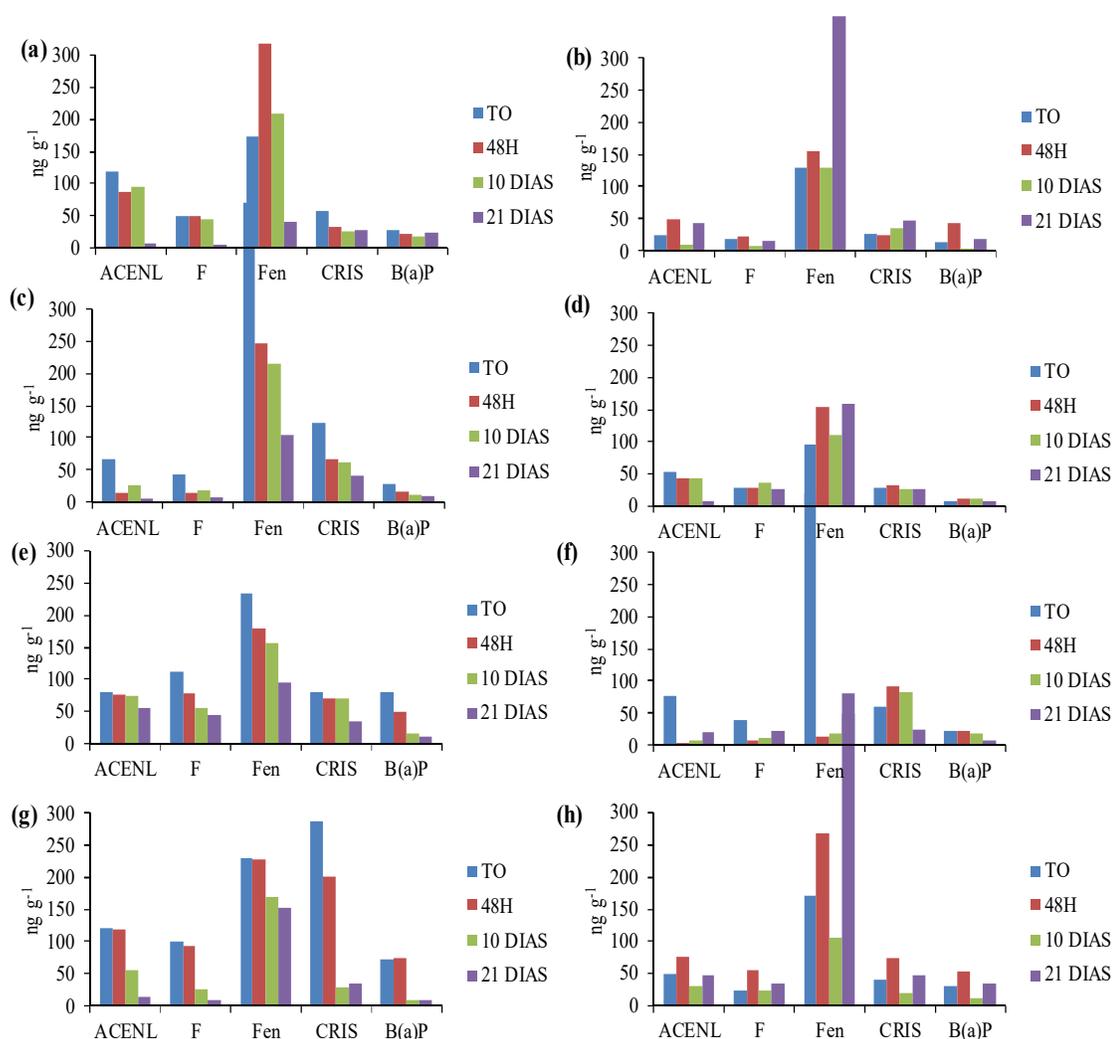


Figura 32. Concentração dos HPA Acenafeno (Ace), Fluoreno (F), Criseno (Cris) e Benzo(a)pireno (B(a)P) nos isolados (a) INPA R 560; (b) INPA R631; (c) INPA R557; (d) INPA R677; (e) INPA R674; e no, (f) Consórcio; (g) controle 1; (g) controle 2 utilizando como fonte de carbono o petróleo.

O criseno foi o composto que após o fenantreno apresentou as maiores concentrações nas amostras avaliadas. Segundo a IARC foi classificado como grupo 2B na probabilidade carcinogênica aos humanos (ABDEL-SHAIFY e MANSOUR, 2016), é um HPA de 4 anéis e portanto tende a ser mais resistente à biodegradação. A espécie INPA R677 levou a diminuição das concentrações deste composto de $80,14 \text{ ng g}^{-1}$ para $12,07 \text{ ng g}^{-1}$ no período final de incubação no experimento com petróleo e, de $222,82 \text{ ng g}^{-1}$ para $140,51 \text{ ng g}^{-1}$ após o período final de incubação, no experimento com óleo diesel. Isso comprova o potencial de

degradação desse microrganismo para a redução do criseno em matrizes complexas como petróleo e seus derivados. GHEVARIYA *et al.* (2011) ao avaliarem a biodegradação de criseno por *Achromobacter xylosoxidans*, uma bactéria halotolerante isolada de área poluída com petróleo bruto, notaram uma diminuição de 85,96 % na concentração de criseno em um período de cinco dias. No entanto a sua avaliação não levou em consideração matrizes complexas como o petróleo, onde o acesso do microrganismo ao composto é mais difícil, devido a competição com outros compostos mais biodisponíveis.

CHENG *et al.* (2018) afirmam que a suscetibilidade de HPA à biodegradação não está baseada no seu número de anéis aromáticos, e sim na estrutura dos substratos nos organismos responsáveis pela biodegradação, os quais controlam a habilidade de penetração na membrana celular de forma a ativar a enzima microbiana responsável pela assimilação do composto.

O acenafteno e o fluoreno são compostos isômeros, formados pela fusão de três anéis benzênicos. As concentrações desses compostos, com exceção nos tratamentos com o isolado INPA R674 e no controle 2, diminuíram durante o período de incubação do experimento com óleo diesel (Figura 31). Comportamento um pouco diferente foi verificado no experimento com o petróleo, pois houve mais variação das concentrações desses compostos entre os diferentes tratamentos do experimento (Figura 32).

De acordo com MARCHAND *et al.* (2017) a volatilização é o fator mais importante processo que controla os processos de HPA de baixo peso molecular no ambiente, com exceção do isolado INPA R674, nas primeiras 48 horas houve diminuição desses compostos em todos os tratamentos do experimento com óleo diesel. No tempo final de incubação, em alguns tratamentos as concentrações de Ace e F, tornaram a aumentar, indicando que a degradação de outros compostos de maior peso molecular do diesel provoca o aumento destes compostos.

YESSICA *et al.* (2013) verificaram que o isolado CIAT 899 (*Rhizobium tropici*) foi capaz de degradar 50 % de Fen, e 45 % de B(a)P, após 120 h. Em comparação, o isolado INPA R557 (*Bradyrhizobim sp*) foi capaz de degradar 73,50 % do Fen e 72,02 % e 65,17 do B(a)P em 48 horas (Tabela 15). Em relação às taxas de degradação de HPA total, HPAT, se destacaram as espécies INPA R557 e consórcio com as cinco espécies que apresentaram remoção de 71,57 % e 41,84 % em apenas 48h, neste mesmo período o controle 1 teve taxa de degradação de 18,77%.

As taxas de degradação pelos isolados INPA R557 foi de 72,63 %, para INPA R677 foi de 85,85 %,e para o consórcio com os cinco isolados foi de 63,61 % (Tabela 15), no período de 21 dias. BISHT *et al.* (2014) utilizando um isolado de rizobactéria obteve degradação de 45,6 % de HPAT em solo após o período de 120 dias.

Tabela 15. Taxas de degradação dos HPA nos períodos de 48 horas e 21 dias no experimento com óleo diesel.

Bactéria	48 horas					
	Ace	F	Fen	Cris	B(a)P	∑HPA
	----- % -----					
INPAR560	42,92	27,05	35,96	19,02	21,56	33,98
INPA R631	87,65	-404,22*	-248,72*	27,96	29,34	-112,95*
INPA R677	83,04	66,72	29,74	36,94	67,75	38,18
INPA R557	61,57	72,61	73,50	64,48	65,17	71,57
INPA R674	-83,78*	-134,41*	-12,03*	9,40	-57,33*	-14,53*
Consórcio	72,31	64,48	27,63	27,63	-4,77*	41,84
Controle 1	62,64	37,88	11,14	17,95	29,75	18,77
Controle 2	51,90	23,44	-108,52*	-480,42*	-314,46*	-129,99*
	----- % -----					
	21 dias					
Bactéria	Ace	F	Fen	Cris	B(a)P	∑HPA
	----- % -----					
INPAR560	60,51	32,04	-17,53*	-11,03*	-31,65*	-0,81*
INPA R631	52,24	3,03	-99,39*	-121,51*	-52,95*	-58,4*
INPA R677	80,87	86,37	86,81	82,32	82,67	85,85
INPA R557	83,04	67,39	79,81	36,94	67,75	72,63
INPA R674	-322,39*	-259,16*	-37,03*	8,93	-18,02*	-43,17*
Consórcio 1	82,94	76,88	52,73	52,73	57,16	63,61
Controle 1	97,86	60,18	76,82	85,82	84,21	79,80
Controle 2	-89,15*	-16,76*	-185,19*	-232,83*	-64,17*	-162,06*

*Os valores de taxas de degradação negativos descritos correspondem à formação destes compostos durante o processo de biodegradação.

As espécies INPA R557 e INPA R677 se destacaram na diminuição da concentração de fen, com taxa de degradação deste composto de 86,81% e 79,81% após o período de 21 dias, respectivamente, sendo a sua atuação individual mais eficiente para a remoção do fenantreno que o consócio com as cinco espécies que apresentou remoção de 52,73 %. Este é o composto mais abundante em combustíveis fósseis (SUPAKA *et al.*, 2001), no entanto, é bem sensível a biodegradação quando comparado com o antraceno, por exemplo (BIACHE *et al.*, 2014).

O benzo(a)pireno por sua recalcitrância e alta toxicidade é indicado pela EPA-US (2001) como um contaminante prioritário. Os isolados INPA R560, INPA R557 e INPA R674 são impróprios para remoção de óleo, pois levaram ao aumento da concentração final desse composto. A remoção deste foi maior no controle com taxa de degradação de 84,21% (Tabela 16). Em 2000 BOONCHAM *et al.* avaliaram a degradação do B(a)P e identificaram que sua degradação era nula por culturas puras de bactérias, identificando que a degradação por espécies isoladas não é viável. No entanto, no presente trabalho a taxa de degradação foi de 65,17% e 67,75% em 48 horas e 21 dias, respectivamente pela espécie INPA R557, e o isolado INPA R 677 apresentou taxa de degradação de 67,75 em 48 horas e 82,67% em 21 dias.

Os valores de taxas de degradação negativos descritos nas Tabela 15 e Tabela 16 correspondem à formação destes compostos durante o processo de biodegradação, segundo PETERS *et al.* (2005a) o HPA é formado por meio da decomposição incompleta da matéria orgânica. ORTEGA-CALVO *et al.* (2013) alertam para o fato de algumas estratégias de biorremediação amentarem a biodisponibilidade de HPA, portanto não necessariamente diminuem o risco ao ambiente. Dessa forma um processo de biorremediação satisfatório é aquele que não só atende aos protocolos de remoção de contaminantes, mas também aumenta a qualidade do ambiente.

Durante o processo realizado pelos microrganismos testados no experimento as espécies INPA R560, 631 e 674, levaram ao aumento da concentração destes contaminantes no solo, indicando que essas bactérias ao decomporem o diesel levam à formação destes compostos. É conhecido que HPA podem ser sintetizados biologicamente por certas bactérias durante a decomposição da matéria orgânica (ABDEL-SHAFY e MANSOUR, 2016). O controle 2 também mostrou taxa de degradação negativa, demonstrando que a ausência dos microrganismos favorece a formação de HPA no meio.

No experimento com petróleo, a biodegradação mais expressiva no tempo de 48 horas foi realizada pelo isolado INPA R557 com 51,00 %. Também apresentou a maior taxa de degradação no óleo diesel neste período, o que comprova o seu potencial. No consórcio 77,09 % de assimilação de HPAT, valor acima no experimento com óleo diesel, que foi de 41,84 %, no mesmo período (Tabela 16).

Tabela 16. Taxas de degradação dos HPA nos períodos de 48 horas e 21 dias no experimento com petróleo.

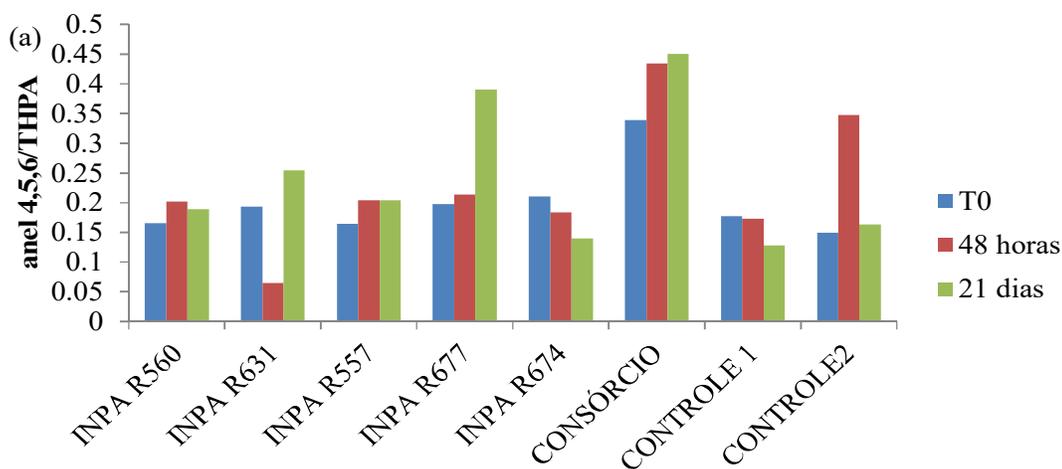
Bactéria	48 horas					
	Ace	F	Fen	Cris	B(a)P	Σ HPA
	----- % -----					
INPAR560	25,97	-0,46*	-82,66*	45,04	26,61	-18,64*
INPA R631	-106,69*	-24,02*	-19,94*	6,90	-211,06*	-38,94*
INPA R677	5,44	30,32	22,63	11,94	38,09	22,42
INPA R557	80,56	66,29	46,99	46,32	44,98	51,00
INPA R674	17,53	-0,59*	-63,50*	-16,04*	-47,84*	-28,14*
Consórcio	96,19	81,46	96,67	-51,29*	3,79	77,09
Controle 3	0,88	7,79	0,56	30,31	-2,79*	11,78
Controle 4	-53,90*	-126,65*	-56,49*	-84,37*	-73,90*	-66,80*
	----- % -----					
Bactéria	21 dias					
	Ace	F	Fen	Cris	B(a)P	Σ HPA
	----- % -----					
INPAR560	93,88	90,57	76,70	51,06	17,60	75,51
INPA R631	-82,69*	18,85	-185,51*	-76,32*	-28,32*	-132,07*
INPA R677	30,73	59,72	58,94	56,86	85,15	58,57
INPA R557	92,42	82,90	77,58	67,03	62,63	76,87
INPA R674	84,94	3,56	-66,01*	6,74	22,19	-6,27*
Consórcio	72,58	45,22	79,58	59,95	61,90	73,73
Controle 3	87,99	90,31	33,56	87,80	85,76	72,61
Controle 4	7,18	-41,19*	-166,13*	-13,42*	-10,43*	-94,23*

*Os valores de taxas de degradação negativos descritos correspondem à formação destes compostos durante o processo de biodegradação.

