

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE**

**DARCY RIBEIRO**

**Rita Maria Costa Wetler Tonini**

**PROSPECÇÃO E ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE  
BACTÉRIAS COM POTENCIAL PARA A DEGRADAÇÃO DE  
COMPOSTOS DE PETRÓLEO NO SEDIMENTO DE DOIS  
MANGUEZAIS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**Campos dos Goytacazes**

**Dezembro/2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE**

**DARCY RIBEIRO**

**Rita Maria Costa Wetler Tonini**

**PROSPECÇÃO E ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE  
BACTÉRIAS COM POTENCIAL PARA A DEGRADAÇÃO DE  
COMPOSTOS DE PETRÓLEO NO SEDIMENTO DE DOIS  
MANGUEZAIS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para a obtenção do título doutor em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: DSc. Carlos Eduardo de Rezende

Co-orientadora: DSc. Adriana Daudt Grativol

**Campos dos Goytacazes**

**Dezembro/2011**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

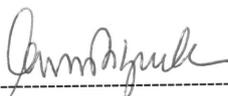
PROSPECÇÃO E ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS COM  
POTENCIAL PARA A DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS DE PETRÓLEO NO  
SEDIMENTO DE DOIS MANGUEZAIS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

RITA MARIA COSTA WETLER TONINI

Tese apresentada à Universidade Estadual do  
Norte Fluminense, como parte das exigências  
para a obtenção do título doutor em Ecologia e  
Recursos Naturais.

Tese aprovada em 19 de dezembro de 2011

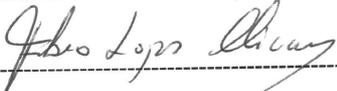
Comissão examinadora:



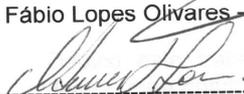
Prof. DSc. Carlos Eduardo de Rezende (Orientador) - UENF



Prof.<sup>a</sup> DSc. Adriana Daudt Grativol (Co-orientadora) - UENF



Prof. DSc. Fábio Lopes Olivares - UENF



Prof.<sup>a</sup> DSc. Valdirene Moreira Gomes - UENF



Prof. DSc. Marcelo Corrêa Bernardes - UFF



Prof.<sup>a</sup> DSc. Cristina Maria Magalhães de Souza (Revisora) - UENF

::

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao Autor da Vida, a Jeová, meu criador, Deus e Pai. Aquele que, com o poder de sua palavra, desenhou e pintou com perfeição o planeta Terra e tudo o que nele há.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela fé, pela capacidade de pensar e de amar todas as obras de sua criação, por me sustentar e guiar todos os meus passos.

Ao meu orientador, DSc. Carlos Eduardo de Rezende por investir no meu trabalho e pelos ensinamentos durante estes quatro anos.

À minha co-orientadora, DSc. Adriana Daudt Grativol pelo apoio e por toda ajuda prestada na execução desta pesquisa.

À UENF, ao PPGERN e ao LCA, pela estrutura fornecida para a realização deste estudo.

À DSc. Cássia Farias e à DSc. Ângela Wagner, do LABMAM - PUC-Rio pela realização das análises de hidrocarbonetos.

Ao DSc. Fabiano Thompson, do Laboratório de Microbiologia – UFRJ, por disponibilizar seu laboratório para as análises moleculares.

À FAPERJ, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao INCT-TMCOcean pelo suporte financeiro que proporcionou a execução deste projeto.

Aos professores do PPGERN, pelo conhecimento transmitido neste curso de doutorado.

À professora DSc. Cristina Maria Magalhães pela contribuição com suas sugestões na revisão da tese.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite para avaliar este trabalho.

Ao professor DSc. Fábio Olivares, pelo tempo dedicado em me auxiliar nas análises e discussão dos dados desta pesquisa.

Ao professor DSc. Carlos Gatts, pelo auxílio nas análises estatísticas dos dados físico-químicos e moleculares.

Aos amigos, professores da UESC, DSc. Bianca Mendes Maciel, DSc. Rachel Passos Rezende, DSc. João Carlos Teixeira Dias; e da Universidad Del Turabo, DSc. Sharon Cantrell, pela imensa ajuda nas análises dos dados microbiológicos e moleculares e pelas palavras de apoio e incentivo.

À minha amiga Albany Agues Marchetti, pelo auxílio nas análises moleculares, pelas orações, conversas e risadas.

Às amigas, alunas de IC do LCA, Aryane Barcelos Maciel, Aline Dias Silva e Caroline Ramos Medeiros, pela dedicação às análises microbiológicas, pelo carinho e por todos os momentos que compartilhamos.

Aos amigos do LCA, Elaine Bernini, Marcos Salomão, Beatriz Araújo, Thiago Rangel, Marianna Louro, Andréia Magro, Eliliane Vasconcelos, Bruna Guedes, Lucas Freitas, Lígia Ribas, Jomar Marques, Bianca Torres, Róger Carvalho, Frederico Brito, Frederico Machado, Bruno Esteves, Dani Awabdi, Vanessa Trindade, Marcelo Maciel, Renato Gobo, e muitos outros, que auxiliaram em análises, deram dicas, tiraram dúvidas, e me apoiaram em todos os momentos.

Aos técnicos e funcionários da UENF, Cristiano Peixoto, Marcelo Almeida, Edilma Muniz, Gerusa Monteiro, Arizoli Gobo, Ana Paula, Alcemir, Sr. Antônio, Ivanilton, Gérson, Elmo, e tantos outros, que ajudaram em análises, coletas, preparo de reagentes, etc., tornando possível a realização deste trabalho.

William Tonini, meu marido, meu grande amor e meu melhor amigo, pelo suporte emocional, pela parceria, carinho, estímulo e pela compreensão com a minha distância em vários momentos do curso de doutorado.

Aos meus pais, Admir e Selda Wetler, pelas noites perdidas desde a minha infância e por renunciarem muitos dos seus sonhos para realizarem os meus. Obrigada por sua visão de águia, quando, aos 14 anos de idade, me estimularam a estudar em outra cidade para entrar em uma boa faculdade. Obrigada por me ensinarem a voar, pelas madrugadas em oração, pelo ombro amigo, pelos ouvidos atentos e pelo amor incondicional.

Aos meus irmãos, Admir Júnior, Henrique e Bruno, por se fazerem presentes, mesmo a uma enorme distância, trazendo sempre palavras de carinho.

À minha cunhada, Thereza Raquel Teles Tonini, pela amizade e companhia durante a redação da tese.

Ao meu avô, Eurico Genésio Wetler (*in memoriam*) e à minha avó, Rita Zonzini Wetler, por me acolherem em sua casa durante o ensino médio, possibilitando o início de tudo.

Agradeço a todos aqueles que, de uma forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.*

*E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.*

*E ainda que distribuisse toda a minha fortuna para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria.*

*O amor é sofredor, é benígnos; o amor não é invejoso; o amor não trata com leviandade, não se ensoberbece.*

*Não se porta com indecência, não busca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal;*

*Não folga com a injustiça, mas folga com a verdade;*

*Tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.*

*O amor nunca falha.”*

*Paulo de Tarso*

*Primeira Carta aos Coríntios*

*Cap. 13, V.1-8*

# SUMÁRIO

	Pág
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	ix
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	xiii
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	xv
<b>RESUMO.....</b>	xviii
<b>ABSTRACT.....</b>	Xix
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	10
2.1 Artigo publicado pela revista Oecologia Australis - Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão....	10
2.2 Artigo publicado pela Revista Virtual de Química - Biodegradação de compostos do petróleo e métodos de identificação de bactérias degradadoras.....	31
<b>3 HIPÓTESES.....</b>	51
3.1 Hipótese 1.....	51
3.2 Hipótese 2.....	51
3.3 Hipótese 3.....	51
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	52
4.1 Objetivo Geral.....	52
4.2 Objetivos Específicos.....	52
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	53
5.1 Área de Estudo.....	53
5.1.1 Baía de Guanabara.....	53

5.1.2	Gargaú.....	55
5.2	Coleta das amostras.....	57
5.3	Análises Físico-Químicas.....	58
5.4	Contagem e seleção de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de petróleo.....	60
5.5	Avaliação da produção de biossurfactantes.....	60
5.6	Análise da diversidade bacteriana.....	61
5.7	Análises estatísticas.....	63
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>65</b>
6.1	Aspectos físicos e químicos.....	65
6.2	Contagens de bactérias heterotróficas totais.....	84
6.3	Contagens de bactérias degradadoras de petróleo.....	89
6.4	Avaliação da produção de biossurfactantes.....	96
6.5	Análise de diversidade bacteriana com base na técnica de T-RFLP	101
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>125</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Quantidades de petróleo derramado em acidentes com navios petroleiros, envolvendo mais de 7 toneladas de poluente entre os anos de 1970 a 2010. Fonte: [www.itopf.com](http://www.itopf.com).

Figura 2: Utilização microbiana de compostos aromáticos por via aeróbia e anaeróbia, demonstrando os diferentes aceptores de elétrons na respiração. Figura adaptada de Díaz (2004).

Figura 3: Mapa com a localização da Baía de Guanabara demonstrando os pontos de coleta das amostras de sedimento. Fontes: programa Landsat 2010 e Farias(2006).

Figura 4: Mapa com a localização do manguezal de Gargaú, demonstrando os pontos de coleta das amostras de sedimento. Fontes: programa CBERS 2B 2010 (*China-Brazil Earth Resources Satellite*) e Farias (2006).

Figura 5: Delineamento amostral para cada área de estudo e análises realizadas em cada fração das amostras.

Figura 6: Resultados do teste de colapso da gota: a) resultado negativo; b) resultado positivo; c) resultado positivo com alta produção de biossurfactante.

Figura 7: Modelo esquemático das etapas da técnica de T-RFLP. Fonte: [http://home.postech.ac.kr/~jaai/fig/T-RFLP\\_fig.gif](http://home.postech.ac.kr/~jaai/fig/T-RFLP_fig.gif) (modificada).

Figura 8: Análise de componentes principais para os fatores físico-químicos e contagens de iniciais bactérias heterotróficas totais (HT) e degradadoras de petróleo (DP) das amostras de sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara (BG1 e BG2) e de Gargaú (G1 e G2).

Figura 9: Médias e respectivos desvios-padrão das contagens bacterianas em placas com meio de cultura para heterotróficos totais.

Figura 10: *Box-plots* demonstrando as contagens de bactérias, provenientes do sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú, cultivadas em meio para heterotróficos totais.

Figura 11: Médias e respectivos desvios-padrão das contagens bacterianas em placas com meio seletivo para degradadores de petróleo.

Figura 12: *Box-plots* demonstrando as contagens de bactérias, provenientes do sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú, cultivadas em meio seletivo para bactérias degradadoras de petróleo.

Figura 13: Porcentagem das bactérias degradadoras de petróleo (DP) em relação ao total de bactérias heterotróficas totais (HT) para as amostras de sedimento coletadas nos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú.

Figura 14: Total de morfotipos bacterianos isolados de placas contendo petróleo de petróleo e bactérias com resultado positivo (+) para produção de biossurfactante nas amostras de sedimento coletadas nos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú.

Figura 15: Índices de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ) calculados para as amostras de sedimento coletadas nos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú ao longo do período de incubação com petróleo. a) Amostras BG1 e BG2; b) Amostras G1 e G2.

Figura 16: Índices de dominância de Simpson ( $D_s$ ) calculados para as amostras de sedimento coletadas nos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú ao longo do período de incubação com petróleo. a) Amostras BG1 e BG2; b) Amostras G1 e G2

Figura 17: Análise de componentes principais dos dados de abundância e diversidade da amostra BG1.

Figura 18: Análise de agrupamento usando o método UPGMA para os dados de diversidade da amostra BG1.

Figura 19: Análise de componentes principais dos dados de abundância e diversidade da amostra BG2.

Figura 20: Análise de agrupamento usando o método UPGMA para os dados de diversidade da amostra BG2.

Figura 21: Análise de componentes principais dos dados de abundância e diversidade da amostra G1.

Figura 22: Análise de agrupamento usando o método UPGMA para os dados de diversidade da amostra G1.

Figura 23: Análise de componentes principais dos dados de abundância e diversidade da amostra G2.

Figura 24: Análise de agrupamento usando o método UPGMA para os dados de diversidade da amostra G2.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhas de pesquisa relacionadas à degradação de petróleo nas instituições de ensino do Brasil.

Tabela 2: Coordenadas dos locais de amostragem em cada um dos manguezais estudados.

Tabela 3: Resultado das análises físico-químicas das amostras de sedimento coletadas nos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú.

Tabela 4: Concentração de HPAs nas amostras de sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú, com valores de referência ( $\text{ng.g}^{-1}$ ).

Tabela 5: Concentrações de HPAs ( $\text{ng.g}^{-1}$  de sedimento seco) analisadas por pesquisadores em diversos estudos.

Tabela 6: Concentração de HPAs padronizados pelo teor de carbono orgânico ( $\text{ng.g}^{-1} \cdot \text{C}_{\text{org}}$ ) nas amostras de sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú e de trabalhos realizados em outros locais por diversos pesquisadores.

Tabela 7: Razões diagnósticas determinantes da origem dos HPAs calculadas para as amostras de sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú.

Tabela 8: Resultados do teste de colapso da gota e número total de colônias isoladas em placas contendo petróleo para as amostras de sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú.

Tabela 9: Exemplos de filotipos bacterianos observados nas amostras de sedimento de manguezal ao longo da sua incubação com petróleo.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A - Antraceno  
ACP – Análise de Componentes Principais  
ANOVA – Análises de variância  
ARDRA - *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*  
ARISA - *automated ribosomal intergenic spacer analysis*)  
BaA - Benzo(a)antraceno  
BghiPe - Benzo(ghi)perileno  
BG1 – Amostra da estação 1 do manguezal da Baía de Guanabara  
BG2 - Amostra da estação 2 do manguezal da Baía de Guanabara  
CBERS - *China-Brazil Earth Resources Satellite*  
Ch - Criseno  
CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear  
C1Ph - C1 fenantrenos  
C1Py - C1 pirenos  
DGGE - *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*  
DNA – *Deoxiribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)  
DP – Degradadores de Petróleo  
D<sub>S</sub> – Índice de Diversidade de Shannon-Weaver  
D<sub>0</sub> – Dia 0 (antes da incubação com petróleo)  
D7 – Dia 7  
D14 – Dia 14  
D21 – Dia 21  
D28 – Dia 28  
D60 – Dia 60  
D90 – Dia 90  
D120 – Dia 120  
D150 – Dia 150  
D157 – Dia 157  
D164 – Dia 164  
D171 – Dia 171  
D178 – Dia 178  
ELISA - Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay

ENB - Efeitos de Nível Baixo  
ENM - Efeitos de Nível Médio  
FI - fluoranteno  
FURB - Universidade Regional de Blumenau  
G1 - Amostra da estação 1 do manguezal de Gargaú  
G2 - Amostra da estação 1 do manguezal de Gargaú  
HAPs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos  
HPAs – Hidrocarbonetos Poliaromáticos  
HT – Heterotróficos Totais  
H' – Índice de Dominância de Simpson  
IFF – Instituto Federal Fluminense  
INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia  
IP - Indeno(1,2,3-cd)pireno  
IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo  
ITOPF - *International Tankers Owners Pollution Federation Limited*  
LABMAM – Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais  
NMP – Número Mais Provável  
NOAA - *National Oceanic and Atmospheric Administration*  
PAHs – *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*  
PAST - *Paleontologic Statistics Software Package for Education*  
PCR – *Polymerase Chain Reaction*  
Ph - Fenantreno  
Py - Pireno  
RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*  
rDNA – DNA ribossomal  
REDUC - Refinaria de Duque de Caxias  
RISA - *Ribosomal Intergenic Space Analysis*  
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio  
SSCP - *Single Strand Conformation Polymorphism*  
TGGE - *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*  
T-RFLP - *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*  
UESB – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
UEL – Universidade Estadual de Londrina  
UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

UERJ - Universidade Estadual do Rio de Janeiro  
UESC - Universidade Estadual de Santa Cruz  
UFAL – Universidade Federal de Alagoas  
UFBA - Universidade Federal da Bahia  
UFC - Universidade Federal do Ceará  
UFCs – Unidades Formadoras de Colônia  
UFES - Universidade Federal do Espírito Santo  
UFG - Universidade Federal de Goiás  
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais  
UFPE - Universidade Federal de Pernambuco  
UFPR - Universidade Federal do Paraná  
UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro  
UFRN - Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
UFS - Universidade Federal de Sergipe  
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina  
UFV - Universidade Federal de Viçosa  
UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas  
UNIT – Universidade Tiradentes  
UPGMA - *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*  
USEPA - *US Environmental Protection Agency*  
USP – Universidade de São Paulo

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de degradação do petróleo e de produção de biossurfactantes, além de demonstrar a dinâmica da comunidade bacteriana do sedimento de dois manguezais, com diferentes características físico-químicas e históricos de contaminação por petroderivados, durante o processo degradativo do óleo *in vitro*. Duas amostras de cada manguezal foram analisadas quanto à quantidade de HPAs, salinidade, pH, granulometria e teores de C<sub>org</sub> e N. As amostras foram incubadas com 2% de petróleo submetidas à contagem de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de petróleo a cada 7 dias, durante 28 dias e, novamente, após a degradação visual do poluente, aos 150 dias, até 178 dias de experimento. Alíquotas do sedimento foram obtidas nos dias 0 (antes da inserção do petróleo), 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120 e 150 para avaliação da diversidade bacteriana pela técnica de T-RFLP. Após a adição do contaminante, observou-se um aumento significativo da contagem de bactérias heterotróficas totais, causado pelo crescimento de linhagens degradadoras. A presença do poluente também estimulou o crescimento de bactérias com capacidade de produzir biossurfactantes em todas as amostras analisadas, confirmando a capacidade degradativa das bactérias autóctones. A análise de T-RFLP demonstrou que, antes da incubação com o petróleo, as amostras do manguezal de Gargaú apresentaram maior diversidade bacteriana do que o da Baía de Guanabara. Após 7 dias de experimento, houve redução da diversidade para três das amostras analisadas, enquanto uma delas apresentou aumento da diversidade bacteriana, sugerindo que os fatores ambientais são determinantes para o crescimento bacteriano na presença do petróleo. Foi possível notar a presença de filotipos sensíveis e resistentes à toxicidade do petróleo, possibilitando a seleção de bactérias de interesse biotecnológico, com capacidade de utilizar este poluente como fonte de carbono para o seu crescimento. Não foi possível detectar um padrão quanto à composição de filotipos e mudança da diversidade, no entanto, aparentemente houve um padrão de sucessão de filotipos que se dividiu em fases, que provavelmente, se relacionam ao estado de degradação do petróleo.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the degradation oil ability and production of biosurfactants, and demonstrate the dynamics sediment of bacterial community of two mangroves, with different physicochemical characteristics and historical contamination petroleum contaminants during the oil degradative processe *in vitro*. Two samples from each mangrove were analyzed for the amount of PAHs, salinity, pH, particle size and concentration of organic carbon and N. The samples were incubated with 2% oil, submitted to the count of total heterotrophic bacteria and oil degrading every 7 days during 28 days and again after the visual degradation of the pollutant, at 150 days, until to 178 days of experiment. Aliquots of sediment were taken at day 0 (before insertion of oil), 7, 14, 21, 28, 60, 90, 120 and 150 to assess the bacterial diversity by T-RFLP technique. After the addition of contaminant, there was a significant increase in total heterotrophic bacteria counts caused by the growth of degrading strains. The pollutant presence also stimulated the growth of bacteria capable of producing biosurfactants in all samples analyzed, confirming the degrading capacity of indigenous bacteria. The T-RFLP analysis showed that before incubation with the oil, samples of Gargaú mangrove showed higher bacterial diversity than the Guanabara Bay. After 7 days of experiment, there was a diversity reduction for the three samples, while one, showed an increase in bacterial diversity, suggesting that environmental factors are essential for bacterial growth in the oil presence. Was observed the presence of sensitive and resistant phylotypes to oil toxicity, allowing the selection of bacteria with biotechnological interest, due the ability to use this pollutant as carbon source for growth. Wasn't detect a pattern in phylotypes composition and diversity change, however, apparently there was a pattern on phylotypes succession; wich was divided into phases, which probably relate to the state of oil degradation.

## 1. INTRODUÇÃO

Os acidentes com navios petroleiros são os responsáveis por espalhar milhares de toneladas de compostos tóxicos no mar, causando a poluição de várias praias e manguezais ao longo de todo o mundo. Estes desastres têm sido registrados em um banco de dados criado pela ITOPF (*International Tankers Owners Pollution Federation Limited*). Neste banco estão contidas informações desde a década de 1970, incluindo a data, o local do acidente, sua causa, quantidade de produto derramado, tipo de óleo e o nome do navio. O banco de dados registra atualmente, quase 10 mil acidentes, sendo eles, em cerca de 80% dos casos, acidentes de pequeno porte. A maioria dos acidentes registrados resultou de operações de rotina, que incluem abastecimento, carga e descarga, ocorrendo, normalmente nos portos ou terminais, envolvendo pequenas quantidades de poluente, enquanto quantidades superiores a 700 toneladas de óleo, geralmente estão relacionadas a acidentes causados por colisões e encalhes. Diante dos problemas causados pela poluição, as empresas que trabalham com o transporte de petróleo têm buscado meios para evitar os acidentes, assim, nos últimos 41 anos, a ITOPF tem registrado um decréscimo significativo nos grandes acidentes, segundo os dados disponíveis no site, 55% dos grandes derramamentos foram registrados na década de 1970, caindo para 20% na década seguinte, e para 17% em 1990, enquanto na década de 2000, ocorreram apenas 7% de acidentes de grande porte. O maior acidente registrado ocorreu em 1979, com o navio *Atlantic Express*, que resultou no derramamento de 278 mil toneladas de petróleo no mar. Em segundo lugar, ocorrido em 1991, o acidente com o *ABT Summer* derramou 260 mil toneladas de poluente, e o terceiro acidente envolveu o derrame de 252 mil toneladas de óleo do navio *Castillo de Bellver*, no ano de 1981 (Figura 1)

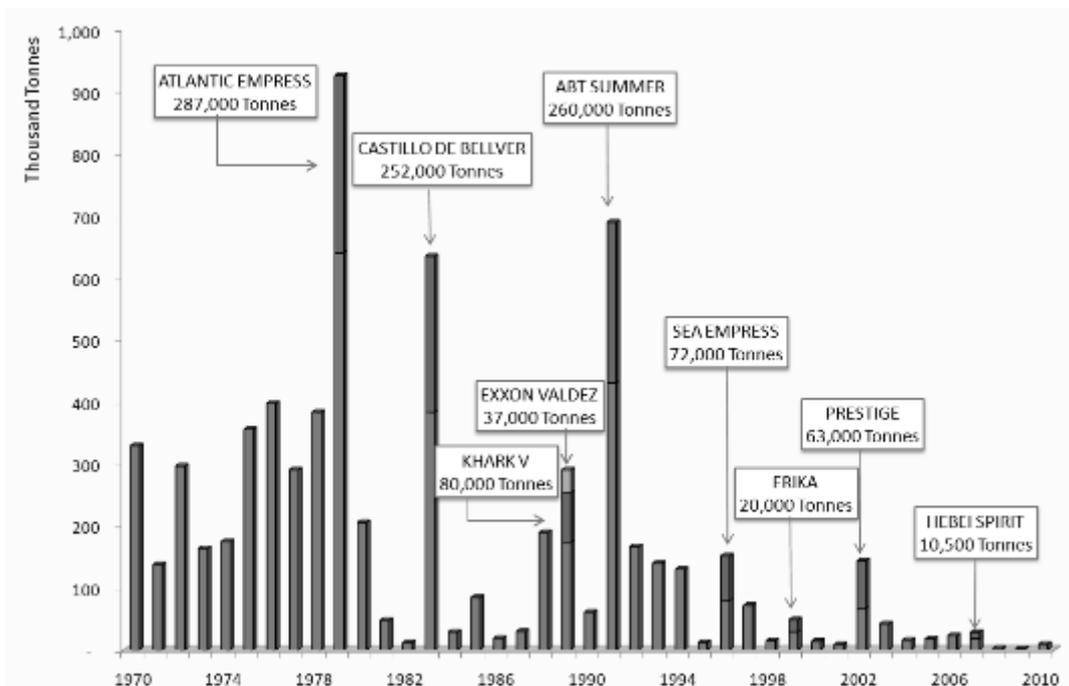


Figura 1: Quantidades de petróleo derramado em acidentes com navios petroleiros, envolvendo mais de 7 toneladas de poluente entre os anos de 1970 a 2010. Fonte: [www.itopf.com](http://www.itopf.com)

Na ocorrência de um acidente com navio petroleiro, ou qualquer outro acidente envolvendo vazamentos em refinarias, oleodutos ou plataformas de exploração de petróleo, a aplicação de técnicas que auxiliem na remoção do poluente são de importância crucial para a recuperação do ambiente afetado. A escolha da estratégia de limpeza irá depender da quantidade de poluente derramado, do seu grau de toxicidade e das características e sensibilidade do ambiente afetado pelo óleo (YU *et al.*, 2005a; KANALY *et al.*, 2000; CHOSSON *et al.*, 1991). Dentre as técnicas usadas para remediação de impactos, podemos citar os processos físicos, como bombeamento e tratamento do contaminante em local apropriado, jateamento de alta pressão para remoção física, contenção com barreiras, uso de absorventes e recolhimento manual do poluente. Outra forma de remediar poluentes do petróleo são os métodos químicos, incluindo o uso de surfactantes e dispersantes a fim de solubilizar e facilitar a degradação do poluente. Por fim, os processos biológicos, envolvem métodos como a e fitorremediação, que envolve o uso de plantas para remediar solos contaminados, e a biorremediação microbiana, em que os microrganismos irão degradar o petróleo derramado no ambiente, em *landfarmings*, laboratórios ou outros tipos de instalações (Jacques *et al.* (2007).

No Brasil, vários grupos de pesquisa entre empresas e universidades têm estudado a poluição por compostos do petróleo em diversos ambientes, que incluem a contaminação da água do mar, águas subterrâneas, costões rochosos, praias arenosas e manguezais. O estado brasileiro com maior número de grupos de pesquisa é o Rio de Janeiro, que possui um total de doze grupos, pertencentes à UERJ, UFRJ, UFRRJ, UENF e IFF; em segundo lugar, o estado de São Paulo, possui seis grupos, distribuídos entre CNEN, UNICAMP, USP e IPT; e em terceiro lugar, ficam empatados os estados da Bahia e Pernambuco, ambos com cinco grupos de pesquisa. Os trabalhos desenvolvidos nas instituições em todo o país têm como objetivo conhecer a natureza dos poluentes, sua ação no ambiente depois de um derramamento, e o processo de degradação. Além de desenvolver técnicas e produtos que auxiliem no processo de remediação, como o isolamento e caracterização de consórcios e linhagens microbianas degradadoras de hidrocarbonetos, identificação e seleção de organismos produtores de biossurfactantes, estudo do metabolismo e diversidade de bactérias com capacidade degradativa, entre outros. A Tabela 1 apresenta os grupos brasileiros com linhas de pesquisa na área de degradação e biorremediação do petróleo cadastrados no CNPQ.

Tabela 1: Linhas de pesquisa relacionadas à degradação de petróleo nas instituições de ensino do Brasil.

<b>Estado</b>	<b>Instituição</b>	<b>Nome do Grupo</b>	<b>Linhas de Pesquisa</b>
AL	UFAL	Grupo de Qualidade Meio Ambiente e Energia	Biodigestão, Biodegradação e Biorremediação; Tratamento de Efluentes
	UFAL	Grupo de Eletroquímica	Eletroquímica e meio ambiente: utilização de metodologia eletroquímica na destruição e modificação de derivados de petróleo; Empreendedorismo em setores tecnológicos; Emprego da tecnologia eletroquímica no tratamento de esgoto urbano e industrial
AM	INPA	Ecologia, monitoramento e uso sustentável de áreas úmidas – MAUA	Efeitos da ação antrópica e ecotoxicologia sobre as áreas alagáveis amazônicas

Tabela 1 Cont.

Estado	Instituição	Nome do Grupo	Linhas de Pesquisa
BA	UFBA	Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis	Adsorção; Biodiesel; Biossurfactantes; Desenvolvimento de campos de petróleo e gás; Membranas cerâmicas; Microemulsão; Reatores de Membrana.
	UFBA	Remediação de Áreas Impactadas por Petróleo	Biorremediação; Geoquímica do petróleo
	UFBA	Engenharia de sistemas reativos	Eliminação de poluentes químicos em sistemas contaminados; Modelagem, simulação de processos químicos e escoamentos reativos; Transformação da biomassa em bio-óleo
	UESC	Bioenergia e Meio Ambiente	Análise do Ciclo de vida de produtos, sistemas e processos energéticos; Avaliação de impactos ambientais; Biodegradação e bioremediação de petróleo, biodiesel e derivados; Catálise heterogênea; Controle de qualidade de biodiesel; Economia dos recursos naturais e meio ambiente; Energia renovável; Uso de co-produtos da produção de biodiesel para produção de biogás
	UESB	Grupo de Pesquisa em Química Analítica	Química do petróleo
CE	UFC	Transferência de Materiais Continente-Oceano	Caracterização da contaminação advinda do agro-negócio em larga escala e da atividade petrolífera
	UFC	Microbiologia ambiental e do pescado	Bactérias degradadoras de compostos derivados de petróleo
	UFC	Águas Residuárias e Qualidade de Água	Biodegradabilidade anaeróbia dos resíduos oriundos das cadeias produtivas dos biocombustíveis; Produção de biogás a partir de resíduos da agroindústria; Qualidade de Água; Tratamento biológico de águas residuárias de refinarias de petróleo
ES	UFES	Pesquisa & Desenvolvimento em Eletroquímica	Degradação de poluentes orgânicos usando a eletroquímica
GO	UFG	Métodos de extração e separação	Química e Bioquímica de Petróleo e Combustíveis



Tabela 1 Cont.

<b>Estado</b>	<b>Instituição</b>	<b>Nome do Grupo</b>	<b>Linhas de Pesquisa</b>
MG	UFMG	Biotecnologia Ambiental	Biodegradação de fenóis; De-emulsificação de efluentes industriais emulsionados por culturas microbianas; Desenvolvimento de novos produtos a partir da glicerina; Produção de Biossurfactantes por Microrganismos; Prospecção de produtos de leveduras com aplicação na produção de biocombustíveis; Tecnologias para o tratamento biológico de solos contaminados com produtos do petróleo refinado.
	UFMG	Cristalografia de proteínas	Abordagem estrutural para o estudo da estabilidade de proteínas envolvidas em biorremediação do petróleo; Relação estrutura 3D e função de proteínas: Aplicações diretas sobre alvos de interesse biotecnológico
	UFV	Ecologia Microbiana	Biodiversidade e bioindicadores de qualidade ambiental; Biotecnologia aplicada a energias renováveis; Microbiologia do Petróleo
PE	UFPE	Caracterização Molecular de Microrganismos de Interesse Biotecnológico, Médico e de Bioengenharia	Detecção e sequenciamento do gene <i>sfp</i> responsável pela síntese de Sufarctina em <i>Bacillus spp</i>
	UFPE	Engenharia Ambiental e da Qualidade	Qualidade da águas; Avaliação e Tratamento de Contaminantes Emergentes; Construção de sensores e nanosensores; energia de biodiesel e bioalcool; Instrumentação Analítica; Monitoramento Ambiental; Preparação de fotocalisadores nanoparticulados e microparticulados para tratar compostos recalcitrantes; Tratamento de áreas degradadas e compostos recalcitrantes utilizando Processos Oxidativos Avançados.; Utilização de adsorventes naturais; Valorização de resíduos
	UFPE	Investigações em microbiologia aplicada e molecular na saúde e no meio ambiente	Biorremediação de ambientes poluídos por petróleo ou seus derivados
	UFPE	Processos Biotecnológicos	Processos de Biodegradação e Biorremediação; Produção de Bioetanol e Biorrefinarias
	UFPE	Materiais Poliméricos e Caracterização	Polímeros biodegradáveis

Tabela 1 Cont.

<b>Estado</b>	<b>Instituição</b>	<b>Nome do Grupo</b>	<b>Linhas de Pesquisa</b>
PR	UEL	RPE aplicada em materiais e recursos naturais	Monitoramento e remediação de áreas impactadas por derrame de petróleo e derivados; RPE no estudo da estrutura molecular de petróleo, derivados e solos; RPE no estudo de bio-óleo e carvão
	UFPR	Síntese e caracterização de polímeros	Aditivos poliméricos para as indústrias do petróleo e de biocombustíveis; Biodiesel: síntese, caracterização e propriedades. Modificação química de polímeros; Polímeros biodegradáveis: síntese, caracterização e avaliação da degradação; Reciclagem química e mecânica de polímeros; Síntese, caracterização e estudo da relação estrutura-atividade de polímeros para variadas aplicações
	UFPR	Estudos de Emulsões na Indústria Química – EMULTEC	Avaliação de solventes na extração de asfaltenos; Desenvolvimento de correlações entre composição das fases e suas características; Efeito da composição e características da água adicionada nas emulsões; Emulsões e o Biodiesel; Estudo de Emulsões em Alimentos; Estudo sobre inversão de emulsões; Influência dos ácidos naftênicos nas emulsões água/óleo; O efeito dos asfaltenos nas emulsões de Petróleo; Remediação de solos contaminados utilizando surfatantes e biossurfatantes
RJ	UERJ	BioProcess- Biorremediação e Fitorremediação de Solos Contaminados, Tratamento de Efluentes e de Resíduos e Avaliação Ecotoxicológica	Biorremediação e fitorremediação e de solos contaminados; Diagnóstico ambiental e avaliação ecotoxicológica; Ecotecnologias no tratamento de águas residuárias
	UERJ	Grupo de Tecnologia Química e Ambiental	Biodiesel; Catálise; Inventário e neutralização de carbono; Microbiologia aplicada ao meio ambiente; Modelagem Matemática e Simulação Computacional de Processos; Modelagem Molecular; Poluição Atmosférica; Processos Catalíticos Oxidativos; Química do Petróleo; Remediação de solos contaminados com petróleo e derivados; Tecnologias de Tratamento e Controle de Águas e Efluentes Industriais
	UERJ	Caracterização de materiais poliméricos	Avaliação da influência de diferentes óleos extensores nas propriedades de borrachas à base de butadieno e estireno (SBR); Caracterização físico-química de polímeros em solução; Emprego de materiais reciclados na contenção de areia em poços de petróleo; Estudo da degradação térmica de materiais poliméricos

Tabela 1 Cont.