No período de 21 dias os isolados INPA R677 e INPA R557 apresentaram taxas de degradação 58,57 % e 76,87 %, respectivamente. O isolado INPA R560 não apresentou potencial de degradação no experimento com óleo diesel, no entanto, ao se utilizar o petróleo, obteve-se valor de 75,51 %, segunda taxa mais alta neste experimento. O consórcio apresentou valor de diminuição de HPAT de 73,73 %, valor acima do primeiro experimento que foi de 63,61 %.

Os controle 2 e 3 que continha o solo natural com o óleo diesel e o petróleo, respectivamente, apresentaram diminuição de HPAT de 79,80 % e 72,61 %, comprovando a possível presença de microrganismos capazes de degradar HPA no próprio solo, pois os resultados dos dois experimentos foram similares.

Foi calculada a razão HPA 4,5,6 anéis/THPA para as amostras do experimento de biodegradação, notando-se aumento da razão para os isolados INPA R557, 677, 631 e para o consórcio com os cinco isolados no experimento com o óleo diesel (Figura 33a), no experimento com petróleo nota-se aumento da taxa para os isolados INPA R560, 557, 677 e o consórcio com as cinco espécies (Figura 33b). BIACHE *et al.* (2014) afirmam que a razão HPA 4,5,6 anéis /THPA aumentam com a biodegradação.



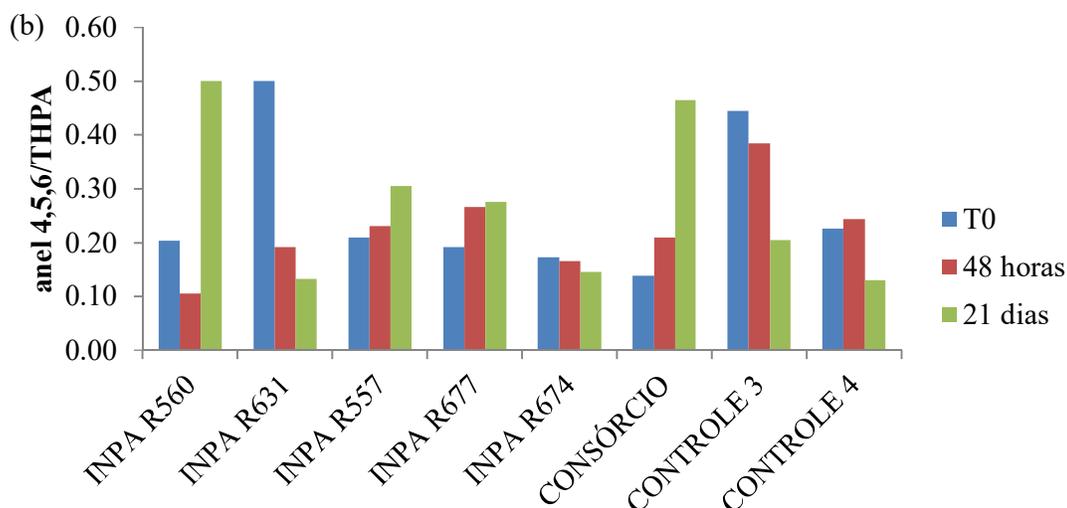


Figura 33. Razão (HPA 4,5,6 anéis/THPA) para as amostras do experimento de biodegradação utilizando como fonte de carbono (a) óleo diesel e; (b) petróleo.

Os controles 1 e 3 que se trata do solo natural com as respectivas fontes de carbono óleo diesel e petróleo, que apresentaram altas taxas de remoção de HPAT apresentaram comportamento diferenciado em relação aos outros tratamentos do experimento com alta taxa de remoção, mostrando que nesses tratamentos a remoção dos HPA de alto peso molecular foi menor em relação às de menor peso molecular.

O teste ANOVA fator único realizado para as taxas de degradação nos tempos de 48 horas e 21 dias para cada fonte de carbono indicaram que as bactérias apresentaram diferença significativa em cada experimento ($p \leq 0,05$).

No tempo de 48 horas, apenas, apresentou diferença significativa ao nível de 95% de confiança com as diferentes fontes de carbono os controle 1 e 3, que continham apenas a amostra de solo natural e as fontes de carbono, sendo a remoção mais eficiente deste tratamento quando as bactérias autóctones (provenientes do próprio solo) tinham como fonte de carbono o óleo diesel.

No período de 21 dias de incubação do experimento apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as fontes de carbono utilizadas os tratamentos INPA R560, que apresentou ótima remoção de hidrocarbonetos no experimento com o petróleo, no entanto não

se mostrou eficiente na remoção de hidrocarbonetos quando se adicionou óleo diesel ao solo; e, ainda os tratamentos com o isolado INPA R677 que apresentou taxa de remoção nas duas fontes de carbono, porém apresentou diferença significativa ao nível de 95 % de confiança entre os dois experimentos, sendo este isolado mais eficiente na remoção de hidrocarbonetos no óleo diesel.

Segundo avaliação estatística, os melhores tratamentos para remoção de hidrocarbonetos em solo de várzea da região Amazônica foram o isolado INPA R557, o consórcio e os controles 1 e 2, que continham o solo natural com as respectivas fontes de carbono, pois apresentaram alta taxa de remoção de hidrocarbonetos em ambos os experimentos ($p \leq 0,05$).

5.5 Marcadores de biodegradação

Os biomarcadores ambientais podem ser utilizados para prever o caminho e os efeitos de poluentes tóxicos e monitorar o processo diagenético no solo (PETERS *et al.*, 2005a).

O cromatograma referente ao íon m/z 231 (Figura 34c) representa a presença deste íon na amostra de solo natural, e nos cromatogramas referentes ao petróleo (Figura 34a) e ao diesel (Figura 34b) nota-se ausência desse íon, a presença do íon é confirmada pelo seu espectro de massas (Figura 34d).

CHENG *et al.* (2018) avaliaram a presença deste composto em amostra de petróleo cru, no entanto a composição do petróleo está intimamente ligada a seus processos de formação, diferindo de uma área para outra.

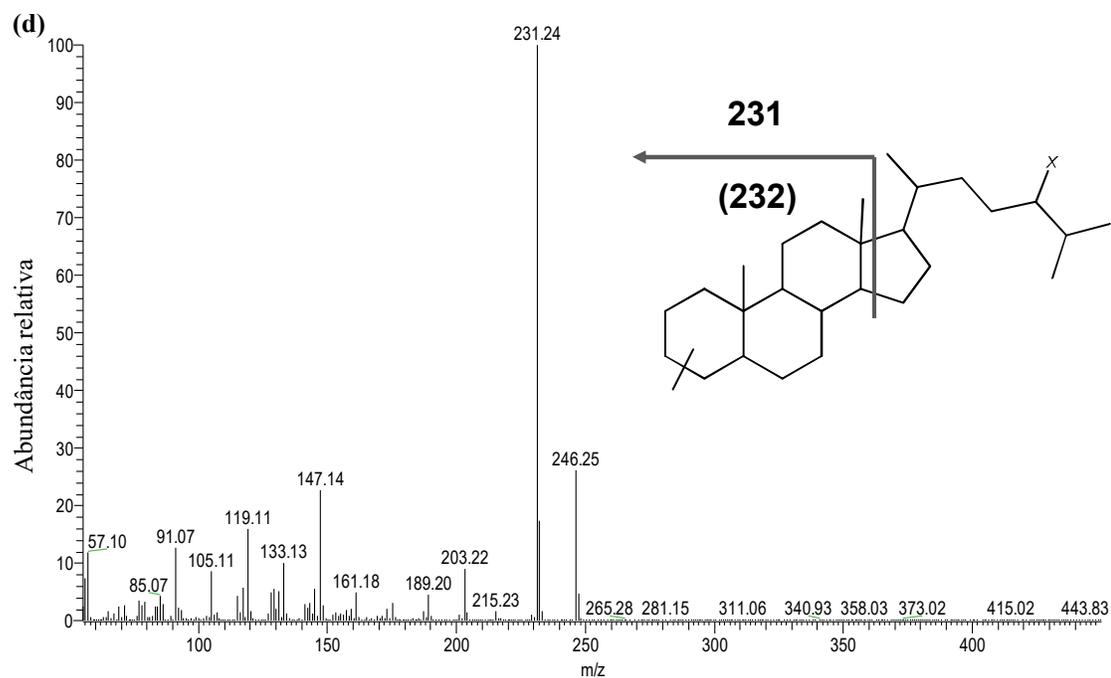
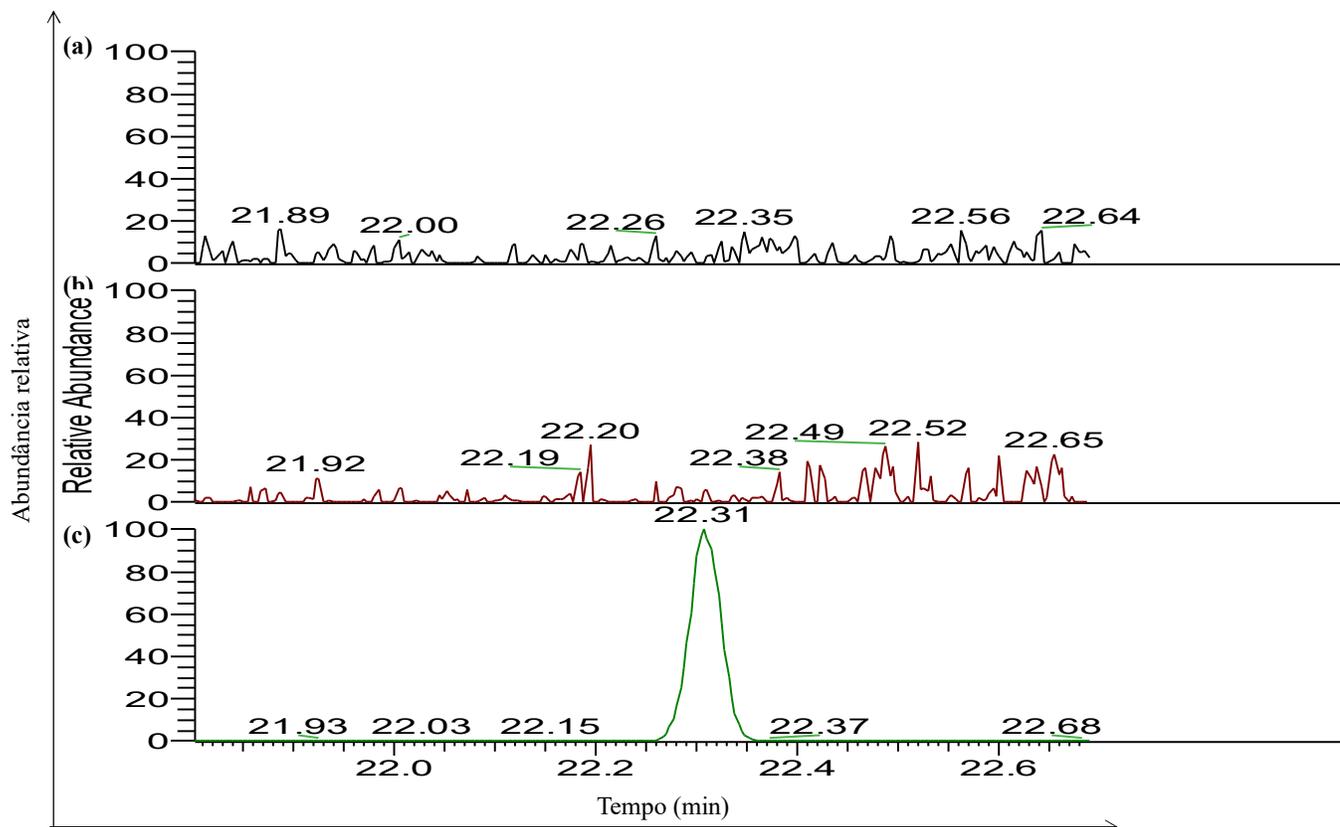


Figura 34. Cromatograma do íon m/z 231 (a) no petróleo; (b) no diesel utilizado no experimento e (c) na amostra de solo natural (d) espectro de massa do íon m/z 231.

O fragmento do íon m/z 231 corresponde aos compostos esteroides triarômicos.

Na Figura 35a que apresenta as amostras com alto poder de remoção de HPA no experimento com óleo diesel, notamos diminuição na área relativa a esse íon entre o período inicial e final do experimento, o que representa maior nível de degradação do diesel, corroborando com os resultados de CHENG *et al.* (2018) que concluíram que a abundância destes compostos diminuem conforme aumenta o processo de biodegradação em óleo cru.

A diminuição da abundância relativa observada comprova a alta taxa de degradação desses tratamentos do experimento, pois segundo HEAD *et al.* (2003) a remoção de compostos esteranos representa óleo em estado severo de degradação.

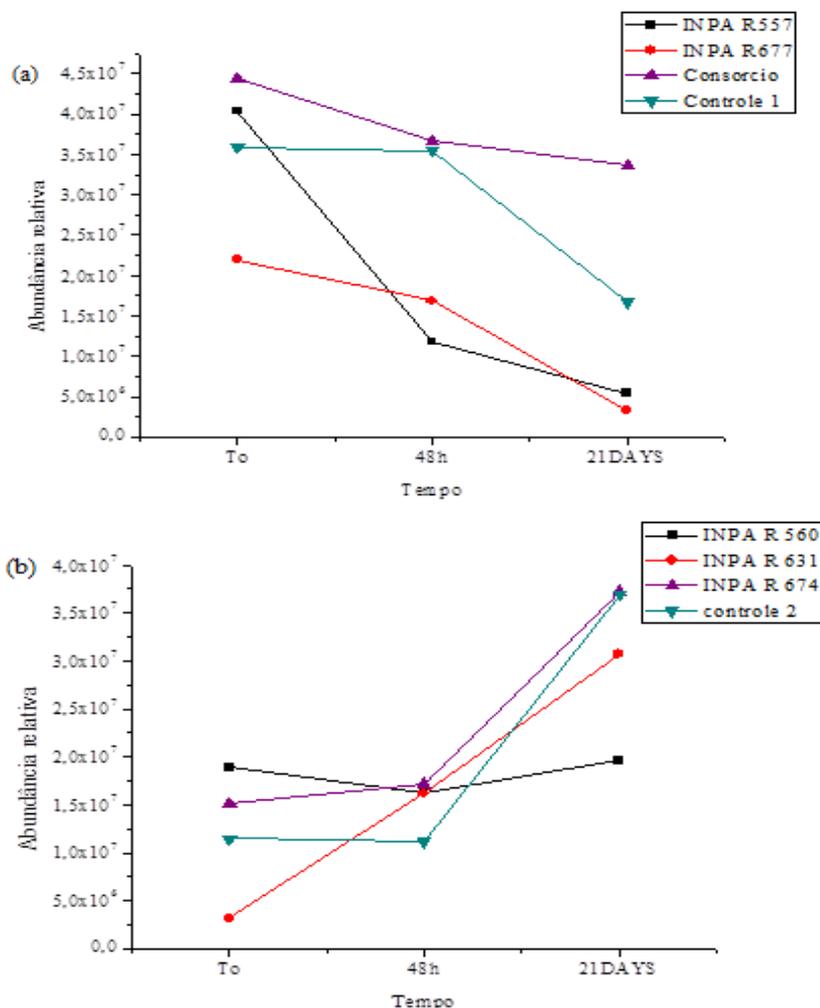


Figura 35. Abundância relativa do fragmento m/z 231 que corresponde ao composto metil-esterano nos tratamentos, (a) que demonstraram; (b) que não demonstraram, potencial de biodegradação no experimento com óleo diesel.