<b>Estado</b>	<b>Instituição</b>	<b>Nome do Grupo</b>	<b>Linhas de Pesquisa</b>
	UFRJ	Geoquímica do Petróleo e Ambiental	Biogeoquímica; Geoquímica do Petróleo; Geoquímica Orgânica Ambiental
	UFRJ	Palinofácies & Fácies Orgânica	Palinofácies & Fácies Orgânica; Petrografia do Carvão; Petrografia Orgânica
	UFRJ	Ecologia Microbiana Molecular	Avaliação da diversidade microbiana como indicador da qualidade do solo através de Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes (DGGE); Bioprospecção da diversidade microbiana de ambientes impactados por ação antrópica; Biorremediação de petróleo; Ecologia Molecular de Microrganismos do solo; Microbiologia e Biotecnologia do Petróleo
	UFRJ	Francisca Pessoa de França	Aproveitamento de resíduo a base de glicerol proveniente da fabricação de biodiesel: produção de biossurfactante; utilização como solvente para polímeros hidrossolúveis; Biodegradação de biodiesel, óleo diesel e BX; Biodegradação de glicerol; Biorremediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos; Biotecnologia para Recuperação Avançada de Petróleo; Manejo e Gestão de Áreas Impactadas; Produção de biopolímeros; Produção de bioprodutos a partir de glicerol; Produção de Biossurfactante; Tratamento de Efluentes Gasosos
	UFRJ	Grupo de biotecnologia aplicada ao setor de petróleo	Aplicação de biossurfactantes na indústria do petróleo; Melhoramento genético de cepas produtoras de biossurfactantes; Produção de biossurfactantes para biorremediação de solos impactados com petróleo
	UFRJ	Tratamento de águas e efluentes industriais	Reúso de Efluentes; Tratamento de Resíduos Industriais; Tratamentos de Águas e Efluentes Industriais
	UFRRJ	Processos e Tecnologia de Polímeros	Biodegradação de misturas poliméricas; Degradação catalítica de polímeros; Polímeros aplicados a indústria de petróleo
	UENF	Biogeoquímica de Ecossistemas Aquáticos	Ecologia e Biogeoquímica de Manguezais; Ecologia molecular
	IFF	Núcleo Multidisciplinar de Pesquisa	Biorremediação de Ambientes Poluídos por Hidrocarbonetos do Petróleo; Caracterização e quantificação de hidrocarbonetos do petróleo
RN	UFRN	Química Analítica e Meio Ambiente	Estudo de materiais anódicos para aplicação em eletroquímica ambiental

Tabela 1 Cont.

<b>Estado</b>	<b>Instituição</b>	<b>Nome do Grupo</b>	<b>Linhas de Pesquisa</b>
SC	UFSC	Biorremediação de resíduos orgânicos perigosos	Biorremediação natural e acelerada de compostos orgânicos tóxicos; Fitorremediação; Gerenciamento ambiental de áreas impactadas por misturas de biocombustíveis e derivados de petróleo; Remediação de aquíferos contaminados por misturas de biocombustíveis e derivados de petróleo
	UFSC	Geoquímica Orgânica e Química Ambiental	Avaliação de contaminantes orgânicos em regiões estuarinas de Santa Catarina; Classificação de resíduos sólidos; Estudo sobre fotodegradação de derivados de petróleo; Origem, degradação e preservação da matéria orgânica na interface continente-oceano.
	FURB	Grupo de Biotransformação e Catálise Enzimática (BIOTRANS)	Aplicação de enzimas em Síntese Orgânica: catálise enantiosseletiva e preparação de biossurfactantes; cinética química e catálise na degradação de compostos orgânicos; Seleção e isolamento de microorganismos de interesse industrial; Tratamento de resíduos industriais por processos biotecnológicos
SE	UNIT	Engenharia de Bioprocessos	Bioprocessos Aplicados ao Meio Ambiente
	UFS	Desenvolvimento e caracterização de materiais	Ciência e engenharia de petróleo
SP	CNEN	Aplicações ambientais da radiação ionizante no tratamento de poluentes orgânicos e no pré-tratamento da biomassa de cana-de-açúcar	Degradação de poluentes orgânicos em efluentes industriais utilizando acelerador de elétrons; Degradação de Poluentes originados de Atividade Petrolífera pelo processo de oxidação avançada por ra Radiação Ionizante
	UNICAMP	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria – CBMAI	Bases de informação sobre diversidade microbiana; Biodiversidade e bioprospecção de fungos; Ecologia microbiana; Metagenômica funcional; Preservação de microrganismos; Sistemática, taxonomia e filogenia de bactérias; Sistemática, taxonomia e filogenia de fungos
	UNICAMP	Microbiologia de Petróleo	Biodegradação de hidrocarbonetos; Caracterização de biomarcadores em amostras de petróleo; Caracterização de comunidades microbianas associadas ao petróleo; Screening de metagenoma em amostras de petróleo; Sistemática e ecologia microbiana
	UNICAMP	Ecologia e Metagenômica Microbiana	Biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo; Caracterização da diversidade microbiana de biomas específicos; Ecologia e metagenômica microbiana; Sistemática de Bactérias

Tabela 1 Cont.

<b>Estado</b>	<b>Instituição</b>	<b>Nome do Grupo</b>	<b>Linhas de Pesquisa</b>
	USP	Grupo de Pesquisa em Química Verde e Ambiental	Degradação de espécies químicas poluentes; Degradação/remediação de espécies poluentes empregando-se processos químicos redutivos; Destoxificação de Poluentes Orgânicos Persistentes; Otimização de Processos Químicos/Refino de Petróleo; Síntese, caracterização e aplicação de novos materiais catalíticos na degradação de espécies poluentes; Toxicologia Ambiental
	IPT	Desenvolvimento e Otimização de Processos Biotecnológicos	Biorremediação de áreas contaminadas com petróleo e seus derivados ou resíduos; Desenvolvimento e otimização de processos biotecnológicos

Este trabalho de tese de doutorado foi desenvolvido no grupo de Biogeoquímica de Ecossistemas Aquáticos, e a pesquisa realizada apresentou como foco o ecossistema de manguezal. Este ambiente foi escolhido devido à sua grande importância ecológica e econômica e pela sua vulnerabilidade a distúrbios antrópicos (Dinesh *et al.*, 2004; Burns *et al.*, 2000). Adicionalmente, os sedimentos de manguezal possuem uma grande quantidade de hidrocarbonetos aromáticos de origem natural, provenientes das folhas e troncos das árvores, e funcionam como acumuladores de hidrocarbonetos do petróleo, propiciando a seleção de bactérias degradadoras destes poluentes e produtoras de biossurfactantes (Cury, 2002), tornando este ecossistema favorável às pesquisas de prospecção de bactérias com capacidade degradativa e estudos sobre diversidade bacteriana diante da poluição por petróleo. Pesquisas envolvendo a biorremediação de petróleo por microrganismos, além da produção de biossurfactantes bacterianos, são de grande interesse, uma vez que podem fornecer novas estratégias de biorremediação para diversos tipos de ambientes, em especial para os ecossistemas de mangue, que são muito sensíveis às técnicas de limpeza físicas e químicas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Artigo publicado pela revista *Oecologia Australis*

#### DEGRADAÇÃO E BIORREMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS DO PETRÓLEO POR BACTÉRIAS: REVISÃO

*Oecologia Australis*

14(4): 1010-1020, Dezembro 2010

doi:10.4257/oeco.2010.1404.11

*Rita Maria Costa Wetler Tonini*<sup>1, \*</sup>, *Carlos Eduardo de Rezende*<sup>1</sup>, *Adriana Daudt Grativol*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Departamento de Biociências e Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Laboratório de Ciências Ambientais, Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil, CEP: 28013-602.

E-mails: micro\_rita@yahoo.com.br, crezende@uenf.br, adgrativol@gmail.com

### RESUMO

O petróleo é um composto orgânico, formado por processos biogeoquímicos, constituído em sua maior parte por uma mistura complexa de hidrocarbonetos. A contaminação ambiental por esta substância e por seus derivados causa grande impacto ecológico e as técnicas para sua remediação têm recebido destaque nas últimas décadas. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) de origem petrogênica estão entre os poluentes de maior persistência, apresentando propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas aos seres humanos. A maior parte dos componentes do petróleo é passível de biodegradação, no entanto, trata-se de um processo lento, podendo levar décadas até a total descontaminação do ambiente. Assim, técnicas de biorremediação tem sido alvo de diversos estudos a fim de acelerar o processo de descontaminação com menor custo e menor dano

ambiental. Neste contexto, bactérias aeróbicas e anaeróbicas têm demonstrado grande potencial para a remediação de poluentes do petróleo, sendo utilizadas com sucesso em diversas técnicas, como atenuação natural, bioaugmentação, bioestimulação, produção de biosurfactantes, entre outras. Este trabalho descreve algumas destas técnicas, bem como as vias aeróbicas e anaeróbicas para o metabolismo de hidrocarbonetos por bactérias e seus fatores intervenientes.

Palavras-chave: HAP; biosurfactante; metabolismo aeróbico; metabolismo anaeróbico; biodegradação

## **ABSTRACT**

### **BACTERIAL DEGRADATION AND BIORREMEDICATION OF PETROLEUM COMPOUNDS: A REVIEW**

Petroleum is an organic compound formed by biogeochemical processes, consisting mostly of a complex mixture of hydrocarbons. Environmental contamination by this substance and its derivatives cause major ecological impact, and techniques for their remediation have been highlighted in recent decades. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from petrogenic origin are among the most persistent pollutants, with toxic, mutagenic and carcinogenic properties to humans. Most components of oil are biodegradable, however, it is a slow process and may take decades until complete environmental decontamination. Thus, bioremediation techniques have been the target of several studies in order to accelerate the decontamination process with less cost and less environmental damage. In this context, aerobic and anaerobic bacteria have shown great remediation potential of oil pollutants, being successfully used in various techniques, such as natural attenuation, bioaugmentation, bioestimulation, biosurfactants production, among others. This review describes some of these bioremediation techniques, as well as aerobic and anaerobic pathways for bacterial hydrocarbons metabolism and factors involved in its activity.

Keywords: PAH; biosurfactant; aerobic metabolism; anaerobic metabolism; biodegradation

## **CARACTERÍSTICAS DO PETRÓLEO E SEUS DERIVADOS**

O petróleo é constituído por uma mistura complexa de hidrocarbonetos (alifáticos ou aromáticos), e em menores quantidades, por compostos não hidrocarbônicos e outros componentes orgânicos, alguns constituintes organometálicos, especialmente complexos de vanádio e níquel. É oleoso, inflamável, menos denso que a água, com cor variando entre negro e castanho escuro e odor característico. Sua composição varia em função da localização geográfica e das condições físicas, químicas e biológicas que o originaram (Crapez *et al.* 2002, Van Hamme *et al.* 2003).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são contaminantes ambientais ubíquos, de origem petrogênica, pirogênica ou biogênica (Widdel & Rabus 2001, Foght 2008, Seo *et al.* 2009). HAPs de origem petrogênica são comprovada ou potencialmente tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos, entrando no ambiente principalmente por deposição atmosférica, escoamento urbano, efluentes municipais, águas residuais de indústrias e derramamentos de óleo (Seo *et al.* 2009, Zhou *et al.* 2009). Assim, a poluição por petróleo 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).

## **BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS DO PETRÓLEO**

A maior parte dos componentes do petróleo (de 60% a 90%) é biodegradável. Entretanto, o restante (de 10% a 40%), em estado bruto ou refinado, é recalcitrante. Mesmo tratando-se de uma porção menor, deve-se ressaltar que isto representa toneladas de poluentes impactando ecossistemas e sendo bioacumulados e biomagnificados na cadeia trófica. O destino destes compostos após um derrame irá depender da interação entre vários fatores, podendo-se destacar a degradação microbiana (Crapez *et al.* 2002).

A presença de hidrocarbonetos em toda a biosfera pode explicar a capacidade de muitas espécies microbianas em utilizar estes compostos como substrato de crescimento, degradando poluentes do petróleo e utilizando-os como

fonte de carbono e energia (Boopathy 2000, Ramsay *et al.* 2000, Widdel & Rabus 2001, Díaz 2004, Mandri & Lin 2007). Para tal, é necessário quebrar ao menos parte da molécula, em um composto mais simples, intermediário na via metabólica (Boopathy 2000, Widdel & Rabus 2001, Van Hamme *et al.* 2003, Díaz 2004, Ferguson *et al.* 2007, Jacques *et al.* 2007, Mandri & Lin, 2007).

Algumas características das bactérias propiciam sua adaptação a várias condições ambientais, como seu crescimento rápido, versatilidade metabólica, plasticidade genética e rápida adaptação a variações do meio. Para sua sobrevivência e crescimento, bactérias necessitam basicamente de energia, carbono e nutrientes (N, P, S, K, Ca, Mg, etc.) (Martins 2004). Várias vias metabólicas de degradação dos HAPs foram identificadas em diferentes bactérias. A quebra de compostos aromáticos pode ser feita aerobicamente ou anaerobicamente, conforme demonstrado na Figura 2 (Dagley 1975, Bugg & Winfield 1998, Boopathy 2000, Widdel & Rabus 2001, Díaz 2004, Jacques *et al.* 2007).

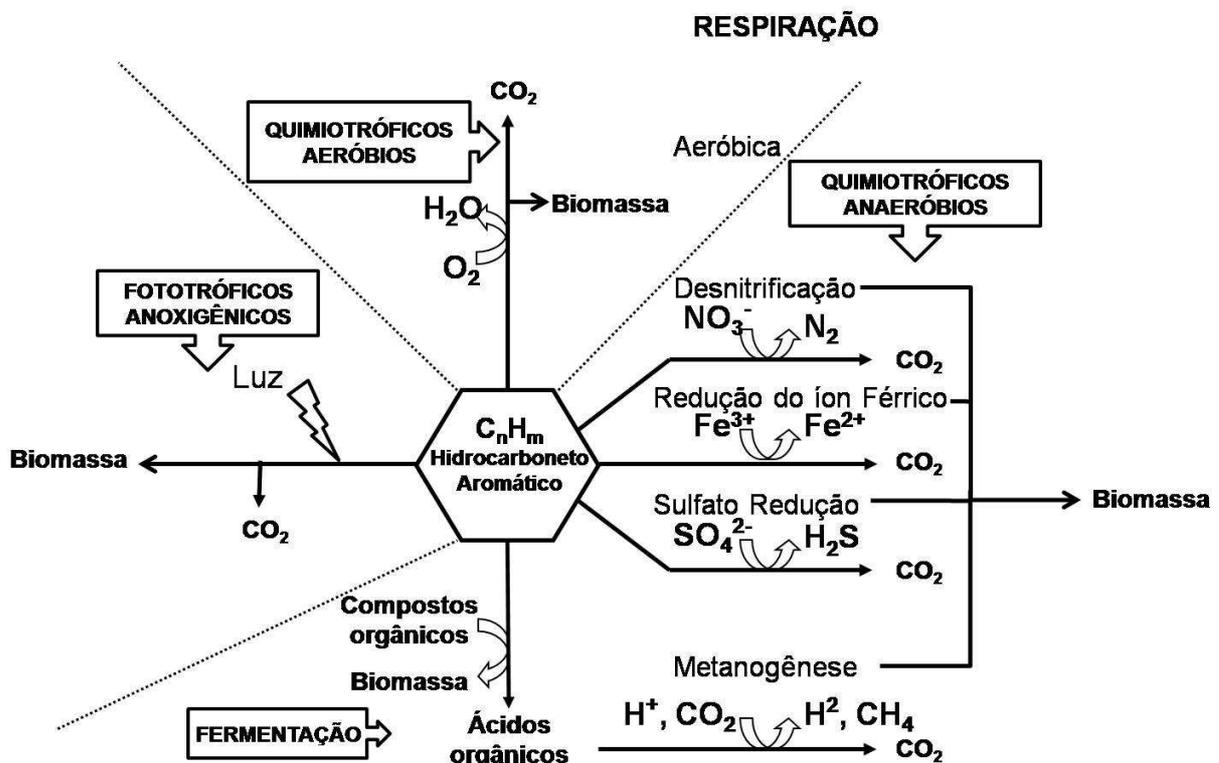


Figura 2- Utilização microbiana de compostos aromáticos por via aeróbia e anaeróbia, demonstrando os diferentes aceptores de elétrons na respiração. Figura adaptada de Díaz (2004).

Nos ambientes naturais, a maior parte da matéria orgânica é mineralizada aerobicamente, porém este processo pode ocorrer também na ausência de oxigênio (Smith 1990, Hopper 1991). Entretanto, de acordo com Díaz (2004), a degradação microbiana do petróleo e seus produtos refinados é muito mais rápida em condições aeróbicas do que em anaeróbicas.

A susceptibilidade dos componentes do petróleo à biodegradação varia de acordo com a concentração do poluente e com o tamanho da molécula do hidrocarboneto (Chosson *et al.* 1991). Geralmente, um aumento no número de anéis aumenta a estabilidade química e a hidrofobicidade da molécula de HAP, tornando-o menos susceptível à biodegradação (Kanaly *et al.* 2000, Yu *et al.* 2005b). A solubilidade dos HAPs em água é, geralmente, baixa e decresce quando o peso molecular aumenta. Compostos de alto peso molecular são, então, considerados recalcitrantes (Seo *et al.* 2009, Zhou *et al.* 2009).

A característica comum de todas as frações do petróleo é a sua baixa solubilidade em água, dificultando a ação microbiana em degradá-los (Kanaly *et al.* 2000, Yu *et al.* 2005a, Cameotra & Singh 2009, Seo *et al.* 2009). O primeiro passo da degradação microbiana consiste em obter melhor contato da superfície celular com o óleo e então, o transporte através da membrana celular. Apesar das muitas pesquisas nesta área, o mecanismo de transporte e assimilação do óleo dentro das células bacterianas ainda não é totalmente conhecido (Cameotra & Singh 2009). A aplicação de surfactantes pode aumentar a disponibilidade dos HAPs aos microrganismos degradadores, auxiliando na solubilização do poluente (Ganeshlingam *et al.* 1994, Ron e Rosenberg 2001, Mariano *et al.* 2007, Cameotra & Singh 2009, Seo *et al.* 2009).

## **SURFACTANTES E SUA AÇÃO NA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS DO PETRÓLEO**

Surfactantes são moléculas anfipáticas, que podem ser obtidos por processos químicos (sintéticos), ou produzidos por microrganismos (biossurfactantes) (Mulligan *et al.* 2001, Colla & Costa 2003). Surfactantes sintéticos têm sido utilizados na indústria do petróleo, ajudando na limpeza de derramamentos e na recuperação de petróleo em reservatórios. Entretanto, estes produtos podem ser tóxicos ao

ambiente e não são biodegradáveis. Por outro lado, os biossurfactantes apresentam vantagens como baixa toxicidade, natureza biodegradável e eficácia em amplas variações de temperatura, pH e salinidade, além da facilidade de síntese (Tabatabaee *et al.* 2005).

Os biossurfactantes são metabólitos produzidos por uma grande variedade de bactérias, leveduras e fungos filamentosos e possuem características de detergência, emulsificação, solubilização, diminuição da tensão superficial e interfacial e dispersão de fases ( Desai & Banat 1997, Maniasso 2001, Ron & Rosenberg 2001, Nitschke & Pastore, 2002, Colla & Costa 2003, Yakubu 2007). Estes produtos alteram a hidrofobicidade e aumentam a dispersão de compostos imiscíveis em água, aumentando a degradação microbiana (Ron & Rosenberg 2001, Mariano *et al.* 2007, Seo *et al.* 2009, Cameotra & Singh 2009). A maioria dos biossurfactantes conhecidos é sintetizada por microrganismos cultivados em hidrocarbonetos imiscíveis em água, mas alguns são produzidos em substratos solúveis como glicose, glicerol e etanol (Tabatabaee *et al.* 2005). Eles podem se encontrar como moléculas intracelulares, serem secretados pelas células microbianas ou ficarem aderidos à sua superfície (Ron & Rosenberg 2001, Mariano *et al.* 2007, Cameotra & Singh 2009, Seo *et al.* 2009).

Estudos indicam que a produção de biossurfactantes por bactérias está ligada à alta densidade celular; a presença de biossurfactantes no ambiente desempenha um papel natural, aumentando a degradação de compostos hidrofóbicos, uma vez que aumentam a área superficial das gotas de óleo, permitindo o acesso de mais bactérias ao substrato, otimizando, por conseguinte, a produção de biomassa bacteriana (Mulligan *et al.* 2001, Ron & Rosenberg 2001, Yakubu 2007, Cameotra & Singh 2009).

## **DEGRADAÇÃO BACTERIANA DE HIDROCARBONETOS POR VIA AERÓBICA**

Em bactérias aeróbicas, o oxigênio não é apenas acceptor terminal de elétrons para a conservação da energia respiratória, mas também um reagente indispensável no mecanismo de ativação (Widdel & Rabus 2001). As vias bacterianas de degradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos podem ser geralmente, divididas em três partes: (1) O composto aromático é transformado em um metabólito

intermediário central da via de degradação dos HAPs, normalmente um catecol, através da introdução de grupos hidroxila por enzimas periféricas, com função de reconhecer as moléculas dos HAPs e convertê-las em intermediários centrais (Bugg & Winfield 1998, Kanaly & Harayama 2000, Widdel & Rabus 2001, Scramin *et al.* 2003, Díaz 2004, Jacques *et al.* 2007); (2) 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 & Fuchs 1997, Bugg & Winfield 1998, Kanaly & 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-hidroxi-mucônico e podem ser subdivididas em proximais e distais, para caracterizar a posição da clivagem do anel em relação ao radical (Bugg & Winfield 1998, Kanaly & Harayama 2000, Scramin *et al.* 2003, Díaz 2004, Jacques *et al.* 2007); (3) 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-hidroxi-mucônico, será transformado em ácido pirúvico e acetaldeído (Kanaly & Harayama 2000, Scramin *et al.* 2003, Díaz 2004, Jacques *et al.* 2007).

## **DEGRADAÇÃO BACTERIANA DE HIDROCARBONETOS POR VIA ANAERÓBICA**

A degradação de hidrocarbonetos em condições estritamente anóxicas foi confirmada no final da década de 1980 (Widdel & Rabus 2001, Díaz 2004). Enquanto a biodegradação aeróbica de hidrocarbonetos tem sido bem estudada desde o início do século XX, os registros sobre a biodegradação anaeróbica são relativamente recentes, tratando-se de uma área emergente, que tem sofrido rápidas mudanças (Widdel & Rabus 2001, Meckenstock *et al.* 2004, Foght 2008). Estudos têm mostrado que alguns passos enzimáticos chave na biodegradação de

hidrocarbonetos anaeróbios envolvem microrganismos versáteis e singulares bioquimicamente, ativando hidrocarbonetos por mecanismos novos, que diferem completamente daqueles utilizados no metabolismo aeróbico ( Widdel & Rabus 2001, Foght 2008).

Muitos ambientes poluídos por hidrocarbonetos são anóxicos, como por exemplo, aquíferos, sedimentos aquáticos e solos submersos. Em tais condições, a biodegradação é realizada por microrganismos anaeróbicos estritos ou facultativos, utilizando aceptores de elétrons como o nitrato (desnitrificantes), sulfato redutores, redutores de  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{CO}_2$  (organismos metanogênicos), ou outros aceptores (Mn, Cr, U, etc.) (Widdel & Rabus 2001, Díaz 2004, Chakraborty & Coates 2004, Foght 2008).

Condições metanogênicas e de sulfato redução fornecem pouca energia às bactérias, entretanto, são fundamentais no metabolismo de linhagens fermentativas, pois estas, em geral, não fazem a biodegradação completa dos HAPs, tornando-se energeticamente favoráveis apenas quando microrganismos metanogênicos ou bactérias redutoras de sulfato estão presentes no substrato, a fim de usar os produtos gerados durante a fermentação. Diferentemente, bactérias fotossintéticas obtêm energia da luz e degradam os compostos aromáticos anaerobicamente para formar metabólitos intermediários, como acetil-CoA, que são posteriormente utilizados em reações biossintéticas (Díaz 2004).

O catabolismo anaeróbico de compostos aromáticos pode ser dividido em três fases: (1) Os caminhos periféricos convergem para uma via central, formando um intermediário aromático, normalmente benzoil-CoA (Heider & Fuchs 1997, Chakraborty & Coates 2004, Díaz 2004, Foght 2008); (2) Ocorre a abertura do anel aromático, convertendo o composto em 3-hidroxiipimelil-CoA, que sofre a ação de uma desidrogenase sendo formado predominantemente glutaril-CoA ou, alternativamente, acetil-CoA (Heider & Fuchs 1997); (3) A enzima glutaril-CoA desidrogenase produz crotonil-CoA, e libera  $\text{CO}_2$ . Segue-se então a transformação de crotonil-CoA em Acetil-CoA, que é oxidado, normalmente, via ciclo do ácido cítrico (Heider & Fuchs 1997).

Informações detalhadas sobre a degradação anaeróbia da HAPs são escassas, e há um debate se HAPs com três ou mais anéis podem servir de substrato de crescimento ou se são apenas parcialmente oxidados através de co-metabolismo com outros substratos ( Meckenstock *et al.* 2004, Foght 2008).

Na última década, algumas culturas puras e mistas de anaeróbios foram obtidas, permitindo os primeiros estudos das vias de degradação anaeróbias. Métodos de cultivo de microrganismos anaeróbios com HAPs como única fonte de carbono e energia foram estabelecidos em 2003, porém, mais bactérias precisam ser isoladas e suas vias degradativas estudadas, uma vez que os processos metabólicos se diferenciam entre as linhagens (Meckenstock *et al.* 2004, Foght 2008).

Um importante fator a ser investigado é se a capacidade degradativa dos organismos isolados em laboratório apresenta a mesma eficiência em condições de campo. Assim, técnicas moleculares podem auxiliar na identificação das linhagens ou comunidades microbianas que agem na degradação de HAPs *in situ* (Meckenstock *et al.* 2004, Foght 2008).

## **BIORREMEDIÇÃO MICROBIANA E SUAS VANTAGENS**

O termo biorremediação pode ser definido como um processo que utiliza a biotecnologia na aceleração da transformação dos poluentes em produtos menos tóxicos. Normalmente utiliza-se o metabolismo de microrganismos para eliminação rápida de poluentes, para reduzir sua concentração para níveis aceitáveis, transformá-los em compostos de baixa toxicidade, ou mesmo mineralizá-los completamente (Torsvik *et al.* 1990, Colla & Costa 2003, Mandri & Lin 2007, Yakubu 2007). Os processos de biorremediação baseiam-se nas atividades aeróbicas ou anaeróbicas de microrganismos denominados “petrófilos” (Boopathy 2000, Mandri & Lin 2007). Assim, vários tipos de microrganismos utilizam vias bioquímicas complexas para transformar os hidrocarbonetos em intermediários comuns do seu catabolismo e, a partir daí, em fonte de carbono e energia para seu crescimento (Díaz 2004, Jacques *et al.* 2007, Mandri & Lin 2007, Seo *et al.* 2009).

Vários aspectos da biorremediação a tornam uma opção atraente na degradação de petróleo, demonstrando vantagens sobre outros métodos de tratamento, pois consiste em um processo natural; algumas técnicas podem ser aplicadas *in situ* com perturbação ambiental mínima, sendo muitas vezes mais baratas e mais seguras. Além disso, muitos microrganismos degradam vários poluentes permanentemente, podendo, ainda, ser associados a métodos de

tratamento físicos ou químicos (Boopathy 2000, Mandri & Lin 2007, Yakubu 2007). Nos últimos anos, diversas pesquisas têm indicado que a biorremediação é uma alternativa segura e eficaz de remoção de petróleo do ambiente (Díaz 2004, Yakubu 2007).

## **TÉCNICAS DE BIORREMEDIAÇÃO E RESPECTIVAS APLICAÇÕES**

As estratégias usadas para a biorremediação dos HAPs podem ser divididas entre as técnicas *in situ*, em que não há necessidade de remoção do substrato contaminado, realizando-se a biorremediação no próprio local poluído; e as técnicas *ex situ*, em que é necessário remover o substrato, procedendo-se a biorremediação em instalações apropriadas, fora do local contaminado (Boopathy 2000, Ramsay *et al.* 2000).

A técnica de bioaugmentação consiste na adição de culturas bacterianas com comprovada atividade degradadora dos poluentes a um local, garantindo que o consórcio adequado de microrganismos estará presente em suficientes tipos, número e compatibilidade a fim de metabolizar o poluente de forma eficaz. Esta técnica pode ser utilizada tanto *in situ* quanto *ex situ*; sendo particularmente importante para tratamentos *in situ*, quando não há populações microbianas indígenas capazes de degradar o contaminante (Jorgensen *et al.* 2000, Jacques *et al.* 2007, Mariano *et al.* 2007, Yakubu 2007, Foght 2008).

Outro método que pode ser realizado tanto *in situ* quanto *ex situ* é a bioestimulação. Entretanto, este só é eficaz quando há populações microbianas degradadoras no substrato (Yakubu 2007). A técnica é realizada estimulando-se a microbiota indígena, otimizando suas condições de crescimento por meio da adição de nutrientes orgânicos e inorgânicos, regulação de pH, temperatura e aeração (Jorgensen *et al.* 2000, Ramsay *et al.* 2000, Ebuehi *et al.* 2005, Jacques *et al.* 2007, Mandri & Lin 2007, Mariano *et al.* 2007, Yakubu 2007, Foght 2008).

A biorremediação intrínseca é uma técnica realizada *in situ*, sendo conhecida, também, como atenuação natural ou biorremediação passiva. Nesta técnica, o contaminante permanece no local e a descontaminação ocorre através de processos físicos, químicos e biológicos naturais, como volatilização, diluição, sorção e

biodegradação. Normalmente, ocorre de maneira muito lenta, exigindo o monitoramento do local em longo prazo, visando a proteção da saúde humana e ambiental (Boopathy 2000, Díaz 2004, Jacques *et al.* 2007, Fogh, 2008).

O sistema de *landfarming* é aplicado para o tratamento da fase sólida de solos contaminados e pode ser realizado *in situ* ou *ex situ* (Boopathy 2000). Nesta técnica, os microrganismos da camada superficial do solo são estimulados a degradar os poluentes transformando-os em substâncias inertes como CO<sub>2</sub> e água, por meio do revolvimento do solo e uso de aração, além da adição de nutrientes e, se necessário, de irrigação, bioaugmentação e surfactantes (Doelman & Breedvelk 1999 citado em Jacques *et al.* 2007, Jorgensen *et al.* 2000).

A técnica de *bioventing* ou bioventilação é normalmente utilizada para o tratamento de solos contaminados e baseia-se na introdução de oxigênio no substrato para estimular a atividade dos microrganismos aeróbios, podendo ser aplicada *in situ* ou *ex situ*, de acordo com o local a ser tratado (Boopathy 2000).

A compostagem é outro processo de descontaminação de solos, realizado por microrganismos aeróbios *ex situ*. No emprego desta técnica, o substrato contaminado é removido do local de origem e colocado em pilhas, com ou sem aeração, controlando-se a lixiviação e o escoamento superficial dos líquidos provenientes dessas pilhas (Jorgensen *et al.* 2000, Jacques *et al.* 2007).

Para o tratamento de líquidos ou suspensões *ex situ*, pode-se utilizar biorreatores. Neste método, a biodegradação ocorre em um recipiente ou reator (Boopathy 2000), onde o material contaminado é misturado com água formando uma suspensão, com 5 a 50% de sólidos, que é agitada mecanicamente, aumentando a aeração, a homogeneidade dos poluentes e sua disponibilidade aos microrganismos. Parâmetros físicos e químicos, como pH, disponibilidade de nutrientes, aeração e temperatura são ajustados para a máxima produção de biomassa, sendo possível, ainda, bioaugmentar o substrato. Após a redução dos contaminantes aos níveis desejados, a suspensão é desidratada e a água pode ser reutilizada no biorreator (Doelman & Breedvelk 1999 citado em Jacques *et al.* 2007, Woo & Park 1999, Van Hamme *et al.* 2003). A técnica possui a vantagem de degradar poluentes de maneira muito rápida. Deve-se, entretanto, considerar que quantidade de substrato tratado é limitada pelo tamanho dos biorreatores; em alguns casos, é necessário o pré-tratamento do substrato para remoção de compostos

tóxicos aos microrganismos; além do custo elevado, devido à alta tecnologia empregada. Estes fatores restringem sua aplicação aos casos em que outras técnicas provavelmente não trariam resultados satisfatórios (Woo & Park 1999, Doelman & Breedvelk 1999 citado em Jacques *et al.* 2007, Van Hamme *et al.* 2003).

É possível utilizar biofiltros para realizar o tratamento de poluentes voláteis por meio da utilização de colunas de captação microbiana, evitando que os contaminantes sejam emitidos na atmosfera (Boopathy 2000).

O método conhecido como *pump and treat* é utilizado para o tratamento de águas subterrâneas, consistindo no seu bombeamento para a superfície, procedendo-se a descontaminação *ex situ* e posteriormente, pela reinjeção da água tratada (Boopathy 2000).

Segundo Mulligan *et al.* (2001), a utilização de biossurfactantes em diversos tipos de substrato contaminados proporciona altas taxas de remoção de poluentes. A adição destas substâncias a culturas puras ou em solo tem demonstrado aumentar a biodegradação de vários hidrocarbonetos, acelerando o processo de reparação (Ganeshlingam *et al.* 1994, Cameotra & Singh 2009). Assim, existe uma clara correlação entre produção de biossurfactante e utilização de hidrocarbonetos por microrganismos (Cameotra & Singh 2009). Estes compostos têm demonstrado maior versatilidade do que muitos surfactantes sintéticos, auxiliando na remediação da poluição ambiental por petróleo tanto *in situ* quanto *ex situ* (Mulligan *et al.* 2001, Yakubu 2007).

## **FATORES INTERVENIENTES NA EFICIÊNCIA E APLICABILIDADE DA BIORREMEDIAÇÃO**

A eficiência de cada processo de degradação depende de fatores físicos, químicos e biológicos como a biomassa microbiana, diversidade populacional, atividades enzimáticas, características físico-químicas do substrato, estrutura molecular do poluente e sua concentração. Diversos fatores ambientais que abrangem pH, temperatura, umidade, atividade de água, oxigênio dissolvido, nutrientes, fontes de carbono e energia a disponibilidade de receptores de elétrons, e a presença de co-metabólitos influenciam a utilização de poluentes pelos

microrganismos (Boopathy 2000, Van Hamme *et al.* 2003, Jacques *et al.* 2007, Seo *et al.* 2009).

A umidade é considerada por Haider (1999), o fator ambiental mais crítico na biodegradação, uma vez que uma atividade microbiana elevada ocorre apenas com disponibilidade de água adequada. Entretanto, o teor de água no substrato tem relação inversa com a disponibilidade de oxigênio, ou seja, um alto teor de água, resulta em baixa concentração de O<sub>2</sub>, causando prejuízos diretos à atividade dos microrganismos aeróbios, que são importantes agentes na degradação dos HAPs, (Leahy e Colwell 1990, Jacques *et al.* 2007). No entanto, em condições de hipóxia ou anoxia, as bactérias anaeróbicas ou aeróbicas facultativas se tornam dominantes na comunidade microbiana devido à sua capacidade de usar aceptores de elétrons alternativos em substituição ao oxigênio (Johnsen *et al.* 2005, Cameotra & Singh 2009).

A temperatura é um fator físico que influencia o consumo de substrato pela microbiota, sua atividade metabólica, e por consequência, a biodegradação dos HAPs (Haider 1999). De acordo com Leahy & Colwell (1990), baixas temperaturas limitam a degradação destes poluentes, uma vez que o metabolismo microbiano diminui e a viscosidade dos HAPs aumenta nestas condições. Em contrapartida, em altas temperaturas, a toxicidade destes compostos aumenta. Assim, a degradação dos HAPs é melhorada na faixa de temperatura entre 30°C e 40°C, diminuindo a viscosidade dos compostos e aumentando o metabolismo microbiano.

O pH é um fator químico que afeta diretamente a atividade microbiana, devido aos efeitos dos íons H<sup>+</sup> na permeabilidade celular e na atividade enzimática, e, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade do alumínio e demais metais pesados, que podem ser tóxicos aos microrganismos (Jacques *et al.* 2007).

A presença e o teor de nutrientes inorgânicos exercem influência na atividade da microbiana. Os efeitos da adição de N e P demonstram resultados conflitantes, provavelmente devido às características de cada ambiente em relação aos teores de nutrientes, tipo de contaminante e população microbiana indígena (Leys *et al.* 2005). O ferro e o enxofre são outros nutrientes que podem influenciar na biodegradação de HAPs, pois desempenham funções celulares relacionadas ao seu metabolismo,

como a participação na estrutura das enzimas que realizam sua degradação nas células microbianas (Jacques 2005).

A matéria orgânica consiste na fonte de carbono e energia para os microrganismos, ou seja, um alto teor de matéria orgânica está associado a uma maior abundância e diversidade microbiana. Níveis mais baixos de matéria orgânica, normalmente, relacionam-se com uma menor abundância bacteriana (Boopathy 2000). Em contrapartida, uma grande quantidade de matéria orgânica, está normalmente relacionada a substratos de partículas finas, que propiciam a sorção dos HAPs. Em virtude da baixa solubilidade em água e da forte tendência de sorção dos HAPs às partículas sólidas, sua biodisponibilidade aos microrganismos degradadores é reduzida

A biodegradação pode ainda, ser limitada pela incapacidade dos microrganismos autóctones em metabolizar os poluentes ou por condições ambientais desfavoráveis à sobrevivência e atividade dos microrganismos degradadores (Johnsen *et al.* 2005, Jacques *et al.* 2007). A produção de metabólitos tóxicos, repressão de enzimas, presença de substratos preferenciais, e a falta de substratos indutores podem, também, ser considerados como fatores limitantes ( Boopathy 2000, Van Hamme *et al.* 2003, Jacques *et al.* 2007).

A biorremediação deve ser adaptada às condições locais específicas, havendo necessidade caracterizar o ambiente a ser tratado e de fazer estudos prévios em pequena escala antes da limpeza do local contaminado ( Boopathy 2000, Mariano *et al.* 2007), com a finalidade de esclarecer alguns fatores a se considerar antes de escolher e aplicar uma técnica de biorremediação, dentre os quais, podemos citar: (i) se o contaminante é biodegradável; (ii) se a biodegradação está ocorrendo naturalmente no local contaminado; (iii) se as condições ambientais são adequadas para a biodegradação; (iv) se o poluente não for completamente degradado, qual será o comportamento do material residual (Boopathy 2000).

Alguns dos critérios não-técnicos que afetam a aplicabilidade das técnicas de biorremediação também devem ser considerados, pois a técnica escolhida deve ser capaz de alcançar a limpeza necessária; possuir custo vantajoso em relação a outras opções de remediação; possibilidade de contaminantes residuais após a biorremediação em níveis aceitáveis; percepção pública e regulatória favorável; capacidade de cumprir as limitações de tempo e espaço (Boopathy 2000).

Outros fatores constituem limitações ao uso da biorremediação, como a questão econômica e a responsabilidade ambiental. Clientes e agências reguladoras, normalmente, avaliam a biorremediação de forma rigorosa, uma vez que se trata da aplicação de técnicas inovadoras, há imposição de normas rígidas e exigência de maior desempenho do que para tecnologias convencionais. Assim, o investimento em biorremediação tem sido lento e, por conseguinte, esta atividade em escala comercial ainda fica aquém de outros setores industriais (Boopathy 2000).

## **PRINCIPAIS BACTÉRIAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS DO PETRÓLEO**

Desde a década de 1950, bactérias degradadoras de compostos do petróleo vêm sendo isoladas. Os principais gêneros são *Acidovorans*, *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Beijemickia*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Comomonas*, *Corynebacterium*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Gordonia*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paracoccus*, *Pasteurella*, *Polaromonas*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* e *Vibrio* (Crapez *et al.* 2002, Jacques *et al.* 2007, Mandri & Lin 2007, Seo *et al.* 2009).

A biodegradação do petróleo em ambientes naturais ou em laboratório, não pode ser realizada por uma única espécie microbiana, uma vez que este poluente é constituído por vários tipos de hidrocarbonetos e nenhum microrganismo é capaz de degradar sozinho todos os compostos ali presentes. A complexidade dos processos metabólicos necessários a essa degradação leva à formação de consórcios, com microrganismos de diferentes gêneros e espécies, cada um especializado em degradar uma ou várias frações do óleo (Crapez *et al.* 2002, Tiburtius *et al.* 2004, Jacques *et al.* 2007).

Nos últimos anos, diversas pesquisas começaram a se voltar ao estudo de tais consórcios, que têm demonstrado maior eficiência do que as culturas puras na degradação de poluentes do petróleo, podendo mineralizar completamente estes compostos devido à complementaridade metabólica entre seus membros (Crapez *et al.* 2002, Van Hamme *et al.* 2003, Tiburtius *et al.* 2004, Jacques *et al.* 2007).

A complementaridade metabólica em consórcios microbianos é essencial para a degradação de alguns hidrocarbonetos, uma vez que estes podem apresentar toxicidade para certos microrganismos e, em contrapartida, servir de fonte de carbono para outros. Assim, o metabolismo de compostos tóxicos por alguns microrganismos resistentes, gera subprodutos que serão utilizados por outras espécies como substrato de crescimento (Van Hamme *et al.* 2003, Tiburtius *et al.* 2004).

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As técnicas de biorremediação constituem uma boa alternativa na descontaminação de ambientes poluídos por petróleo e seus derivados, apresentando, na maioria das vezes, baixo custo de implementação, e menor risco ambiental do que técnicas de limpeza que envolvem processos físicos e químicos. Para a biorremediação ser bem sucedida, as técnicas utilizadas necessitam da presença de microrganismos com capacidade fisiológica e metabólica para degradar os poluentes do local, além de alguns fatores físico-químicos do ambiente que favoreçam sua atividade (Boopathy 2000). Compreender como estes fatores afetam a transformação de um determinado HAP é difícil e entender os processos em ambientes naturais onde misturas de HAPs estão presentes é ainda mais complexo (Van Hamme *et al.* 2003). A contaminação pode ocorrer em substratos multifásicos, heterogêneos, haver associação do contaminante com partículas e sua dissolução em líquidos. Assim, o estudo da ecologia microbiana tem aumentado nos últimos anos, e, com uma abordagem interdisciplinar, envolvendo microbiologia, biologia molecular, engenharia, ecologia, geologia e química, tem fornecido informações úteis para a melhoria das estratégias de biorremediação, além de permitir avaliar o impacto da técnica utilizada sobre os ecossistemas (Boopathy 2000).

**AGRADECIMENTOS:** Ao Laboratório de Ciências Ambientais (LCA) do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pelo fornecimento da infra-estrutura necessária para o desenvolvimento deste estudo. Ao INCT - Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Transferência de Materiais Continente-Oceano (Proc. 573.601/2008-9). CER

recebe apoio do CNPq (PQ 306.234/2007-6) e FAPERJ (E-26/102.697/2008), ADG recebe apoio da CAPES (AUX-PE-PNPD-2303/2008) e RMCWT recebe apoio FAPERJ (E-26/101.829/2008).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOOPATHY, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74: 63-67.
- BUGG, T.D.H. & WINFIELD, C.J. 1998. Enzymatic cleavage of aromatic rings: mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. *Natural Product Reports*: 513-530.
- CAMEOTRA, S.S. & SINGH, P. 2009. Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. *Microbial Cell Factories*, 8:16.
- CHAKRABORTY, R. & COATES, J.D. 2004. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 437–446.
- CHOSSON, P.; LANAU, C.; CONNAN, J. & DESSORT, D. 1991. Biodegradation of refractory hydrocarbon biomarkers from petroleum under laboratory conditions. *Nature*, 351: 640–642.
- COLLA, L.M. & COSTA J.A.V. 2003. Obtenção e aplicação de biossurfactantes. *Vetor*, Rio Grande, 13: 85-103.
- CRAPEZ, M.A.C.; BORGES, A.L.N.; BISPO, M.G.S. & PEREIRA, D.C. 2002. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência hoje*, 30: 179.
- DAGLEY, S.A (1975). Biochemical approach to some problems of environmental pollution. *Essays in Biochemistry*, 11: 81-138.
- DESAI, J.D. & BANAT, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61 (1): 47-64.
- DÍAZ, E. 2004. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*, 7: 173–180.

- EBUEHI, O.A.T.; ABIBO, I.B.; SHEKWOLO, P.D.; SIGISMUND, K.I.; ADOKI, A. & OKORO, I.C. 2005. Remediation of Crude Oil Contaminated Soil by Enhanced Natural Attenuation Technique. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 9 (1): 103–106.
- FERGUSON, A.S.; HUANG, W.E.; LAWSON, K.A.; DOHERTY, R.; GIBERT, O.; DICKSON, K.W.; WHITELEY, A.S.; KULAKOV, L.A.; THOMPSON, I.P.; KALIN, R.M. & LARKIN, M.J. 2007. Microbial analysis of soil and groundwater from a gasworks site and comparison with a sequenced biological reactive barrier remediation process. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 1227–1238.
- FOGHT, J. 2008. Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects *Journal of Molecular and Microbiology and Biotechnology*, 15: 93–120.
- GANESHALINGAM, S.; LEGGE, R.L. & ANDERSON, W.A. (1994). Surfactant enhanced leaching of polyaromatic hydrocarbons from soil. *Process Safety and Environmental Protection*, 72b: 247-251.
- HAIDER, K. 1999. Microbe-soil-organic contaminant interactions. *In: Adriano, D.C. et al. (Ed). Bioremediation of contaminated soils*. Madison: ASA/CSSA/SSSA, p. 33-51.
- HEIDER, J. & FUCHS, G. 1997. Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *European Journal of Biochemistry*, 243: 577-596.
- HOPPER, D.J. 1991. Aspects of the Degradation of Aromatics by Microorganisms. *In: Betts, W.B. (org), Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*. London. Springer-Verlag Limited. p. 69 – 89.
- JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I. & CAMARGO; F.A.O. 2007. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, 37 (4): 1192-1201.
- JACQUES, R.J.S. 2005. Biorremediação de antraceno, fenantreno e pireno em um argissolo. *Tese de Doutorado*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. 188p.
- JOHNSEN, A.R.; WICK, L.Y. & HARMS, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133 : 71-84.

- JORGENSEN, K. S.; PUUSTINEN J. & SUORTTI A-M. 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environmental Pollution*, 107: 245-254.
- KANALY, R.A.; BARTHA, R.; WATANABE, K. & SHIGEAKI, H. 2000. Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (10): 4205-4211.
- KANALY, R.A. & HARAYAMA, S. 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182 (8): 2059–2067.
- LEAHY, J.G. & COLWELL, R.R. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*, 54 (3): 305-315.
- LEYS, N.M.; BASTIAENS, L.; VERSTRAETE, W. & SPRINGAEL, D. 2005. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*,. 66 (6): 726–736.
- MANIASSO, N. 2001. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, 24 (1): 87-93.
- MANDRI, T. & LIN, J. 2007. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *African Journal of Biotechnology*, 6 (1): 023-027.
- MARIANO, A.P.; KATAOKA, A.P.A.G.; ANGELIS, D.F. & BONOTTO, D.M. 2007. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 346-353.
- MARTINS, B.A.D. 2004. Avaliação da cinética de biodegradação do etanol em concentrações mínimas necessárias dos nutrientes nitrogênio e fósforo. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis,SC, Brasil. 86p.
- MECKENSTOCK, R.U.; SAFINOWSKI, M. & GRIEBLER, C. 2004. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*, 12: 257–276.
- MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N. & GIBBS, B.F. 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, 60: 371-380.

- NITSCHKE, M. & PASTORE, G.M. 2002. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química Nova*, 25 (5): 772–776.
- RAMSAY, M.A.; SWANNELL, R.P.J.; SHIPTON, W.A.; DUKE, N.C. & HILL, R. T. 2000. Effect of biorremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 41 (7-12): 413-419.
- RON, E.Z. & ROSENBERG, E. 2001. Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 3 (4): 229-236.
- SCRAMIN, S.; DENTZIEN, A.F.M. & MELO, I.S. 2003. Indução da enzima pirocatecase por *Acinetobacter baumannii* envolvida na biodegradação do herbicida Diuron. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13: 113–118.
- SEO, J.; KEYN, Y & LI, Q.X. 2009. Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research. and Public Health* . 6: 278- 309.
- SMITH, M.R. 1990. The biodegradation of aromatics hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation*,1: 191–206.
- TABATABAEE, A.; MAZAHERI ASSADI, M.; NOOHI, A.A. & SAJADIAN, V.A. 2005. Isolation of Biosurfactant Producing Bacteria from Oil Reservoirs. *Iranian Journal of Environmental Health, Science and Engineering*, 2 (1): 6-12.
- TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P. & LEAL, E.S. 2004. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova*, 27 (3): 441-446.
- TORSVIK, V.; SALTE, K.; SORHEIM, R. & GOKSOYR, J. 1990. Comparison of Phenotypic Diversity and DNA Heterogeneity in a Population of Soil Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (3): 776-78.
- VAN HAMME, J.D.; SINGH, A. & WARD, O.P. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4): 503 549.
- WIDDEL, F. & RABUS, R. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 259–276
- WOO, S.H. & PARK, J.M. 1999. Evaluation of drum bioreactor performance used for decontamination of soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74:937-944.

YAKUBU, M.B. 2007. Biological approach to oil spills remediation in the soil. *African Journal of Biotechnology*, 6 (24): 2735-2739

YU, S.H.; KE, L.; WONG, Y.S. & TAM, N.F.Y. 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International*, 31: 149-154.

ZHOU, H.W.; WONG, A.H.Y.; YU, R.M.K.; PARK, Y.S. & TAM, N.F.Y. 2009. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Structural Shift of Bacterial Communities in Mangrove Sediment. *Microbial Ecology*, 58: 153–16.

## 2.2. Artigo publicado pela Revista Virtual de Química

### Biodegradação de compostos do petróleo e métodos de identificação de bactérias degradadoras

Wetler-Tonini, R. M. C.; Rezende, C. E.; Grativol, A. D.

*Rev. Virtual Quim.* **2011**, **3** (2), 78-87. Data de publicação na Web: 30 de junho de 2011

<http://www.uff.br/rvq>

#### Resumo

Componentes do petróleo podem ser degradados por diversas espécies bacterianas. Assim, estes microrganismos são de grande interesse para a indústria e para aplicação na recuperação de ambientes contaminados. Métodos de isolar, cultivar e identificar bactérias degradadoras destes poluentes têm sido desenvolvidos no campo da química, bioquímica, microbiologia e biologia molecular, possibilitando conhecer melhor a ecologia e dinâmica das comunidades bacterianas no contexto ambiental e em laboratório. Por fim, observa-se a necessidade crescente de pesquisas multidisciplinares a fim de conhecer o maior número possível de espécies, das suas características metabólicas e das suas respectivas funções dentro do processo de degradação de petroderivados e, com estas informações, desenvolver estratégias de descontaminação de ambientes poluídos por estes compostos.

**palavras-chave:** ecologia microbiana; biodegradação de petróleo; métodos de identificação bacteriana

## **Oil compound biodegradation and identification methods for degrading bacteria**

**Abstract:** Petroleum compounds can be degraded by several bacterial species. Thus, these microorganisms are of great interest to the industry and to the recovery of contaminated environments. Methods to isolate, cultivate and identify bacteria able to degrade these pollutants have been developed in the field of chemistry, biochemistry, microbiology and molecular biology, allowing for a better understanding of bacterial communities ecology and dynamics in the environmental context and in the laboratory. Finally, there is a growing need for multidisciplinary research in order to meet the greatest possible number of species, their metabolic properties and their respective roles in the degradation process of oil compounds and, with this information, develop strategies for decontamination of environments polluted with these substances.

**Keywords:** microbial ecology; petroleum biodegradation; bacterial identification methods

\*Laboratório de Ciências Ambientais, P5, sala 211. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Av. Alberto Lamego, 2000. Parque Califórnia. Campos dos Goytacazes, RJ. CEP: 28013-602

E-mail para correspondência: [micro\\_rita@yahoo.com.br](mailto:micro_rita@yahoo.com.br)

# **Biodegradação de compostos do petróleo e métodos de identificação de bactérias degradadoras**

**Wetler-Tonini<sup>a\*</sup>, R. M. C.; Rezende, C. E. <sup>a</sup>; Grativol, A. D. <sup>a</sup>**

<sup>a</sup>Laboratório de Ciências Ambientais, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Av. Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes – RJ. CEP-28013-602

\*micro\_rita@yahoo.com.br

*Recebido em 30 de junho de 2011. Aceito para publicação em 30 de junho de 2011*

- 1. Biodegradação de petróleo**
- 2. Detecção de microrganismos degradadores de poluentes do petróleo**
  - 2.1. Pesquisa de indicadores físico-químicos de poluição no solo**
- 3. Enumeração e identificação de microrganismos degradadores**
  - 3.1-Métodos dependentes de cultura**
  - 3.2-Métodos independentes de cultura**
- 4. Considerações Finais**
- 5. Referências Bibliográficas**

## **1. Biodegradação de petróleo**

O petróleo pode ser utilizado por diversos microrganismos como fonte de carbono e energia, uma vez que exibem grande versatilidade fisiológica e bioquímica, degradando seus compostos tanto por via aeróbia, quanto anaeróbia. Uma grande quantidade de substratos e metabólitos presentes em solos impactados por hidrocarbonetos, fornece condições para o desenvolvimento de uma complexa comunidade microbiana.<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6, 7</sup>

Segundo Braddock *et al.* (1996),<sup>8</sup> as populações de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos em sedimentos marinhos contaminados com petróleo são

maiores do que nos não contaminados. Normalmente, as populações destes microrganismos constituem menos de 1% do total das comunidades microbianas em ambientes naturais. Entretanto, quando poluentes derivados do petróleo estão presentes, as populações degradadoras destes compostos aumentam para 10% da comunidade.<sup>9</sup> Derrames sucessivos de petroderivados no mesmo ambiente aceleram o aumento da biomassa bacteriana degradadora de hidrocarbonetos. Desta forma, uma alta concentração dessas bactérias pode ser utilizada como um indicador de ambiente impactado cronicamente por petróleo.<sup>10</sup> Portanto, o estudo da diversidade microbiana autóctone torna-se fundamental para a compreensão das funções exercidas pelos microrganismos diante da contaminação dos habitats por petróleo e seus derivados.<sup>11</sup>

Ecologicamente, microrganismos degradadores de hidrocarbonetos são amplamente distribuídos. As dificuldades encontradas para caracterizar comunidades microbianas de ambientes impactados por hidrocarbonetos do petróleo são agravadas pela grande quantidade de substratos específicos e interações metabólicas possíveis. Apesar da complexidade destas comunidades, ferramentas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de caracterizar a abundância e distribuição microbiana em ambientes naturais, a fim de associar estruturas comunitárias com as funções do ecossistema. Métodos baseados em cultura e independentes de cultura têm sido desenvolvidos e aplicados para fornecer uma compreensão destas comunidades microbianas e a evolução nas pesquisas tem gerado e disponibilizado listas-referência de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos para consulta, uma vez que técnicas para isolar e identificar microrganismos responsáveis pelo metabolismo destes compostos são fundamentais de um ponto de vista aplicado.<sup>5</sup>

## **2. Detecção de microrganismos degradadores de poluentes do petróleo**

### **2.1. Pesquisa de indicadores físico-químicos de poluição no solo**

As taxas de infiltração de água estão sujeitas as características físicas (ex.: granulometria) e químicas (ex.: conteúdo da matéria orgânica) dos solos e,

consequentemente, controlam a distribuição de poluentes e dos microrganismos degradadores.<sup>12,7</sup> Os intervalos de densidade do solo, em geral, variam de <1,0 (em solos orgânicos) a 1,7 g cm<sup>-3</sup> e são dependentes das rochas formadoras dos sedimentos e das características das partículas (areia, silte, argila e matéria orgânica). Camadas de solo compactado têm densidades elevadas, e inibem o movimento do ar e da água através do solo, dificultando a ação de microrganismos degradadores aeróbios. Neste caso, deve-se direcionar a prospecção para microrganismos anaeróbios. Os solos com texturas mais finas tendem a agregar partículas de matéria orgânica e possuir maior quantidade de bactérias degradadoras aeróbias.<sup>12,7</sup>

Características químicas como o pH, a condutividade elétrica e a presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) devem ser levados em consideração, pois o pH pode ser alterado pela presença de poluentes e influencia diretamente na solubilidade dos minerais e da matéria orgânica do solo, na disponibilidade de nutrientes e na atividade de microrganismos.<sup>12,7</sup> A condutividade elétrica é uma indicação da quantidade de íons (sais dissolvidos) presentes na solução do solo e o excesso de sais afeta diretamente a atividade microbiana.<sup>12</sup> A detecção de HAPs de origem petrogênica, pirogênica ou biogênica pode ser utilizada como indicadora da presença de microrganismos degradadores de petróleo, uma vez que estes possuem vias metabólicas para a degradação de compostos orgânicos aromáticos.<sup>13, 14, 6, 7</sup>

### **3. Enumeração e identificação de microrganismos degradadores**

Abordagens para a detecção da diversidade microbiana e as funções de cada microrganismo na comunidade podem ser divididas em métodos dependentes de cultura e independentes de cultura.<sup>5</sup>

#### **3.1. Métodos dependentes de cultura**

Os métodos tradicionais, dependentes de cultura, são os mais conhecidos e baseiam-se na diferenciação morfológica, metabólica e fisiológica dos

microrganismos. As técnicas incluem o isolamento e cultivo em meios sólidos contendo compostos do petróleo como única fonte de carbono, número mais provável (NMP), que é feito em culturas líquidas e, mais recentemente, Biolog que emprega placas de utilização do substrato.<sup>1,5</sup>

Técnicas de cultura tradicionais produziram informações essenciais sobre interações microbianas com hidrocarbonetos no ambiente. Isto pode ser demonstrado em estudos, onde catálogos de microrganismos foram compilados com base no isolamento convencional e técnicas de plaqueamento. Estas pesquisas documentaram que há uma coleção diversa amplamente distribuída de bactérias, leveduras e fungos, capazes de utilizar hidrocarbonetos. Outras investigações contemporâneas continuam registrando comunidades microbianas em ambientes impactados por hidrocarbonetos em todo o mundo.<sup>1, 5</sup> Embora possibilitem isolar e identificar microrganismos presentes em ambientes impactados por hidrocarbonetos, as descrições de comunidades microbianas por métodos dependentes de cultivo são baseadas apenas nas características morfológicas e funcionais.<sup>5</sup>

Após o isolamento, são feitas análises morfológicas e testes bioquímicos para a identificação das bactérias degradadoras ao nível de gênero. O primeiro passo consiste na caracterização morfológica da colônia, coloração de Gram, visualização e descrição das bactérias coradas em microscópio. A seguir, são feitos testes bioquímicos primários, a saber: catalase e oxidase, oxidação-fermentação e motilidade. Testes secundários consistem na avaliação do crescimento em meios específicos (MacConkey®, DNase e Marine Agar), susceptibilidade a penicilina, utilização de hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia, hidrólise do amido, requerimento de íons de sódio, teste de utilização de citrato, fermentação e produção de gás a partir da glicose e fermentação de D-manitol.<sup>15</sup>

Para estudos em que não há necessidade de obtenção de isolados para os hidrocarbonetos não-voláteis com base na formação das emulsões, pode-se aplicar a técnica de NMP (número mais provável) em placas de cultura de tecidos ou placas de ELISA, utilizando-se um programa de computador para estimar o número de microrganismos degradadores no meio de cultivo. Ensaios de NMP dividem comunidades em tipos fisiológicos, podendo apresentar maior eficiência com o uso de vários meios seletivos em associação com uma detalhada caracterização do local de estudo. Esta técnica tem se mostrado particularmente útil para estudar sistemas

anaeróbios, pois se mostra sensível, mesmo quando anaeróbios de crescimento lento estão sendo analisados. A técnica de NMP também se mostra bastante útil para uma abordagem visando à caracterização de comunidades microbianas de ambientes impactados por petróleo e tem sido utilizada a fim de avaliar o papel de grupos microbianos específicos e durante o processo de remediação.<sup>5, 15, 16</sup>

A técnica de Biolog pode ser aplicada para verificar padrões na utilização de substrato para avaliar a diversidade funcional de comunidades microbianas. Neste teste, a amostra é incubada com até 95 diferentes fontes de carbono em microplacas e o corante azul de tetrazólio é usado para indicar a atividade microbiana. O resultado do ensaio é um perfil qualitativo fisiológico das potenciais funções metabólicas exercidas pela porção cultivável da comunidade microbiana. As diferenças nos perfis podem então ser analisadas por estatística multivariada.<sup>12</sup> No entanto, algumas identificações incorretas e a constatação de que o tempo de incubação pode causar modificações prejudica a confiabilidade do sistema. Parte das falhas encontradas na identificação de organismos pode ser amenizada complementando o Biolog com testes bioquímicos quando a microplaca é inoculada. De maneira resumida, pode-se inferir que o sistema Biolog oferece grandes avanços, no entanto, a sua identificação deve ser analisada com cautela.<sup>18</sup>

Com base em estudos de cultivo de bactérias utilizando hidrocarbonetos como única fonte de carbono, observou-se que os isolados obtidos apresentaram especificidade quanto ao uso de substratos e, foram identificadas várias vias metabólicas de degradação de HAPs para diferentes microrganismos.<sup>5, 19, 20</sup> Para utilizar estes compostos, o microrganismo deve ter a capacidade de quebrar pelo menos parte da molécula de hidrocarboneto, transformando-o em outro composto intermediário da via degradativa.<sup>5, 19, 20</sup> Em laboratório, utilizando-se culturas puras, as condições de crescimento podem ser controladas para otimizar a capacidade de biodegradação, uma vez que é possível controlar fatores físicos e químicos intervenientes na atividade microbiana, como pH, temperatura, umidade e concentração de nutrientes.<sup>7</sup>

A presença de co-metabolismo é essencial para a degradação de alguns hidrocarbonetos em condições laboratoriais, uma vez que estes podem apresentar toxicidade para certos microrganismos e, em contrapartida, servir de fonte de carbono para outros. Assim, o metabolismo de compostos tóxicos por alguns

microrganismos resistentes gera subprodutos que serão utilizados por outras espécies como substrato de crescimento. A biodegradação do petróleo em ambientes naturais ou em laboratório, não pode ser realizada por uma única espécie microbiana, uma vez que este poluente é constituído por vários tipos de hidrocarbonetos. Nenhum microrganismo é capaz de degradar sozinho todos os compostos ali presentes, exigindo a formação de consórcios compostos por várias espécies microbianas, os quais têm demonstrado maior eficiência na degradação, podendo chegar à mineralização completa do poluente em função da complementaridade metabólica entre seus membros.<sup>2, 21, 5, 10</sup>

Diversas pesquisas têm tentado descrever as interações entre microrganismos e entre os hidrocarbonetos e microrganismos, por extrapolação de estudos detalhados em laboratório com isolados de ambientes contaminados por hidrocarbonetos. Por exemplo, as avaliações funcionais e fisiológicas de grupos de isolados, objetivando quantificar a capacidade de emulsificação do óleo e a forma utilizada por isolados ambientais para assimilar hidrocarbonetos.<sup>5</sup> Os pesquisadores também têm elaborado consórcios microbianos, contendo várias linhagens já estudadas com a finalidade de descrever processos ecológicos específicos de vários ambientes naturais.<sup>5</sup>

Nos últimos anos, os métodos dependentes apenas de cultivo microbiano têm demonstrado que a contagem utilizando estas técnicas apresenta discrepâncias quando comparadas à comunidade de microrganismos no ambiente, uma vez que, as células bacterianas se mostraram sensíveis ao cultivo. Deve-se considerar que apenas uma pequena fração dos microrganismos pode ser cultivada a partir de amostras ambientais, e mesmo que um microrganismo seja cultivado, o seu papel e função na comunidade e sua contribuição para o ecossistema não são, necessariamente, identificados.<sup>5, 22</sup>

Outro aspecto a ser ressaltado é que a contagem microscópica direta excede as contagens de células viáveis em meio de cultura em várias ordens de grandeza.<sup>23</sup> Algumas explicações podem incluir i) a presença de um grande número de células muito pequenas e, provavelmente, inativas, que não são capazes de crescer em condições laboratoriais; ii) normalmente, o cultivo em laboratório apresenta seletividade, permitindo o crescimento de algumas espécies e reprimindo o crescimento de outras; iii) a composição da fração cultivável da comunidade pode

ser distorcida pelo método de cultura, uma vez que o tempo de replicação varia de acordo com a espécie microbiana, e, com o crescimento rápido de algumas espécies, outras de replicação mais lenta são excluídas por competição; iv) os meios de cultura são extremamente ricos em fontes de carbono quando comparados aos substratos encontrados em ambientes naturais, podendo falsear a composição da comunidade original. Assim, devido às limitações dos meios de cultura em reproduzir as condições adequadas, a diversidade e equitabilidade obtidas por cultivo não podem representar com precisão a comunidade real encontrada *in situ*.<sup>23, 24, 22</sup>

De acordo com Felske *et al.* (1999)<sup>22</sup>, apesar das limitações supracitadas, é possível cultivar vários tipos de bactérias em laboratório com o uso de nutrientes e condições adequadas. Membros de vários grupos microbianos onipresentes difíceis de cultivar já foram isolados por ajustes das condições de cultura, até mesmo por modificações simples, tais como o uso de formulações sólidas em lugar de líquidas, redução das concentrações de nutrientes e minerais, ou aumento do tempo de incubação.<sup>25</sup>

A diversidade de microrganismos é muito ampla, no entanto, ainda pouco conhecida. Estima-se que um grama de solo pode conter de 10 a 20 bilhões de microrganismos, representando milhares de espécies de fungos, bactérias e leveduras. Com os avanços nas pesquisas, o número de espécies microbianas identificadas cresce a cada ano, indicando que foram descobertas e nomeadas, talvez, menos de 0,1% e no máximo 10% das espécies microbianas existentes, dependendo do habitat estudado. Acredita-se que menos de 1% de todas as células bacterianas do solo podem ser cultivadas pelos métodos tradicionais.<sup>5, 17, 22</sup> A extração direta de ácidos nucleicos de amostras ambientais têm comprovado que uma grande proporção de microrganismos (90-99,9%) não é facilmente cultivada em laboratório, mas que pode ser responsável pela maior parte da atividade biodegradativa de interesse biotecnológico.<sup>24</sup>

Microrganismos não cultiváveis compõem a maior parte da comunidade microbiana, no entanto, até pouco tempo, o cultivo era indispensável para sua identificação. Além disso, a frequência de ocorrência das populações, a sazonalidade, e em muitos casos, a dependência de hospedeiros e/ou substratos específicos para sua sobrevivência e replicação também consistiam em importantes limitações à identificação.<sup>17, 22</sup>

O uso de técnicas de cultivo é indispensável aos estudos de microrganismos ambientais, auxiliando no isolamento e proporcionando a compreensão detalhada das características e do metabolismo dos organismos separadamente. Entretanto, na análise de comunidades, não são capazes de reproduzir a alta diversidade existente, os nichos ecológicos e as relações simbióticas encontradas em ambientes naturais complexos. Neste contexto, a identificação direta de bactérias do solo por meio de técnicas que independem de cultura prévia, com o uso do gene 16S rDNA, indicou a presença de muitas espécies bacterianas não cultiváveis.<sup>23, 24, 22</sup> No entanto, existe a hipótese de que as bactérias cultiváveis representem as células viáveis, enquanto as sequências de 16S rDNA podem ser obtidas a partir de células mortas presentes na amostra. Esta possibilidade, indicaria que a análise de sequências clonadas do 16S rDNA fornece informações, principalmente de interesse taxonômico, podendo não indicar as principais bactérias vivas agindo nos processos biogeoquímicos dos solos e sedimentos.<sup>22</sup>

Quando combinados aos métodos microbiológicos clássicos, os métodos moleculares podem proporcionar uma interpretação mais abrangente da comunidade microbiana presente no ambiente e sua resposta à biorremediação induzida e aos processos naturais de atenuação.<sup>24</sup>

### **3.2. Métodos independentes de cultura**

A disparidade entre a diversidade microbiana no ambiente e a cultivável aumentou a importância das abordagens moleculares independentes de cultura, mas recentemente, a análise do DNA tornou-se o alvo dominante de estudo. Métodos baseados na assinatura do DNA bacteriano por meio do gene 16S rDNA demonstram as relações filogenéticas nas comunidades microbianas e têm aumentado substancialmente o conhecimento sobre a diversidade de microrganismos em ambientes naturais. A caracterização de um organismo em termos de filotipo requer apenas uma sequência de genes, e não uma célula metabolicamente ativa. Estes genes podem ser obtidos por clonagem de DNA, isolado diretamente da amostra ambiental usando várias técnicas já padronizadas. Estes métodos tornaram-se ferramentas indispensáveis não somente na ecologia microbiana clássica, mas também em outras áreas de pesquisa, uma vez que muitas

características de algumas espécies só podem ser explicadas em um contexto de comunidade.<sup>23, 24, 26, 27</sup>

As sondas de DNA podem detectar genes ou seqüências de genes no DNA total isolado e purificado a partir de amostras ambientais. De acordo com Widada *et al.* (2002),<sup>24</sup> técnicas de hibridização de DNA, usando DNA marcado como uma sonda específica foram utilizadas em diversas pesquisas para identificação de microrganismos específicos em amostras ambientais.

Um dos primeiros estudos para a utilização de técnicas de hibridização direta de monitoramento para degradadores de xenobióticos consistiu no uso de plasmídeos em microcosmos no solo. Bactérias foram hibridizadas com plasmídeos como sondas para quantificar as células que continham a sequência responsável pela utilização do poluente. Uma correlação positiva foi observada entre as concentrações de plasmídeo e as taxas de mineralização. A exposição aos substratos aromáticos causou um aumento na quantidade de plasmídeos encontrados nas amostras.<sup>24</sup>

Microrganismos podem ser usados para determinar a biodisponibilidade de um determinado composto químico no solo e sedimento. Para tal, é indicada a medição de plasmídeos em bactérias, uma vez que o gene que codifica a resistência aos xenobióticos são, geralmente, codificados nestes plasmídeos; estes servem como indicadores de contaminantes no ambiente. É possível usar abordagem endógena ou exógena. Na abordagem endógena, plasmídeos são extraídos das bactérias e isolados em placas de ágar. Na abordagem exógena, uma amostra de solo ou sedimento é misturada com bactérias sem plasmídeo, que, por conjugação, posteriormente, os adquirem naturalmente das bactérias que contêm plasmídeos. Se o número de plasmídeos encontrado apresentar aumento em um determinado local, uma investigação dos fatores de estresse pode ser iniciada.<sup>12</sup>

A ecologia microbiana sofreu uma mudança profunda nas duas últimas décadas quanto aos métodos empregados para a análise das comunidades naturais. As técnicas de investigação da diversidade microbiana estrutural mudaram de cultivo para métodos que se baseiam na investigação de parte da sequência do DNA, com maior ênfase para o gene 16S rDNA, em bactérias, e 18S rDNA, para fungos. A caracterização pode ser feita através da clonagem e seqüenciamento direto, por hibridização do DNA da amostra com sondas ou, alternativamente, pelo uso da

técnica de PCR (polymerase chain reaction, em inglês), com o uso de iniciadores universais que amplificam as sequências-alvo de diversos organismos e, posteriormente, os fragmentos amplificados podem ser analisados através de outras técnicas.<sup>1, 23, 17, 27</sup> De acordo com Felske *et al.* (1999)<sup>22</sup> estudos moleculares podem fornecer informações sobre a maioria dos membros metabolicamente ativos da comunidade bacteriana no solo e também são aplicáveis em sedimentos, porém algumas adaptações se fazem necessárias devido as características de cada tipo de matriz ambiental.