Na Figura 35b estão apresentadas as amostras que não demonstraram degradação de HPA, nota-se então que ocorre um de aumento de compostos metil-esteranos entre os tempos inicial e final. Durante a transformação da matéria orgânica no solo por microrganismos esse composto é formado ou sofre alteração (HEAD *et al.*, 2003), outros processos podem influenciar a transformação destes compostos, pois o tratamento 3 que continha o solo esterilizado, ou seja sem a presença de microrganismos, observou-se um grande aumento da abundância relativa do metil-esterano nesse tratamento após o período de 21 dias, o que não se observou durante o período de 48 horas onde ocorreu pouca variação.

No experimento com petróleo, ao avaliar o íon m/z 231, encontrou-se o mesmo comportamento do experimento com óleo diesel, as espécies que demonstraram capacidade de degradação de HPA, INPA R560, 557, 677, assim como o consórcio e controle 4, levaram à diminuição da área relativa ao composto metil-esterano (Figura 36a).

Nos tratamentos do experimento em que não houve taxa de degradação de compostos HPA, ocorreu aumento da área relativa ao metil-esterano (Figura 36b), corroborando com os resultados avaliados no experimento com óleo diesel, comprovando o potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo pelos isolados INPA R557 e 677, sendo possível sua utilização por processos de biorremediação por bioaugmentação.

SUN *et al.* (2012), notaram que HPA de 4 a 6 anéis reduziram 35,36 % por processo de bioaugmentação, 11,0 % em processo de bioestimulação, e, 55,0 % pelas duas técnicas utilizadas em conjunto.

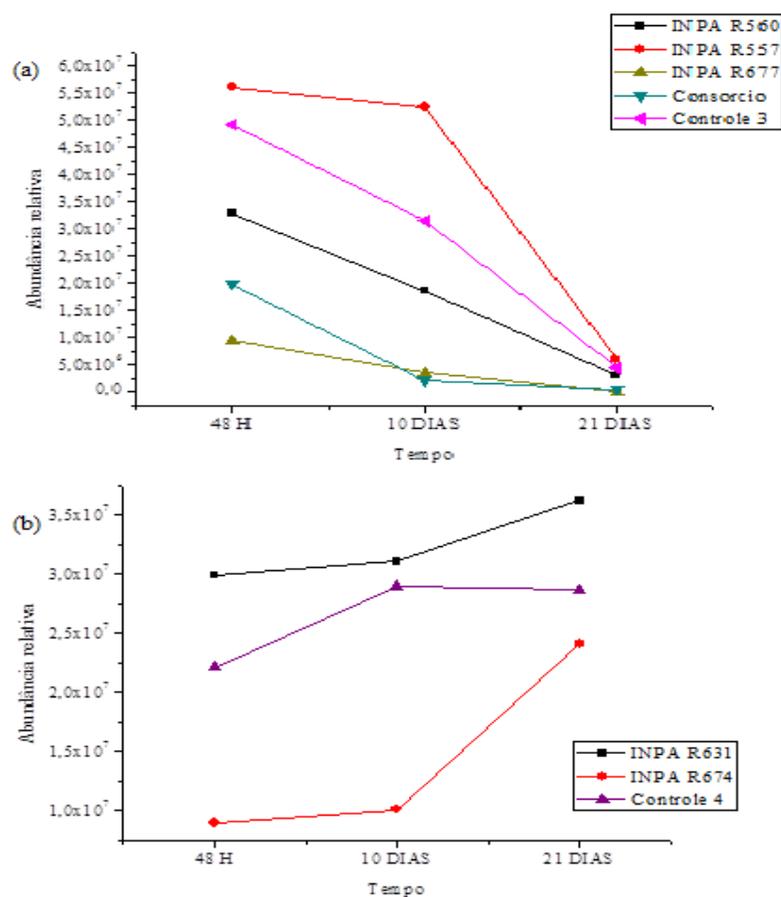


Figura 36. Abundância relativa do fragmento m/z 231 que corresponde ao composto metil-esterano nos tratamentos, (a) que demonstraram; (b) que não demonstraram, potencial de biodegradação no experimento com petróleo.

No controle 4, que se trata do experimento sem adição de microrganismos mas com a presença de petróleo, notou-se pouca variação em relação à intensidade do metil-esterano durante o processo de incubação do experimento, diferindo do resultado avaliado no óleo diesel.

A espécie INPA R560 apresentou comportamentos diferentes nos experimentos realizados com óleo diesel e petróleo, pois ela obteve capacidade de degradação de hidrocarbonetos no experimento com petróleo, mas não foi capaz de levar a menores concentrações desses compostos quando se adicionou no experimento com óleo diesel, sendo necessários outros testes para a avaliação do potencial de degradação desde isolado, como a medida das concentrações de hidrocarbonetos em mais tempo de experimento, visto que fatores biológicos influenciam os processos de degradação de óleo, e entender esses processos é fundamental para compreender completamente a extensão da biodegradação por bactérias (CRAMPON *et al.*, 2016).

De acordo com CHENG *et al.* (2018) a suscetibilidade de hidrocarbonetos esteroides triaromáticos à biodegradação é baseada na mudança que ocorre na composição destes compostos durante o processo.

O nível de biodegradação pode ser medido baseado na abundância relativa de várias classes de compostos. Em processos severos de biodegradação hopanos são formados (HEAD *et al.*, 2003), e sua presença ou sua transformação no ambiente indica óleo em estado severo de degradação. O monitoramento das concentrações desses compostos é realizado para identificar o grau de decomposição do óleo. Segundo BENNETT *et al.* (2006) esteroides triaromáticos e outros compostos resistentes à biodegradação aumentam em 35 % em consequência da remoção de outros compostos mais biodisponíveis à microrganismos.

A presença de íons m/z 207, 208 e 123 (Figura 38b), indica formação do íon molecular de massa m/z 414 que corresponde ao composto C₃₁ 8(14)-sec-hopanóide, que é produto da ciclização produzida por bacterohopanopolióis, cuja formação e deposição ainda são pouco conhecidas (PETERS *et al.*, 2005b). Uma das rotas propostas para a formação desses compostos no ambiente está descrita na Figura 37.

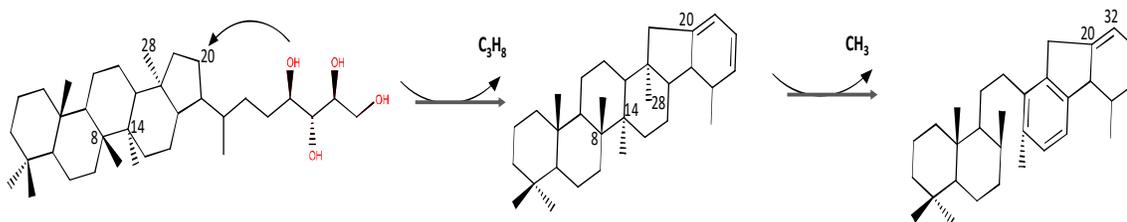


Figura 37. Proposta do caminho da formação do C₃₁diaromático 8(14)- sec-hopanóide. Fonte: Peters *et al* (2005b).

No ambiente estes compostos são encontrados como uma mistura homóloga de 4 compostos e a sua formação vai depender das condições em que ocorrem a deposição da matéria orgânica (PETERS *et al.*, 20005b).

Ao se avaliar o cromatograma de F1 nota-se presença deste composto na amostra de solo natural (Figura 38) e ausência no petróleo e no óleo diesel utilizado no experimento, indicando que este composto é formado pela decomposição da matéria orgânica proveniente do solo utilizado do experimento. Segundo PETERS *et al.* (2005b) este composto não é encontrado em petróleo e seus derivados. No espectro de massas do solo natural (Figura 38b), nota-se presença do íon m/z 123 mostrando que ocorre processo de formação deste C₃₁diaromático 8(14)- sec-hopanóide no solo natural de várzea.

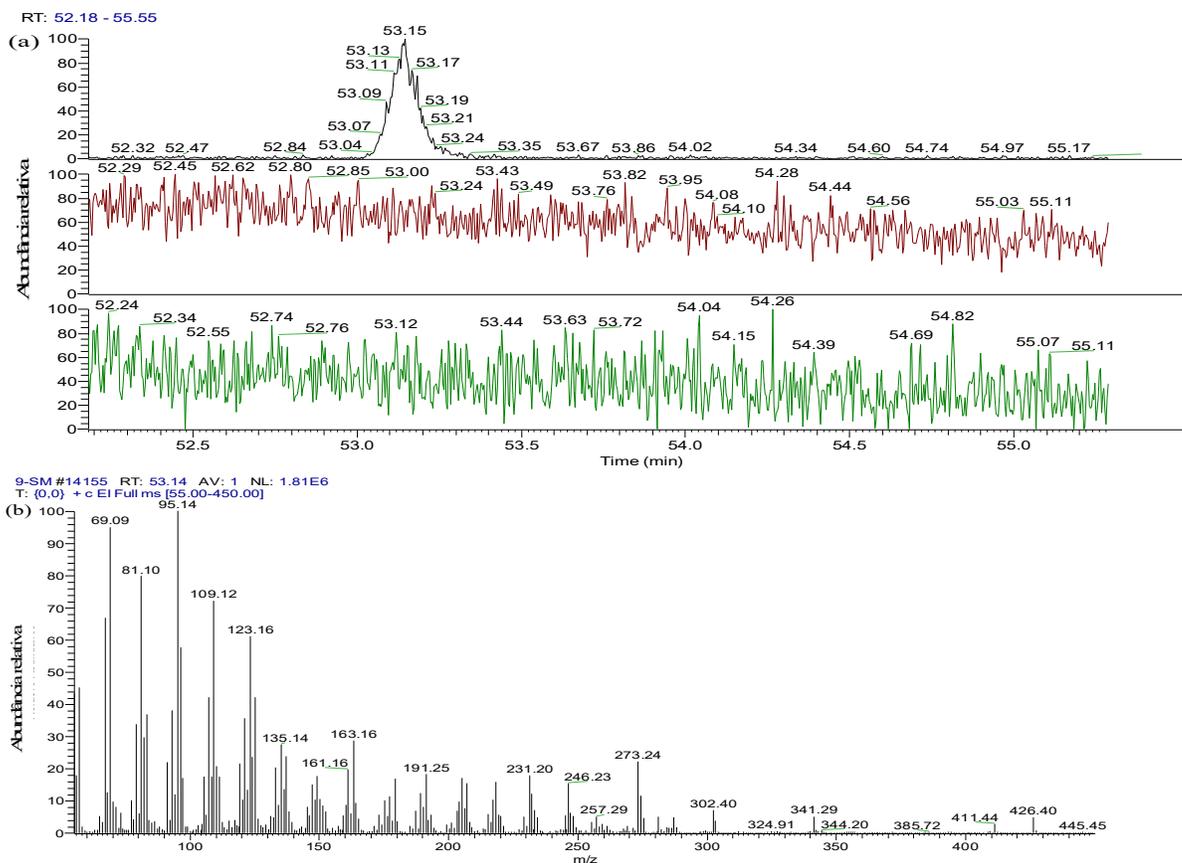
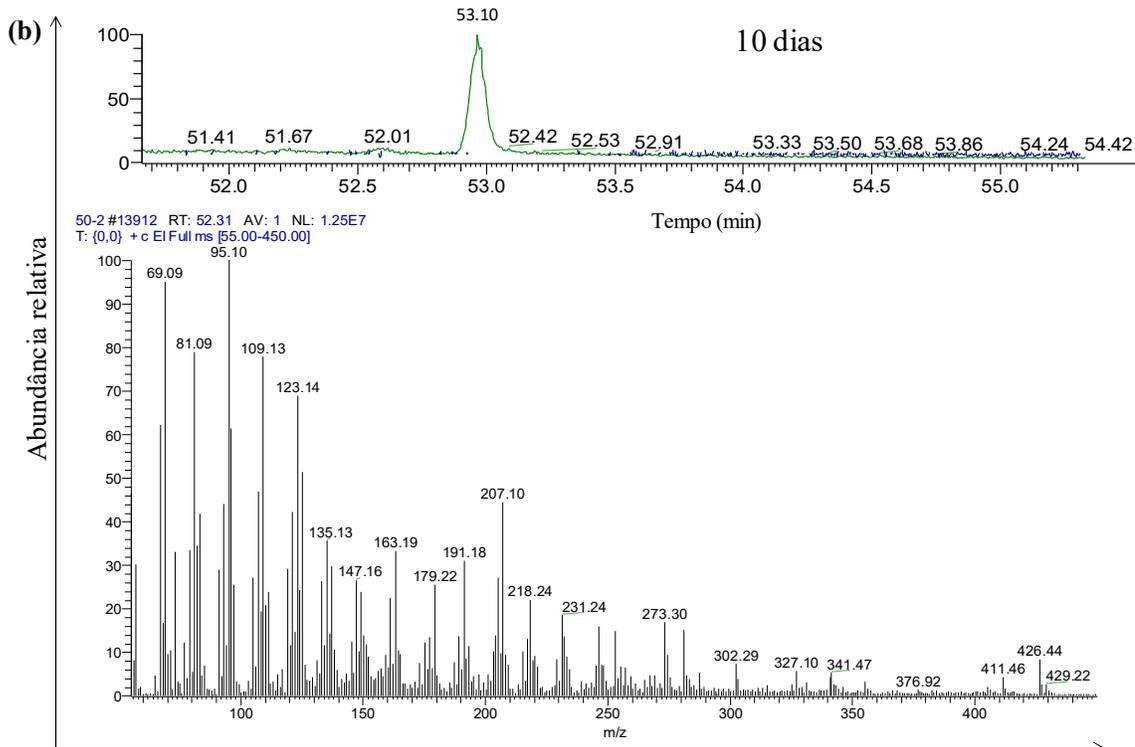
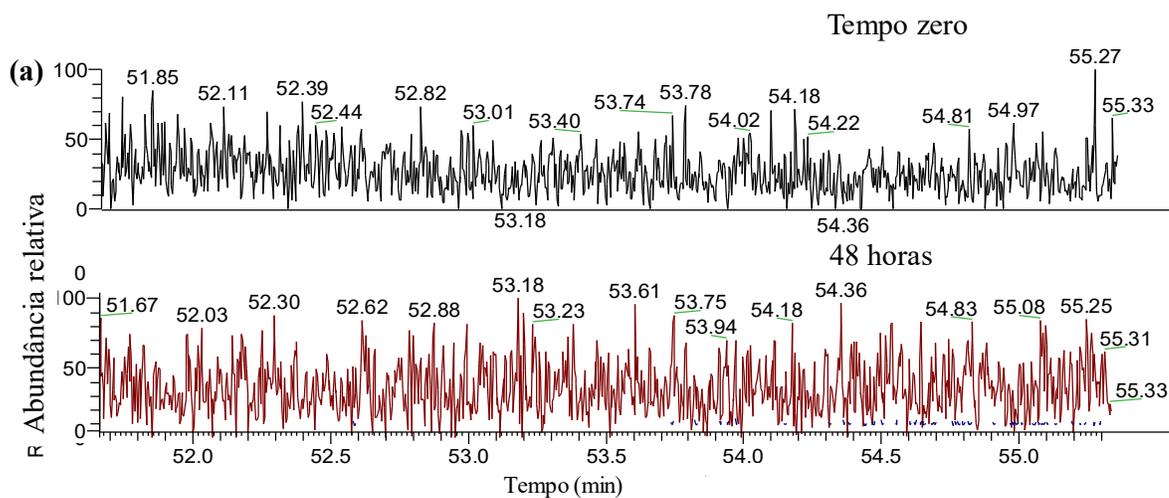


Figura 38. (a) Cromatogramas do solo natural, do petróleo e do diesel utilizado no experimento; (b) Espectro apresentado para o pico no tempo de retenção 53,15 minutos.