Com a rápida expansão no campo da genética, a ecologia e a biogeoquímica molecular têm apresentado uma série de abordagens baseadas na técnica de PCR. Desta forma, os estudos de microrganismos através dos fragmentos de DNA amplificados usando clonagem ou sequenciamento ou submetidos a uma série de métodos de caracterização genética são empregados para avaliar perfis de comunidades.<sup>28, 23, 5, 17, 24, 22</sup> A evolução da utilização de DNA *microarrays* tem atraído a atenção dos microbiologistas ambientais, uma vez que esta técnica permite o acompanhamento de milhares de genes ao mesmo tempo.<sup>5</sup> Diante da evolução das técnicas de estudo da ecologia microbiana, é possível afirmar que a identificação filogenética e a caracterização da dinâmica das comunidades dos microrganismos, em breve, serão pré-requisitos essenciais para a execução de estudos de qualidade nesta área, tornando possível a obtenção de dados taxonômicos e quantitativos tão confiáveis quanto os da ecologia de macro organismos.<sup>26</sup>

A seguir, serão apresentadas algumas técnicas baseadas na PCR, comumente usadas com a finalidade de estudar a diversidade e identificar microrganismos ambientais.

ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*) é uma ferramenta comumente empregada para estudar a diversidade microbiana, que se baseia no polimorfismo do DNA. Assim, clones contendo fragmentos do gene 16S rDNA, obtidos através do uso de iniciadores universais ou específicos, são amplificados por PCR e digeridos por enzimas de restrição. A seguir procede-se a separação dos fragmentos em gel de agarose de alta densidade ou gel de acrilamida. Os perfis resultantes são, então, utilizados para classificar a comunidade em grupos genotípicos específicos ou para a tipagem de linhagens.<sup>29</sup>

RISA (*ribosomal intergenic space analysis*) é um método de análise da comunidade microbiana, que fornece estimativas de diversidade e composição da comunidade. Foi usado originalmente para a comparação da diversidade em solos e mais recentemente para analisar a diversidade microbiana na rizosfera e em ambientes marinhos. O método envolve a PCR do DNA total da comunidade bacteriana, amplificando a região intergênica entre a subunidade pequena (16S) e a subunidade grande (23S) do gene rRNA, com iniciadores específicos para regiões conservadas dos genes ribossomais 16S e 23S. Nesta técnica, as diferenças no comprimento do espaçador intergênico são exploradas. A região intergênica 16S-23S, que pode codificar tRNAs dependendo da espécie bacteriana, apresenta significativa heterogeneidade no comprimento e na sequência de nucleotídeos, que podem ser utilizadas para distinguir cepas bacterianas e espécies estreitamente relacionadas. O produto da PCR passa por uma eletroforese em gel de poliacrilamida, e o DNA é corado e visualizado. O resultado é um padrão complexo de bandas que fornece um perfil da comunidade específica, onde cada banda de DNA correspondente a, pelo menos, um organismo da comunidade original. Embora esta técnica forneça estimativas relativamente rápidas da composição de comunidades microbianas, a eletroforese em gel de poliacrilamida tende a ser demorada e complicada.<sup>20,30</sup> Diante das limitações existentes, a técnica foi aprimorada com o uso da automatização, sendo, assim, criada a técnica de ARISA (*automated ribosomal intergenic spacer analysis*), que pode ser utilizada para investigar a dinâmica espacial e temporal das assembléias bacterianas, para análises de estruturas das comunidades microbianas ambientais, obtendo-se uma estimativa do número de táxons de bactérias. Esta técnica difere da RISA pela análise dos produtos da PCR em um sistema capilar de eletroforese automatizado. Assim, é produzido um eletroferograma, cujos picos correspondem a fragmentos distintos de DNA, que são diferenciados por um sistema de detecção de fluorescência a laser. A sensibilidade deste método é muito elevada (detecta diferenças de um único nucleotídeo), e a reprodutibilidade é garantida pela automatização instrumental. A técnica de ARISA tem sido utilizada para analisar a estrutura genética de várias comunidades de bactérias e / ou de fungos em amostras de água doce, bacterioplâncton, e diferentes solos, permitindo uma estimativa bastante confiável da complexidade da comunidade.<sup>31, 32</sup> A utilização de uma técnica automatizada e a fácil análise dos dados gerados tem demonstrado que

ARISA é uma técnica apropriada para analisar e comparar um grande número de amostras e os resultados obtidos são confiáveis e reprodutíveis. <sup>31, 32</sup>

A técnica de T-RFLP (*terminal restriction fragment length polymorphism*) necessita de iniciadores marcados com fluorescência, produzindo amplicons de mesmo tamanho com marcadores terminais através da reação de PCR. Após a purificação, os produtos amplificados são digeridos por enzimas de restrição selecionadas, produzindo fragmentos de tamanhos diferentes. A última etapa é executada em um sequenciador automático, no qual os fragmentos marcados são identificados por densitometria e desenhado um perfil de picos com base no comprimento dos fragmentos. Esta técnica permite obter estimativas semi-quantitativas da importância relativa de cada filotipo detectado e, em certos casos permite, através da comparação com banco de dados internacionais, a identificação do gênero ou mesmo espécie correspondente ao o comprimento do fragmento de cada eletroferograma. <sup>31, 12, 24, 33, 27</sup>

O DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) é um método que pode ser utilizado para amostras de solo, sedimento ou água. Consiste na amplificação de fragmentos do gene 16S rRNA e posterior corrida dos produtos da PCR em um gel com gradiente de desnaturação 30-60% uréia/formamida. Com base no grau de desnaturação, os fragmentos de DNA correm pelo gel, produzindo bandas em locais diferentes, possibilitando distinguir populações ao nível de gênero, estimar a diversidade bacteriana e comparar com outros locais, contaminados ou não com hidrocarbonetos, além da observação dos efeitos destes poluentes na diversidade bacteriana. Ainda é possível retirar e sequenciar as bandas obtidas no gel a fim de identificar as espécies presentes na comunidade. Esta técnica pode ser utilizada para identificar populações responsáveis pela descontaminação durante a biorremediação em associação com métodos de avaliação da taxa de degradação a fim de definir melhores estratégias para a remoção do poluente. <sup>20, 25, 24, 5</sup>

TGGE (*temperature gradient gel electrophoresis*) é um método pelo qual fragmentos de DNA de mesmo tamanho, mas apresentando diferentes sequências são obtidos por PCR e podem ser diferenciados por eletroforese. A separação é baseada na diminuição da mobilidade eletroforética do fragmento de DNA parcialmente desnaturado em um gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de temperatura. Assim, esta técnica segue a mesma lógica do DGGE, porém ao

invés da desnaturação, utiliza-se um gradiente de temperatura para a separação dos fragmentos de DNA.<sup>24</sup>

SSCP (*single strand conformation polymorphism*) nesta técnica, a sequência de interesse do DNA é amplificada pela PCR usando iniciadores marcados. Os produtos resultantes da PCR são desnaturados e visualizados por uma eletroforese em gel de poliacrilamida, detectando-se mutações quando há alterações na motilidade das fitas simples. Assim, a mutação pode ser posteriormente caracterizada por eluição do alelo mutado, que é usado para uma nova amplificação e sequenciamento. Uma importante aplicabilidade para este método é avaliar se duas sequências de DNA são iguais, reduzindo a necessidade de sequenciamento. Apesar de haver algumas descrições do uso do SSCP na biologia de populações, esta técnica ainda é pouco usada a fim de identificar variações genéticas em ecologia molecular.<sup>24, 34, 35</sup>

A análise de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) é conceitualmente simples; pequenas quantidades de DNA genômico total são submetidas à PCR utilizando iniciadores com seqüência aleatória. O protocolo de amplificação difere das condições normais de PCR, em que apenas um único iniciador aleatório é empregado e é desnecessário o conhecimento prévio do genoma submetido à análise. O protocolo de análise por RAPD é realizado de acordo com métodos originais utilizando iniciadores curtos de seqüência aleatória que são comercialmente disponíveis. Só moléculas de alto peso molecular, ou seja, DNA não degradado devem ser submetidos a análises de RAPD. Os produtos de amplificação podem ser detectados por eletroforese em gel de agarose. A técnica possui várias aplicações potenciais em ecologia molecular, incluindo a determinação de identidades taxonômicas, detecção de fluxo gênico interespecífico, análise de amostras misturadas, e produção de sondas específicas. Algumas limitações devem ser consideradas, por exemplo, o tamanho do iniciador irá determinar o grau de especificidade na digitalização do genoma; sua sensibilidade às condições de reação, em que pequenas mudanças nas condições podem afetar a reprodutibilidade dos produtos de amplificação. A técnica é sensível ao programa de temperatura, ao tipo de polimerase utilizado, ou a concentração de DNA. Apenas as condições de reação estritamente padronizadas irão garantir produtos de amplificação reprodutíveis. Além disso, a concentração ideal de DNA por reação

pode variar substancialmente em condições específicas, dependendo do iniciador e do programa utilizado no termociclador.<sup>36</sup>

É importante ressaltar que todas as técnicas dependentes da PCR possuem uma limitação no que se refere à comparação de resultados, uma vez que os pesquisadores da área de biologia molecular utilizam diferentes conjuntos de iniciadores, explorando assim diferentes regiões do genoma. Além disso, o uso de iniciadores diferentes pode influenciar na eficiência de amplificação, dependendo da sensibilidade do iniciador para detectar DNA de populações menos representativas na mistura, bem como da especificidade do iniciador.<sup>31, 32</sup>

A análise de ácidos graxos fosfolipídicos, componentes essenciais da membrana presentes em organismos vivos, pode ser utilizada para fornecer informações sobre a estrutura trófica (ao nível fenotípico) de comunidades microbianas. O uso de padrões de ácidos graxos fosfolipídicos, em geral, consiste em um método rápido e confiável para a detecção de mudanças na estrutura das comunidades microbianas dos solos e sedimentos e as variações detectadas podem estar relacionadas a mudanças no uso do solo, manejo e poluição, assim como nos sedimentos dos ecossistemas aquáticos continentais e marinhos.<sup>12</sup>

#### **4. Considerações Finais**

Nas últimas décadas a contaminação ambiental por petróleo e derivados tem causado mobilização de empresas privadas e do poder público em todo o mundo e, com isso, tem aumentado a demanda de estudos de caracterização de microrganismos visando a aplicação na biorremediação de compostos do petróleo. Para tal, faz-se necessário conhecer detalhadamente a diversidade e a dinâmica das comunidades microbianas presentes em diferentes ecossistemas; a ação de cada microrganismo no metabolismo de compostos específicos, gerados em diferentes fases da degradação do petróleo; bem como das vias metabólicas e consórcios microbianos utilizados para degradar os poluentes em cada ambiente ou em laboratório.

As técnicas de biologia molecular têm contribuído de maneira significativa para os estudos de comunidades microbianas, pois oferecem métodos rápidos,

sensíveis, e precisos para analisar as bactérias e seus genes catabólicos no ambiente. Seu uso tem contribuído para o rápido crescimento dos bancos de dados, cada vez que os pesquisadores obtêm alta confiabilidade ao afirmar que uma espécie está presente na comunidade estudada. Elas têm permitido uma melhor caracterização das comunidades de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos e das adaptações celulares e fisiológicas das bactérias à presença dos poluentes, além dos mecanismos de acesso e captação das substâncias pelas células microbianas. Além disso, permitem comparações entre diferentes comunidades, o monitoramento das mudanças temporais resultantes de alterações nos parâmetros ambientais, a avaliação dos impactos de biorremediação e a modelagem ecológica. As informações obtidas a partir de estudos nesta área proporcionam uma visão em longo prazo dos efeitos ecológicos causados pela contaminação com petróleo ou outros poluentes, como metais pesados e pesticidas.<sup>23, 5, 24</sup>

A associação entre os métodos dependentes de cultura e os métodos independentes desta tem permitido o isolamento e identificação de diversos microrganismos degradadores de compostos do petróleo; elaboração *in vitro* de consórcios microbianos com reconhecida capacidade degradativa e a produção em larga escala de tensoativos, como os biossurfactantes, que são utilizados na solubilização do petróleo, facilitando sua degradação. Além disso, estes estudos têm fornecido dados importantes sobre a diversidade de comunidades microbianas em ambientes naturais e o conhecimento da participação de cada organismo em processos biogeoquímicos em diversos ecossistemas. As técnicas descritas no presente artigo fornecem informações úteis para a melhoria das estratégias de biorremediação, proporcionando maior segurança na escolha da técnica mais adequada para cada tipo de ecossistema.

**AGRADECIMENTOS:** Os autores agradecem ao Laboratório de Ciências Ambientais do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense pela disponibilidade da infra-estrutura. Este trabalho faz parte do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia sobre a Transferência de Material na Interface Continente – Oceano (CNPq Proc. 573.601/2008-9) e CER recebe apoio

financeiro da FAPERJ (E- 26/102.697/2008; E- 26/112.037-2008); CNPq (Proc. 573.601/2008-9).

## 5. Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Ferguson, A. S.; Huang, W. E.; Lawson, K. A.; Doherty, R.; Gibert, O.; Dickson, K. W.; Whiteley, A. S.; Kulakov, L. A.; Thompson, I. P.; Kalin, R. M.; Larkin, M. J. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102: 1227–1238.[\[CrossRef\]](#)
- <sup>2</sup> Jacques R. J. S.; Bento, F. M.; Antonioli, Z. I.; Camargo, F. A. O. *Ciência Rural*, 2007, 37 (4): 1192-1201.[\[CrossRef\]](#)
- <sup>3</sup> Mandri, T.; Lin, J. *African Journal of Biotechnology*, 2007, 6 (1): 023-027.[\[Link\]](#)
- <sup>4</sup> Díaz, E. *International Microbiology*, 2004, 7:173–180.[\[Link\]](#)
- <sup>5</sup> Van Hamme, J. D.; Singh, A.; Ward, O. P. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67 (4): 503-549.[\[CrossRef\]](#)
- <sup>6</sup> Widdel, F.; Rabus, R. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, 12: 259–276. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>7</sup> Boopathy R. *Bioresource Technology*, 2000, 74: 63-67.[\[CrossRef\]](#)
- <sup>8</sup> Braddock, J. F.; Lindstrom, J. E.; Yeager, T. R.; Rasley, B. T.; Brown, E. G. *Proceedings of the Exxon Valdez oil spill symposium*. Bethesda: American Fisheries Society. 1996, 18, 94-108.[\[Link\]](#)
- <sup>9</sup> Atlas, R. M. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1995, 317-327.[\[Link\]](#)
- <sup>10</sup> Crapez, M. A. C.; Borges, A. L. N.; Bispo, M. G. S.; Pereira, D. C. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência hoje*, v. 30 , nº 179, janeiro/fevereiro de 2002.
- <sup>11</sup> Maciel, B. M. Estudos prospectivos de microrganismos de solo de landfarm com potenciais aplicações em estratégias de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo. Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA, 2004.
- <sup>12</sup> Arias, M. E.; González-Pérez, J. A.; González-Vila, F. J.; Ball, A. S. *International Microbiology*, 2005, 8:13-21[\[PubMed\]](#)

- <sup>13</sup> Seo, J.; Keyn, Y; Li, Q. X. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2009, 6: 278- 309.[\[CrossRef\]](#)
- <sup>14</sup> Foght J. *Journal of Molecular and Microbiology and Biotechnology*, 2008, 15: 93–120.[\[CrossRef\]](#)
- <sup>15</sup> Ramsay, M. A.; Swannell, R. P. J.; Shipton, W. A.; Duke, N.C.; Hill, R. T. Effect of biorremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 2000, 41 (7-12): 413-419.
- <sup>16</sup> Wrenn, B. A.; Venosa, A. D. *Canadian Journal of Microbiology*, 1996, 42: 252-258. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>17</sup> Zilli, J. E.; Rumjanek, N. G.; Xavier, G. R.; Coutinho, H. L. C.; Neves, M. C. P. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, 2003, 20 (3): 391-411. [\[Link\]](#)
- <sup>18</sup> Klingler, J. M.; Stowe, L R. P; Obenhuber, D. C.; Groves, T. O.; Mishra, S. K.; Pierson, D. L. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58 (6): 2089-2092. [\[PubMed\]](#)
- <sup>19</sup> Hopper, D.J. Em: Betts, W.B. (org), *Biodegradation: Natural and Synthetic Materials*. London. Spring-Verlang Limited. 1991, 69 – 89.
- <sup>20</sup> Smith, M.R. *Biodegradation*, 1990, 1: 191–206.[\[CrossRef\]](#)
- <sup>21</sup> Leahy, J. G.; Colwell, R. R. *Microbiological Reviews*, 1990, 54 (3): 305-315.[\[PubMed\]](#)
- <sup>22</sup> Felske, A.; Wolterink, A.; van Lis, R.; de Vos, W. M.; Akkermans. A. D. L. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 30: 137-145.[\[CrossRef\]](#)
- <sup>23</sup> Nocker, A.; Burr, M.; Camper, A. K. *Microbial Ecology*, 2007, 54: 276–289. [\[CrossRef\]](#)
- <sup>24</sup> Widada, J.; Nojiri, H.;-Omori; T. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60:45–59.[\[CrossRef\]](#)
- <sup>25</sup> Committee on Metagenomics: Challenges and Functional Applications, National Research Council. (2007). *The New Science of Metagenomics: Revealing the Secrets of Our Microbial Planet*, Washington–DC, 170p. Download de: <http://www.nap.edu/catalog/11902.html>
- <sup>26</sup> Amann, R.; Ludwig, W. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24: 555-565.[\[CrossRef\]](#)

- <sup>27</sup> Hugenholtz, P.; Pace, N. R. *Reviews Tibtech*, 1996, 14: 190-197.[\[Link\]](#)
- <sup>28</sup> Ramette. A. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (8):2495–2505.  
[\[CrossRef\]](#)
- <sup>29</sup> Sklarz, M. Y.; Angel, R.; Gillor, O.; Soares, M. I. M. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2009, 96:659–664.[\[CrossRef\]](#)
- <sup>30</sup> Fisher M. M.; Triplett, E. W. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (10): 4630–4636.[\[Link\]](#)
- <sup>31</sup> Danovaro, R.; Luna, G. M.; Dell’Anno, A.; Pietrangeli, B. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72 (9): 5982–5989.[\[Link\]](#)
- <sup>32</sup> Cardinale, M.; Brusetti, L.; Quatrini, P.; Borin, S.; Puglia, A. M.; Rizzi, A.; Zanardini, E.; Sorlini, C.; Corselli, C.; Daffonchio, D. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (10): 6147–6156.[\[CrossRef\]](#)
- <sup>33</sup> Marsh, T. L. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2: 323-327.[\[CrossRef\]](#)
- <sup>34</sup> Sunnucks, P.; Wilson, A. C. C.; Beheregaray, L. B.; Zenger, K.; French, J.; Taylor, A. C. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 2000, 9: 1699–1710.[\[CrossRef\]](#)
- <sup>35</sup> Hayashi, K. *Genome Research*, 1991, 1: 34-38.[\[CrossRef\]](#)
- <sup>36</sup> Hadrys, H.; Balick, M.; Schierwatert, B. *Molecular Ecology*, 1992, 1: 55-63.[\[CrossRef\]](#)

### **3. HIPÓTESES**

#### **3.1. Hipótese 1**

A poluição por petróleo no sedimento de manguezais altera a estrutura da comunidade bacteriana autóctone, havendo um aumento das populações de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos e uma redução na diversidade. Desta forma, espera-se que um manguezal com histórico de contaminação por petróleo, como é o caso da Baía de Guanabara, apresente maior desenvolvimento da comunidade bacteriana degradadora de HPAs e menor diversidade de bactérias, quando comparada à comunidade bacteriana de um manguezal sem histórico de contaminação por petroderivados, como o de Gargaú.

#### **3.2. Hipótese 2**

Os fatores físico-químicos do ambiente, tais como pH, salinidade, granulometria, concentração de hidrocarbonetos e teores de carbono e nitrogênio exercem influência na atividade e crescimento das bactérias do sedimento. Assim, no manguezal de Gargaú, que não possui histórico de contaminação por petróleo e condições ambientais favoráveis será observada maior diversidade bacteriana do que no manguezal da Baía de Guanabara.

#### **3.3. Hipótese 3**

Diante de uma contaminação por petróleo, as bactérias do sedimento de manguezal serão selecionadas, com o favorecimento de linhagens degradadoras de hidrocarbonetos, aumentando a proporção de bactérias com capacidade degradativa e produtoras de biossurfactante entre os morfotipos isolados.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo Geral**

Avaliar a diversidade e verificar a potencialidade dos microrganismos para a degradação de compostos do petróleo e produção de biossurfactantes em dois manguezais do estado do Rio de Janeiro (Brasil); um localizado em Gargaú, na foz do rio Paraíba do Sul, município de São Francisco do Itabapoana, e outro nas proximidades da Baía de Guanabara, na cidade do Rio de Janeiro.

### **4.2. Objetivos Específicos**

i) Caracterizar os sedimentos dos manguezais estudados quanto aos seus parâmetros físicos e químicos.

ii) Verificar o perfil da diversidade bacteriana presente no sedimento dos manguezais estudados por meio da técnica de TRFLP, comparando-a com as características físico-químicas do sedimento;

iii) Comparar os níveis de contaminação por petróleo dos manguezais estudados através da análise de hidrocarbonetos nos sedimentos;

iv) Isolar bactérias que utilizem petróleo como única fonte de carbono a partir dos ambientes estudados e testar sua capacidade de produção de biossurfactantes

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Área de Estudo

#### 5.1.1. Baía de Guanabara

A Baía de Guanabara possui uma área de aproximadamente 391 km<sup>2</sup> e localiza-se entre 22° 24' e 22° 57'S e 42° 33' e 43° 19' O (Figura 3). As cidades do Rio de Janeiro, São Gonçalo, Duque de Caxias, Niterói e outras pequenas comunidades localizam-se às suas margens, constituindo o segundo maior conglomerado urbano do Brasil (mais de dez milhões de pessoas). Além de uma alta densidade demográfica, um dos maiores complexos industriais do Brasil, uma refinaria de petróleo e dois portos se localizam nas proximidades da Baía, constituindo potenciais fontes de poluição para este ecossistema (SILVA *et al.*, 2007; KJERFVE *et al.*, 1997). Apesar da expansão urbana, a Baía de Guanabara é margeada por um remanescente de florestas de mangue, que inclui a área de proteção ambiental de Guapimirim. Originalmente, a APA possuía uma área que correspondia a 28.500 hectares, restando no ano de 2009 uma área de manguezal bem preservado igual a 13.500 ha (BRITO *et al.*, 2009).

Um dos maiores problemas da Baía de Guanabara é a descarga de uma grande quantidade de efluentes domésticos sem tratamento, provenientes da área metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. Outros problemas consistem na entrada de águas residuais das indústrias concentradas em seu entorno, e a contaminação por petróleo devido ao tráfego de petroleiros, emissões atmosféricas e despejos urbanos e industriais, que somam cerca de 17 toneladas por dia (BRITO *et al.*, 2006). Em 18 de janeiro de 2000, aproximadamente 1,3 milhões de toneladas de petróleo foram derramados na Baía de Guanabara, devido a um acidente ocorrido na refinaria de Duque de Caxias, sob a administração da Petrobrás, com poluição visível ao longo de 5 km da costa. Este não foi o primeiro acidente envolvendo vazamento de petróleo ocorrido na REDUC, no entanto, foi o maior registrado. Este evento atingiu as praias adjacentes e o manguezal localizado na área de proteção ambiental de Guapimirim, que permanece preservada apesar da degradação da

Baía (BRITO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2006; MACIEL-SOUZA *et al.*, 2006).

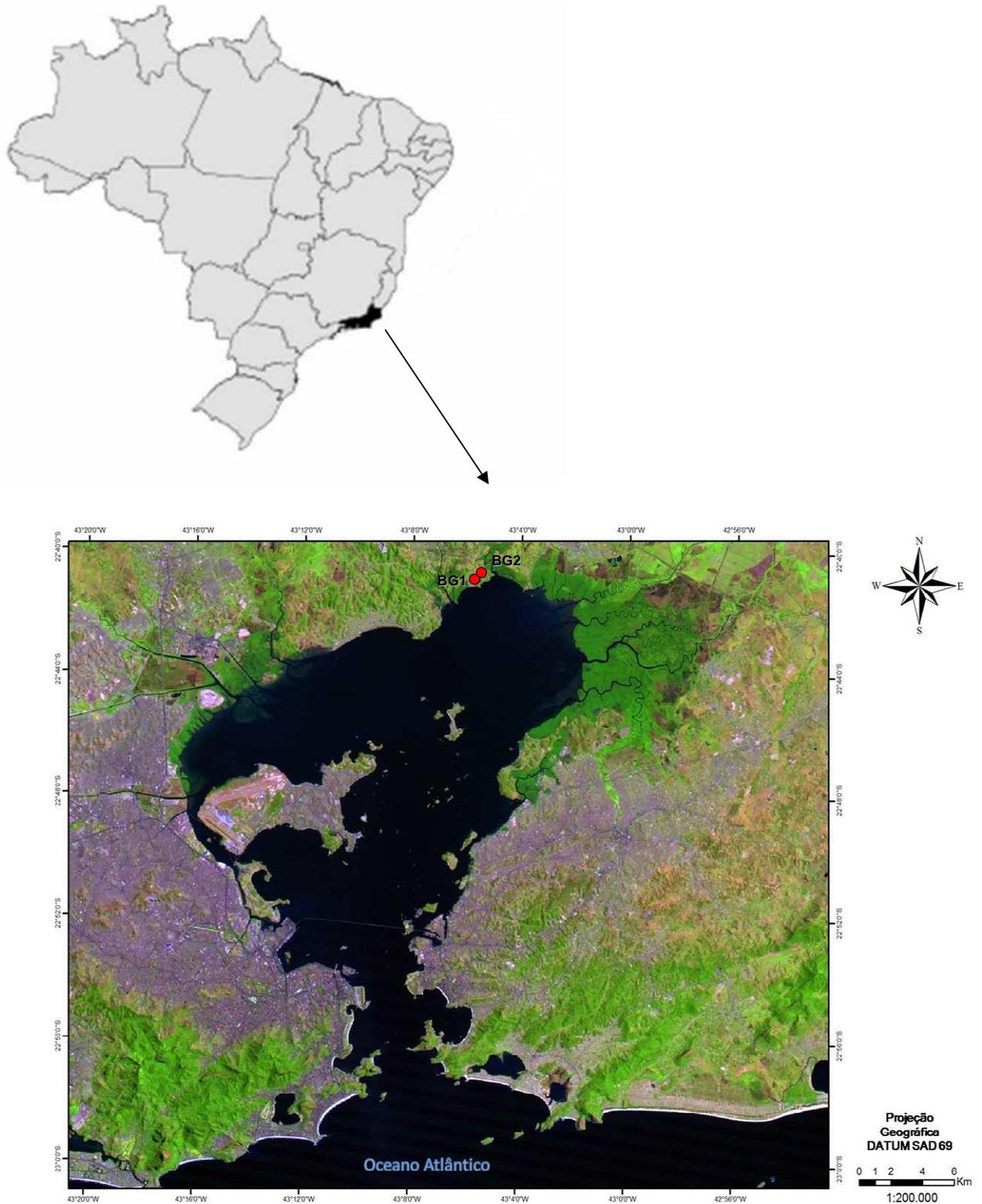


Figura 3: Mapa com a localização da Baía de Guanabara demonstrando os pontos de coleta das amostras de sedimento. Fontes: programa Landsat 2010 e Farias(2006).

### 5.1.2. Gargaú

O manguezal de Gargaú encontra-se nas coordenadas 21°36'00" S e 41°03'00" O (Figura 4) e está inserido no município de São Francisco do Itabapoana (RJ), nas proximidades do Estuário Secundário do rio Paraíba do Sul (BERNINI *et al.*, 2010; BERNINI & REZENDE, 2004). O manguezal deste estuário é o maior da região Norte Fluminense, suas florestas são compostas por *Avicennia germinans* (L.) Stearn., *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. e *Rhizophora mangle* L, tendo como espécies associadas *Acrostichum aureum* L. e *Hibiscus pernambucensis* Arruda (BERNINI *et al.*, 2010; BERNINI e REZENDE, 2004).

De acordo com o estudo realizado por BERNINI *et al.* (2010), em 1986 a área de manguezal correspondia a aproximadamente 912 hectares e, no ano de 2001, constatou-se a perda de 20% da floresta de mangue, restando cerca de 725 hectares. A degradação do manguezal de Gargaú relaciona-se principalmente ao corte seletivo de árvores e ao desmatamento causado por fazendeiros para a implantação de pastagens para a criação de gado. Além destes fatores, o crescimento da comunidade tem causado a invasão da floresta pela construção de casas e a poluição da área pelo despejo de efluentes domésticos e de lixo dentro do manguezal, uma vez que não há saneamento básico ou rede de esgoto. A ação humana tem causado ainda, a degradação do manguezal pelo despejo de efluentes industriais, construção de estradas e aterros, entre outros. (BERNINI *et al.*, 2010; BERNINI, 2008).



Figura 4: Mapa com a localização do manguezal de Gargaú, demonstrando os pontos de coleta das amostras de sedimento. Fontes: programa CBERS 2B 2010 (*China-Brazil Earth Resources Satellite*) e Farias (2006).

## 5.2. Coleta das amostras

Duas coletas de sedimento foram realizadas no ano de 2009, uma no manguezal de Gargaú, localizado no município de São Francisco do Itabapoana - RJ (21°28'25" S 41°07'12" O) e uma no manguezal da Baía de Guanabara, na cidade do Rio de Janeiro - RJ (22°54'12" S, 43°12'34" O). Amostras de aproximadamente 1000 g foram retiradas a partir da camada superior do sedimento (0 - 10 cm) durante a maré baixa, em dois locais diferentes de cada manguezal estudado, denominadas BG1 e BG2 (amostras do manguezal da Baía de Guanabara), e G1 e G2 (Gargaú). A Figura 5 representa um esquema do delineamento amostral em campo e o destino de análise dado a cada amostra.

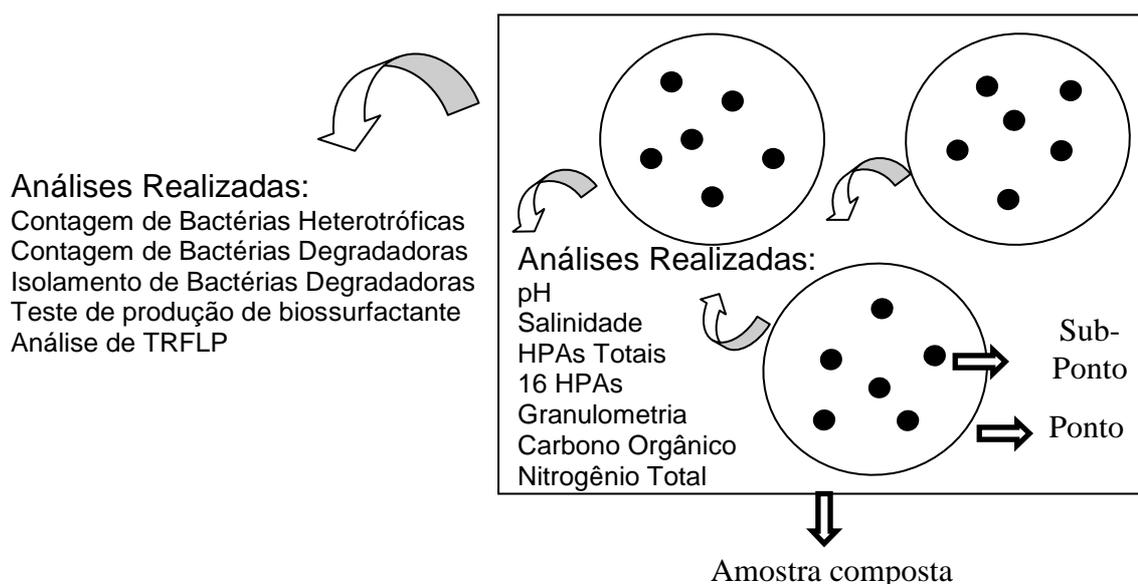


Figura 5: Delineamento amostral para cada área de estudo e análises realizadas em cada fração das amostras.

O ponto BG1 foi escolhido por se tratar de um local mais distante de habitações, e suas coordenadas de foram 22°41'145"S e 43°05'683"O, enquanto a amostra BG2 foi obtida em um local próximo de diversas casas, nas coordenadas 22°41'155"S e 43°05'921"O. A amostra G1 foi obtida em um local próximo à vila de pescadores de Gargaú (21°35'09.11"S e 41°03'39.70"O) e a amostra G2 foi coletada em um local distante da vila, minimizando a influência antrópica, nas seguintes

coordenadas: 21°36'27.85"S e 41°03'05.74"O (Tabela 2). As amostras foram acondicionadas em recipiente isotérmico contendo gelo e o transporte foi realizado, imediatamente após a coleta, para a Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), onde as amostras foram analisadas.

Tabela 2: Coordenadas dos locais de amostragem em cada um dos manguezais estudados.

<b>Local</b>	<b>Amostra</b>	<b>Coordenadas</b>	
<b>Baía de Guanabara</b>	BG1	22°41'14.5"S	43°05'6.83"O
	BG2	22°41'1.55"S	43°05'9.21"O
<b>Gargaú</b>	G1	21°35'9.11"S	41°03'39.70"O
	G2	21°36'27.85"S	41°03'05.74"O

### 5.3. Análises físico-químicas

Parte das amostras de sedimento foi destinada à análise de granulométrica, a qual foi realizada utilizando-se as amostras brutas, sem a remoção de carbonatos e matéria orgânica. A granulometria foi determinada com o auxílio do analisador de partícula por difração a laser (Shimadzu modelo SALD-3101) conforme escala Wentworth (Suggio, 1973). O aparelho é capaz de circular as partículas de alta densidade e desiguais, cobrindo uma faixa de grãos com tamanhos entre 0,05 a 3000µm. O equipamento utiliza uma alíquota de cada amostra de sedimento úmido, que é agitada em banho com ultrassom por 10 minutos para desagregação das partículas. Posteriormente, a determinação da distribuição granulométrica é realizada por difração a laser, resultante da interação do feixe de laser com as partículas (Blott et al., 2004; McCave et al., 1986). Para o controle da precisão analítica, foi aferida a variação analítica entre triplicatas de cada uma das amostras, considerando-se aceitáveis os resultados com coeficientes de variação inferiores a 10%. A exatidão foi determinada por meio da análise de três amostras certificadas

fornecidas pelo fabricante do equipamento com faixa de tamanho de partículas diferenciadas. O limite de detecção do método foi de 0,1%.

Para a realização das análises de pH e salinidade, aproximadamente 50g do sedimento foram colocados em tubos Falcon de 50 mL e centrifugados em um aparelho Hitachi, modelo Himac CF7D2, a uma rotação de 2800 rpm durante 15 minutos, a fim de separar a água intersticial para a realização das medições. As análises de pH, foram feitas com o auxílio de um pHmêtro Digimed, modelo DM- 2P. Para a avaliação da salinidade, foi utilizado um refratômetro de salinidade VEE GEE, modelo A366ATC.

As análises de carbono orgânico e nitrogênio total foram feitas utilizando-se aproximadamente 10mg da fração < 2,0 mm do sedimento seco em estufa a 60°C por 12h. O teor de nitrogênio foi determinado nas amostras brutas, enquanto o teor de C orgânico, foi avaliado depois que as amostras de sedimento foram descarboxadas utilizando HCl 1,0N por 12 h à temperatura ambiente. A determinação foi realizada no Analisador Elementar CHNS/O Perkin Elmer (2.400 Series II). Os valores foram expressos em percentual (%), sendo a precisão obtida com três repetições de cada amostra. O nível mínimo de tolerância de variação analítica dentro da mesma amostra foi igual a 90%. Os limites de detecção para foram iguais a 0,05% para o C, e de 0,04% para o N. Os testes de exatidão para C orgânico foram realizados com padrão certificado marinho NIST 2702 e revelaram recuperações superiores a 95%.

Parte da amostra foi congelada e enviada em triplicata em recipientes descartáveis de alumínio ao Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais (LABMAM), da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, onde foram feitas análises dos hidrocarbonetos. A extração dos hidrocarbonetos foi realizada com base no método EPA 3540C. Posteriormente, a fração aromática foi obtida por cromatografia líquida em coluna de sílica/alumina (7 g de alumina desativada a 2 % e 10 g de sílica desativada a 5% e em coluna de vidro de 30 cm de comprimento com 1,3 cm de diâmetro interno). Para a determinação dos HPAs, a metodologia utilizada foi a de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas, seguindo, com algumas modificações o protocolo EPA-8270D.

#### **5.4. Contagem e seleção de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de petróleo**

As amostras de sedimento foram submetidas à diluição seriada em NaCl 0,85% (de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) e plaqueadas em duplicata pelo método de esgotamento (TORTORA & FUNKE, 2005) em meio para heterotróficos totais (LI *et al.*, 2000) pH 7,0 (extrato de carne 3 – 5 g/L; peptona 10 g/L; NaCl 5 g/L; ágar bacteriológico 25 g/L) e pela técnica de *Pour Plate* (TORTORA & FUNKE, 2005) em meio seletivo para degradadores de petróleo ( $K_2HPO_4$  0,1%;  $KH_2PO_4$  0,1%;  $NH_4Cl$ , 0,1%;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05%,  $CaCl_2$  0,001%,  $FeSO_4$  0,001%) contendo 0,5% (V/V) de petróleo como única fonte de carbono e 1,5% de ágar bacteriológico como agente solidificante (LI *et al.*, 2000 modificado). As placas foram incubadas em estufa a 30° C e a contagem bacteriana foi realizada após 48 h de crescimento. Para as análises estatísticas, foram consideradas as contagens de 4 placas contendo entre 30 e 300 UFCs (TORTORA & FUNKE, 2005). Este procedimento foi realizado imediatamente após a coleta (dia 0) para a obtenção do número de bactérias heterotróficas e degradadoras de petróleo no sedimento. A seguir, 50 g das amostras foram incubadas sob agitação a 120 rpm a 28° C em frasco Erlenmeyer contendo 450 mL em meio mineral e 2% de petróleo. Procederam-se as diluições e plaqueamentos nos dias 7, 14, 21 e 28 de incubação. As amostras permaneceram incubadas durante cinco meses, quando foi observada a degradação visual do petróleo inoculado, se realizou a repetição do experimento.

#### **5.5. Avaliação da produção de biossurfactantes**

Para testar a capacidade de produção de biossurfactantes das bactérias isoladas, foram padronizados inóculos de densidade 2 com o uso do cartão de Wickerham (TOSTA, 2004), utilizando 2% de glicose como fonte de carbono para o crescimento das bactérias durante 72h em estufa a 30° C. A seguir, 100 µL de suspensão bacteriana padronizada, obtidos de cada amostra, foram inoculados separadamente em "poços" de placas de ELISA previamente preenchidos com 50 µL de óleo mineral. Após 1 minuto de reação, o resultado determinado visualmente (Figura 6). Quando houve o colapso da gota de óleo mineral o resultado foi

considerado positivo. O controle positivo foi preparado utilizando-se SDS (dodecil sulfato de sódio) no lugar das amostras.

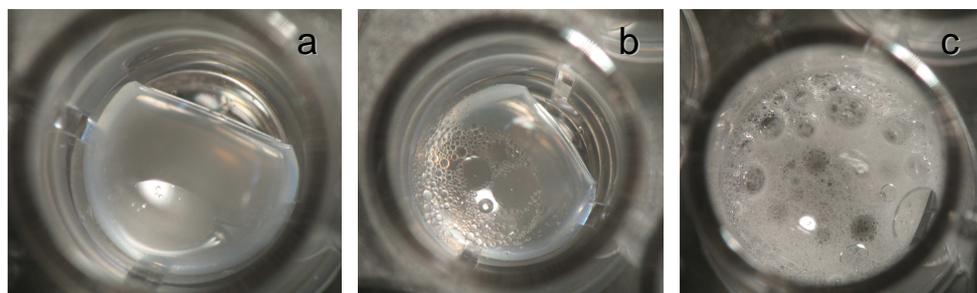


Figura 6: Resultados do teste de colapso da gota: a) resultado negativo; b) resultado positivo; c) resultado positivo com alta produção de biossurfactante.

## 5.6. Análise de diversidade bacteriana

A extração de DNA total do sedimento foi realizada através do *Kit Mobio Ultraclean Soil DNA (MO BIO LABORATORIES, SOLANA BEACH, CA)*, seguindo o protocolo do fabricante. Cada amostra foi composta por 0,3g de solo em duplicata, para assim obter uma maior quantidade de DNA.

Para amplificar os fragmentos desejados do gene ribossomal 16S, foi utilizada a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), com o uso do *HotStarTaq® Master Mix Kit (Qiagen)*, em uma reação de 20µl composta por 10µL do kit e 1µL de cada iniciador, 5µL da água do kit e 3 µL de DNA para cada amostra. O programa do termociclador (*TC 412 -Techne*) se inicia em 94° C/5 min para desnaturação; 35 ciclos de 94° C/30 seg, 52° C/30 seg, 72° C/1min e 30 seg; e para a extensão final, 72° C/10 min, com os iniciadores 27F-Fam, com a sequência 5'-AAGGAGGGWTCCARCC-3', marcado com fluorescência FAM e 1525R com a sequência 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3' (SAKANO & KERKHOF, 1998). O produto gerado pela reação de PCR foi aplicado em um gel de agarose a 1% para visualização. Em cada poço foram aplicados 10 µL de amplicom de cada amostra, 3 µL de um marcador com peso molecular conhecido *Low Mass (Invitrogen)*, e 2 µl de corante "*Blue Juice*" acrescido *Gel Red (Biotium)* para estimar os pesos dos fragmentos amplificados. Este gel foi submetido a uma corrida eletroforética com uma carga de 93 Volts em tampão TE por 30 minutos. O gel foi visualizado em um fotodocumentador *UVP DigiDoc-It Biolmaging System*.

O DNA amplificado foi digerido com a enzima de restrição Hae III (*Invitrogen*), conforme o protocolo indicado pelo fabricante para uma quantidade de 10 µL. A seguir, foi realizada a precipitação do amplicon já digerido juntamente com 24,5 µl de água deionizada, 62,5 µL de álcool etílico (95%) e 3µL de acetato de amônio 3M. Todos esses reagentes foram misturados com o amplicon e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 14000 g/30 min. O sobrenadante foi aspirado e descartado. Foram adicionados 250 µL de etanol (70%), ao *pellet* e o material foi centrifugado a 14000 g/ 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado e descartado, e o *pellet* foi mantido no microtubo, que foi colocado aberto em um termoclador a 70° C/ 15 min.

Para ressuspender o DNA, foram utilizados 14,8 µL de Hi-Di formamida com 0,2 µL de *standard Gene Scan 600 Liz* (*Applied Biosystem, Warrinton, UK*), que possibilita a formação de picos padronizados na análise de TRFLP. Essa alíquota foi aplicada em uma placa de sequenciador, e levada ao termociclador por a 95° C/ 5 min para desnaturação. A seguir as amostras foram submetidas a 1 minuto de banho de gelo. Em seguida foram aplicadas em um sequenciador *ABI 3500* (*Applied Biosystems*). de 8 capilares, onde foram gerados os eletroferogramas. Os picos gerados pela eletroforese foram submetidos a uma rápida limpeza de imagem no software *Gene Mapper 4.0*, onde foi obtida a imagem do padrão, e delineados os picos dentro de 50 a 600 pares de base (pb). A seguir, os dados foram analisados estatisticamente. A Figura 7 apresenta, de maneira sintética, um esquema com as etapas da técnica de T-RFLP.

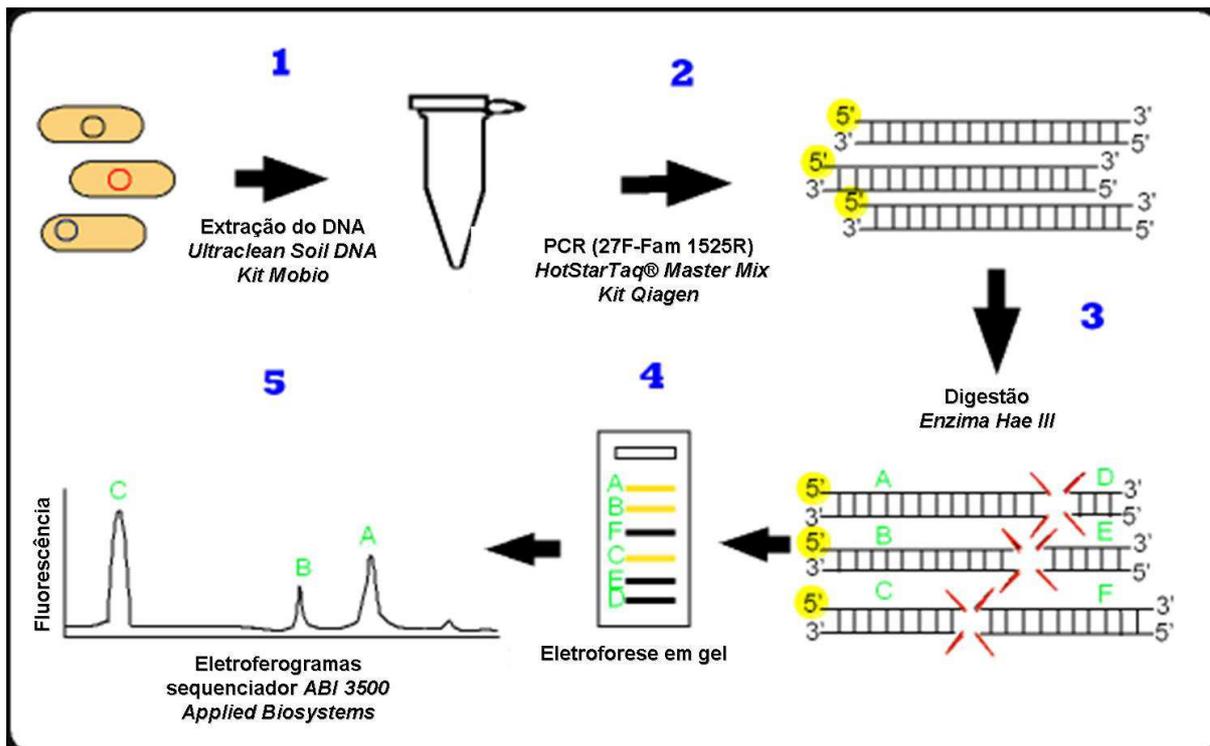


Figura 7: Modelo esquemático das etapas da técnica de T-RFLP. Fonte: [http://home.postech.ac.kr/~jaai/fig/T-RFLP\\_fig.gif](http://home.postech.ac.kr/~jaai/fig/T-RFLP_fig.gif) (modificada).

## 5.7. Análises Estatísticas

Para avaliar as interações entre as contagens de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de petróleo com as características físico-químicas nas amostras de sedimento, realizou-se uma Análise de Componentes Principais (ACP) com o auxílio do programa *Statistica for Windows 8.0* (StatSoft, 2007), com o qual foram confeccionados os gráficos desta análise. Utilizando o mesmo programa, as contagens bacterianas foram submetidas à análise de variância (ANOVA) a fim de verificar diferenças nos padrões de crescimento durante o tempo de incubação com o petróleo e foram feitos gráficos de *box-plot* a fim de demonstrar os padrões observados. Para a confecção dos gráficos de contagens de bactérias heterotróficas, degradadoras de petróleo e produtoras de biossurfactantes foi utilizado o programa *Microsoft Office Excel 2003*.

Os dados gerados pela análise de T-RFLP foram analisados por diferentes abordagens. Primeiramente avaliou-se a diversidade bacteriana nas amostras de sedimento ao longo do tempo de incubação, verificando o impacto do petróleo na

comunidade original e a sua modificação durante o processo degradativo. Para tal foi realizada uma análise de agrupamento do tipo *cluster* utilizando os dados de diversidade. Para tal, foi confeccionada uma tabela de dados binários, a partir da qual foram gerados dendrogramas utilizando o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) e o índice de similaridade de Bray-Curtis com o auxílio do programa PAST.

Os dados de diversidade e abundância foram tratados no programa *Statistica for Windows 8.0* (StatSoft, 2007) para a realização de uma ACP, a qual fornece informações sobre as semelhanças e diferenças observadas entre as amostras durante a incubação com petróleo. Posteriormente, com o uso do programa PAST, foi gerada uma matriz de diversidade, que fornece uma visualização do processo de sucessão bacteriana ao longo do experimento. Estes dados também foram utilizados pelo programa para calcular os índices de diversidade de Shannon-Weaver, ( $H'$ ) e o índice de dominância de Simpson ( $D_S$ ).

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1. Aspectos físicos e químicos**

Com a finalidade de caracterizar as áreas de manguezal estudadas, foram realizadas as análises de alguns parâmetros físicos e químicos nas amostras de sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú. Na Tabela 3 encontram-se discriminados os resultados obtidos para pH, salinidade, granulometria e os teores de carbono e de nitrogênio.

Tabela 3. Resultado das análises físico-químicas das amostras de sedimento coletadas nos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú.

Parâmetro	Amostra				
	BG1	BG2	G1	G2	
pH	7,7	7,6	6,8	6,1	
Salinidade	24	24	4	3	
Granulometria (%)	Areia	30	76	14	12
	Argila	13	6	18	20
	Silte	57	18	68	68
C <sub>org</sub> (%)	5,72	0,75	5,86	7,56	
N (%)	0,24	0,04	0,39	0,43	
Razão C/N	27,8	25,0	17,5	20,5	

Os valores de salinidade obtidos para as amostras BG1 e BG2 foram iguais a 24. Enquanto o pH foi equivalente a 7,7 para BG1, e para BG2 igual a 7,6. Os resultados encontrados para salinidade e pH no sedimento do manguezal da Baía de Guanabara são um pouco inferiores aos da água do mar, mas demonstram a influência de águas marinhas nas áreas estudadas, já que a Baía possui ligação direta com o oceano. Para as amostras do manguezal de Gargaú, G1 se localiza mais próxima do mar do que a amostra G2, portanto, G1 apresentou salinidade igual a 4 e pH igual a 6,77, valores um pouco maiores do que G2, que apresentou salinidade 3 e pH 6,09. As características de pH e salinidade das amostras de sedimento do manguezal de Gargaú são reflexo da grande influência das águas doces provenientes do rio Paraíba do Sul. De acordo com Bernini & Rezende, (2004), esta é uma peculiaridade deste ambiente, pois o manguezal é completamente inundado pela água do mar, apenas nas marés de sizígias, apresentando, assim, salinidade baixa e pH levemente ácidos.

A análise granulométrica demonstrou que os sedimentos das estações amostradas do manguezal da Baía de Guanabara são heterogêneos. A amostra BG1 apresentou em sua composição, 57% de silte, 13% de argila, 30% de areia. Para BG2, foram obtidos apenas 18% de silte e 6% de argila, enquanto a areia correspondeu a 76% do sedimento. Baseado na escala *Wentworth* (Suggio, 1973), o sedimento amostrado na estação BG1 foi classificado como silte arenoso. Entretanto, o sedimento de BG2 é composto, em sua maior parte, por grãos maiores, classificando-se como areia. A granulometria do sedimento do manguezal de Gargaú demonstrou homogeneidade entre as áreas estudadas indicando que as mesmas são ricas em partículas finas. Em sua maior parte, as amostras foram constituídas por silte, seguidos pela argila e em menor quantidade de areia. A estação G1 possui 14% de areia, 18% de argila e 68% de silte, enquanto G2 apresenta 12% de areia, 20% de argila e 68% de silte. Entretanto, a diferença é pequena e, de acordo com a escala *Wentworth*, ambos encontram-se classificados como sedimentos silte-argilosos. As características granulométricas relacionam-se com a localização dos pontos de amostragem, uma vez que, os locais mais próximos do mar tendem a possuir sedimentos pobres em grãos finos, pois estes são carregados durante a subida das marés, e se precipitam em áreas mais altas, enquanto as partículas mais grossas se acumulam nas áreas com mais próximas do mar, pois são mais pesadas.

O teor de carbono encontrado na amostra BG1 foi equivalente a 5,72%, e o de nitrogênio foi igual a 0,24% N. Para BG2, observou-se um teor de carbono igual a 0,75% e 0,04% de nitrogênio. É possível notar que BG1 possui quantidades muito maiores, tanto para o carbono, quanto para o nitrogênio do que BG2. O resultado obtido para as amostras da Baía de Guanabara era esperado, uma vez que BG1 possui granulometria mais fina, a matéria orgânica presente no sedimento tende a se adsorver aos grânulos de silte e argila presentes nesta amostra, devido à maior área superficial destas partículas. Assim, o carbono orgânico fica retido no sedimento, enquanto partículas mais grosseiras, como observado na amostra BG2, se comportam de maneira inerte quanto à matéria orgânica (Cameotra & Singh, 2009; Jacques *et al.*, 2007; Johnsen *et al.*, 2005). Para as amostras coletadas no manguezal de Gargaú, observou-se que G1 apresentou um teor de carbono equivalente a 5,86% e 0,39% de nitrogênio, enquanto G2 apresentou teor de carbono igual a 7,56% e de nitrogênio igual a 0,43%. As diferenças foram pequenas entre as amostras para estes fatores químicos. Entretanto, é possível perceber que estas características acompanham as diferenças granulométricas, visto que, G1, que possui maior quantidade de areia, possui menos carbono e nitrogênio do que G2, enquanto este apresenta maior quantidade de silte e argila.

A relação C/N permite inferir qual é a fonte de matéria orgânica responsável pelo aporte de carbono ao ambiente estudado. Assim, um valor alto, em torno de 20, como o encontrado neste trabalho, indica que a matéria orgânica das amostras é proveniente de plantas vasculares com grande quantidade de carbono e de difícil decomposição. Enquanto valores baixos, por volta de 7, demonstram que a matéria orgânica é oriunda, predominantemente, de fitoplâncton. A razão C/N calculada para as amostras de sedimento da Baía de Guanabara foi igual a 27,8 para BG1 e correspondeu a 25 para BG2. As amostras coletadas no manguezal de Gargaú apresentaram relações C/N com valores que corresponderam a 17,53, para G1, e 20,51 para G2. Os resultados aqui observados são típicos de áreas de manguezal, de uma forma genérica, visto que a decomposição bacteriana da serrapilheira das árvores de mangue constitui a principal fonte de carbono orgânico para o sedimento (Garcia *et al.*, 2007). As amostras de sedimento dos manguezais estudados foram, ainda, analisadas quanto à concentração dos compostos individuais entre os 16 HPAs prioritários e a soma dos HPAs Totais, que se encontram discriminadas na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração de HPAs nas amostras de sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú, com valores de referência (ng.g<sup>-1</sup>).

Composto (ng.g <sup>-1</sup> )	Amostras				Referências		
	BG1 (n=3)	BG2 (n=3)	G1 (n=3)	G2 (n=3)	ENB <sup>a</sup>	ENM <sup>b</sup>	LD <sup>c</sup>
<b>Naftaleno</b>	0,13 ± 0,20	0,09 ± 0,12	0,38 ± 0,37	0,79 ± 0,67	160	2100	0,02
<b>Acenaftileno</b>	0,88 ± 0,72	0,13 ± 0,18	2,10 ± 0,32	2,54 ± 0,80	44	640	0,04
<b>Acenafteno</b>	0,35 ± 0,22	<0,02	0,30 ± 0,04	0,29 ± 0,07	16	500	0,02
<b>Fluoreno</b>	0,55 ± 0,14	0,11 ± 0,15	1,25 ± 0,09	1,03 ± 0,25	19	540	0,03
<b>Fenantreno</b>	3,55 ± 0,42	1,01 ± 0,41	8,89 ± 0,18	10,5 ± 1,52	240	1500	0,05
<b>Antraceno</b>	4,95 ± 5,59	0,33 ± 0,19	3,52 ± 0,13	4,13 ± 0,94	85	1100	0,04
<b>Fluoranteno</b>	34,4 ± 27,1	7,88 ± 8,96	33,22 ± 2,81	46,8 ± 6,54	600	5100	0,02
<b>Pireno</b>	24,5 ± 18,2	4,73 ± 5,55	23,1 ± 1,69	32,1 ± 5,76	665	2600	0,06
<b>Benzo(a)antraceno</b>	48,7 ± 59,4	4,02 ± 5,01	24,6 ± 0,85	37,3 ± 4,92	261	NA	0,09
<b>Criseno</b>	78,4 ± 112,9	3,74 ± 3,12	20,3 ± 1,78	29,4 ± 3,49	384	2800	0,09
<b>Benzo(b)fluoranteno</b>	38,1 ± 35,0	6,18 ± 4,82	31,0 ± 2,96	42,9 ± 7,73	NA	NA	0,06
<b>Benzo(k)fluoranteno</b>	15,5 ± 16,6	1,74 ± 1,66	11,2 ± 0,57	14,9 ± 2,49	NA	NA	0,07
<b>Benzo(a)pireno</b>	28,8 ± 28,5	2,96 ± 3,22	22,5 ± 2,45	31,5 ± 5,76	430	1600	0,05
<b>Ideno(123-cd)pireno</b>	21,0 ± 19,0	3,92 ± 2,16	19,0 ± 2,19	27,0 ± 4,91	-	NA	0,06
<b>Dibenzo(ah)antraceno</b>	7,58 ± 6,17	1,08 ± 1,79	6,90 ± 0,73	8,96 ± 1,88	63	260	0,05
<b>Benzo(ghi)perileno</b>	16,4 ± 14,3	1,98 ± 1,83	15,3 ± 3,76	22,0 ± 3,62	NA	NA	0,04
<b>∑ 16 HPAs</b>	324 ± 343	39,8 ± 39,0	224 ± 16,9	312 ± 49,9	1332	6380	
<b>HPAs Totais</b>	489 ± 407	65,0 ± 56,1	368 ± 44,1	431 ± 65,9			

<sup>a</sup> ENB efeitos de nível baixo (Buchman, 1999); <sup>b</sup> ENM efeitos de nível médio (Buchman, 1999); <sup>c</sup> LD limite de detecção do aparelho. Os valores da tabela referem-se às médias de três réplicas amostrais ± 1 desvio padrão. Tabela adaptada de Maciel-Souza *et al.* (2006)

Uma forma de avaliar o risco potencial ao ambiente da poluição por HPAs consiste em analisar separadamente a concentração de cada um dos compostos entre os 16 HPAs prioritários. A *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA) estabelece valores-referência para cada um destes compostos com base em suas concentrações. Assim, são estimados Efeitos de Nível Baixo (ENB), no qual efeitos biológicos adversos raramente não observados no ambiente e os Efeitos de Nível Médio (ENM), que indica o nível de contaminação em que os efeitos tóxicos à biota serão observados com frequência (Buchman, 1999). As concentrações encontradas para os compostos hidrocarbônicos individuais nas áreas estudadas não representam riscos potenciais de toxicidade a estes manguezais, uma vez que os valores detectados não indicam efeitos de nível médio ou baixo para os sedimentos coletados, conforme pode ser observado na Tabela 4.

A soma das concentrações dos 16 HPAs prioritários constitui outra maneira de avaliar a possível toxicidade dos hidrocarbonetos ao ambiente. De acordo com as normas internacionais de qualidade ambiental, a USEPA (*US Environmental Protection Agency*) estabelece que uma concentração de 16 HPAs acima de 4.022  $\text{ng.g}^{-1}$  apresenta toxicidade à biota (Farias, 2006). Assim, as quantidades de HPAs obtidas neste estudo indicam que todas as amostras encontram-se abaixo do limite de toxicidade considerado tolerável, conforme proposto pela USEPA. A distribuição dos compostos hidrocarbônicos é bastante heterogênea entre as réplicas das amostras coletadas no manguezal da Baía de Guanabara. A soma dos 16 HPAs indicativos da presença de petróleo correspondeu a 324  $\text{ng.g}^{-1}$  para BG1 enquanto para BG2 foi de 39,8  $\text{ng.g}^{-1}$ . A soma de todos os hidrocarbonetos (HPAs Totais) na amostra coletada em BG1 foi igual a 489  $\text{ng.g}^{-1}$  e BG2 apresentou 65,0  $\text{ng.g}^{-1}$ . Os locais escolhidos para coleta de sedimento no manguezal de Gargaú demonstram resultados homogêneos em relação à concentração de HPAs. A amostra G1 apresentou uma concentração de 16 HPAs igual a 224  $\text{ng.g}^{-1}$ , enquanto G2 apresentou 312  $\text{ng.g}^{-1}$ . A concentração total de HPAs foi de 368  $\text{ng.g}^{-1}$  para a amostra G1, e para G2, a foi equivalente a 431  $\text{ng.g}^{-1}$ . Dados comparativos com diversos estudos, realizados em manguezais e estuários localizados em vários locais do mundo encontram-se discriminados na Tabela 5.

As concentrações obtidas em locais considerados naturais ou mais próximos das condições naturais variaram bastante. No manguezal da Baía de Sepetiba (RJ)

Maciel-Souza *et al.* (2006) encontraram valores menores do que o limite de detecção (0,02) para cada um dos 16 HPAs avaliados. Entretanto, Farias (2006) encontrou uma concentração de  $1.173 \text{ ng.g}^{-1}$  para o somatório dos 16 HPAs no manguezal de Piedade (RJ).

Os resultados obtidos por Tam *et al.*(2001) demonstraram heterogeneidade quanto à concentração de HPAs em vários manguezais de Hong Kong. Estes autores observaram que entre as áreas estudadas, havia concentrações bastante distintas de hidrocarbonetos. Além disso, relatam que em um mesmo manguezal, a quantidade de HPAs apresentou grande variação entre os pontos amostrados, como por exemplo, nos pontos de coleta no manguezal de Sai Keng, a concentração de 16 HPAs variou de 356 a  $1.811 \text{ ng.g}^{-1}$ . No mesmo trabalho, os autores encontraram uma variação de 649 a  $1.485 \text{ ng.g}^{-1}$  de 16 HPAs nos pontos amostrados no manguezal de Tolo. Para Ho Chung, sua pesquisa também registra uma grande variação entre as amostras, com uma concentração entre 1.273 e  $11.098 \text{ ng.g}^{-1}$ . E ainda, para o manguezal Mai Po, concentrações que variam de 685 a  $4.680 \text{ ng.g}^{-1}$  para os 16HPAs.

Um estudo realizado por Farias (2006), no manguezal da Baía de Guanabara, avaliou as concentrações de HPAs no sedimento quatro meses após o derrame de 2000 e realizou um monitoramento que fornece as concentrações de HPAs quatro anos após o acidente. Em sua primeira coleta, nos pontos atingidos pelo derramamento, foram registradas concentrações entre 83 e  $2.427.277 \text{ ng.g}^{-1}$  para os HPAs Totais no sedimentos superficial, e concentrações cada vez mais baixas nas camadas mais profundas. Ao longo do tempo, foi observado um decréscimo nas concentrações de HPAs Totais nas camadas superiores, e no ano de 2004 observou-se que as concentrações de HPAs Totais na superfície do sedimento haviam diminuído em 70%. Nas camadas mais profundas foi detectado um aumento da quantidade de HPAs, indicando que houve uma migração dos poluentes. Desta forma, a redução observada na camada superficial foi atribuída a processos ambientais diversos, como a remoção pelas marés, deslocamento vertical causado pela bioturbação e a degradação por microrganismos.

Farias (2006) constatou que o perfil cromatográfico de cada um dos 16 HPAs encontrados quatro meses após o acidente coincide com o óleo MF 380, que contaminou o manguezal no ano 2000. Na sua primeira coleta, apenas um dos

pontos amostrados apresentou concentração dos 16 HPAs superior ao limite proposto pela USEPA, igual a  $8.163 \text{ ng.g}^{-1}$ . Após quatro anos de estudos, foram observadas mudanças nas concentrações dos compostos, e indícios do desaparecimento de componentes mais lábeis devido aos processos físicos e químicos naturais. A concentração dos 16 HPAs na última coleta equivaleu a  $1.207,5 \text{ ng.g}^{-1}$ . Assim, seu trabalho não observa possíveis efeitos tóxicos à biota quatro anos após a ocorrência do acidente.

Maciel-Souza *et al.* (2006) encontraram concentrações de 16 HPAs até 700 vezes maiores do que aquelas obtidas no presente estudo. De acordo com estes autores, foram obtidas concentrações de 16 HPAs entre  $1.230 \text{ ng.g}^{-1}$  e  $28.300 \text{ ng.g}^{-1}$  de sedimento. Seu trabalho foi realizado no manguezal da Baía de Guanabara dezessete meses após o acidente ocorrido em 2000, no qual, foi analisado o sedimento de quatro pontos localizados em locais próximos à REDUC.

Cabe ressaltar que o trabalho de Maciel-Souza *et al.* (2006) foi realizado por volta de um ano e meio após o derramamento ocorrido na Baía de Guanabara, enquanto as coletas desta pesquisa foram realizadas nove anos depois do acidente. Além disso, os pontos de amostragem escolhidos pelos pesquisadores foram diretamente atingidos pelo óleo e se localizam a uma grande distância dos lugares amostrados neste estudo. É possível que os pontos de coleta deste trabalho tenham sido atingidos com uma menor quantidade do poluente. De acordo com Cardoso (2007), a ocorrência de processos de intemperismo resulta na redução das concentrações de poluentes nos ambientes naturais. Assim, fenômenos como a atenuação natural e a bioturbação em conjunto com as perdas abióticas, devido à evaporação, espalhamento, oxidação, dispersão e dissolução, podem justificar as baixas concentrações de HPAs encontradas nesta pesquisa. Corroborando os resultados aqui obtidos, Brito *et al.* (2009) relatam que a degradação do petróleo em manguezais consiste em um processo bastante lento, sendo influenciado diretamente pelas condições ambientais e pela atividade da microbiota. Assim, um manguezal demora aproximadamente cinco anos para se recuperar após um grande derramamento de petróleo.

Tabela 5: Concentrações de HPAs ( $\text{ng.g}^{-1}$  de sedimento seco) analisadas por pesquisadores em diversos estudos.

Área de estudo	16 HPAs	HPAs Totais	Observações importantes	Referência
Iko River (Nigéria)	6.100 – 30.310	NA	Amostras coletadas no estuário do Iko River, numa região cercada por refinarias.	Essien <i>et al.</i> (2011)
Suruí (RJ)	3.260 – 436.000	NA	Coletas realizadas seis anos após o derramamento ocorrido no ano 2000.	Fontana <i>et al.</i> (2010)
Baías de Antonina e Paranaguá (PR)	NA	1,92 – 296	Valores mínimos obtidos em um ponto com baixa quantidade de grãos finos e pouco fluxo de embarcações. Valores máximos observados em um ponto com grande fluxo de barcos.	Maceno (2010)
Fortaleza (CE)	721 – 2.235	NA	Coleta realizada no manguezal do Rio Cocó, cercado pela urbanização da cidade de Fortaleza.	Cavalcante <i>et al.</i> (2009)
Fortaleza (CE)	96– 1.859	NA	Coleta realizada no manguezal do Rio Ceará, cercado pela urbanização da cidade de Fortaleza.	Cavalcante <i>et al.</i> (2009)
Diversos Manguezais (China)	24 – 238	NA	Valor mínimo obtido no manguezal de Beihai, sem histórico de contaminação por petróleo e valor máximo obtido em Shenzhen, localizado em uma região altamente urbanizada.	Vane <i>et al.</i> (2009)
Parques Nacionais (Brasil)	3,7 – 24.430	NA	Valores máximos encontrados no Parque Nacional de Itatiaia (SP), atribuídos a fontes de contaminação locais. Valores mínimos obtidos no Parque Nacional da Serra da Bocaina (RJ) e	Meire <i>et al.</i> (2008)
Bahia (Brasil)	NA	6.352.000	Sedimento de manguezal com histórico de contaminação por petróleo	Silva (2008)
Fugong Mangrove Nature Reservation Area (China)	280 – 1.207	NA	Área de mangue sem histórico de contaminação por petróleo com vegetação dominada por <i>Kandelia candel</i> .	Tian <i>et al.</i> (2008)

Tabela 5 Cont.

<b>Área de estudo</b>	<b>16 HPAs</b>	<b>HPAs Totais</b>	<b>Observações importantes</b>	<b>Trabalho</b>
Iko River (Nigéria)	6.300 – 9.930	NA	Área impactada por derramamentos de óleo e descarga de efluentes domésticos e industriais.	Udotong <i>et al.</i> (2008)
Baía de Guanabara (RJ)	NA	1424 – 19.194	Valores mínimos obtidos no manguezal localizado na reserva de Guapimirim, e valores máximos obtidos nas proximidades da REDUC.	Gomes <i>et al.</i> (2007)
Suruí (RJ)	329 – 1.001	6.601 – 33.082	Valores mínimos obtidos um ano após o início do estudo.	Nudi <i>et al.</i> (2007)
Nova Orleans (RJ)	171 – 268	924-1.446	Valores obtidos um ano após o início do estudo.	Nudi <i>et al.</i> (2007)
Piedade (RJ)	305 - 421	615 - 792	Valores máximos obtidos um ano após o início do estudo.	Nudi <i>et al.</i> (2007)
Peteca (RJ)	337 – 630	2.550 – 6.132	Coleta realizada no ano 2004.	Nudi <i>et al.</i> (2007)
Guaratiba (RJ)	22 – 42	175 – 243	Área de mangue considerada sem contaminação por petróleo.	Nudi <i>et al.</i> (2007)
Baía de Guanabara (RJ)	77 – 7.751	NA	Valores máximos foram obtidos nas estações localizadas nas proximidades da REDUC.	Silva <i>et al.</i> (2007)
Suruí (RJ)	1.207 – 8.163	27.955 – 303.410	Valores mínimos foram obtidos quatro anos após a contaminação do ano 2000.	Farias (2006)
Nova Orleans (RJ)	202 - 299	1.899,6 – 5.778	Valores mínimos foram obtidos quatro anos após a contaminação do ano 2000	Farias (2006)
Piedade (RJ)	425 – 1.170	641 – 2.033	Valores mínimos foram obtidos quatro anos após a contaminação do ano 2000	Farias (2006)
Baía de Guanabara (RJ)	1.232 – 28.278	NA	Maiores valores obtidos dentro da REDUC e valores mínimos obtidos em um local mais distante da fonte de contaminação.	Maciel-Souza <i>et al.</i> (2006)

Tabela 5 Cont.