Na fração de n-alcenos, nota-se que os experimento com petróleo que apresentaram as melhores taxas de remoção de hidrocarbonetos houve o surgimento de C31diaromático 8(14)-sec-hopanóide ao longo do tempo de incubação do experimento. Em relação ao tratamento que utilizou o isolado INPA R677 nota-se presença destes compostos, a partir de dez dias (Figura 39a) e no período após 21 dias de incubação (Figura 39b), no controle 4 só nota-se a presença deste composto após o período de 21 dias de incubação (Figura 40b).

Estes compostos são representados pelos íons m/z 191 e m/z 207, outros íons presentes no espectro são ainda provenientes das transformações que continuam a ocorrer nas amostras durante o período de incubação do experimento, notando-se diferença na intensidade do íon m/z 207 do espectro 1 para o espectro 2, comprovando ação dos microrganismos na transformação do petróleo (Figura 39b e c).



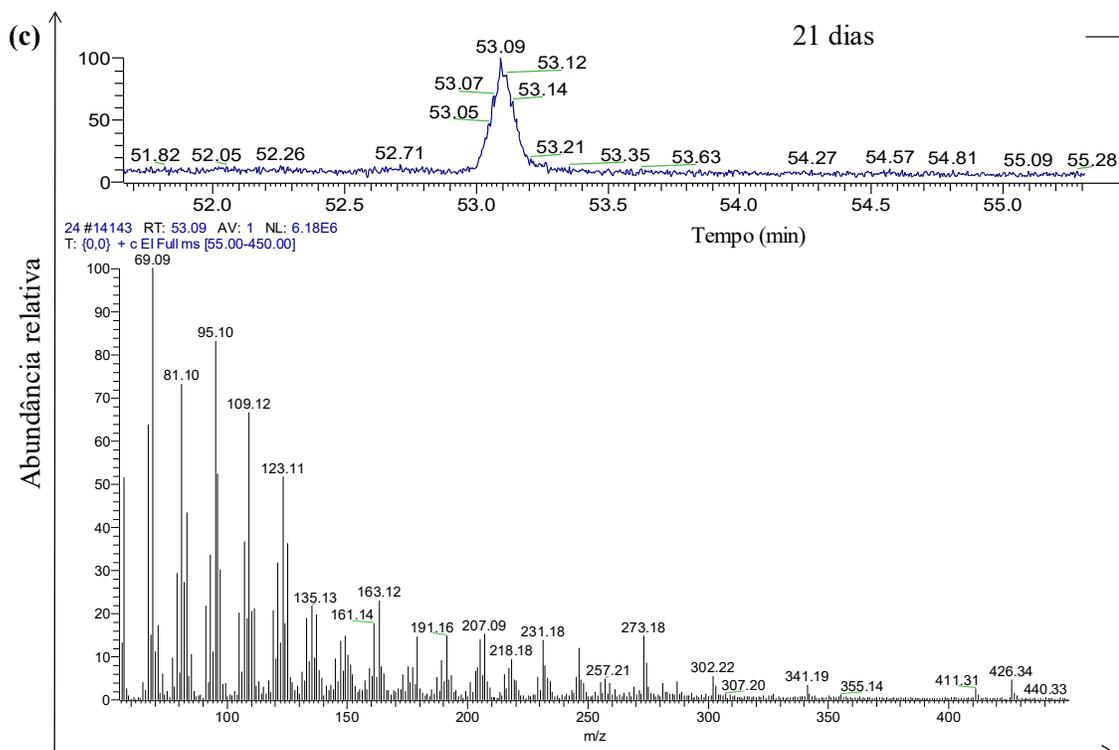


Figura 39. (a) Cromatogramas nos tempo zero/ (b) Cromatograma do pico no tempo de retenção de 53,10 minutos com seu respectivo espectro de massa no tempo de 48 horas; (c) Cromatograma do pico no tempo de retenção de 53,12 minutos com seu respectivo espectro de massa no tempo de 21 dias para a Rizobactéria INPA R677 no experimento com petróleo.

No controle 4, amostra que corresponde à amostra de solo autoclavado com o petróleo só observamos a presença do composto referente ao íon m/z 207 no último cromatograma (Figura 40a), que corresponde ao período de 21 dias de incubação do experimento, e ainda assim com baixa intensidade do íon (Figura 40b).

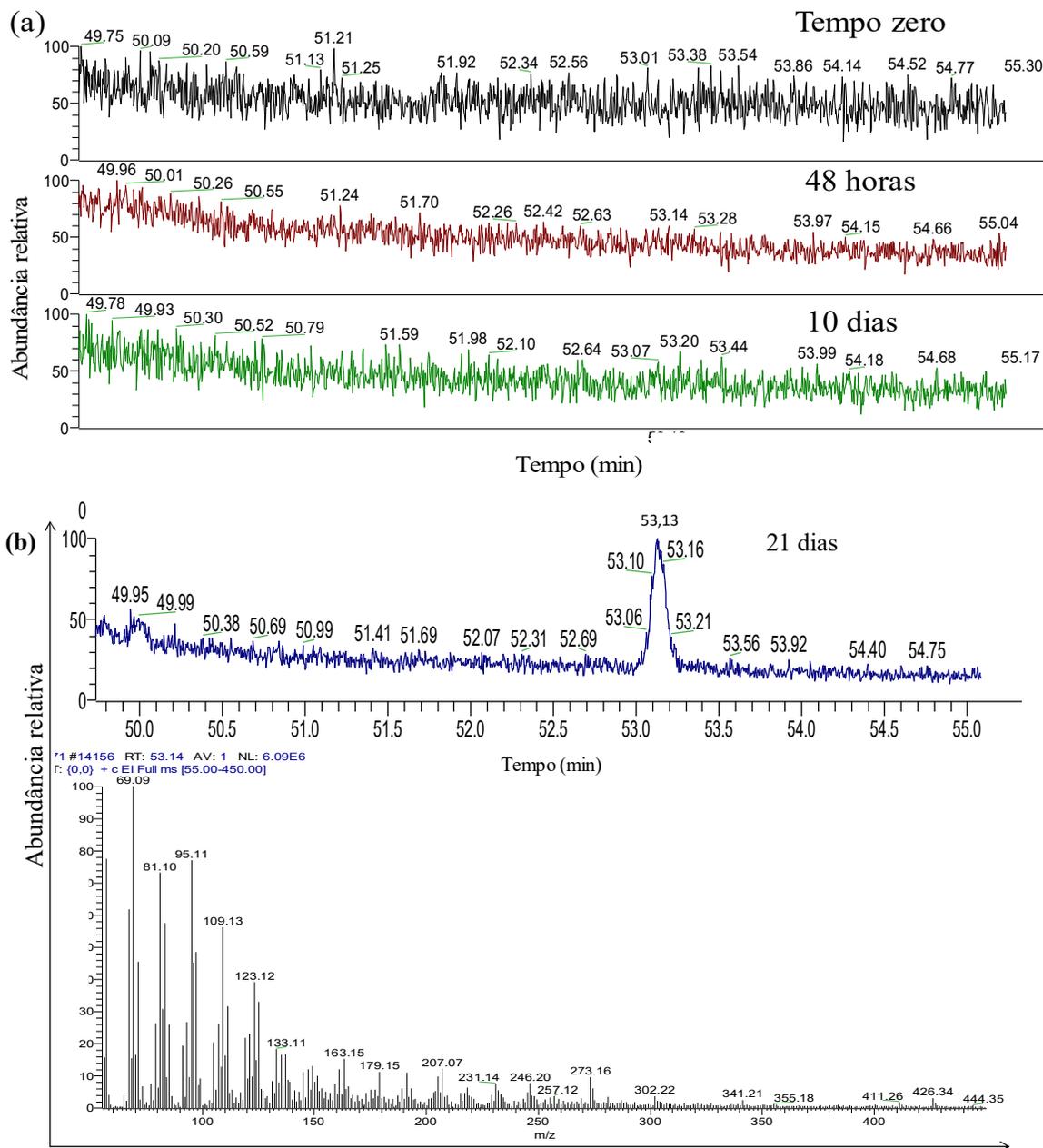
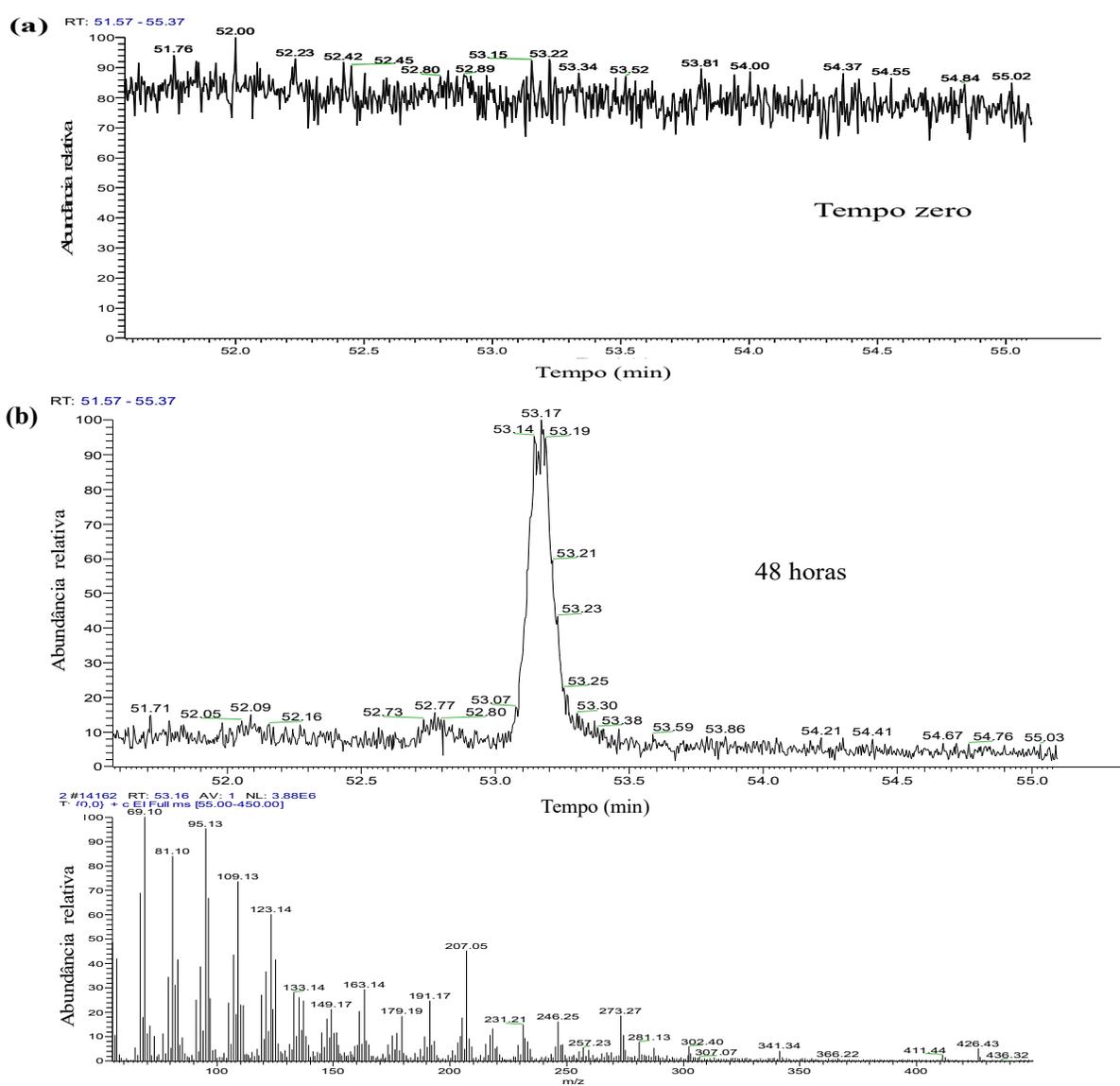


Figura 40. (a) Cromatogramas nos tempo zero, 48 horas e 10 dias; (b) Cromatograma do tempo de retenção 53,16 minutos com seu respectivo espectro de massa para o controle 4 no experimento com petróleo.

Para não se verificar o composto referente ao tempo de retenção 53 minutos no tempo zero do experimento, demonstra que alguma alteração é causada neste composto durante o processo de esterilização do solo, pois este composto foi observado, na amostra de solo natural, e como ela passa a reaparecer no decorrer do tempo de incubação do experimento

demonstrado ação dos isolados na produção desse composto, o que ocorre também naturalmente no ambiente, no entanto a formação se dá por processos diferentes, fato este que pode ser comprovado pelos espectros de massa obtidos para cada pico no solo natural e após a instalação do experimento de biodegradação.

No experimento com óleo diesel, nota-se o mesmo comportamento em relação ao composto referente ao íon m/z 207, no entanto há presença deste íon a partir do tempo de 48 horas com a espécie INPA R677 (Figura 41b), no período de 21 dias nota-se uma diminuição na área relativa do pico referente a este íon (Figura 41c).