<b>Área de estudo</b>	<b>16 HPAs</b>	<b>HPAs Totais</b>	<b>Observações importantes</b>	<b>Trabalho</b>
Ho Chung (China)	1162 – 3.322	NA	Manguezal em região altamente impactada por efluentes domésticos e industriais.	Yu <i>et al.</i> (2005b)
Wisconsin (USA)	115.000	NA	Coletas realizadas nas proximidades do porto (South Milwaukee Harbor)	Ringelberg <i>et al.</i> (2001)
Sai Keng (China)	356 – 1.811	NA	Manguezal sem fonte visível de contaminação por HPAs.	Tam <i>et al.</i> (2001)
Tolo (China)	649 – 1.485	NA	Manguezal localizado em uma região impactada pela urbanização.	Tam <i>et al.</i> (2001)
Ho Chung (China)	1.273 – 11.098	NA	Manguezal em região altamente impactada por efluentes domésticos e industriais.	Tam <i>et al.</i> (2001)
Mai Po (China)	685 – 4.680	NA	Manguezal em região altamente impactada por efluentes domésticos e industriais.	Tam <i>et al.</i> (2001)
Ohio (USA)	1.560 – 216.830	NA	Coletas realizadas no Little Scioto River. Valores mínimos foram obtidos em pontos localizados a montante da fonte de contaminação, valores máximos observados em locais à jusante da fonte de poluição por HPAs.	Lagworthy <i>et al.</i> (1998)
Tennessee (USA)	960.000	NA <sup>a</sup>	Amostra coletada nas proximidades em local contaminado pelo vazamento de um tanque de óleo	Herbes e Scwall (1978)

<sup>a</sup>NA = não avaliado.

Jacques *et al.* (2007) e Boopathy (2000) relatam que a natureza do sedimento exerce influência direta na concentração e na distribuição dos HPAs. Segundo estes autores, sedimentos com altos teores de carbono orgânico e alta porcentagem de silte e argila possuem concentrações mais elevadas de HPAs do que sedimentos ricos em areia e pobres em matéria orgânica. No presente estudo, o sedimento da Baía de Guanabara possui histórico de poluição por petróleo, em contraste com Gargaú, que nunca apresentou nenhum caso de derramamento deste tipo de contaminante. Adicionalmente, os locais têm características granulométricas distintas, que não refletem com clareza o grau de poluição de cada área. A padronização da concentração de HPAs em relação ao teor de carbono orgânico do sedimento retira o efeito da granulometria, e facilita esta visualização.

Conforme discutido anteriormente, a amostra BG1 apresentou a maior concentração de HPAs entre as áreas estudadas, e a quantidade de HPAs obtida nas amostras de Gargaú foi muito maior do que aquela observada em BG2. No entanto, quando a concentração dos HPAs foi normalizada tomando como base a quantidade de carbono orgânico do sedimento em detrimento da sua granulometria, observa-se que, na realidade, as duas amostras da Baía de Guanabara possuem maior quantidade de HPAs do que as amostras de Gargaú. Assim, para os 16 HPAs, a maior concentração observada foi igual a  $5.664 \text{ ng.g}^{-1}\text{C}_{\text{org}}$  na amostra BG1, em segundo lugar,  $5.306 \text{ ng.g}^{-1}\text{C}_{\text{org}}$  em BG2, seguida por  $4.126 \text{ ng.g}^{-1}\text{C}_{\text{org}}$  em G2 e finalmente,  $3.822 \text{ ng.g}^{-1}\text{C}_{\text{org}}$  em G1. Isto sugere que o manguezal da Baía de Guanabara é mais impactado por derivados do petróleo do que o manguezal de Gargaú, corroborando a descrição realizada no trabalho de Brito *et al.*(2006) que relatam que a poluição por compostos do petróleo na Baía de Guanabara é conhecida e continua ocorrendo devido ao tráfego de petroleiros, emissões atmosféricas e despejos urbanos e industriais, que juntos, contribuem para a entrada diária de 17 toneladas de HPAs neste ecossistema. A Tabela 6 apresenta os cálculos para as concentrações de HPAs normalizadas nas áreas estudadas por este trabalho, comparando-as com outras pesquisas realizadas em diversas partes do mundo.

Tabela 6: Concentração de HPAs normalizadas pelo teor de carbono orgânico ( $\text{ng.g}^{-1} \cdot \text{C}_{\text{org}}$ ) nas amostras de sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú e de trabalhos realizados em outros locais por diversos pesquisadores.

Área de estudo	16 HPAs	HPAs Totais	Histórico de poluição	Referência
BG1 <sup>b</sup>	5.664	8.549	Sim	Este estudo
BG2 <sup>b</sup>	5.306	8.667	Sim	Este estudo
G1 <sup>b</sup>	3.822	6.274	Não	Este estudo
G2 <sup>b</sup>	4.126	5.701	Não	Este estudo
Iko River (Nigéria)	59.700 – 363.000	NA	Sim	Essien <i>et al.</i> (2011)
Baías de Antonina e Paranaguá (PR)	NA	8.970	Sim	Maceno (2010)
Baías de Antonina e Paranaguá (PR)	NA	58,2	Não	Maceno (2010)
Bahia (Brasil)	NA	96.242.424	Sim	Silva (2008)
Nova Orleans (RJ)	2.036 – 3.191	11.000 – 17.214	Sim	Nudi <i>et al.</i> (2007)
Peteca (RJ)	4.012 – 7.500	30.557 – 73.000	Sim	Nudi <i>et al.</i> (2007)
Guaratiba (RJ)	1.833 – 3.500	14.583 – 20.250	Não	Nudi <i>et al.</i> (2007)
Suruí (RJ)	29.596 – 217.683	685.169 – 8.090.939	Sim	Farias (2006)
Nova Orleans (RJ)	3.125,2 – 13.756,9	29.360,1 – 265.082,6	Sim	Farias (2006)
Piedade (RJ)	4.136 – 40.512	6.229 – 70.350	Não	Farias (2006)
Tolo (China)	11.307 – 25.871	NA	Sim	Tam <i>et al.</i> (2001)
Ho Chung (China)	23.839 – 207.828	NA	Sim	Tam <i>et al.</i> (2001)

<sup>a</sup> NA = não avaliado.

<sup>b</sup> Os valores referem-se aos cálculos com base nas médias obtidas na Tabela 3.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos podem ser originados de três diferentes formas. A primeira delas é a origem pirolítica, em que os HPAs são gerados pela combustão incompleta de matéria orgânica em altas temperaturas. A segunda forma possível é a degradação da matéria orgânica por processos diagenéticos. Alternativamente, há a origem petrogênica, que deriva de matéria orgânica submetida à alta pressão e temperatura, durante um longo período de tempo. E, por fim, os HPAs podem ser sintetizados durante os processos metabólicos de algas e microrganismos (Farias, 2006). É possível avaliar a origem dos HPAs presentes em uma determinada amostra com base no cálculo de alguns índices com base na concentração de compostos específicos. A Tabela 7 apresenta os índices calculados para os HPAs presentes nas amostras de sedimento dos manguezais estudados.

Tabela 7: Razões diagnósticas determinantes da origem dos HPAs calculadas para as amostras de sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú.

Razões Diagnósticas	Petróleo	Combustão	Combustão de Petróleo	Combustão de Biomassa	Mistura de Fontes	BG1	BG2	G1	G2
<b>FI/FI+Py</b>	< 0,4		0,4 – 0,5	> 0,5		0,58	0,63	0,59	0,59
<b>FI+Py/ (FI+Py+C1Py)</b>	< 0,5	> 0,5				0,70	0,76	0,82	0,85
<b>Ph+A/ (Ph+A+C1Ph)</b>		> 0,5			< 0,5	0,50	0,33	0,59	0,68
<b>A/A+Ph</b>	< 0,1	> 0,1				0,47	0,24	0,28	0,28
<b>BaA/ BaA+Ch</b>	< 0,2	> 0,35			0,2 – 0,35	0,47	0,44	0,55	0,56
<b>IP/ IP+BghiPe</b>	< 0,2		0,2 – 0,5	> 0,5		0,55	0,70	0,56	0,55
<b>S3-6anéis/ S séries alquil</b>	< 0,05		> 0,8		0,05 – 0,8	1,63	1,81	2,37	4,26

Legenda – Onde: FI = fluoranteno; Py = Pireno; C1Py = C1 pirenos; Ph = Fenantreno; C1Ph = C1 fenantrenos; A= Antraceno; BaA = Benzo(a)antraceno; Ch = Criseno; IP = Indeno(1,2,3-cd)pireno; BghiPe = Benzo(ghi)perileno.

De acordo com as razões diagnósticas, foi possível estimar que os HPAs presentes nas amostras de sedimento da Baía de Guanabara são provenientes de várias fontes, predominantemente de combustão e combustão de biomassa. Semelhantemente, os hidrocarbonetos presentes nas amostras do manguezal de Gargaú também foram originados destes tipos de fonte. Para ambos, porém, um dos índices demonstra HPAs oriundos de combustão de petróleo.

Para avaliar o nível de poluição de cada uma das áreas estudadas, faz-se necessário levar em consideração as características de cada local, além das concentrações de HPAs observadas neste trabalho somadas aos cálculos dos índices acima mencionados. Sabendo que o manguezal da Baía de Guanabara possui um histórico de contato com poluentes do petróleo, demonstrando uma poluição ambiental crônica. Desta forma, os HPAs avaliados permanecem em concentrações sub-tóxicas nos locais de coleta deste estudo. Em contraste, o manguezal de Gargaú não possui nenhum registro de poluição por petroderivados, sendo considerado ainda um local preservado. Com base em todos os fatores citados acima, é possível dizer que o grau de toxicidade dos HPAs encontrado tanto o manguezal da Baía de Guanabara quanto no de Gargaú se encontra abaixo do limite proposto pelas organizações internacionais.

Devido a processos de perda naturais, é possível que os resíduos provenientes do derramamento ocorrido no ano 2000 não tenham sido detectados neste estudo. Nudi *et al.*(2007) observaram uma redução de 75% na quantidade de HPAs na camada superficial do sedimento do manguezal de Suruí (Baía de Guanabara-RJ) entre o início de sua pesquisa em 2003 até o final das coletas, em 2004. Maciel-Souza *et al.* (2006) relatam alguns dos pontos de estudo na Baía de Guanabara com baixa quantidade de HPAs. De acordo com o trabalho destes autores, estes locais não sofreram impactos recorrentes, e a biorremediação natural havia reduzido a concentração de HPAs na área estudada. De acordo com Brito *et al.* (2009), sua área de estudo no manguezal da Baía de Guanabara não apresentava indícios de compostos remanescentes da contaminação de 2000, ou o local estudado não havia sido afetado pelo derramamento. No entanto, atividades rotineiras que ocorrem nas proximidades da Baía de Guanabara, relacionadas ao tráfego de embarcações, lavagem de taques, limpeza de motores e o despejo de resíduos domésticos e industriais são, provavelmente, responsáveis pelo nível de

contaminação observado neste trabalho. Novas entradas de HPAs no sedimento do manguezal da Baía de Guanabara também são relatadas pelo trabalho de Nudi *et al.* (2007), corroborando os resultados obtidos nesta pesquisa.

Nas amostras de sedimento do manguezal de Gargaú, a presença de compostos oriundos da combustão de petróleo pode ser atribuída a pequenos derrames de óleo de barcos de pesca e limpeza dos motores, uma vez que a comunidade residente na vila de Gargaú obtém recursos, predominantemente, por meio da pesca, com o auxílio de pequenos barcos com motor movido a diesel, além da captura artesanal de caranguejos. Segundo Bernini *et al.* (2010) a degradação do manguezal de Gargaú relaciona-se principalmente ao corte seletivo de árvores, ao desmatamento para a implantação de pastagens para a criação de gado e aterros para urbanização.

A Figura 8 mostra a Análise de Componentes Principais (ACP) para os fatores físico-químicos e contagens iniciais de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de petróleo para as amostras de sedimento coletadas nos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú. A ACP realizada para as amostras de sedimento demonstrou que dois fatores são capazes de explicar cerca de 84% da variação dos dados. Assim, o Fator 1 explica aproximadamente 64%, enquanto o Fator 2 é responsável por 20%. De acordo com a Figura 6a, o teor de silte e argila apresentou correlação positiva com o carbono orgânico, o nitrogênio total e os HPAs Totais ( $r_s= 0,933$ ;  $r_s= 0,962$  e  $r_s= 0,599$ , respectivamente), e os HPAs Totais com o carbono orgânico ( $r_s= 0,610$ ). Os 16HPAs, constituindo parte dos HPAs Totais, conforme esperado, também apresentam correlação positiva com estes fatores. Todos os fatores descritos acima se correlacionaram negativamente com a areia, enquanto a salinidade e o pH apresentaram correlação positiva com esta ( $r_s= 0,790$  e  $r_s= 0,701$ , respectivamente). Outros estudos relatam que os sedimentos com granulometria mais fina possuem maiores concentrações de matéria orgânica e nitrogênio, e que, devido à sua alta hidrofobicidade, os HPAs tendem a se adsorver às partículas de silte e argila, explicando os resultados obtidos neste trabalho (Cameotra & Singh, 2009; Jacques *et al.*, 2007; Johnsen *et al.* 2005; Mater *et al.*, 2004).

O pH apresenta correlação positiva com a salinidade ( $r_s=0,927$ ), uma vez que as águas de rios, com baixa salinidade, possuem um pH mais ácido. Os manguezais com maior influência fluvial possuem baixa salinidade e a predominância de grãos

finos em seu sedimento. Em contrapartida, os sedimentos mais grosseiros localizam-se em regiões mais próximas do mar, apresentando altos valores de salinidade. As contagens de bactérias heterotróficas totais apresentam correlações muito baixas com os fatores avaliados. Isto pode demonstrar que há outros fatores, não explorados neste trabalho que influenciam a quantidade de bactérias no sedimento dos manguezais. A quantidade de bactérias degradadoras de petróleo apresentou correlação positiva com o teor de grãos finos ( $r_s=0,687$ ), com o nitrogênio ( $r_s=0,797$ ), o carbono orgânico ( $r_s=0,695$ ), conseqüentemente, a contagem de degradadoras de petróleo esteve negativamente correlacionada com a areia ( $r_s= -0,684$ ), a salinidade ( $r_s= -0,858$ ), e o pH ( $r_s= -0,617$ ). Estes valores confirmam que as bactérias degradadoras necessitam de condições adequadas de salinidade, pH e concentração de matéria orgânica para o seu desenvolvimento (Jacques *et al.*, 2007; Johnsen *et al.* 2005; Boopathy 2000). Entre si, as contagens bacterianas possuem baixa correlação positiva, com  $r_s=0,246$ . Maiores detalhes sobre este parâmetro serão descritos adiante, nos tópicos 6.2 e 6.3.

A Figura 8b separa as áreas de estudos de acordo com os parâmetros analisados. Assim, as amostras G1 e G2 comportaram-se como um grupo homogêneo, que se relaciona negativamente com a amostra BG2 da Baía de Guanabara devido as características muito distintas de pH, salinidade, granulometria, teores de carbono, nitrogênio e concentrações de 16 HPAs e HPAs Totais. Através da proximidade dos pontos que representam as amostras, é possível perceber que as características do sedimento de Gargaú não demonstram grandes variações entre as réplicas analisadas, enquanto nas amostras da Baía de fica nítida a distância entre as réplicas de BG1 e BG2 devido à heterogeneidade das características ambientais da área de estudo. A amostra BG1 apresentou uma grande variação nas características físico-químicas entre as réplicas coletadas.

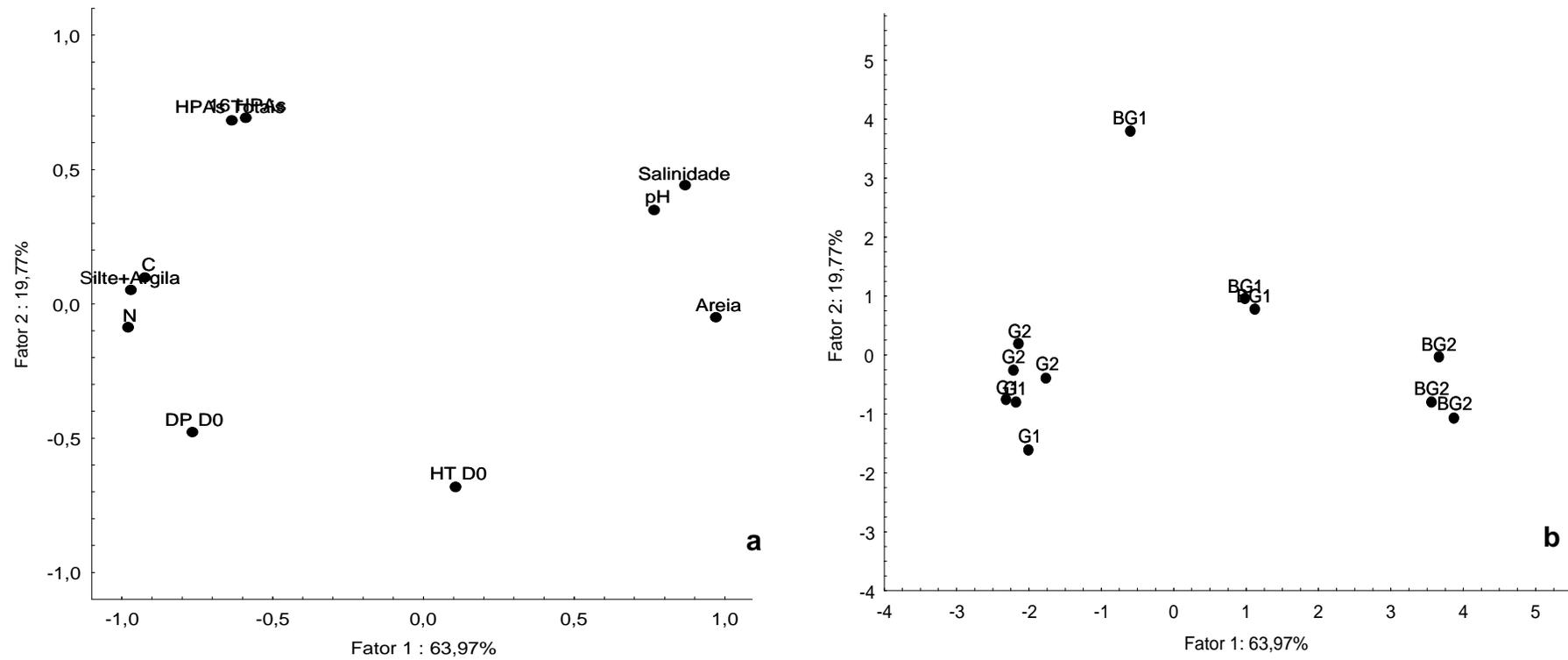


Figura 8: Análise de componentes principais para os fatores físico-químicos e contagens iniciais de bactérias heterotróficas totais (HT) e degradadoras de petróleo (DP) das amostras de sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara (BG1 e BG2) e de Gargaú (G1 e G2).

## 6.2. Contagens de bactérias heterotróficas totais

O crescimento em placa de bactérias heterotróficas totais (HT) para a amostra BG1 apresentou um valor mínimo de  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento seco, observado no  $D_0$ , enquanto o valor máximo foi registrado no 28º dia de incubação, e correspondeu a  $10^{11}$  UFC.  $g^{-1}$ . Houve uma queda na contagem de HT e, entre os dias 150 e 178 do experimento, observou-se, então, que os valores permaneceram entre  $10^8$  e  $10^{10}$  UFC.  $g^{-1}$ . Para BG2, observou-se uma contagem inicial de  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$  e um máximo de  $10^{10}$  UFC.  $g^{-1}$ , registrado no 28º dia de incubação. A contagem de HT se manteve constante entre os dias 150 e 178, permanecendo na ordem de  $10^8$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento seco. Para as amostras de sedimento do manguezal de Gargaú, observou-se que G1, apresentou uma contagem de HT de  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento seco no momento inicial, com o crescimento máximo de  $10^{10}$  UFC.  $g^{-1}$ , registrado aos 28 dias de experimento. A partir dos 150 dias de incubação, a contagem de heterotróficos diminuiu, se mantendo constante até o final do período de incubação, em  $10^6$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento seco. A amostra G2 apresentou uma contagem inicial de HT na ordem de  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento, e o valor máximo, na ordem de  $10^{10}$  UFC.  $g^{-1}$ , obtido no 28º dia de experimento. No decorrer do tempo de incubação, a contagem diminuiu novamente, permanecendo na ordem de  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$  entre os dia 150 e 178, quando o período experimental terminou (Figura 9).

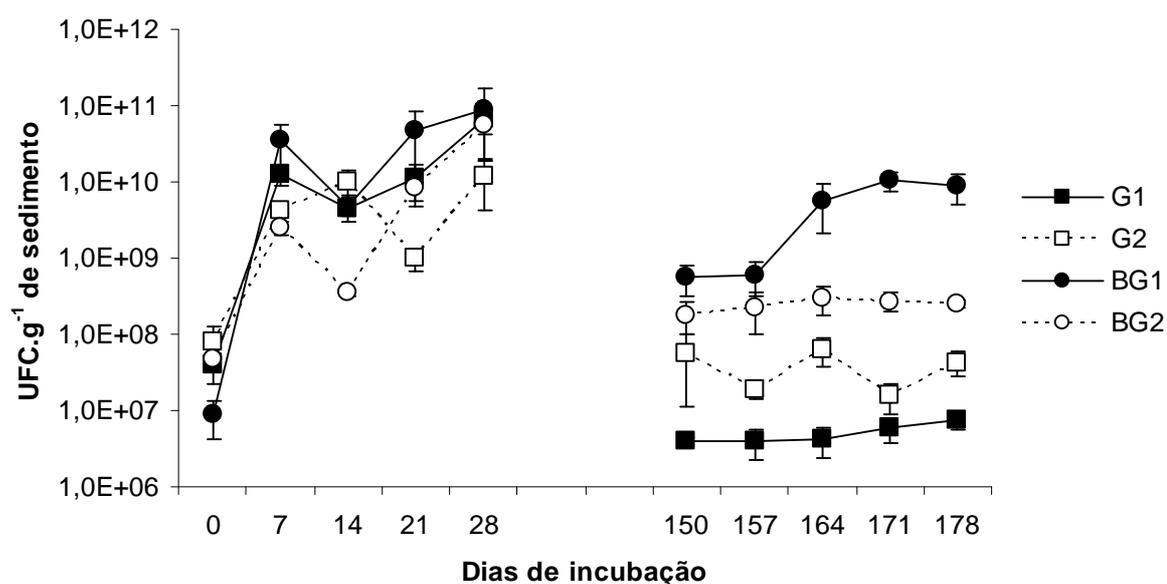


Figura 9: Médias e respectivos desvios-padrão das contagens bacterianas em placas com meio de cultura para heterotróficos totais.

A contagem inicial de heterotróficos totais foi a menor registrada na BG1 e BG2, crescendo a partir do 7º dia e se mantendo mais alta do que a inicial durante todo o experimento. É possível perceber que, entre os dias 7 e 28, as contagens tiveram um aumento bastante pronunciado, e uma queda no período entre 150 e 178 dias, em que o crescimento bacteriano permanece, entretanto, maior do que o valor inicial entre uma e duas ordens de grandeza para BG1 e em uma ordem de grandeza para BG2. Adicionalmente, nota-se que BG1 possui maior contagem bacteriana durante esta fase, do que os outros três locais estudados. Entre as amostras de Gargaú, nota-se que G1 e G2 apresentaram comportamentos semelhantes às amostras da Baía de Guanabara, entretanto, a diminuição na contagem de HT ocorrida entre os dias 150 e 178 para estas amostras foi maior, sendo registrados, inclusive, valores uma ordem de grandeza menores do que as contagens iniciais. E ainda, que neste período, as contagens de G2 são maiores do que as de G1, permanecendo na ordem de  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$ .

O experimento realizado por Wetler (2006) em um manguezal preservado no sul da Bahia demonstrou uma contagem inicial de HT na ordem de  $10^8$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento. Após cinco meses de incubação com petróleo, a autora obteve uma contagem de  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento. Maciel-Souza *et al.* (2006) observaram em um local não contaminado, uma contagem inicial de heterotróficos na ordem de  $10^8$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento. Enquanto nos pontos de coleta localizados no manguezal da Baía de Guanabara, Maciel-Souza *et al.* (2006) obtiveram contagens de HT em torno de  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$  a  $10^8$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento. Entretanto, estes autores não fizeram incubação com petróleo.

Em um manguezal da Austrália, Ramsay *et al.* (2000) realizaram um estudo em que a contagem bacteriana foi avaliada diante da adição de óleo cru, e da contaminação seguida de biorremediação *in situ*. Estes pesquisadores observaram que, nos pontos utilizados como controle, as contagens de HT permaneceram na ordem de  $10^6$  a  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$  durante todo o período do experimento. Nos pontos em que houve biorremediação e naqueles em que houve adição de óleo, foi detectado um aumento na ordem de  $10^2$  UFC.  $g^{-1}$  durante o período de aeração (120 dias), após este, o número de HT dos pontos com óleo e biorremediados diminuiu de  $10^9$  para  $10^8$  UFC.  $g^{-1}$ , mas as contagens permaneceram maiores do que os pontos controle.

Os valores iniciais obtidos pelos autores supracitados foram próximos àqueles encontrados no presente trabalho, que estiveram na ordem de  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$  UFC. Para a contagem realizada aos 150 dias, os valores aqui obtidos também são consistentes com o trabalho de Wetler (2006) e Ramsay *et al.* (2000). Em um manguezal com histórico de contaminação por hidrocarbonetos, localizado no estado da Bahia, Silva (2008) observou uma enumeração inicial de bactérias heterotróficas que foi menor do que aquelas obtidas nesta pesquisa em duas a três ordens de grandeza. Seu trabalho relata contagens iniciais na ordem de  $10^4$  a  $10^5$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento seco.

Para detectar possíveis diferenças entre as contagens de bactérias heterotróficas nas amostras coletadas em função do local de estudo, efetuou-se uma ANOVA, que demonstrou diferença significativa com  $p < 0,001$ . De acordo com o teste de Duncan, foi possível observar que as contagens possuem um mesmo padrão ao longo do tempo para todos os locais estudados, dividindo o trabalho em três grupos característicos durante o período experimental. Assim, se observam, primeiramente, a contagem inicial, que corresponde às bactérias heterotróficas aeróbias cultiváveis, presentes na amostra de sedimento antes da adição do petróleo. A seguir, com a entrada do poluente no frasco de incubação, é possível notar um aumento significativo nas contagens de HT, que permanece entre os dias 7 e 28 do experimento, sugerindo que o petróleo foi utilizado de maneira eficiente por bactérias autóctones como fonte de carbono. Em um terceiro momento, percebe-se uma diminuição estatisticamente significativa, em que o número de bactérias heterotróficas retorna aos valores próximos aos iniciais (Figura 10).

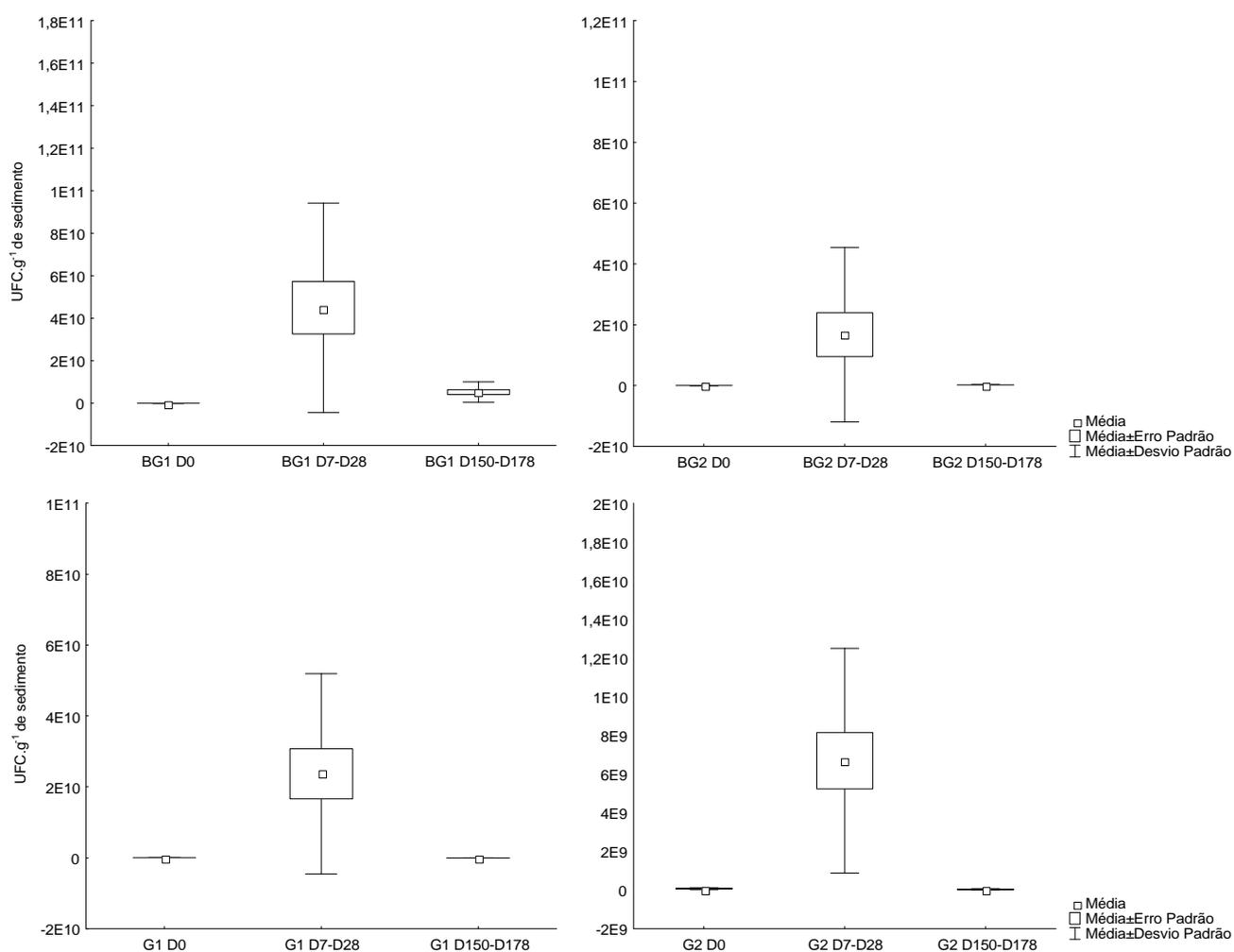


Figura 10: *Box-plots* demonstrando as contagens de bactérias, provenientes do sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú, cultivadas em meio para heterotróficos totais.

O padrão obtido para as contagens de bactérias heterotróficas totais deste trabalho foi semelhante àquele observado por Kaplan e Kitts (2004). Estes autores avaliaram a degradação do petróleo durante 168 dias, no solo de um campo de petróleo. As contagens de heterotróficos totais mantiveram-se na ordem de  $10^7$  a  $10^8$  UFC. g<sup>-1</sup> de sedimento seco, durante todo o período experimental. Estes autores observaram que, durante os primeiros 21 dias de experimento, houve rápida degradação dos hidrocarbonetos pelas bactérias autóctones, e com isto, uma elevação na contagem de heterotróficos totais, devido à dominância de espécies degradadoras de petróleo. De acordo com seu estudo, cerca de 37% da degradação do petróleo ocorreu durante os primeiros 21 dias, portanto, este período foi considerado como uma fase de degradação rápida, em que houve um aumento da

biomassa bacteriana em resposta à elevada oferta de carbono, proveniente dos hidrocarbonetos. Assim, a comunidade de bactérias apresentou elevado crescimento de poucas espécies, com comprovada capacidade de degradação de petróleo, que dominaram a comunidade, enquanto a diversidade foi baixa. Estes autores observaram, ainda, que a fase de rápida degradação é sucedida por uma fase de degradação lenta, em que os compostos de alto peso molecular remanescentes levam a uma diminuição na abundância e aumento na diversidade bacteriana. Assim, é possível que no presente estudo, algumas espécies bacterianas tenham se mantido com número elevado durante os primeiros 28 dias utilizando os compostos mais leves do petróleo, que são degradados com maior facilidade, enquanto outras espécies foram excluídas por competição ou, alternativamente, estas espécies podem possuir maior sensibilidade ao poluente, tendo seu crescimento inibido pela toxicidade de algumas substâncias. Com o esgotamento das fontes de carbono mais lábeis durante o longo período de incubação, permaneceram os compostos de maior peso molecular, que têm menor biodisponibilidade e caracterizam-se por sua difícil e lenta degradação. Houve, então, uma redução na contagem devido à carência de substrato, uma vez que, no processo de degradação microbiana do petróleo, os compostos recalcitrantes tendem a ser metabolizados por último (Brito *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009; Ke *et al.*, 2005; Harayama 1997).

Leahy & Colwell (1990), relatam que, em um eventual derrame de hidrocarbonetos, os consórcios microbianos respondem à elevada oferta de carbono com um crescimento exponencial, ocorrendo uma vantagem seletiva para as cepas que possuem plasmídeos que codificam enzimas para a degradação, resultando na degradação dos hidrocarbonetos mais suscetíveis no aumento da ocorrência destes plasmídeos na comunidade. Um estudo efetuado por Zhou *et al.* (2009), mostrou que tanto a concentração, quanto o tempo de exposição aos HPAs causam uma redução da diversidade microbiana. Segundo Brito *et al.* (2006), em ambientes naturais, microrganismos utilizam preferencialmente outras fontes de carbono, que são degradadas com maior facilidade do que os poluentes do petróleo. Assim, o derrame de um poluente pode resultar em um aumento seletivo na comunidade bacteriana, em que as linhagens com capacidade para degradar o composto são favorecidas e linhagens sem tal capacidade são inibidas. Alternativamente, o contaminante pode levar à redução na contagem de microrganismos dependendo da

sua concentração e do seu grau de toxicidade. Diante da poluição por petróleo, pode ocorrer um aumento das populações capazes de se adaptarem às condições do ecossistema e um decréscimo das que são sensíveis ao poluente. As informações dos autores supracitados sugerem que a contagem de bactérias heterotróficas desta pesquisa teve seu aumento inicial atribuído ao crescimento de linhagens com capacidade de metabolizar compostos do petróleo. Com a degradação das frações mais leves do poluente e a presença de compostos de elevado peso molecular, resultantes do processo metabólico, a abundância de bactérias diminuiu devido à carência de fonte energética para seu crescimento.

### **6.3. Contagens de bactérias degradadoras de petróleo**

Entre as amostras coletadas na Baía de Guanabara, observou-se uma contagem inicial de  $10^5$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento seco para BG1, e valor máximo de  $10^{10}$  UFC.  $g^{-1}$ , registrado no 21º dia da incubação. A partir do 28º dia, é possível perceber uma queda no número de bactérias degradadoras, e a estabilização entre os dias 164 e 178, permanecendo em  $10^6$  UFC.  $g^{-1}$ . A amostra BG2, apresentou um número inicial de  $10^5$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento seco, e o valor máximo também foi  $10^{10}$  UFC.  $g^{-1}$ , observado no dia 21, com declínio no dia 28 para  $10^8$  UFC.  $g^{-1}$ . Após este período a contagem de bactérias degradadoras continuou caindo, oscilando de  $10^6$  a  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$ . Para as amostras de sedimento coletadas no manguezal de Gargaú, foram observadas contagens iniciais de  $10^6$  UFC.  $g^{-1}$  para a amostra G1, e o valor máximo, de  $10^9$  UFC.  $g^{-1}$ , foi registrado no 7º dia de experimento. As contagens de bactérias degradadoras permanecem altas até o 21º dia, e se inicia o declínio no 28º. Entre os dias 150 e 178, o crescimento de bactérias degradadoras variou de  $10^5$  UFC.  $g^{-1}$  a  $10^6$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento. A amostra G2, apresentou uma contagem de  $10^6$  UFC.  $g^{-1}$  no primeiro dia do experimento e o crescimento máximo de colônias ocorreu no sétimo dia de incubação ( $10^8$  UFC.  $g^{-1}$ ). Para esta amostra também foi observado o declínio na contagem a partir do 28º dia, e entre os dias 150 e 178, os valores, mantiveram-se entre  $10^6$  e  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento.