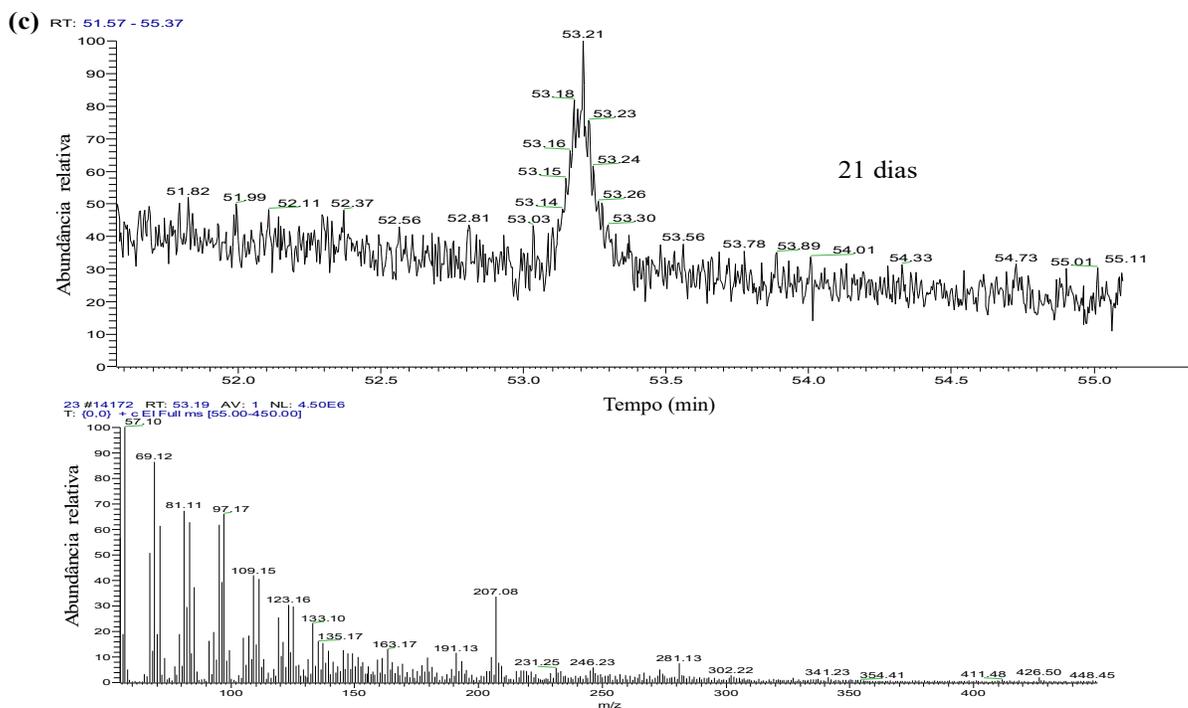
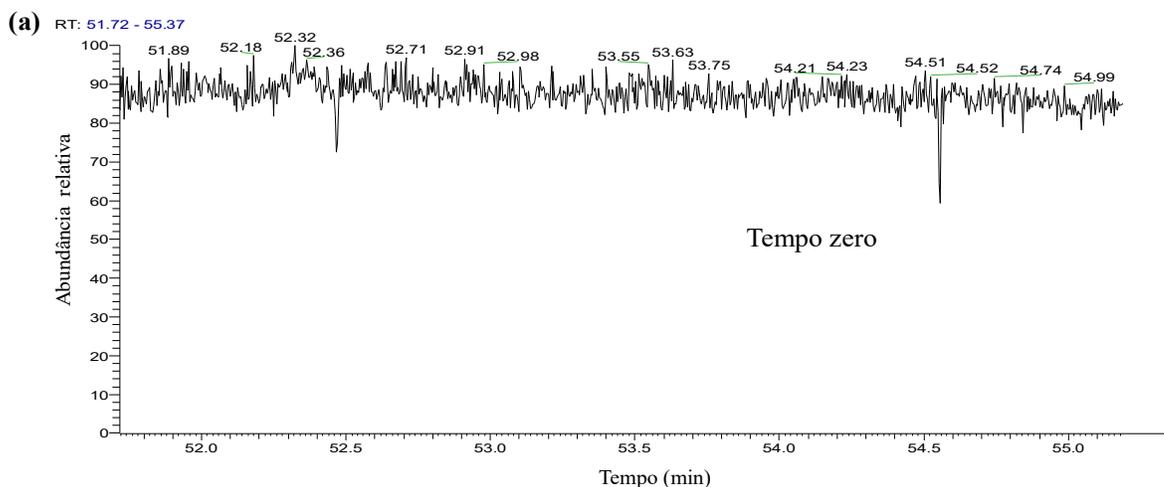


Figura 41. (a) Cromatograma no tempo zero; (b) Cromatograma do pico no tempo de retenção de 53,17 minutos com seu respectivo espectro de massa no tempo de 48 horas; (c) Cromatograma do pico no tempo de retenção de 53,21 minutos com seu respectivo espectro de massa no tempo de 21 dias para a Rizobactéria INPA R677 no experimento com óleo diesel.

No controle 2 referente ao experimento que continha apenas o óleo diesel com o solo esterilizado, nota-se formação do pico no tempo de retenção 52,29, no entanto ao observar seu espectro nota-se ainda ausência do íon m/z 207 (Figura 42b), e este íon começa aparecer somente no tempo de 21 dias e em baixa intensidade (Figura 42c).



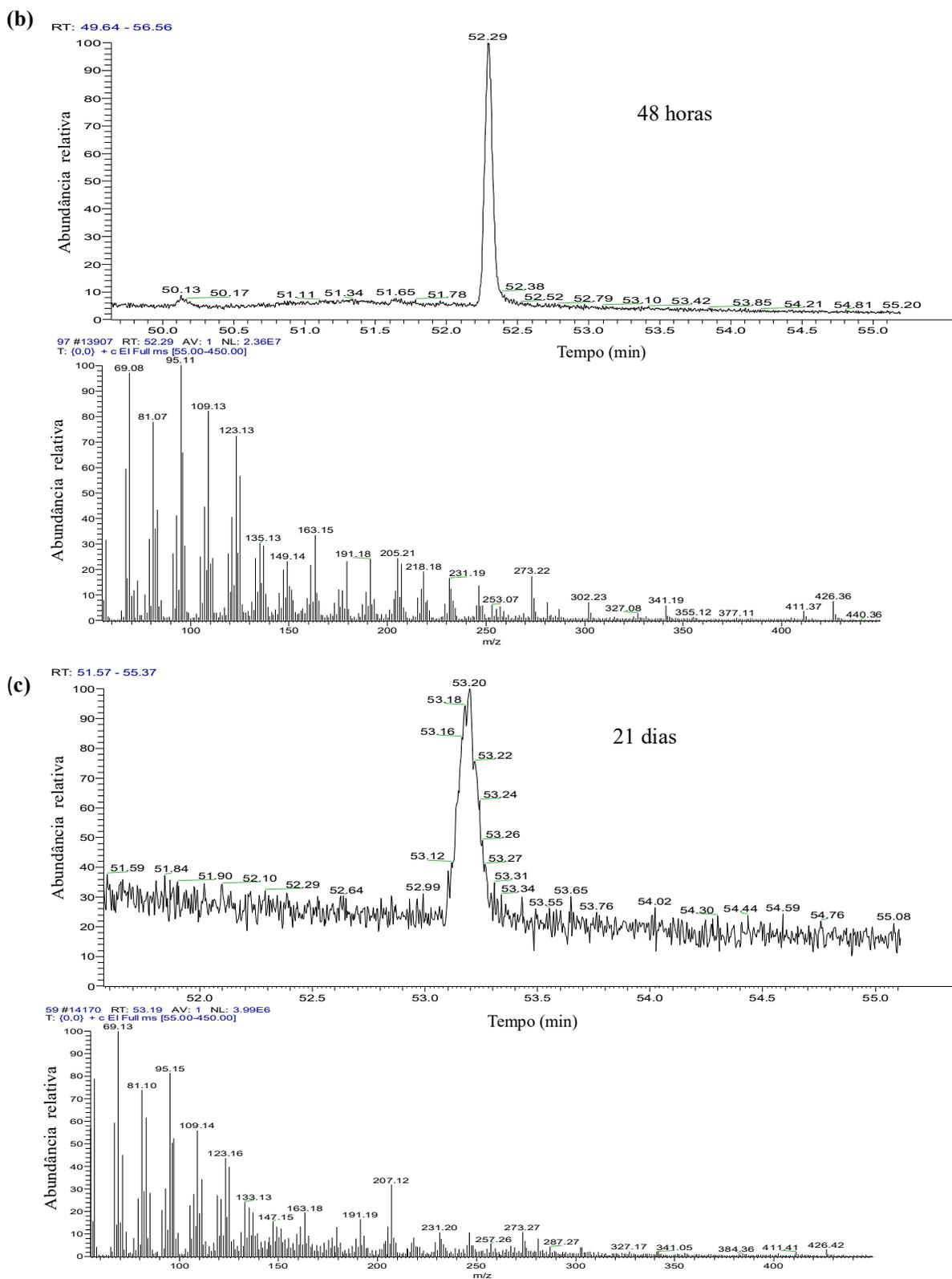


Figura 42. (a) Cromatograma no tempo zero; (b) Cromatograma do pico no tempo de retenção de 52,29 minutos com seu respectivo espectro de massa no tempo de 48 horas; (c)

Cromatograma do pico no tempo de retenção de 53,20 minutos com seu respectivo espectro de massa no tempo de 21 dias para o controle 2 no experimento com óleo diesel.

Vários compostos são produzidos e removidos durante o processo de biodegradação de petróleo e seus derivados. O monitoramento de alguns destes compostos podem levar ao nível de degradação do óleo. A presença de hopanóides, indica degradação severa (HEAD et al., 2003) com nível de degradação entre 6 e 10, valores medidos através da estimativa de massa perdida pelo óleo durante a biodegradação (PETERS *et al.*, 2005a). A variação dos compostos formados durante o experimento indica que a espécie INPA R677 levou o petróleo e o óleo diesel a estados severos de degradação.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta tese é a primeira a avaliar biodegradação de hidrocarbonetos em solo de várzea da região Amazônica, salientando a importância da avaliação da concentração individual de HPA neste tipo de experimento. Deixa como legado este a implementação do método analítico para a central de apoio multidisciplinar – CAM/UFAM.

Conforme os resultados encontrados as propriedades químicas do solo (macro e micro nutrientes) estão em consonância com o descrito pela literatura para região de várzea da Amazônia, diferenciando apenas em relação aos níveis de N e M.O que apresentaram altos valores, diferente do que é comumente observado nesses ambientes.

O baixo teor de alumínio observado contribui para atividade de biodegradação nessa região, pois este elemento é um limitante por ser tóxico aos microrganismos, e alta taxa de nutrientes observadas (P, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu) favorece o crescimento e a atuação das espécies de bactérias.

Os resultados de metais apresentaram em geral baixos valores, com exceção de Ba, Cd e Se que foram acima do recomendado, fator importante para atividade de degradação por bactérias, pois a presença de grandes concentrações de metais pode inibir as ações enzimáticas em bactérias no processo de degradação de contaminantes de petróleo e óleo diesel. No entanto, cada microrganismo difere em relação à tolerância de cada metal, como os microrganismos utilizados no estudo são provenientes do mesmo ambiente avaliado, a atividade de degradação não foi afetada com a presença desses metais, provavelmente pela adaptação destes microrganismos à composição do ambiente.

Dentre as cinco rizobactérias avaliadas, com exceção do isolado INPA R631, as demais apresentaram taxas de degradação de n-alcenos acima de 60 % no período de 48 horas e valores de remoção acima de 80 % após o período de 21 dias. Uma porcentagem desses compostos é perdida por volatilização, pois nos controles 2 e 4, que representavam os

experimentos sem a presença de microrganismos houve diminuição de 25 % dos n-alcenos do óleo diesel e 29,21 % do petróleo, entre os tempos inicial e final de incubação do experimento. Os consórcios, com a mistura as cinco espécies, também apresentou taxas de remoção consideráveis de n-alcenos com valor de 67,57 % no experimento com óleo diesel e 67,80 % no experimento com petróleo.

As espécies testadas apresentaram alto potencial de degradação de HPA nas primeiras 48 horas, destacando-se a espécie INPA R557, INPA 677 e consórcio com os cinco isolados, que foram capazes de reduzir as concentrações de HPA, tanto no experimento com óleo diesel como com o petróleo.

Das cinco espécies testadas individualmente, duas, INPA R677 e 577, apresentaram potencial de biodegradação de HPA com taxas de degradação elevada após o período de 21 dias, para o experimento com óleo diesel; e três apresentaram potencial de biodegradação, INPA R 677, 557 e 560, no experimento com petróleo, sugerindo que a espécie INPA R560, deve ser mais bem avaliada, para identificar o comportamento diferenciado diante de matrizes diferentes.

O consórcio, que continha as misturas dos isolados testados, apresentou potencial de degradação nas duas fontes de carbono avaliadas durante o período de incubação do experimento. Sugere-se, dessa forma, a avaliação da mistura contendo apenas as espécies que apresentaram maior potencial de degradação de hidrocarbonetos de petróleo, para ver se é possível uma maior remoção em um período menor de tempo.

O controle que continha apenas o solo também apresentou alta taxa de biodegradação sugerindo que microrganismos provenientes do próprio solo são capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo, pois foram capazes de degradar n-alcenos, HPA e metil-estirano após o período de 21 dias. No entanto este processo é mais lento visto que no período de 48

horas as taxas de degradação de HPA, foram menores em relação aos compostos testados individualmente e com o consórcio.

Com alto potencial de biodegradação os isolados INPA R557 e INPA R677 podem ser utilizados para técnica de bioaugmentação em solo de ambiente de várzea para biorremediação de petróleo e seus derivados, pois reduziram os teores de n-alcenos, HPA e compostos mais complexos, como metil-estirano, durante o período de 21 dias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, v. 25, p. 107–123, 2016.
- ABOUL-KASSIM, T.S.T.; SIMONEIT, B.R.T. Organic pollutants in aqueous-solid phase environments: types, analyses and characterizations. *The handbook of environmental chemistry*, 5. 105p. 2001.
- AHMAD, D.; MEHMANNVAZ, 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.
- BAIRD, C. *Química Ambiental*. Porto Alegre. Ed. Bookmanp.622. 2002.
- BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Sussex, v.80, n.7, p.723-736, 2005.
- BATISTA, S. B. Bactérias de Ambientes Contaminados Com Petróleo ou Derivados Produtoras de Surfactantes e Emulsificantes. 2002.Tese (Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola). Viçosa. Minas Gerais.
- BARTHEM, R.B.; FABRÉ, N.N. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. In: Ruffino, M.L. (coord.). A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira. IBAMA/PROVÁRZEA. p. 17-62, 2004.
- BAUMARD, P.; BUDZINSKI, H.; MICHON, Q.; GARRIGUES, P.; BURGEOT, T.; BELLOCQ, J. Origin and bioavailability of PAHs in the Mediterranean sea from mussel and sediment records. *Estuar. Coast. Shelf S.* v. 47. p. 77–90, 1998.
- BENNETT, B.; FUSTIC, M.; FARRIMOND, P.; HUANG, H.; LARTER, S. R. 25-Norhopanes: Formation during biodegradation of petroleum in the subsurface. *Organic Geochemistry*, v. 37, p. 787–797, 2006.
- BEZZA, F. A.; CHIRWA, E. M. N. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere*, v. 144, p. 635-644, 2016.
- BIACHE, C.; MANSUY-HUAULT, L.; FAURE, P. Impact of oxidation and biodegradation on the most commonly used polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) diagnostic ratios: implications for the source identifications. *Journal of hazardous materials*, v. 267, p. 31-39, 2014.
- BIACHE, C.; OUALIA, S.; CÉBRON, LORGEUX, C.; COLOMBANO, C.; FAURE, P. Bioremediation of PAH-contaminated soils: Consequences on formation and degradation of polar-polycyclic aromatic compounds and microbial community abundance. *Journal of Hazardous Materials*, v. 329 p. 1–10, 2017.
- BINSZTOK, J.; WASSERMAN, J.; BARROS, S. R. Processos sócio-Ambientais no Médio Amazonas e baixo Trombetas (Trecho Santarém-Oriximiná). 2008.
- BISHTA, S.; PANDEY, P.; KAUR, G.; AGGARWAL, H.; SOOD, A.; SHARMA, S.; KUMAR, V.; BISHT, N.S. Utilization of endophytic strain *Bacillus* sp. SBER3 for biodegradation of polyaromatic hydrocarbons (PAH) in soil model system. *European Journal of Soil Biology*, v. 60, p. 67 – 76, 2014.
- BOEHM, M.; AGUILAR, R. C.; BONIFACINO, J. S. Functional and physical interactions of the adaptor protein complex AP-4 with ADP-ribosylation factors (ARFs). *EMBO J.*, v. 20, p. 6265-76, 2001.

- BONA, C.; YAMAMURA, M.; SILVA, B. da; REZENDE, I. M.; SANTOS, G. O.; SOUZA, L. A.; INCKOT, R. C. Efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folha de plântulas de *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) e *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). *Acta Botanica Brasilica* v. 25, n. 2, p. 277–285, 2011.
- BOONCHAN, S.; BRITZ, M. L.; STANLEY, A. A. Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures. *Applied And environmental microbiology*, v. 66:(3), p. 1007–1019, 2000.
- BOUCHEZ, M.; BLANCHET, D.; HAESLER, F.; VANDECASTEELE, J-P.; *Rev Inst. Fr. Petr.* 407p. 1996.
- BRAGA, T. G.; PÓVOA, P. V.; PIRETE, L. M.; LEMOS, D. A.; CARDOSO, V. L.; RESENDE, M. M.; VIERIRA, P. A. Biorremediação de solo contaminado com biodiesel de processo (biodiesel e glicerina): avaliação de condições operacionais empregando reatores rotativo e de bandeja. *Blucher chemical engineering proceedings*. v. 1. n. 1.2014.
- 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.
- 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.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, *Applied Microbiology and Biotechnology*. Berlin, v. 50, p. 520-529, 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.
- CAVALCANTE, R. M.; LIMA, D. M.; CORREIA, L. M.; NASCIMENTO, R. F.; SILVEIRA, E. R.; FREIRE, G. S.; R. B.; VIANA, R. B. Técnicas de extrações e procedimentos de clean-up para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (hpa) em sedimentos da costa do ceará. *Química nova na escola*. v. 31, n. 6, p. 1371 – 1377. 2008.
- CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, v. 3, n. 2-3, p. 351-368, 1992.
- CHENG, X.; Hou, D.; Mao, R.; Xu, C. Severe biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in reservoir crude oils from the Miaoxi Depression, Bohai Bay Basin. *Fuel*, v. 211, p. 859–867, 2018.
- COCHRANE, T.T. Chemical properties of native savanna and forest soils in central Brazil. *Soil Science Society of America Journal*, Volume 53, no.1. p. 139-141. 1989.
- COLOMBO, J.C.; E.; BROCHU, C.; KHALIL, M. Determination of hydrocarbon sources using n-alkane and polyaromatic hydrocarbon distribution indexes. Case study: Rio de La Plata estuary, Argentina. *Environ. Sci. Technol.* v. 23. p. 888–894. 1989.
- COMMENDATORE, M. G.; NIEVAS, M. L.; AMIN, O.; ESTEVES, J. L. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Patagonia, Argentina). *Marine Environmental Research*, v. 74. p. 20-31, 2012.
- CRAMPON, M.; BODILIS, J.; LE DERF, F.; PORTET-KOLTALO, F. Alternative techniques to HPCD to evaluate the bioaccessible fraction of soil-associated PAHs and correlation to biodegradation efficiency. *Journal of Hazardous Materials*, v. 314, p. 220–229, 2016.

- CRAMPONA, M.; CÉBRON, A.; PORTET-KOLTALO, F.; UROZ, S.; LE DERF, F.; BODILIS, J. Low effect of phenanthrene bioaccessibility on its biodegradation indiffusely contaminated soil. *Environmental Pollution*, v. 225, p. 663 - 673, 2017.
- CRISTALE, J.; SILVA, F. S.; MARCHI, M. R. R. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. *Eclética química*, v. 33, n. 4, 2008.
- CRUZ, G. F.; MARSAIOLI, A. J. Processos Naturais de Biodegradação do Petróleo em Reservatórios. *Quim. Nova*, V. 35, N. 8, p. 1628-1634, 2012.
- DAS, K., MUKHERJEE, A. K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, v. 9, n. 8, p. 1339 – 1345, 2007.
- DEZORDI, C.; TEIXEIRA, W. G. Seminário de Pós-Graduação na Embrapa Amazônia Ocidental: Integrando Esforços para o Desenvolvimento da Amazônia. Embrapa Amazônia Ocidental. 2008.
- DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*. n. 7, p. 173-180. 2004.
- DISAI, J. D.; BANAT, J. A. J. Production of biosurfactants their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. *New York*, v. 61. N. 1. p. 47-64, 1997.
- DOMINGO, J. L.; NADAL, M. Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the scientific literature. *Food and Chemical Toxicology*, v.86, p.144–153, 2015.
- ELETOBRAS - Centrais Elétricas Brasileiras S.A. Grupo técnico operacional da região norte – gton. programa mensal de operação dos sistemas isolados. *Relatório técnico*, 2016.
- ELSHAFIE, A.; Alkindi, A. Y.; AL-BUSAIDI, S.; BAKHEIT, C.; ALBAHRY, S. N. Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman. *Marine Pollution Bulletin*, v. 54, p. 1692–1696, 2007.
- EMBRAPA. Donagema, G. K.; Campos, D. V. B.; Calderano, S. B.; Teixeira, W. G.; Viana, J. H. M. *Manual de métodos de análise de solo*. 2ª ed. Rio de Janeiro. 2011.
- EMÍDIO, E. S.; DÓREA, H. S. Comparação entre as extrações ultra-som e soxhlet para determinação de alcanos em sedimentos ambientais. *Scientia plena*, v. 6:(9), p. 1 – 7, 2010.
- EPA – U.S. Environmental Protection Agency. 1986. Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods; Method 8270D – Semivolatile organic compounds by gas chromatography / masspectrometry – CD-ROM Internet. Edition, www.epa.gov/SW-864/main.htm.
- EPA – U.S. Environmental Protection Agency. 2001. EMERGENCY PLANNING AND COMMUNITY RIGHT-TO-KNOW ACT - SECTION 313: Guidance for Reporting Toxic Chemicals: Polycyclic Aromatic Compounds Category – Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/documents/2001pacs.pdf>. Acessado em: 28/09/2016.
- EPA – U.S. 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.
- FAJARDO, J. D. V.; SOUZA, L. A. G.; ALFAIA, S. S. Características químicas de solos de várzeas sob diferentes sistemas de uso da terra, na calha dos rios baixo Solimões e médio Amazonas. *Acta amazônica*. vol. 39:(4). p. 731 – 740, 2009.
- FERREIRA, V. R. Otimização de protocolo analítico para extração e Fracionamento de hidrocarbonetos alifáticos e Aromáticos em sedimentos. 2010. Dissertação de mestrado. Universidade federal do Paraná.

- GARCIA, M.; RÖMBKE, J.; GARCIA, T.; MARTINS, G.; TEIXEIRA, W. Métodos para avaliação da toxicidade de hidrocarbonetos de petróleo em solos tropicais. In: Congresso Nacional de Piatam, 1., 2005, Manaus. Ambiente, homem, gás e petróleo: anais. Manaus: Universidade Federal do Amazonas: Centro de Pesquisas da Petrobrás, p. 108. 2005.
- GHEVARIYA, S. M.; BHATT, J. K.; DAVE, B. P. Enhanced chrysene degradation by halotolerant *Achromobacter xylosoxidans* using Response Surface Methodology. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 9668 – 9674, 2011.
- GILLER, K.E., WITTER, E., MCGRATH, S.P. Toxicity of heavy metals to micro-organisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biol. Biochem.* 30, p. 1389–1414. 1998.
- GOMES, A. P. Biodegradação de biodiesel soja, mamona e hidrocarbonetos monoaromáticos em ambientes aquáticos. 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental.
- GOURION, B.; BERRABAH, F.; RATET, P.; STACEY, G. Rhizobium–legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends in plant science*, v. 20, n. 3, p. 186-194, 2015.
- GUERIN, T. F. The extraction of aged polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) residues from a clay soil using sonication and a Soxhlet procedure: a comparative study. *J. Environ. Monit.*, v. 1, p. 63–67, 1998.
- GUIMARÃES, E. F.; REGO, E. C. P.; CUNHA, H. C. M.; RODRIGUES, J. M.; VILLAR, J. D. F.; CUNHA, V. S. C. Validação de metodologia analítica para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em soluções. *Produto e Produção*, v. 11:(1), p. 113 – 123, 2010.
- GUIMARÃES, S. T.; LIMA, H. N.; TEXEIRA, W. G.; JUNIOR, A. F. N.; SILVA, F. W.; MACEDO, R. S.; SOUZA, K. W. Caracterização e classificação de gleissolos da várzea do rio Solimões (Manacapuru e Iranduba), Amazonas, Brasil. *R. Bras. Ci. Solo.* v. 37, p. 317 – 326. 2013.
- GUO, C.; KE, L.; DANG, Z.; TAM, N. F. Temporal changes in *Sphingomonas* and *Mycobacterium* populations in mangrove sediments contaminated with different concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Marine Pollution Bulletin*, v. 62, p. 133–139, 2011.
- HARA, F.A. S.; OLIVEIRA L. A. . Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.40, n.7, p.667-672, jul. 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.
- HEAD, I. M.; JONES, D. M.; LARTER, S. R. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature*. n. 20, v.426, p. 344-52. 2003.
- HEIDER, J.; FUCHS, G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *European Journal of Biochemistry*, n. 243, p. 577-596. 1997.
- 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.
- JOHNSON, D. L.; ANDERSON, D. R.; MCGRATH, S. P. Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 37, n. 12, p. 2334-2336, 2005.

- JOHNSON, D. L.; MAGUIRE, K. L.; ANDERSON, D. R.; MCGRATHA, S.P. Enhanced dissipation of chrysene in planted soil: the impact of a rhizobial inoculum. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 36, n. 1, p. 33-38, 2003.
- KAKSONEN, A. H.; JUSSILA, M. M.; LINDSTRO, K.; SUOMINEN, L. Rhizosphere effect of *Galega orientalis* in oil-contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 38, n. 4, p. 817-827, 2005.
- 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.
- KONG, L.; GAO, Y.; ZHOU, Q.; Zhao, X.; Sun, Z. Biochar accelerates PAHs biodegradation in petroleum-polluted soil by biostimulation strategy. *Journal of Hazardous Materials*, v. 343, p. 276 – 284, 2018.
- KRÜGER, O.; KALBE, U.; MEIBNER, K. Sebastian Sobottka. Sorption effects interfering with the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in aqueous samples. *Talanta*, v. 122, p. 151 – 156, 2014.
- LEE, L.S., HAGWALL, M., DELFINO, J.J., RAO, P.S.C. Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from diesel fuel into water. *Environmental Science & Technology*, v. 26(11). p. 2104- 2110, 1992.
- LEI nº 13.263, de 23 de março de 2016. Presidência da República Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional.
- LEMO, J. L. S.; OLIVEIRA, S. D.; BARROS, C. A.; REICHE, A. P. Fungos Filamentosos: Agentes de Degradação de Petróleo e de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs), Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 58p. 2008.
- LIMA, H. N.; MELLO, J. W. V.; SCHAEFER, C. E.; KER, J. C. Dinâmica da mobilização de elementos em solos da Amazônia submetidos à inundação. *Acta Amazonica*. v. 35:(3). p.317 – 330. 2005.
- LIU, P. W. G.; CHANG, T. C.; WHANG, L. M.; KAO, C. H.; PAN, P.T.; CHENG, S. S. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 65, n. 8, p. 1119-1127, 2011.
- LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. da. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 6, 1596-1608, 2009.
- LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. *Química nova*. n. 19. v. 5. p. 497 – 515. 1996.
- LÜCHMANN, K. H.; MATTOS, J. J.; SIEBERT, M. N.; GRANUCCI, N.; DORRINGTON, T. S.; BÍCEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; SASAKI, S. T.; DAURA-JORGE, F. G.; BAINY, A. C. D. Biochemical biomarkers and hydrocarbons concentrations in the mangrove oyster *Crassostrea brasiliana* following exposure to diesel fuel water-accommodated fraction. *Aquatic Toxicology*, v. 105, p. 652 – 660, 2011.
- MACIAS-ZAMORA, J.V. Distribution of hydrocarbon in recent marine sedimentsoff the coast of Baja California. *Environmental Pollution*, v. 92:(1). p.45–53, 1996.
- 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.
- MAIOLI, O.L.G.; RODRIGUES, K.C.; KNOPPERS, B.A.; AZEVEDO, D.A. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbon in surface sediments from two