Os resultados apresentados na Figura 11 demonstram que as contagens bacterianas em meio contendo petróleo sofreram um pronunciado aumento quando

o petróleo foi introduzido no frasco que continha o sedimento. A partir do sétimo dia as contagens apresentaram uma grande elevação, e assim permaneceram até o 28º dia. A partir do dia 28 iniciou-se uma fase de declínio, tendendo à estabilidade no final do experimento, com as contagens retornando a valores próximos ao número inicial. Após a degradação visual do poluente, a contagem bacteriana diminuiu, possivelmente, por escassez de fontes de carbono. Este comportamento ocorreu para todas as amostras analisadas, e se assemelhou àquele observado para as contagens de bactérias heterotróficas, podendo indicar que, a princípio, o petróleo estimulou o crescimento de algumas espécies degradadoras, demonstrando que as bactérias autóctones do sedimento dos manguezais estudados são capazes de utilizar o petróleo como única fonte de carbono e energia para seu crescimento (Bugg & Winfield, 1998), apresentando assim, grande interesse biotecnológico, visto que a biodegradação bacteriana constitui, segundo Santos *et al.* (2011) a melhor maneira de remediar sedimentos de manguezais contaminados com petróleo.

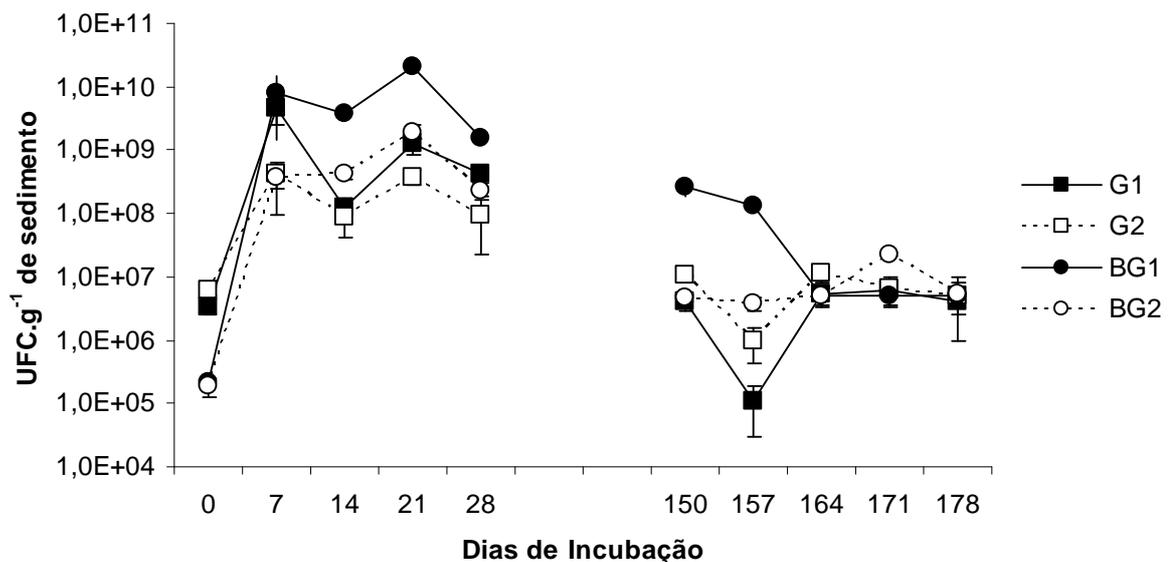


Figura 11: Médias e respectivos desvios-padrão das contagens bacterianas em placas com meio seletivo para degradadores de petróleo.

As contagens de bactérias degradadoras de petróleo observadas em sedimento de manguezal por Yu *et al.* (2005a) foram da ordem de  $10^4$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento seco. Em seu estudo, Ramsay *et al.* (2000) também encontraram uma contagem para bactérias degradadoras correspondente a  $10^4$  UFC.  $g^{-1}$  nos pontos controle em todo o período experimental. Este trabalho encontrou contagens iniciais

um pouco maiores de bactérias degradadoras, provavelmente porque os estudos citados acima foram realizados em regiões temperadas, enquanto este trabalho foi desenvolvido em um país tropical, com temperaturas mais elevadas, que favorecem o crescimento bacteriano (Santos *et al.*, 2011).

No estudo de Ramsay *et al.* (2000) foi observado um aumento nas contagens de  $10^4$  UFC.  $g^{-1}$  para  $10^6$  UFC.  $g^{-1}$  a  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento nos locais onde houve adição de óleo e biorremediação respectivamente, durante o período de aeração. Após o período de aeração, a contagem de bactérias degradadoras diminuiu, retornando a valores entre  $10^4$  a  $10^5$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento. Este padrão também foi observado no presente trabalho, uma vez que, a adição de petróleo e nutrientes ao frasco de incubação resultou em um aumento da população de bactérias. De maneira semelhante ao trabalho de Ramsay *et al.* (2000), após o estímulo inicial, nesta pesquisa também houve uma diminuição na contagem de bactérias degradadoras, que tiveram a tendência de retornar aos números observados inicialmente.

A pesquisa de Maciel-Souza *et al.* (2006), demonstrou contagens iniciais em torno de  $10^5$  UFC.  $g^{-1}$  para um manguezal sem histórico de contaminação por petróleo e de  $10^6$  UFC.  $g^{-1}$  para áreas contaminadas com petróleo na Baía de Guanabara. Igualmente, Wetler (2006) obteve uma contagem inicial de bactérias degradadoras de petróleo na ordem de  $10^5$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento, para um manguezal não contaminado, e após 150 dias de incubação com o poluente, foram observadas contagens entre  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$  e  $10^8$  UFC.  $g^{-1}$ . Este trabalho demonstrou resultados semelhantes às pesquisas dos autores acima. Foram registradas contagens iniciais na ordem de  $10^5$  a  $10^6$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento, e após 150 dias de incubação, os valores ficaram entre  $10^5$  e  $10^7$  UFC.  $g^{-1}$  de sedimento. Desta forma, os dados aqui obtidos, corroboram as pesquisas de Maciel-Souza *et al.* (2006) e Wetler (2006).

A ANOVA, realizada para as amostras de sedimento coletadas nos manguezais da Baía de Guanabara e de Gargaú, detectou diferenças significativas para as contagens bacterianas nas placas com meio para degradadores de petróleo ( $p < 0,001$ ) ao longo do experimento. O teste de Duncan foi utilizado como pós-teste, a fim de identificar médias com diferenças estatisticamente significativas entre as médias analisadas. A Figura 12 demonstra que as contagens de bactérias

degradadoras apresentaram o mesmo padrão observado para as bactérias heterotróficas, dividindo-se, igualmente, em três períodos, a saber, i) inicial, observado no dia 0, antes da incubação do sedimento com o petróleo, que se caracteriza pelo número de bactérias degradadoras de petróleo cultiváveis presentes nas amostras de sedimento; ii) fase de crescimento, após a adição do petróleo ao sedimento, observada entre o 7º e 28º dia, em que a presença dos compostos lábeis do petróleo servem como fonte de carbono, estimulando o aumento da população de bactérias degradadoras e, finalmente, iii) a fase de declínio, compreendida entre os dias 150 e 178 do experimento, em que as contagens de bactérias tendem a retornar aos valores iniciais devido à presença de compostos do petróleo com alto peso molecular, que são de difícil biodegradação.

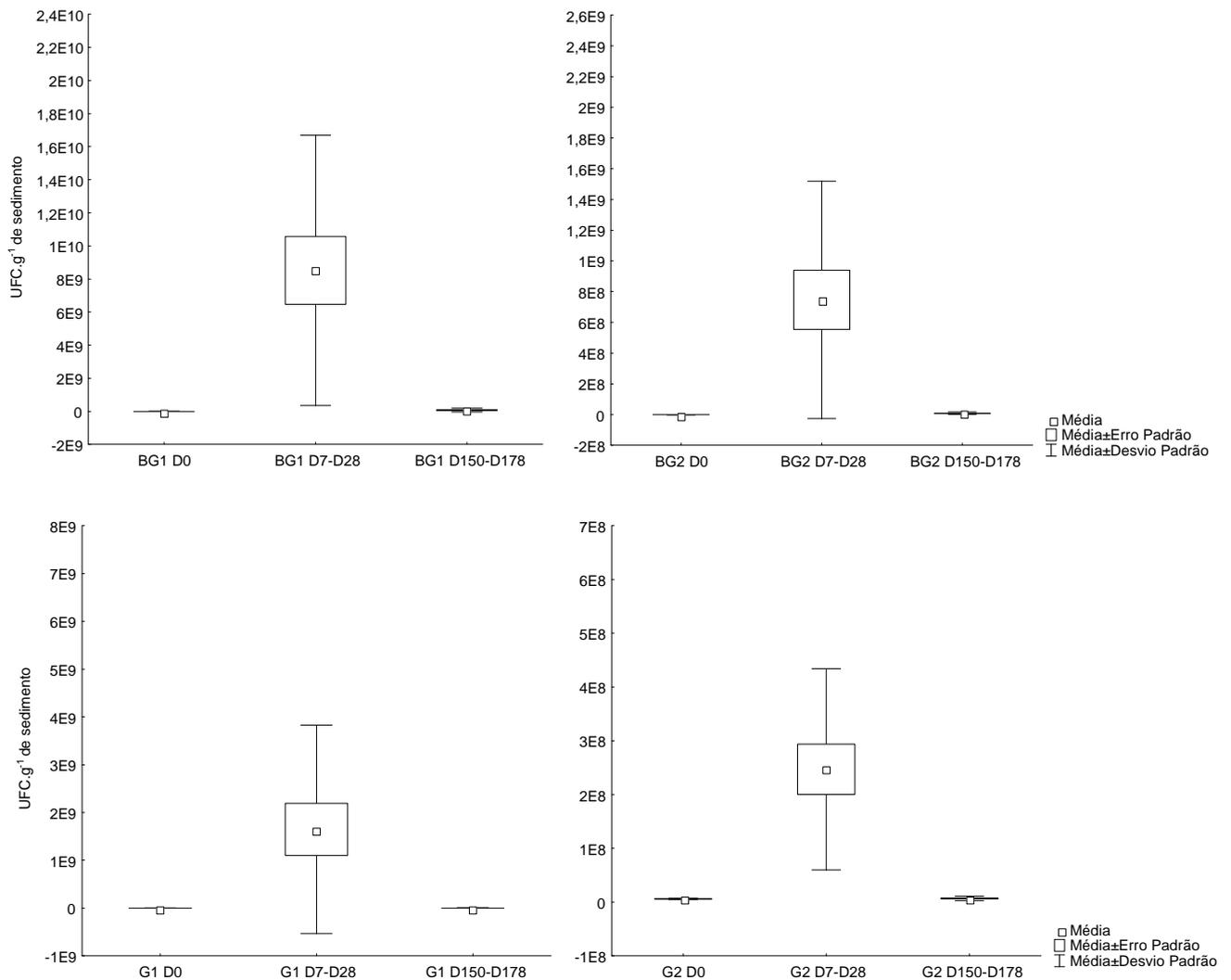


Figura 12: *Box-plots* demonstrando as contagens de bactérias, provenientes do sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú, cultivadas em meio seletivo para bactérias degradadoras de petróleo.

Brito *et al.* (2006) relatam que, durante a degradação do petróleo por bactérias, compostos mais lábeis são metabolizados primeiramente, resultando em um rápido aumento das populações de bactérias degradadoras, enquanto compostos de alto peso molecular possuem degradação difícil, uma vez que poucas espécies possuem a capacidade de degradá-los devido à sua baixa disponibilidade às bactérias. Desta forma, tais substâncias, são metabolizadas por último e mais lentamente, reduzindo as populações degradadoras. Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram as descrições de Brito *et al.* (2006); Ke *et al.*, (2005) e Kaplan e Kitts (2004), demonstrando que, inicialmente, o petróleo serviu como fonte extra de carbono para as bactérias com capacidade degradativa, resultando em um notável aumento da sua abundância durante as primeiras semanas de experimento. Entretanto, o processo de degradação do petróleo ao longo da incubação, levou à redução das populações de bactérias degradadoras em virtude da escassez de substrato de crescimento, uma vez que os compostos biodisponíveis são consumidos primeiro, resultando na presença de compostos recalcitrantes, que servem como fonte de carbono para poucas linhagens bacterianas. Além disso, alguns dos compostos derivados do metabolismo de poluentes petrogênicos podem ser tóxicos aos microrganismos, inibindo seu crescimento (Yu *et al.*, 2005b; Kanaly *et al.*, 2000; Harayama, 1997).

Considerando-se que o meio de cultura para heterotróficos totais permite acessar o total da comunidade de bactérias que podem ser cultivadas em placas, e que o meio seletivo para degradadores de petróleo irá fornecer a proporção da comunidade bacteriana capaz de utilizar petróleo como única fonte de carbono, é possível fazer uma estimativa da relação entre o total de bactérias cultiváveis e, dentre estas, a porcentagem das bactérias degradadoras ao longo do experimento. Para tal, foram estabelecidos como referência, o dia 0, que corresponde à comunidade bacteriana autóctone do sedimento dos manguezais estudados; seguido pelos dias 7 e 28, que se referem ao início e final do período de crescimento, respectivamente. Finalmente, seguem-se o dia 150 demonstrando o final da incubação, que marca o momento em que o petróleo foi visualmente degradado (Figura 13).

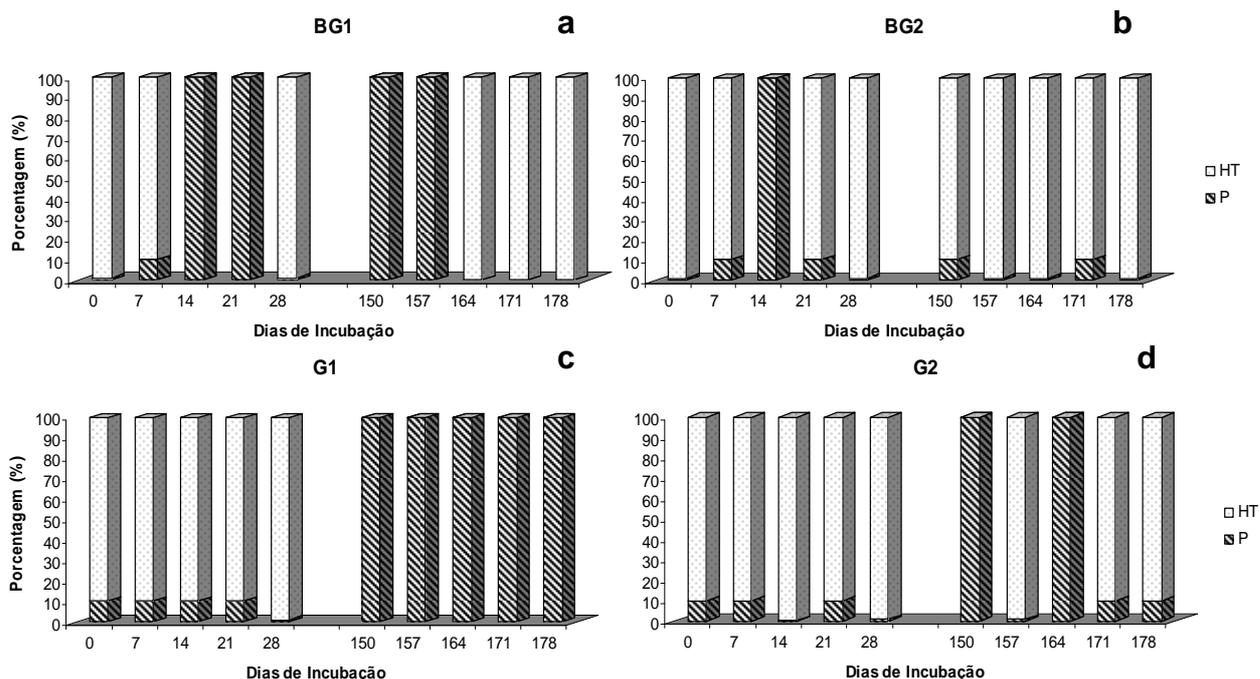


Figura 13: Porcentagem das bactérias degradadoras de petróleo (DP) em relação ao total de bactérias heterotróficas totais (HT) para as amostras de sedimento coletadas nos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú.

As amostras BG1 e BG2 possuíam inicialmente uma proporção de bactérias degradadoras de petróleo correspondente a 1% do total de bactérias cultiváveis no sedimento (Figura 13a e 13b). Com a adição do petróleo ao frasco de incubação, observou-se um aumento expressivo, e a comunidade bacteriana degradadora passou a responder por 10% do total das bactérias cultiváveis. As amostras da Baía de Guanabara apresentaram um mesmo padrão, em que o crescimento das bactérias degradadoras foi estimulado pela presença do petróleo, corroborando o trabalho de Zhou *et al.* (2009).

Entre as amostras do manguezal de Gargaú, observa-se que, de maneira surpreendente, as bactérias degradadoras corresponderam a 10% do total da comunidade bacteriana cultivável antes da incubação com petróleo (Figura 13c e 13d). Os dados aqui observados contradizem a afirmação de Atlas (1981), que, em ecossistemas não poluídos, as populações de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos representam menos de 0,1% da comunidade. Em contrapartida, Bugg & Winfield (1998) registram que ecossistemas de manguezal possuem grande concentração de hidrocarbonetos aromáticos naturais em seu sedimento. Assim, as

bactérias autóctones podem metabolizar o petróleo como fonte de carbono utilizando as vias de degradação destes compostos, justificando a capacidade de crescimento de microrganismos nativos em presença de petróleo.

Após 7 dias em presença de petróleo, não foi observado aumento na porcentagem de bactérias degradadoras para as amostras de Gargaú, que permaneceu em 10%. Vale ressaltar, no entanto, que no 7º dia do experimento, todas as amostras apresentaram aumentos significativos, tanto na contagem de heterotróficos totais, quanto na contagem de degradadores de petróleo, portanto, o fato de que a comunidade de degradadores permaneceu em 10% do total de cultiváveis, significa que sua contagem aumentou de maneira proporcional, juntamente com os heterotróficos totais nestas amostras, enquanto para as amostras da Baía de Guanabara, o aumento de bactérias degradadoras foi mais expressivo do que o de heterotróficos.

No 28º dia de incubação observa-se para todas as amostras uma queda na proporção de bactérias degradadoras, passando para 1% do total da comunidade cultivável. É possível que neste momento, a presença de compostos tóxicos resultantes do metabolismo do petróleo tenha inibido o crescimento das espécies degradadoras, reduzindo sua abundância na comunidade (Santos *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2009; Mater *et al.* 2004). No entanto, aos 150 dias de experimento, quando o petróleo foi visualmente degradado, observa-se um novo aumento das populações degradadoras, chegando a representar 100% do total de bactérias cultiváveis para as amostras BG1, G1 e G2 e equivalendo a 10% para BG2. Assim, houve um padrão diferente para as amostras de sedimento estudadas, em que algumas apresentaram maior crescimento de bactérias degradadoras de petróleo do que outras, além das características iniciais distintas quanto à comunidade bacteriana indígena. Estes resultados sugerem que, tanto as características do sedimento, quanto o tipo de hidrocarboneto presente irão influenciar a dinâmica e a composição da comunidade bacteriana autóctone, estimulando algumas espécies, e inibindo o crescimento de outras dependendo de sua sensibilidade ao poluente e de sua capacidade de metabolizá-lo. Santos *et al.* (2011) relatam que as condições físico-químicas do ecossistema podem afetar a atividade bacteriana e influenciar sua capacidade degradativa. Nota-se que as amostras que apresentaram grande crescimento de bactérias degradadoras possuem granulometria mais fina, que

favorece a aderência da matéria orgânica e das bactérias, uma vez que estas, normalmente tendem a formar biofilmes aderidos às partículas do sedimento, estas condições são favoráveis à sua multiplicação. Em contrapartida, BG2 apresenta uma pequena porcentagem de grãos finos, levando a uma limitação do crescimento bacteriano.

#### **6.4. Avaliação da produção de biossurfactantes**

O teste de colapso da gota para avaliação da produção de biossurfactante pelas bactérias foi realizado apenas com as colônias isoladas a partir das placas contendo petróleo. Para tal, foram feitos estoques das colônias com características morfológicas distintas de coloração, tamanho e/ou textura, ou seja, morfotipos distintos.

Para a amostra BG1, foi obtido um total de 58 morfotipos durante os primeiros 28 dias de incubação do sedimento com petróleo, destes, 30 foram capazes de produzir biossurfactante, equivalendo a aproximadamente 52% do total. Entre os dias 150 e 178 do experimento, foram isoladas 103 colônias, dentre as quais, 58% apresentaram capacidade de produção de biossurfactante. Assim, foram obtidos 161 morfotipos bacterianos isolados, com capacidade de utilizar petróleo como única fonte de carbono, destes, aproximadamente 56% demonstraram capacidade de produção de biossurfactante utilizando glicose como substrato de crescimento. Isolaram-se 65 colônias durante entre o primeiro e o 28º dias de incubação do sedimento com petróleo para BG2, destas, 30 morfotipos produziram biossurfactante pelo teste de colapso da gota em óleo mineral, equivalendo a aproximadamente 46% das colônias isoladas.

A amostra BG2 foi analisada no período entre 150 e 178 dias de experimento, obtendo-se 128 colônias capazes de utilizar petróleo como substrato, dentre as quais, 81 produziram biossurfactante. Assim, após a degradação visual do petróleo no frasco de incubação, observou-se que 63% das colônias isoladas demonstraram capacidade de produção do emulsificante. Desta forma, o total de morfotipos degradadores de petróleo isolados foi igual a 193; entre estes, obteve-se 111

colônias capazes de produzir biossurfactante utilizando glicos, aproximadamente 58% (Tabela 8).

Tabela 8: Resultados do teste de colapso da gota e número total de colônias isoladas em placas contendo petróleo para as amostras de sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú.

Dias de incubação	BG1		BG2		G1		G2	
	Isolados*	+**	Isolados	+	Isolados*	+**	Isolados	+
D0	17	10	12	8	16	1	14	4
D7	6	3	25	6	12	1	7	1
D14	20	7	7	2	10	5	14	7
D21	10	6	7	5	5	2	12	7
D28	5	4	14	9	17	4	19	6
D150	16	9	3	2	17	10	14	11
D157	22	15	33	18	15	9	20	9
D164	18	10	21	11	23	13	21	16
D171	29	18	51	35	15	9	18	14
D178	18	8	20	15	19	5	21	13
Total	161	90	193	111	149	59	160	88

Legenda: \*Total= total de colônias isoladas / \*\*+ = número de colônias com resultado positivo para produção de biossurfactantes

Durante os primeiros 28 dias de experimento, a amostra G1 apresentou um total de 60 isolados, dos quais, 13 apresentaram capacidade de produzir biossurfactante, aproximadamente 22%. Entre os dias 150 e 178 de incubação obteve-se um total de 89 colônias isoladas, e destas, 46 produziram biossurfactante utilizando glicose como substrato de crescimento, que correspondem a aproximadamente 52% do total de isolados. Durante todo o experimento, foram isoladas 149 colônias de bactérias degradadoras de petróleo, das quais, 59 apresentaram capacidade de produção de biossurfactante.

Para a amostra G2, foi possível isolar 66 morfotipos de bactérias degradadoras entre o início do experimento até o 28º dia de incubação, destas,

aproximadamente 32% apresentou resultado positivo para produção de biossurfactante. Entre 150 e 178 dias de experimento, foram isoladas 94 colônias, das quais, 63 produziram biossurfactante pelo teste de colapso da gota. O total de morfotipos bacterianos degradadores de petróleo isolados foi igual a 160, dentre estes, 88 foram capazes de produzir biossurfactante pelo teste de colapso da gota.

A partir dos 150 dias de incubação, foi observado um pequeno aumento na quantidade de morfotipos de bactérias degradadoras de petróleo isolados, e um aumento mais pronunciado na porcentagem de produtores de biossurfactantes. É provável que neste período do experimento, haja o predomínio de compostos hidrocarbônicos de alto peso molecular. De acordo com Brito *et al.* (2009), as substâncias mais pesadas dentre os constituintes do petróleo, são as últimas a serem metabolizadas pelas bactérias durante o processo de degradação. Assim, o aumento no número de bactérias produtoras de biossurfactantes pode funcionar como um indicador da presença destes compostos, que necessitam da produção de um tensoativo que torne possível sua assimilação pela microbiota (Nitschke & Pastore, 2002). Isto indica que, durante o processo de degradação do petróleo, os compostos gerados agem como selecionadores da comunidade bacteriana, estimulando o crescimento de linhagens com capacidade de produção de biossurfactantes, uma vez que este tipo de metabólito constitui uma importante ferramenta na degradação dos HPAs do petróleo, diminuindo sua hidrofobicidade e, por consequência, tornando-os mais biodisponíveis à microbiota (Cameotra & Singh, 2009; Mariano *et al.*, 2007; Ron & Rosenberg, 2001)

É importante salientar que os sedimentos de manguezais são ricos em HPAs de origem natural, como a lignina, a celulose e o tanino e, de acordo com Harayama (1997), um número limitado de microrganismos é capaz de degradar HPAs com quatro ou mais anéis aromáticos, pois sua biodegradação é limitada pela sua baixa disponibilidade, devido à sua elevada hidrofobicidade (Ke *et al.*, 2005). Segundo Boopathy (2000) e Ganeshalingam *et al.* (1994), a aplicação de surfactantes como agentes de solubilização pode ser uma maneira de aumentar a disponibilidade de HPAs aos microrganismos. Brito *et al.* (2009) observaram a emulsificação do petróleo em um sistema de microcosmos após uma semana de experimento devido à atividade de um consórcio microbiano inoculado no sedimento contaminado. Este tipo de emulsão indica que a degradação do petróleo está ocorrendo, pois a

emulsificação é considerada parte do processo de biodegradação, em que as bactérias produtoras de tensoativos utilizam tais produtos para reduzir a tensão interfacial do óleo, formando micelas que diminuem o tamanho das gotas de óleo e facilitam sua assimilação.

A Figura 14 mostra o total de morfotipos bacterianos isolados de placas contendo petróleo durante os primeiros 28 dias e entre os dias 150 e 178 de incubação com o poluente, além das colônias com resultado positivo para produção de biossurfactante pelo teste de colapso da gota para as amostras de sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e de Gargaú.

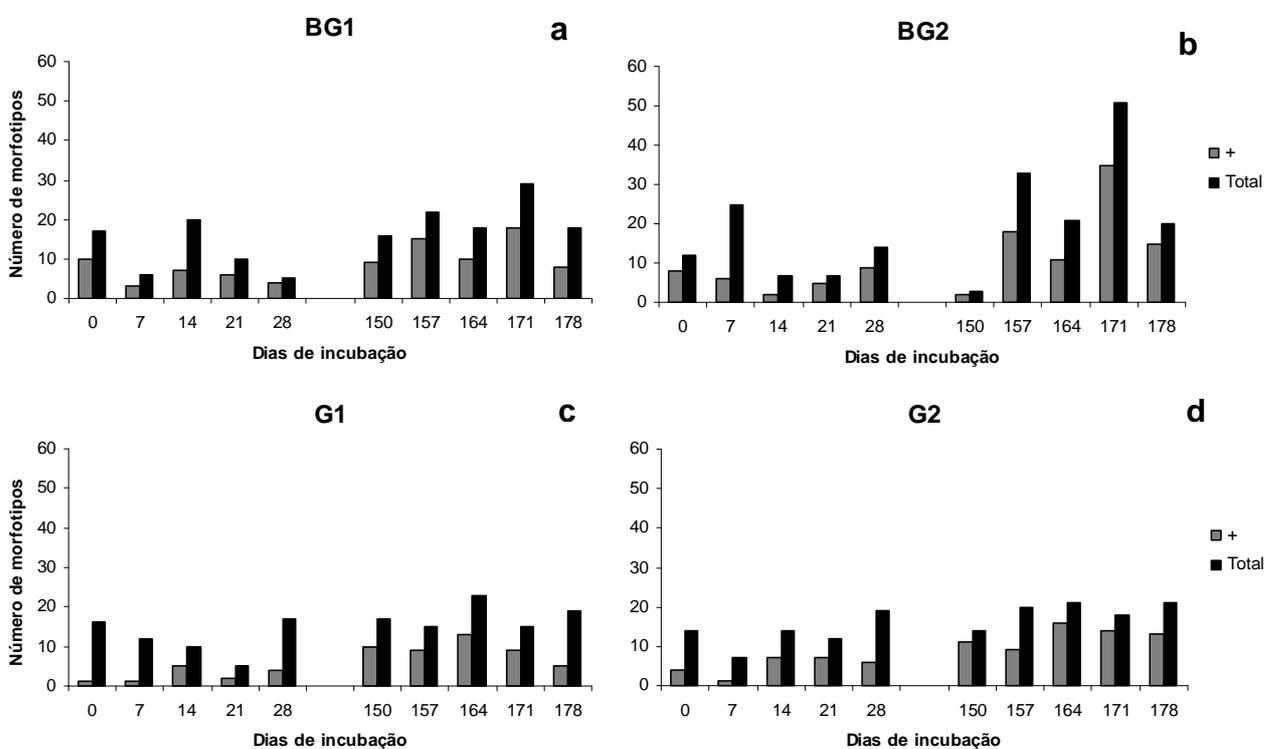


Figura 14: Total de morfotipos bacterianos isolados de placas contendo petróleo e bactérias com resultado positivo (+) para produção de biossurfactante nas amostras de sedimento coletadas nos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú.

Com base na Figura 14a e 14b, observa-se que a amostra BG1 possui maior diversidade inicial de morfotipos do que a amostra BG2. Conforme relatado por Jacques *et al.* (2007), sedimentos com granulometria mais fina, como é o caso de BG1, possuem maior diversidade e maior quantidade de bactérias do que sedimentos mais grosseiros devido à sua maior área superficial e adsorção de água

e matéria orgânica, que são fatores físico-químicos favoráveis à sobrevivência e multiplicação bacteriana. Além disso, a granulometria também exerce influência na sorção dos hidrocarbonetos, selecionando as bactérias capazes de metabolizar os contaminantes do petróleo (Zhou *et al.*, 2009).

Durante os primeiros 28 dias de incubação, é possível perceber que a quantidade de morfotipos degradadores de petróleo permanece baixa, de uma maneira geral, para todas as áreas, o que indica uma baixa diversidade bacteriana com alta contagem em placas. Em contrapartida, no período entre os dias 150 e 178 de experimento, o número de morfotipos se eleva, e a contagem diminui em relação aos primeiros dias, indicando que a diversidade aumentou e a dominância diminuiu. De acordo com Braddock *et al.* (1996) e Atlas (1995), as populações de microrganismos degradadores constituem, normalmente, uma proporção baixa do total das comunidades microbianas em ambientes não impactados por petróleo. Mas, quando poluentes derivados do petróleo estão presentes, estas populações aumentam, podendo corresponder até a 100% da comunidade de bactérias viáveis no ecossistema.

Durante o período entre os dias 150 e 178, houve um aumento da proporção de morfotipos produtores de biossurfactante, indicando que a incubação com o petróleo propiciou o crescimento de várias linhagens de bactérias degradadoras, uma vez que a produção deste metabólito é uma característica comum durante a degradação do poluente. Bodour *et al.* (2003), observaram por meio de análise filogenética que há uma grande diversidade entre os microrganismos produtores de biossurfactantes, e isto indica que a produção desses metabólitos constitui uma importante ferramenta para a sobrevivência desses microrganismos no ambiente. Assim, diante da contaminação, as linhagens com capacidade de produção de biossurfactante tendem a aumentar.

Os resultados obtidos para as bactérias isoladas e produtoras de biossurfactante confirmam o trabalho de Kaplan e Kitts (2004), em que se observam algumas espécies degradadoras que foram favorecidas no início do experimento e dominaram a comunidade bacteriana com uma alta densidade de células, e ao final da incubação, aumentou o número de espécies degradadoras, diminuindo a contagem, como foi possível notar no experimento anterior. Além disso, o aumento no número de produtores de biossurfactantes sugere que a população degradadora

foi selecionada pelos compostos de alto peso molecular, devido à necessidade de solubilização prévia para que sejam metabolizados pelas bactérias (Seo *et al.*, 2009; Cameotra & Singh, 2009; Mariano *et al.*, 2007; Bodour *et al.*, 2003; Ron & Rosenberg, 2001).

A capacidade de produção de biossurfactantes observada para as bactérias isoladas a partir do sedimento dos manguezais da Baía de Guanabara e de Gargaú sugerem que estas, possuem potencial utilidade em processos de biorremediação, uma vez este tipo de metabólito apresenta grande importância do ponto de vista aplicado, proporcionando o desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos a fim de remediar impactos ambientais causados pela contaminação oriunda do petróleo e seus derivados.

#### **6.5. Análise de diversidade bacteriana com base na técnica de T-RFLP**

As amostras de sedimento dos manguezais estudados foram analisadas com a técnica de T-RFLP, por meio da qual, foram obtidos dados de diversidade e abundância das bactérias presentes no sedimento no momento da coleta e após a sua incubação com o petróleo. Posteriormente, com o uso do programa PAST, foram calculados os índices de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ), e dominância de Simpson ( $D_S$ ) para as amostras de sedimento sem adição de petróleo, e periodicamente, após a incubação com este contaminante.

Nas Figuras 15 e 16 é possível constatar que o sedimento coletado nas duas estações do manguezal de Gargaú apresentou, inicialmente, maior diversidade bacteriana e menor dominância de espécies do que o sedimento obtido nas estações da Baía de Guanabara. A amostra G1 apresentou  $H'= 3,81$  e  $D_S= 0,04$ ; G2 apresentou  $H'= 3,46$  e  $D_S= 0,04$ ; enquanto para BG1 foram obtidos  $H'= 3,00$  e  $D_S= 0,06$  e para BG2 o  $H'$  foi igual a 2,78 e o  $D_S$  correspondeu a 0,07. Para o índice de diversidade, foram constatados valores maiores do que os iniciais em vários momentos da incubação entre as amostras da Baía de Guanabara. No entanto, as amostras de Gargaú apresentaram queda na diversidade após a adição do petróleo, e os valores de  $H'$  se mantiveram mais baixos do que os iniciais durante a maior parte do tempo, com exceção apenas dos dias 120 e 150 para a amostra G2. O

contato com poluentes do petróleo e as características ambientais, como a grande quantidade de areia e a salinidade elevada são fatores que contribuem para a redução na diversidade bacteriana de um ambiente, explicando assim, a menor diversidade observada inicialmente nas amostras da Baía de Guanabara. Corroborando os dados obtidos nesta pesquisa, o trabalho de Alonso-Gutiérrez *et al.* (2009) demonstrou que a diversidade bacteriana sofreu redução logo depois da poluição por petróleo, sendo recuperada um ano após a ocorrência da contaminação *in situ*. Entretanto, houve uma profunda mudança na composição das espécies, com predomínio de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos após o contato com o poluente. De maneira semelhante, a pesquisa de Pucci *et al.* (2011) avalia a diversidade bacteriana de um local preservado antes e após o contato do sedimento com o petróleo. Seus resultados demonstraram uma redução na diversidade a partir do quarto dia de exposição ao poluente, entretanto, 102 dias após o acidente estes autores observaram um aumento na diversidade.