- Brazilian Estuarine Systems. *Journal of Brazilian Chemical Society*, v. 21:(8). p.1543–1551, 2010.
- MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 87-93, 2001.
- MANSOURI, A.; ABBES, C.; LANDOULSI, A. Combined intervention of static magnetic field and growth rate of *Microbacterium maritypicum* CB7 for Benzo(a)Pyrene biodegradation. *Microbial Pathogenesis*, v. 113, p. 40–44, 2017.
- MARCHAND, C.; ST-ARNAUD, M.; HOGLAND, W.; BELL, T. H. HIJRI, M. Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 116, p. 48 -57, 2017.
- MARTÍNEZ-ALVAREZ, L. M.; LO BALBO, A. ; MAC CORMACK, W. P.; RUBERTO, L. A. M. Bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated Antarctic soil: optimization of a biostimulation strategy using response-surface methodology (RSM). *Cold Reg. Sci. Technol.* v. 119, p. 61 – 67, 2015.
- MARCHI, G. O que é qualidade do solo? *EMBRAPA* (2008). Disponível em: www.agrosoft.org.br/pdf.php/?node=101400. Acessado em 24/06/2008.
- MATSUURA, A. B. J.; Produção e caracterização de biossurfactantes visando a aplicação industrial e em processos de biorremediação. 2004. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.
- MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Bioavailability and toxicity of contaminant mixtures to soil biota. *Developments in Soil Science*, v. 32, p. 233-243, 2008.
- MIELNICZUCK, J. Matéria orgânica e a sustentabilidade de sistemas agrícolas. In: SANTOS, G.A.; CAMARGO, F.A.O (Eds.). *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Gênese, p.1-6. 1999.
- MOURA, G.C.D.; Efeitos da Adição de Nutrientes nos Solos Contaminados por petróleo no processo de biorremediação. 2012. Dissertação (Programa de pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas.
- NETO, A. D. P.; MOREIRA, J. C. M.; 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 (6). p. 765-773, 2000.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química nova*, v. 25:(5). p. 772-776, 2002.
- OLIVEIRA, V. M., MANFIO, G.P. Molecular approaches for the screening of novel enzymes. *Enzyme Assays: High-throughput screening, genetic selection and fingerpriniting*. p. 221-238, 2006.
- OLIVEIRA, T. C. S. Caracterização de marcadores moleculares e uso de diferentes proxis para estudo do registro de combustão em sedimento na Amazônia Central (Coari – Manaus). 2007. Tese de doutorado, Programa de pós-graduação em química, PUC, Rio de Janeiro.
- OLIVEIRA, T. C. S.; WAGENER, A. L. R. ; SCOFIELD, A. L. . Molecular Markers and Trace-Metals as Proxis of Biomass Combustion in Central Amazon Sediments. In: Goldschmidt Conference Cologne, 2007, Cologne. Awards Ceremony Speeches and Abstracts of the 17th Annual V. M. Goldschmidt Conference Cologne, v. 71. p. A727-A746, 2007a. Disponível em: https://goldschmidt.info/2007/abstract_volume.pdf
- OLIVEIRA, T. C. S.; WAGENER, A. L. R. ; SCOFIELD, A. L. . Investigação da presença de marcadores geoquímicos em sedimento de lagos de várzea, Amazônia Central.. In: XI Congresso Brasileiro de Geoquímica - Ano Internacional do Planeta Terra, Atibaia -

- SP. XI Congresso Brasileiro de Geoquímica - Ano Internacional do Planeta Terra, 2007b. Disponível em: <http://www.sbgq.org.br/phocadownload/XI/424.pdf>
- ORTEGA-CALVO, J.J.; TEJEDA-AGREDANO, M.C.; JIMENEZ-SANCHEZ, C.; CONGIU, E.; SUNGTHONG, R.; NIQUI-ARROYO, J.L.; CANTOS, M. Is it possible to increase bioavailability but not environmental risk o PAHs in bioremediation? *Journal of Hazardous Materials*, v. 261, p. 733– 745, 2013.
- PETERS, K. E.; WALTERS, C. C.; MOLDOWAN, J. M. The biomarker guide. v. 1. 471p. 2005a.
- PETERS, K. E.; WALTERS, C. C.; MOLDOWAN, J. M. The biomarker guide. v. 2. 471p. 2005b.
- PETROBRAS (2012) Disponível em: <http://www.br.com.br/wps/portal/portalconteudo/produtos/paralocomotivas/oleodiesel>. Acessado em: 13/09/16.
- PRINCE, R.C. Petroleum Spill Bioremediation in Marine Environments. *Critical Reviews Microbiology*, v.19. 217-242, 1996.
- QIN, W.; FAN, F.; ZHU, Y.; HUANGA, X.; DINGA, A.; LIU, X.; DOUA, J. Anaerobic biodegradation of benzo(a)pyrene by a novel Cellulosimicrobium cellulans CWS2 isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, article in press, 2017.
- REBOLÇAS, C.A.M.; PORTELA, J. C.; SOBRINHO, F. E.; CAVALCANTE, J. S. J.; SILVA, M. L. N.; GODIM, J. E. F. Caracterização física, química e morfológica do solo em várzea do município de Florânia, RN. *ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido*, v. 10, n. 1, p. 134-142, 2014.
- ROANE, T.M., JOSEPHSON, K.L., PEPPER, I.L. Microbial cadmium detoxification allows remediation of co-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3208–3215. 2001.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactantes. *Environmental microbiology*, v. 3, n. 4. P. 229-236. 2001.
- ROSATO, Y. B. *Biodegradação do Petróleo*. In MELO, I. S.; AZEVEDO, J.L. *Microbiologia ambiental. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA*. 440 p. 1997.
- SAMANTA, S. K.; SINGH, O. V.; JAIN, R. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology*. v.20:(6). p. 243 – 248. 2002.
- SANTOS, J. J.; MARANHO, L. T. Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: A review. *Journal of Environmental Management*, v. 210, p.104 – 113, 2018.
- SEO, J.; KEYN, Y & LI, Q.X. Bact Aromatic Compounds. *International Journ Research and Public health*, v.6, p. 278-309. 2009.
- 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.
- SOARES, A. L. D. L., FERREIRA, P. A. A., PEREIRA, J. P. A. R., VALE, H. M. M. D., LIMA, A. S., ANDRADE, M. J. B. D., & MOREIRA, F. M. D. S. Eficiência Agronômica de Rizóbios selecionados e diversidade de Populações Nativas Nodulíferas Em Perdões (Mg). II–Feijoeiro. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 30, n. 5, p. 803-811, 2006.
- SOCLO, H. H. Etude de la distribution des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les sediments recents. Identification des sources. 1989. PhD Thesis, University Bordeaux I, Bordeaux, France.

- SOCLO, H.H., GARRIGUES, P., EWALD, M. Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Mar.Pollut. Bull.* v.40:(5), p. 387–396, 2000.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. Methods in legume-Rhizobium technology. NifTAL Project and MIRCEN, Hawaii, 365p. 1985.
- SOUZA, A. C. B. Ambiente e vida regional ritmado pela várzea no complexo Solimões - Amazonas. *Revista Geonorte*, v. 2, 4, p. 91 – 102, 2012.
- SOUZA, R. C. R. Energia renovável e eficiência energética. Relatório técnico ECOGERMA. n. 1. 2014.
- SOUZA, HILTON M. L. ; TANIGUCHI, SATIE ; BÍCEGO, MÁRCIA C. ; OLIVEIRA, LUIZ A. ; OLIVEIRA, TEREZA C. S. ; BARROSO, HILÉIA S. ; ZANOTTO, SANDRA P. . Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Superficial Sediments of the Negro River in the Amazon Region of Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)*, v. 26, p. 1438-1449, 2015.
- STEVENSON, F.J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2. ed. John Willey, New York, USA. 496pp. 1994.
- SUN, G. D., XU, Y., JIN, J. H., ZHONG, Z. P., LIU, Y., LUO, M., & LIU, Z. P. Pilot scale ex-situ bioremediation of heavily PAHs-contaminated soil by indigenous microorganisms and bioaugmentation by a PAHs-degrading and bioemulsifier-producing strain. *Journal of hazardous materials*, v. 233, p. 72-78, 2012.
- SUOMINEN, L.; JUSSILA, M.M. MAKELAINEN, K.; ROMANTSCHUK, M.; LINDSTROM, K. Evaluation of the Galega–Rhizobiumgalegae system for the bioremediation of oil-contaminated soil. *Environmental pollution*, v. 107, n. 2, p. 239-244, 1999.
- 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, p. 21 – 28, 2001.
- SVERDRUP, L. E.; KROGH, P. H.; KJAER, C.; STENERSEN, J. Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), ryegrass (*Lolium perenne*), and mustard (*Sinapsis alba*). *Chemosphere*, v. 53(8). p. 993-1003, 2003.
- 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.
- THOMAS, José Eduardo. *Fundamentos de engenharia de petróleo*. Rio de Janeiro: Interciência, 2001.
- VINCENTE, 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.
- WALTERS, C. C.; MARSHALL, C. P.; FAIRBRIDGE, R. W. Em *Encyclopedia of Geochemistry*; eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: the Netherlands, 1999.
- WANG, S. M.; WANG, B. Z.; JIN, W.B.; CAO, X. D.; BO, T. In-Situ Remediation Technology for Polluted Water in Urban River. *Urban Environ and Urban Ecol.* 21:1 - 4. 2008.

- 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.
- WILCKER, W.; AMELUNG, W.; KRAUSS, M.; MARTINUS, C.; BANDEIRA, A.; GARCIA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) patterns in climatically different ecological zones of Brazil. *Organic geochemistry*, v. 34, p. 1405-1417, 2003.
- WILSON, S. C.; JONES, K. C. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution*, v.81. p. 229-249, 1993.
- XIA, W.; DU, Z.; CUI, Q.; DONG, H.; WANG, F.; HE, P.; TANG, Y. Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas* sp . WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Hazard. Mater.* 276, 489–498. 2014.
- YAKUBU, M. B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African Journal of biotechnology*. n. 6. v. 6. p. 2735 – 2739. 2007.
- 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.
- YUNKER, M.B., MACDONALD, R.W., CRETNEY, W.J., FOWLER, B.R., MCLAUGHLIN, F.A. Alkane, terpene, and polycyclic aromatic hydrocarbon geochemistry of the Mackenzie River and Mackenzie shelf: riverine contributions to Beaufort Sea coastal sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, v. 57. p. 3041-3061, 1993.
- YUNKER, M.B.; MACDONALD, R.W.; VINGARZAN, R.; MITCHELL, R.H.; GOYETTE, D.; SYLVESTRE, S. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem.* v. 33. p.489–515. 2002.
- 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.

ANEXO I

CRITÉRIOS PARA INTERPRETAÇÃO DE ANÁLISE DE SOLO, PARA FINS DE AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE.

Tabela 17. Classificação do teor de pH em solo.

Classificação Agronômica	pH em H ₂ O	Classificação Química	pH em H ₂ O
Muito Baixo	<4,5	Muito Elevada	<4,5
Baixo	4,5 a 5,4	Elevada	4,5 – 5,0
Médio	5,5 a 6,0	Média	5,1 – 6,0
Alto	6,1 a 7,0	Fraca	6,1 – 6,9
Muito Alto	>7,0	Neutra	7,0

Tabela 18. Classificação das concentrações de cátions em solo.

Níveis	Unidade	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	K ⁺
Muito Baixo	cmol _c kg ⁻¹	<0,40	<0,16	<0,20	<0,16
Baixo	cmol _c kg ⁻¹	0,41-1,16	0,16-0,45	0,21-0,50	0,16-0,40
Médio	cmol _c kg ⁻¹	1,17-2,32	0,46-0,90	0,51-1,0	0,41-0,70
Alto	cmol _c kg ⁻¹	2,33-4,06	0,91-1,50	1,01-2,00	0,71-1,20
Muito Alto	cmol _c kg ⁻¹	>4,06	>1,5	>2,00	>1,20

FONTE: MOREIRA *et al.*, 2002.

Tabela 19. Classificação da concentração de fósforo em solo.

Níveis	P (mg kg ⁻¹)
Muito Baixo	<2,8
Baixo	2,8-5,4
Médio	5,5-8,0
Alto	8,1-12,0
Muito Alto	>12,0

FONTE: MOREIRA *et al.*, 2002.

Tabela 20. Classificação das concentrações dos metais Fe, Mn, Zn e Cu em solo.

Classificação	Unidade	Fe	Mn	Zn	Cu
Muito baixo		≤8	≤2	≤0,4	≤0,3
Baixo		9-18	3-5	0,5-0,9	0,4-0,7
Médio	mg kg ⁻¹	19-30	6-8	1,-1,5	0,8-1,2
Bom		31-45	9-12	1,6-2,2	1,3-1,8
Alto		>45	>12	>2,2	>1,8

FONTE: RIBEIRO *et al.*, 1999.

Tabela 21. Classificação da fertilidade do solo em relação às concentrações de M.O. e N.

Classificação	Unidade	Matéria Orgânica (M.O)	Nitrogênio
Muito baixo		$\leq 7,0$	De 0,2 a 0,5
Baixo	$g\ kg^{-1}$	$\leq 7,1 - 20,0$	De 0,5 a 0,7
Médio		20,1 – 40,0	De 0,7 a 1,2
Bom		40,1 – 70,0	De 1,2 a 1,7
Muito bom	$g\ kg^{-1}$	$\geq 70,0$	Acima de 1,7

FONTE: COCHRANE et al., 1989.

ANEXO II

ETAPAS DA ANÁLISE DE HIDROCARBONETO

Amostra seca com Na₂SO₄.

Extração por ultrassom.



Amostras transferidas para balão.



Rotaevaporação das amostras.



Fracionamento e limpeza dos extratos.

Secagem das frações po N₂.

CG – EM
HPA

ANEXO III

Tabela 22. Linearidade das curvas de calibração para quantificação de HPA.

HPA	r ²	Equação da reta	Identificação da curva
Naftaleno	0,9934	$y = 0,1115x - 1,6188$	Curva baixa
Acenaftileno	0,9933	$y = 0,02x - 1,7028$	Curva baixa
Acenafteno	0,9968	$y = 0,038x - 0,9928$	Curva baixa
Fluoreno	0,9961	$y = 0,012x - 1,0745$	Curva baixa
Fenantreno	0,9967	$y = 0,0146x - 0,9827$	Curva baixa
Fenantreno	0,9988	$y = 0,008x + 10,517$	Curva alta
Antraceno	0,9933	$y = 0,0106x - 1,0428$	Curva baixa
Fluoranteno	0,9978	$y = 0,0077x - 0,6872$	Curva baixa
Pireno	0,9850	$y = 0,0196x - 1,0763$	Curva baixa
Benzo(a)antraceno	0,9950	$y = 0,0073x - 0,4806$	Curva baixa
Criseno	0,9987	$y = 0,0127x - 0,7753$	Curva baixa
Criseno	0,9986	$y = 0,0065x - 0,4615$	Curva alta
Benzo(b)Fluoranteno	0,9903	$y = 0,0018x - 0,1539$	Curva baixa
Benzo(k)fluoranteno	0,9830	$y = 0,0125x + 0,4821$	Curva baixa
Benzo(a)pireno	0,9810	$y = 0,0042x + 0,5646$	Curva baixa
Perileno	0,9905	$y = 0,0138x - 0,5284$	Curva baixa
Ideno(1,2,3-cd)pireno	0,9917	$y = 0,0093x - 0,0657$	Curva baixa
Dibenzo(ah)antraceno	0,9862	$y = 0,0147x - 0,5463$	Curva baixa
Benzo(g,h,i)perileno	0,9849	$y = 0,0174x - 0,401$	Curva baixa

Tabela 23. Limite de detecção e quantificação do método.

HPA	LD ng g ⁻¹	LQ ng g ⁻¹
Naftaleno	0,61	17,69
Acenaftileno	1,27	17,68
Acenafteno	1,39	17,86
Fluoreno	0,17	1,08
Fenantreno	0,33	29,87
Antraceno	6,77	47,54
Fluoranteno	4,70	19,83
Pireno	0,13	0,90
Benzo(a)antraceno	5,12	24,75
Criseno	1,11	50,03
Benzo(b)Fluoranteno	4,97	46,21
Benzo(k)fluoranteno	6,44	24,75
Benzo(a)pireno	9,98	46,21
Perileno	2,55	25,00
Ideno(1,2,3-cd)pireno	27,27	54,28
Dibenzo(ah)antraceno	5,12	42,09
Benzo(g,h,i)perileno	17,39	49,42

ANEXO IV

Tabela 24. Concentrações dos HPA determinados nas amostras com experimento com óleo diesel.

	Aceft	Ace	F	Fen	A	Fl	Pi	BaA	CRIS	BbFl	BkFl	BaPi	Pe	Ipi	DahA	BghiPe	ΣHPA
-----ng g ⁻¹ -----																	
INPA R560-T0	Nd	175,39	53,53	607,18	Nd	nd	nd	nd	133,78	nd	Nd	32,17	nd	nd	nd	nd	1002,05
INPA R560-48h	Nd	100,11	39,05	388,84	Nd	nd	nd	nd	108,33	nd	Nd	25,24	nd	nd	nd	nd	661,57
INPA R560-21D	Nd	69,27	36,38	713,62	Nd	nd	nd	nd	148,53	nd	Nd	42,36	nd	nd	nd	nd	1010,15
INPA R631-T0	Nd	189,30	23,75	376,09	Nd	nd	nd	nd	113,35	nd	Nd	28,35	nd	nd	nd	nd	730,85
INPA R631-48h	Nd	23,38	119,78	1311,52	Nd	nd	nd	nd	81,66	nd	Nd	20,03	nd	nd	nd	nd	1556,36
INPA R631-21d	Nd	90,40	23,04	749,88	Nd	nd	nd	nd	251,09	nd	Nd	43,37	nd	nd	nd	nd	1157,77
INPA R557-T0	Nd	62,97	39,69	1292,12	Nd	nd	nd	nd	219,96	nd	Nd	53,97	nd	nd	nd	nd	1668,72
INPA R557-48h	Nd	24,20	10,87	342,41	Nd	nd	nd	nd	78,12	nd	Nd	18,80	nd	nd	nd	nd	474,40
INPA R557-21d	Nd	12,05	5,41	170,43	Nd	nd	nd	nd	38,88	nd	Nd	9,36	nd	nd	nd	nd	236,13
INPA R677-T0	Nd	217,75	118,18	940,99	Nd	nd	nd	nd	222,82	nd	Nd	91,22	nd	nd	nd	nd	1590,95
INPA R677-48h	Nd	72,25	39,33	661,12	Nd	nd	nd	nd	180,87	nd	Nd	29,89	nd	nd	nd	nd	983,46
INPA R677-21d	Nd	36,92	38,53	190,01	Nd	nd	nd	nd	140,51	nd	Nd	29,42	nd	nd	nd	nd	435,40
INPA R674-T0	Nd	30,38	16,26	596,11	Nd	nd	nd	nd	148,74	nd	Nd	23,30	nd	nd	nd	nd	814,79
INPA R674-48h	Nd	55,83	38,11	667,85	Nd	nd	nd	nd	134,76	nd	Nd	36,66	nd	nd	nd	nd	933,22
INPA R674-21D	Nd	128,31	58,39	816,86	Nd	nd	nd	nd	135,46	nd	Nd	27,50	nd	nd	nd	nd	1166,52
Cons-T0	Nd	179,47	66,33	190,13	Nd	nd	nd	nd	190,13	nd	Nd	33,61	nd	nd	nd	nd	659,66
Cons-48h	Nd	49,69	23,56	137,60	Nd	nd	nd	nd	137,60	nd	Nd	35,21	nd	nd	nd	nd	383,66
Cons-21D	Nd	30,61	15,33	89,87	Nd	nd	nd	nd	89,87	nd	Nd	14,40	nd	nd	nd	nd	240,08
Controle 1 -T0	Nd	169,73	62,49	1209,22	Nd	nd	nd	nd	238,69	nd	Nd	71,64	nd	nd	nd	nd	1751,77
Controle 1- 48h	Nd	63,41	38,82	1074,53	Nd	nd	nd	nd	195,84	nd	Nd	50,33	nd	nd	nd	nd	1422,93
Controle1 - 21D	Nd	3,62	24,88	280,28	Nd	nd	nd	nd	33,85	nd	Nd	11,31	nd	nd	nd	nd	353,94
Controle 2-T0	Nd	26,40	20,30	168,69	Nd	nd	nd	nd	27,64	nd	Nd	10,05	nd	nd	nd	nd	253,08
Controle 2 - 48h	Nd	12,70	15,54	351,77	Nd	nd	nd	nd	160,41	nd	Nd	41,66	nd	nd	nd	nd	582,08
Controle2 -21D	Nd	49,94	23,70	481,09	Nd	nd	nd	nd	91,98	nd	Nd	16,50	nd	nd	nd	nd	663,22

nd – não detectado

Tabela 25. Concentrações dos HPA determinados nas amostras com experimento com petróleo.

	Aceft	Ace	F	Fen	A	Fl	Pi	BaA	CRIS	BbFl	BkFl	BaPi	Pe	Ipi	DahA	BghiPe	ΣHPA
-----ng g ⁻¹ -----																	
INPA R560-T0	Nd	118,30	48,33	174,06	Nd	nd	nd	nd	57,61	nd	Nd	29,30	nd	nd	nd	nd	427,42
INPA R560-48h	Nd	87,45	48,55	317,94	Nd	nd	nd	nd	31,66	nd	Nd	21,50	nd	nd	nd	nd	507,10
INPA R560-10D	Nd	94,79	45,90	209,17	Nd	nd	nd	nd	25,82	nd	Nd	18,15	nd	nd	nd	nd	393,83
INPA R560-21D	Nd	7,23	4,56	104,56	Nd	nd	nd	nd	28,19	nd	Nd	24,14	nd	nd	nd	nd	104,69
INPA R631-T0	Nd	23,42	18,50	128,36	Nd	nd	nd	nd	26,75	nd	Nd	13,68	nd	nd	nd	nd	210,71
INPA R631-48h	Nd	48,40	22,94	153,96	Nd	nd	nd	nd	24,91	nd	Nd	42,56	nd	nd	nd	nd	292,76
INPA R631-10D	Nd	9,23	7,26	128,43	Nd	nd	nd	nd	34,49	nd	Nd	2,51	nd	nd	nd	nd	181,91
INPA R631-21D	Nd	42,78	15,01	366,49	Nd	nd	nd	nd	47,17	nd	Nd	17,56	nd	nd	nd	nd	489,01
INPA R557-T0	Nd	65,92	42,99	463,91	Nd	nd	nd	nd	123,54	nd	Nd	28,06	nd	nd	nd	nd	724,42
INPA R557-48h	Nd	12,82	14,49	245,92	Nd	nd	nd	nd	66,32	nd	Nd	15,44	nd	nd	nd	nd	354,98
INPA R557-10D	Nd	26,65	17,35	216,08	Nd	nd	nd	nd	61,44	nd	Nd	10,59	nd	nd	nd	nd	332,11
INPA R557-21D	Nd	5,00	7,35	104,00	Nd	nd	nd	nd	40,74	nd	Nd	10,48	nd	nd	nd	nd	167,57
INPA R674-T0	Nd	52,50	28,07	94,88	Nd	nd	nd	nd	28,50	nd	Nd	8,15	nd	nd	nd	nd	212,10
INPA R674-48h	Nd	43,30	28,23	155,13	Nd	nd	nd	nd	33,07	nd	Nd	12,05	nd	nd	nd	nd	271,79
INPA R674-10D	Nd	43,66	36,62	110,10	Nd	nd	nd	nd	27,05	nd	Nd	11,48	nd	nd	nd	nd	228,90
INPA R674-21D	Nd	7,91	27,07	157,51	Nd	nd	nd	nd	26,58	nd	Nd	6,34	nd	nd	nd	nd	225,41
INPA R677-T0	Nd	80,25	111,44	233,06	Nd	nd	nd	nd	80,14	nd	Nd	81,25	nd	nd	nd	nd	586,14
INPA R677-48h	Nd	75,88	77,65	180,32	Nd	nd	nd	nd	70,57	nd	Nd	50,30	nd	nd	nd	nd	454,72
INPA R677-10D	Nd	74,67	56,42	157,26	Nd	nd	nd	nd	69,44	nd	Nd	15,47	nd	nd	nd	nd	373,26
INPA R677-21D	Nd	55,58	44,89	95,70	Nd	nd	nd	nd	34,57	nd	Nd	12,07	nd	nd	nd	nd	242,81
Cons-T0	Nd	75,86	392,32	392,32	Nd	nd	nd	nd	59,90	nd	Nd	22,03	nd	nd	nd	nd	589,56
Cons-48h	Nd	2,89	118,39	13,06	Nd	nd	nd	nd	90,62	nd	Nd	21,19	nd	nd	nd	nd	240,40
Cons-10D	Nd	6,58	113,06	18,39	Nd	nd	nd	nd	83,13	nd	Nd	18,22	nd	nd	nd	nd	231,67
Cons-21D	Nd	20,80	80,10	80,10	Nd	nd	nd	nd	23,99	nd	Nd	8,39	nd	nd	nd	nd	154,90
Controle 1 -T0	Nd	120,07	100,16	228,72	Nd	nd	nd	nd	287,20	nd	Nd	72,01	nd	nd	nd	nd	808,17
Controle 1- 48h	Nd	119,02	92,36	227,44	Nd	nd	nd	nd	200,16	nd	Nd	74,02	nd	nd	nd	nd	713,00

Controle1 - 10D	Nd	56,03	26,64	169,60	Nd	nd	nd	nd	28,98	nd	Nd	10,43	nd	nd	nd	nd	291,68
Controle1 - 21D	Nd	14,42	9,71	151,97	Nd	nd	nd	nd	35,03	nd	Nd	10,26	nd	nd	nd	nd	221,38
Controle 2-T0	Nd	50,04	24,51	170,30	Nd	nd	nd	nd	40,85	nd	Nd	30,65	nd	nd	nd	nd	316,35
Controle 2 - 48h	Nd	77,01	55,55	266,51	Nd	nd	nd	nd	75,32	nd	Nd	53,30	nd	nd	nd	nd	527,69
Controle2 -10D	Nd	30,16	23,45	106,88	Nd	nd	nd	nd	20,62	nd	Nd	11,35	nd	nd	nd	nd	192,46
Controle2 -21D	Nd	46,44	34,61	453,23	Nd	nd	nd	nd	46,33	nd	Nd	33,85	nd	nd	nd	nd	614,46

nd – não detectado

ANEXO V

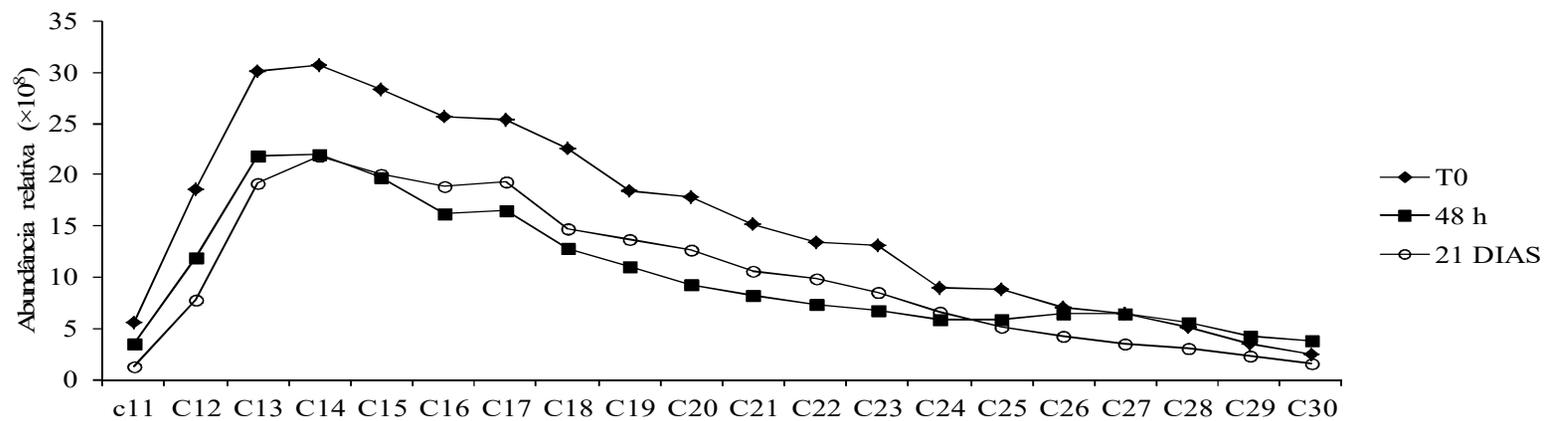


Figura 43. Variação da abundância relativa dos n-alcenos individuais no experimento com óleo diesel para a espécie INPA R560

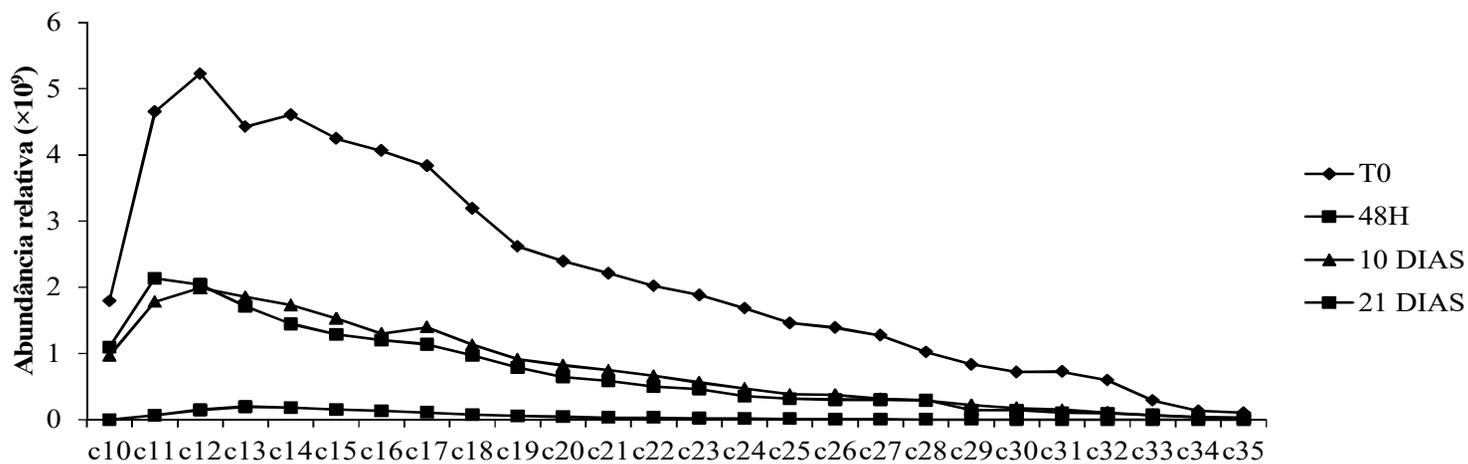


Figura 44. Variação da abundância relativa dos n-alcenos individuais no experimento com petróleo para a espécie INPA R560.