Após sete dias de incubação com o petróleo, observa-se que houve uma queda na diversidade e aumento na dominância para todas as amostras, exceto para BG2, na qual foi constatado aumento da diversidade bacteriana e redução da dominância. Röling *et al.* (2002) também observaram a redução da diversidade e aumento de dominância, seis dias depois da adição do petróleo ao sedimento, em sistemas de microcosmos. Entretanto, dos Santos *et al.* (2011) relatam aumento na diversidade após 23 dias de contato do sedimento de manguezal com 2% petróleo em sistema de microcosmos. Os resultados destes autores corroboram os desta pesquisa, indicando que a resposta da comunidade bacteriana ao estresse causado pela inserção do poluente varia de acordo com o local de estudo e com suas características físico-químicas. Alonso-Gutiérrez *et al.* (2009) relatam que a diversidade bacteriana é influenciada pelo tipo de substrato de crescimento, assim, locais com granulometria mais fina tendem a possuir maior diversidade do que aqueles que possuem grãos com partículas mais grosseiras. Conforme descrito anteriormente, as amostras de Gargaú e as de BG1 apresentaram sedimento com maior teor de grãos finos do que a amostra BG2. Este sedimento apresenta dificuldade em reter matéria orgânica; sua tendência é possuir, inicialmente, menor diversidade do que as outras amostras. Assim, a introdução de petróleo de maneira artificial promoveu o crescimento de linhagens bacterianas com capacidade de

utilizá-lo como fonte de carbono. Entretanto, nas amostras de granulometria fina, as fontes de carbono mais lábeis são utilizadas preferencialmente para o crescimento das bactérias, e a entrada do poluente causou uma inibição de seu crescimento, selecionando apenas bactérias degradadoras. Este resultado pode ser reforçado pelas contagens de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de petróleo, apresentadas anteriormente, uma vez que se observa um aumento significativo no número de bactérias com capacidade de degradar petróleo a partir do sétimo dia de experimento. Wetler (2006) relata que o petróleo é capaz de selecionar bactérias degradadoras. Seu trabalho descreve que poucas bactérias isoladas de um sedimento sem contato com petróleo apresentavam habilidade de crescer utilizando BTX (benzeno, tolueno e xileno) como fonte de carbono. No entanto, após a incubação do sedimento com petróleo, foi constatado um aumento na quantidade de isolados com capacidade degradativa.

Não é possível dizer que a diversidade e dominância de espécies bacterianas apresentaram um mesmo padrão entre as áreas estudadas. Entretanto, pode-se afirmar que todas as amostras demonstraram modificação nas espécies que constituem a comunidade ao longo do tempo de incubação, com o desaparecimento de alguns filotipos, e o surgimento de outros no eletroferograma. Isto sugere que o processo de degradação do petróleo gera diversos compostos, que, para serem metabolizados, dependem de espécies bacterianas diferentes. Alguns filotipos aparecem durante um período, desaparecendo posteriormente. Alguns, que estavam presentes inicialmente no sedimento, desaparecem após a adição do petróleo, e tornaram a surgir com a sua degradação. Outros, entretanto, não aparecem antes da incubação com o petróleo, surgindo no eletroferograma apenas quando o poluente foi adicionado ao sedimento. Desta forma, é possível dizer que a presença do petróleo pode inibir ou estimular o crescimento de algumas espécies de bactéria, e que durante o processo degradativo ocorre uma sucessão de populações bacterianas, que são provavelmente, influenciadas de acordo com os compostos gerados ou degradados no meio (Tabela 9). Segundo Pucci *et al.* (2011) e Röling *et al.* (2002), a poluição de um sedimento com petróleo provoca mudança na composição de espécies bacterianas, assim é possível encontrar índices de diversidade semelhantes antes e depois da contaminação, entretanto, as espécies que contribuem para esta diversidade são diferentes. Em sua pesquisa, Alonso-

Gutiérrez *et al.* (2009) demonstram que diferentes tipos de sedimento podem ter uma composição de espécies bacterianas semelhante, entretanto, diante da poluição, os compostos do petróleo irão direcionar mudanças na comunidade bacteriana de maneira diferente para sedimentos finos e grosseiros. A alteração da composição bacteriana após seu contato com o petróleo pode ser demonstrada pelo surgimento e pela depleção de filotipos nos perfis de T-RFLP durante a incubação do sedimento com o poluente. Alguns destes filotipos, juntamente com suas características encontram-se descritos na Tabela 9.

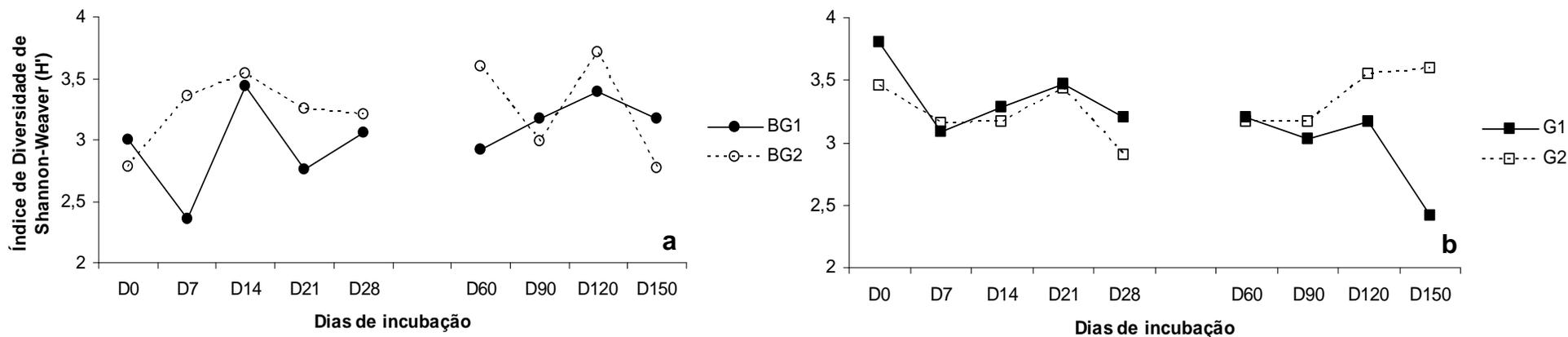


Figura 15: Índices de diversidade de Shannon-Weaver ( $H'$ ) calculados para as amostras de sedimento coletadas nos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú ao longo do período de incubação com petróleo. a) Amostras BG1 e BG2; b) Amostras G1 e G2.

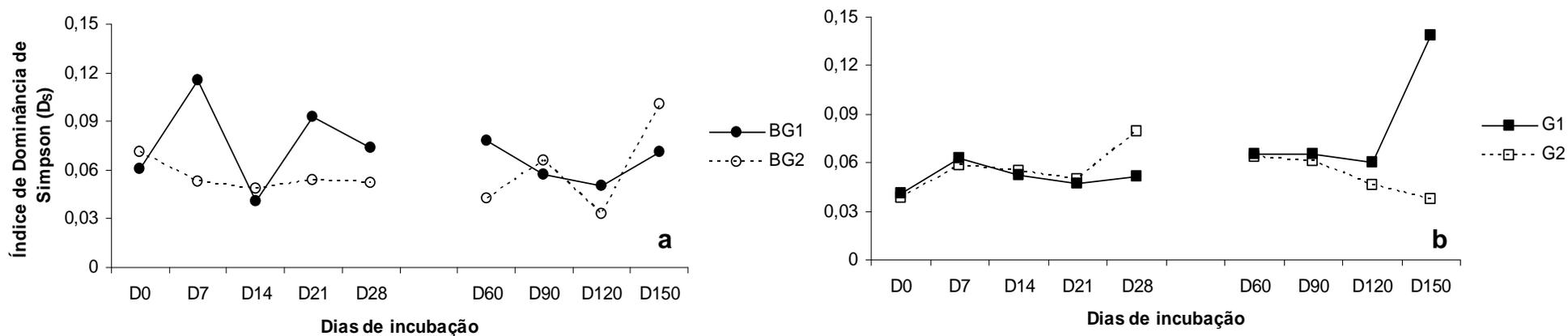


Figura 16: Índices de dominância de Simpson ( $D_s$ ) calculados para as amostras de sedimento coletadas nos manguezais da Baía de Guanabara e Gargaú ao longo do período de incubação com petróleo. a) Amostras BG1 e BG2; b) Amostras G1 e G2.

Tabela 9: Exemplos de filotipos bacterianos observados nas amostras de sedimento de manguezal ao longo da sua incubação com petróleo.

<b>Presença</b>	<b>Reação ao petróleo</b>	<b>Filotipos (pb)</b>	<b>Amostra</b>
Dia 0	Inibição do crescimento	98, 330	BG1 e BG2
		206, 235	G1 e G2
		62, 107, 186	BG1
		56, 136, 164	BG2
		92, 227, 382, 448, 520, 600	G1
		57, 83, 193	G2
Dia 7	Degradação de compostos específicos	50	BG1
		229, 374, 564	BG2
		64, 124, 209, 225, 396	G1
		51, 136, 222	G2
Dia 14	Degradação de compostos específicos	52, 144, 162, 288, 405	BG1
		66, 115, 225, 308, 396	BG2
		73, 148, 210, 379, 397	G1
		150, 229, 231, 245, 372	G2
Dia 21	Degradação de compostos específicos	268	BG1
		51, 60, 122	BG2
		95, 116, 394	G1
		127, 190, 249, 393, 398	G2
Dia 28	Degradação de compostos específicos	99, 138, 268	BG1
		52, 146, 287	BG2
		62, 85, 147	G1
		155, 225, 279	G2
Dia 60	Degradação de compostos específicos	54, 71, 109	BG1
		55, 159, 248, 335, 476	BG2
		56, 107, 143	G1
		99, 135, 257	G2

Tabela 9 Cont.

Dia 90	Degradação de compostos específicos	61, 128, 403	BG1
		90, 111	BG2
		58, 161, 185	G1
		104, 200, 264	G2
Dia 120	Degradação de compostos específicos	92, 139, 196, 213, 358	BG1
		61, 132, 202, 321, 461	BG2
		51, 60, 83	G1
		59, 143, 226, 284, 388	G2
Dia 150	Degradação de compostos específicos	199, 295, 340	BG1
		53, 159	G1
		121, 238, 273, 313, 559	G2
Do dia 0 até 150	Resistência / Degradação de compostos leves e pesados	78	BG1, BG2, G1 e G2
		84	BG1, BG2 e G1
		80, 87	BG1 e BG2
		82	BG1
		74	BG2
Do dia 0 até 7	Degradação compostos leves	72	G1
		50, 372	G1
		68, 92, 94, 98	G2
Do dia 0 até 28	Degradação compostos leves	76	BG2
		196	G2
Do dia 0 até 60	Degradação compostos leves	67	BG1
Do dia 7 até 150	Estímulo do crescimento / Degradação de compostos leves e pesados	223	BG2
		80	G1
		82	G2

Tabela 9 Cont.

Do dia 14 até 150	Estímulo do crescimento /	66	BG1
	Degradação de compostos leves e pesados	67	G2
Do dia 60 até 150	Degradação de compostos pesados	189, 201	BG1
		203	BG2
		198	G2
Do dia 90 até 150	Degradação de compostos pesados	68, 145, 202,	BG1
		254, 289, 302,	
		320	G1
		129	G2
Do dia 120 até 150	Degradação de compostos pesados	73	
		58, 100, 123,	BG1
		164, 203, 214,	
		215, 253	BG2
		220, 228, 237	
120, 150, 213,	G2		
218, 291, 301			

Vários filotipos que foram detectados no sedimento inicialmente desapareceram com a introdução do petróleo, e não voltaram a aparecer durante todo o experimento. Estas bactérias demonstraram sensibilidade ao efeito tóxico do petróleo, sendo excluídas da comunidade. Corroborando os resultados desta pesquisa, Yu *et al.* (2011) destacam a toxicidade do petróleo à microbiota indígena. Em seu trabalho, estes autores observaram que bactérias do gênero *Marinobacter* foram inibidas em um microcosmo contendo petróleo, nutrientes e biossurfactantes, enquanto no microcosmo controle, este gênero foi dominante. Isto demonstra a importância dos estudos de diversidade na área de biorremediação, pois somente através deles torna-se possível identificar as espécies sensíveis e as espécies resistentes à toxicidade do petróleo.

Espécies resistentes ao petróleo possuem essencial importância no processo de biorremediação, pois podem ser utilizadas na formação de consórcios com alta capacidade degradativa. Neste trabalho foram encontrados alguns filotipos com esta característica em todas as amostras de sedimento estudadas (Tabela 9). Como

exemplo, é possível citar o filotipo com 78 pares de bases, que foi observado inicialmente no sedimento e permaneceu nos eletroferogramas durante todo o período de incubação com o petróleo, indicando que esta bactéria possui grande versatilidade metabólica, degradando vários componentes do petróleo. Além disso, merece especial destaque devido à sua ubiquidade, uma vez que foi observada tanto nas amostras BG1 e BG2, quanto em G1 e G2. Esta peculiaridade possibilita a sua utilização em processos de biorremediação de vários manguezais, por se tratar de uma espécie nativa destes ambientes. Alonso-Gutiérrez *et al.* (2009) também relatam a ubiquidade de bactérias com capacidade degradativa. Em seu trabalho, as mesmas linhagens foram encontradas em pontos de amostragem a 400 Km de distância. O filotipo com 84 pares de base também se destacou, pois esteve presente nos eletroferogramas durante todo o período experimental, nas amostras BG1, BG2 e G1. Além destes, os filotipos com 80 e 87 pb também resistiram ao poluente nas duas amostras de sedimento coletadas na Baía de Guanabara. Outras espécies, que estiveram presentes em apenas um dos locais de coleta, também demonstraram a característica de versatilidade metabólica, como o filotipo de 82 pb pertencente a BG1, o de 74 pb da amostra BG2 e o de 72 pb, que foi observado em G1. Bactérias capazes de degradar uma grande variedade de componentes do petróleo são de grande interesse em pesquisas de biorremediação (Tiburtius, 2004).

Alguns filotipos não se encontram na comunidade inicial do sedimento, por exemplo, os filotipos com 223 pb da amostra BG2, o de 80 pb de G1 e o de 82 pb pertencente a G2. Eles só são detectados a partir do 7º dia de incubação, e permanecem presentes até o fim do experimento. Semelhantemente, os picos com 66 pb da amostra BG1 e com 67 pb de G2 somente são observados nos eletroferogramas a partir do 14º dia, permanecendo até o último dia de incubação. Estes resultados corroboram o trabalho de dos Santos *et al.* (2011), que observaram bactérias com comprovada capacidade degradativa apenas depois da introdução do petróleo no sedimento de manguezal. Estas espécies possuem grande importância em pesquisas que envolvem o metabolismo bacteriano de compostos do petróleo, pois, não apenas demonstram a capacidade de degradá-lo, como são estimuladas pela presença do poluente no meio, uma vez que não foram detectadas no eletroferograma inicialmente, e surgiram depois de 7 ou 14 dias de experimento (Tabela 9).

Um fato a ser destacado é que se observou a existência de filotipos de bactérias específicos para cada etapa do processo degradativo. Alguns exemplos estão discriminados na Tabela 9. Assim, foram detectadas algumas bactérias com a capacidade de metabolizar apenas os compostos presentes no início da degradação do petróleo. O filotipo com 67 pb da amostra BG1, esteve presente desde o início do experimento e apareceu nos eletroferogramas até o 60º dia de incubação. Na amostra G1, os filotipos com 50 e 372 pb estiveram presentes nos dias 0 e 7, e desapareceram a partir do dia 14. Esta característica também foi observada para os filotipos com 68, 92, 94 e 98 pb da amostra G2, enquanto os filotipos com 76 pb de BG2 e 196 pb de G2 prevaleceram do dia 0 até o dia 28. Isto indica que estas bactérias resistiram ao estresse inicial causado pelo poluente, e possuem um papel chave na degradação dos compostos mais leves do petróleo, entretanto, seu desaparecimento dos perfis do T-RFLP sugere que estes filotipos não são capazes de utilizar os compostos mais pesados, que são gerados nas fases mais tardias da degradação. Estes dados são corroborados pelo trabalho de Cury (2002), no qual é descrita a existência de microrganismos com habilidade para metabolizar compostos específicos, alguns degradam compostos aromáticos, outros utilizam alcanos, e alguns são capazes de metabolizar ambos.

Alguns filotipos bacterianos foram observados apenas a partir do 60º dia de incubação ou ainda mais tarde, após 90, 120 ou exclusivamente aos 150 dias (Tabela 9). A amostra BG1 apresentou dois filotipos que estiveram presentes apenas entre os dias 60 e 150, com 189 e 201 pb; em BG2, a espécie com 203 pb demonstrou este padrão; e em G2, a espécie com 198 pb. Alguns picos aparecem somente a partir do 90º dia, em BG1, observa-se os filotipos com 68, 145, 202, 254, 289, 320 e 302 pb, em G1 o filotipo com 129 pb e em G2 com 73 pb. Outros surgem apenas depois de 120 dias em contato com o petróleo, como os picos de 58, 100, 123, 164, 203, 214, 215 e 253 de BG1. Além destes, observa-se os filotipos com 220, 228 e 237 pb na amostra BG2, e os picos com 120, 150, 213, 218, 291 e 301 pb em G2. Röling *et al.* (2004) relatam a presença de um filotipo dominante que surgiu apenas depois de 80 dias de incubação com petróleo em sistema de microcosmos, permanecendo até o final do experimento (315 dias). Segundo Wang & Bartha (1990), produtos parcialmente oxidados podem apresentar alta toxicidade e pode levar à morte de bactérias durante o início da incubação. Estas observações podem ser indícios de que as espécies prevalentes no final do experimento são capazes de metabolizar apenas os compostos com maior peso molecular, que são

degradados no final do processo de metabolização do petróleo (Alonso-Gutiérrez *et al.*, 2009). Sabendo que estes poluentes são recalcitrantes devido à sua baixa biodisponibilidade e que a maioria das bactérias não é capaz de metabolizá-los, espécies que apresentam esta característica possuem especial importância na formação de consórcios para fins de biorremediação (Pucci *et al.*, 2011; Cury, 2002).

Diversos filotipos bacterianos foram detectados em apenas um dos dias de incubação, alguns foram observados apenas no dia 7, outros no dia 14, outros apareceram exclusivamente no dia 21, ou 28, assim sucessivamente até o final do experimento (Tabela 9). Nota-se o surgimento de alguns filotipos em um dia e a sua ausência nos outros dias de incubação, sugerindo que a presença de compostos específicos, originados no processo de degradação do petróleo, seja capaz de estimular o crescimento de bactérias diferentes ao longo do período experimental. Com a degradação do poluente, outro composto pode se originar, inibindo o crescimento de algumas espécies e favorecendo o crescimento de outras. De acordo com Maciel (2004) e Crapez (2002), a degradação do petróleo é um processo complexo, que envolve a formação de consórcios de bactérias de diferentes espécies e gêneros, especializadas em metabolizar um ou mais compostos nas diferentes fases de degradação do poluente. Desta forma, a partir do metabolismo de um produto por um consórcio bacteriano, compostos diferentes são originados, os quais, normalmente, são utilizados por bactérias distintas daquelas que degradaram o composto anterior.

A Figura 17 demonstra a ACP realizada para a amostra BG1, que explicou aproximadamente 75% da variação dos dados, sendo que o Fator 1 foi responsável por 54% e o Fator 2 explicou cerca de 20% desta. Esta análise dividiu as amostras em dois grupos, o primeiro é constituído pelos dias 0 a 60, enquanto o segundo é composto pelos dias 90 a 150. O dia 0 apresentou forte correlação positiva com os dias 21, 28 e 60 (os valores do  $r_s$  foram 0,647; 0,734 e 0,716, respectivamente). Com os dias 7 e 14 a correlação com o dia 0 foi considerada baixa, com o  $r_s$  menor que 0,50 (0,463 e 0,459 respectivamente). A correlação entre os dias 0 e 90 apresentou um índice com valor intermediário, equivalente a 0,522. Quando os dados dia 0 são comparados com os dias 120 e 150 é possível notar uma correlação muito baixa ( $r_s=0,269$  e 0,138), enquanto a correlação entre eles possui um índice igual a 0,771.

Na análise de agrupamento (Figura 18), observa-se a formação de dois *clusters*, com 28% de similaridade e o índice de correlação cofenética entre a matriz de dados e o dendrograma foi igual a 0,841. O primeiro *cluster* foi constituído pelos dias 0 a 60. Observou-se uma similaridade de 40% entre os dias 7 e 14. Ainda dentro deste *cluster*, houve um agrupamento dos dias 0, 21, 28 e 60 que apresentou uma similaridade de 38% com os dias 7 e 14. Estes resultados demonstraram que, nesta amostra, houve uma modificação substancial na diversidade e na abundância de filotipos quando o petróleo foi introduzido, explicando os baixos valores de similaridade entre os clusters e o baixo índice de correlação observado na ACP entre o dia 0 e os dias 7 e 14. Este resultado foi compatível com os resultados descritos no trabalho de Röling *et al.* (2002), que detectaram a diferenciação dos membros da comunidade bacteriana do sedimento após seis dias de contato com o petróleo havendo seleção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos leves e exclusão de alguns filotipos sensíveis ao poluente. O dia 0 apresentou 50% de similaridade com os dias 21, 28 e 60. Provavelmente houve uma estabilização da comunidade bacteriana na presença do contaminante, e alguns filotipos, que estavam presentes inicialmente no sedimento, reapareceram entre os dias 21 e 60 (Figura 15a). Observou-se uma alta similaridade entre os dias 28 e 60 (75%), indicando que a composição de filotipos entre eles foi bastante semelhante. A partir de 90 dias, quando, provavelmente começou a predominância de compostos de alto peso molecular, que são altamente hidrofóbicos e possuem baixa biodisponibilidade aos microrganismos (Brito *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2006; Hamamura, 2006; Yu *et al.*, 2005b), a comunidade tornou a se modificar, formando um novo *cluster*, composto pelos dias 90, 120 e 150. A similaridade do dia 90 com os dias 120 e 150 foi igual a 48%, enquanto os dois últimos se agruparam com 60% de similaridade. O dia 0 ficou em um agrupamento diferente deste, e a similaridade entre eles foi equivalente a apenas 28%, indicando uma grande diferença entre os filotipos que estavam presentes na comunidade original e aqueles que foram observados após 120 e 150 dias de incubação. Nas contagens bacterianas os valores de HT e DP no final do experimento se assemelham àqueles obtidos inicialmente (Figuras 9 e 11), entretanto, os resultados das análises moleculares apresentados na Tabela 9, na ACP e na análise de *cluster*, demonstram diferença qualitativa na composição da comunidade.

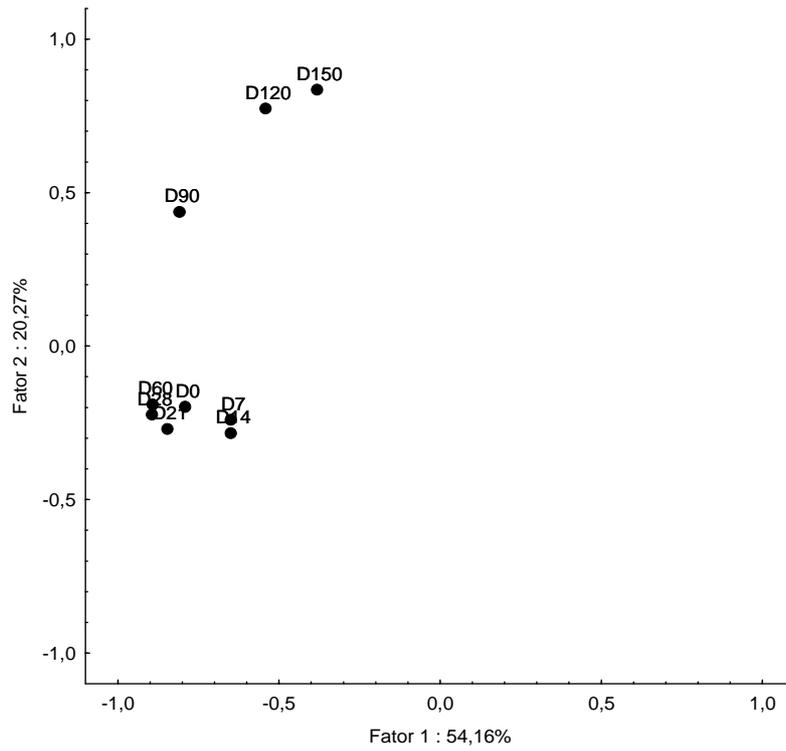


Figura 17: Análise de componentes principais dos dados de abundância e diversidade da amostra BG1.

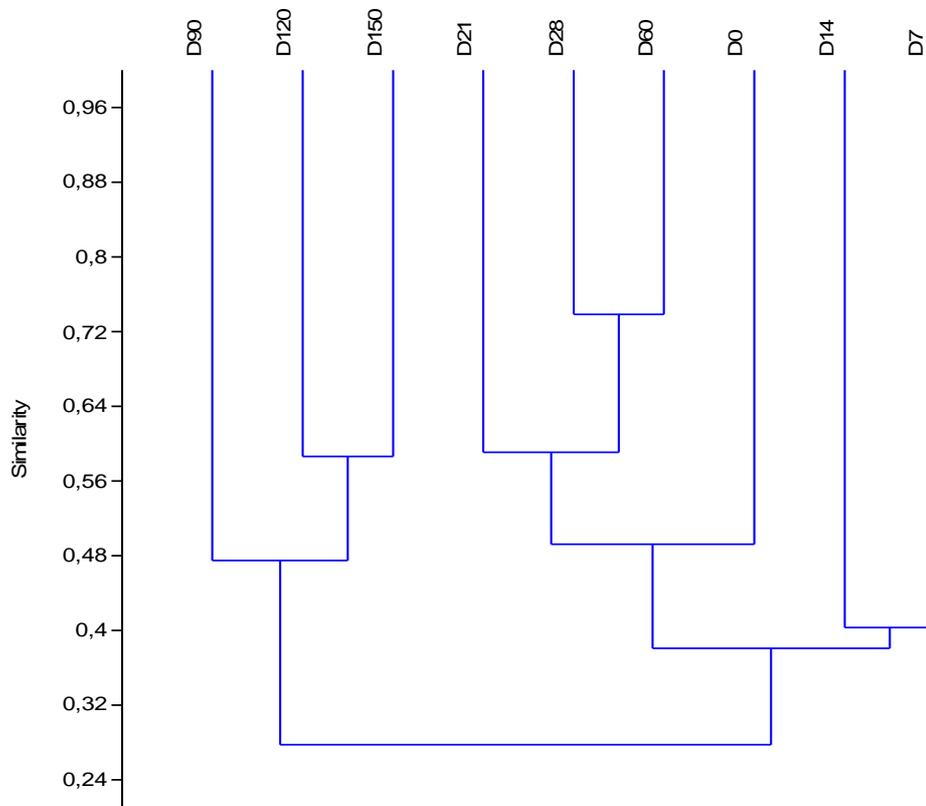


Figura 18: Análise de agrupamento usando o método UPGMA para os dados de diversidade da amostra BG1.

A ACP realizada para a amostra BG2 foi capaz de explicar apenas 58% da variação nos dados. O Fator 1 foi o responsável por 46%, enquanto o Fator 2 explicou aproximadamente 12% da variação (Figura 19). O dia 0 apresentou um índice de correlação muito baixo com os dias 7 ( $r_s=0,246$ ), 14 ( $r_s=0,142$ ) entretanto, os dias 21 e 28 demonstraram índices acima de 0,50 (0,548 e 0,619 respectivamente). Os índices de correlação voltaram a cair a partir do dia 60 ( $r_s=0,183$ ) e permaneceram menores que 0,50 até o final do experimento. Para o dia 90, observou-se um  $r_s$  igual a 0,370, o dia 120 apresentou 0,463 e o dia 150, igual a 0,268 com o dia 0. A correlação entre os dias 120 e 150 apresentou um índice igual a 0,656.

Na análise de agrupamento, o índice de correlação cofenética foi igual a 0,714. No dendrograma (Figura 20), observou-se a formação de dois *clusters* com 30% de similaridade, em que o primeiro agrupamento, formado pelos dias 7 e 14 (45% de similaridade), se une com o segundo *cluster*. Os baixos valores para os índices de correlação obtidos na ACP do dia 0 com os dias 7 e 14 e a baixa similaridade entre os *clusters* foram procedentes com os valores observados para o índice de diversidade de Shannon, que apresentou um aumento neste período, indicando que, nesta amostra, o petróleo atuou estimulando as bactérias degradadoras do sedimento, modificando a composição dos filotipos da amostra. Este aumento na diversidade foi observado apenas nesta amostra, e, possivelmente foi ocasionado por suas características granulométricas, uma vez que este local foi o único com predominância de areia. Conforme descrito por dos Santos *et al.* (2011), a presença do petróleo no sedimento pode estimular o crescimento de bactérias com capacidade degradativa, devido ao surgimento de novos nichos, aumentando a diversidade. O dia 0 se agrupou com os dias 21, 28 e 90, com 37% de similaridade. O dia 90 se agrupou com os dias 21 e 28, com 46% de similaridade, enquanto os dias 21 e 28 apresentaram uma similaridade igual a 56. A diminuição da diversidade nos dias 21 e 28, acompanhada pelo aumento da correlação com o dia 0 na ACP são indícios de que, neste período, os filotipos que compunham a comunidade bacteriana foram mais semelhantes aos da composição original do sedimento. É possível notar que este *cluster* apresentou 35% de similaridade com o agrupamento formado pelos dias 60, 120 e 150 e que estes possuíram 38% de similaridade. Observou-se ainda, que os dias 120 e 150 apresentaram 55% de similaridade. Segundo Yu *et al.* (2011), após 70 dias de incubação com petróleo, as populações de bactérias degradadoras de compostos recalcitrantes, como os gêneros

*Sphingomonas* e *Ochrobactrum* tendem a aumentar. Dos Santos *et al.* (2011), Hamamura (2006) e Röling *et al.* (2002) corroboram esta afirmação, relatando mudança temporal na comunidade bacteriana com uma diferenciação dos filotipos que a compõem antes e após a incubação com petróleo, explicando os baixos valores de similaridade obtidos entre estes dois *clusters*. Associando estes resultados à Tabela 9, foi possível constatar que, também nesta amostra, os filotipos presentes ao final do experimento se diferenciam bastante da composição inicial do sedimento, apesar da obtenção de contagens semelhantes.

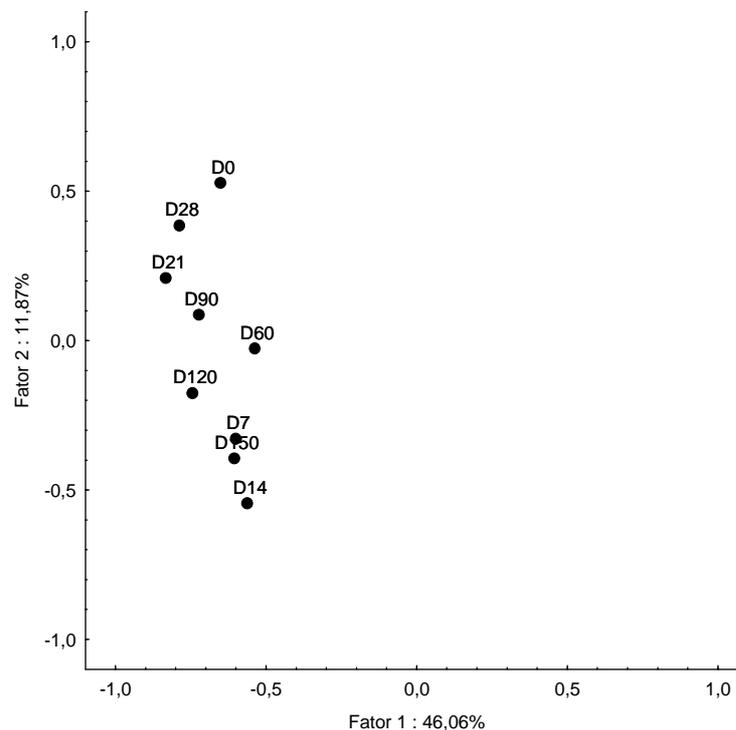


Figura 19: Análise de componentes principais dos dados de abundância e diversidade da amostra BG2.

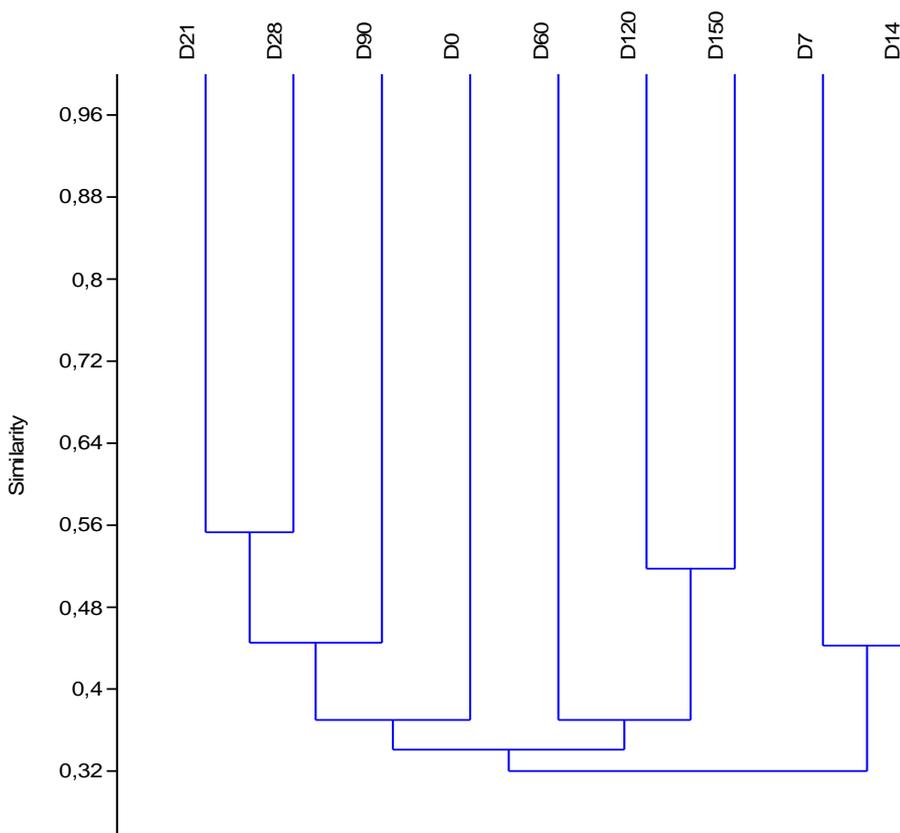


Figura 20: Análise de agrupamento usando o método UPGMA para os dados de diversidade da amostra BG2.

Para a amostra G1, a ACP foi capaz de explicar 70% da variação dos dados. O Fator 1 explicou 61%, enquanto o Fator 2 foi o responsável pela explicação de 9% da variação (Figura 21). A análise de TRFLP do dia 0 demonstrou baixa correlação com a do dia 7 ( $r_s=0,298$ ). A partir do 14<sup>a</sup> dia, a correlação aumentou e permaneceu acima de 0,50 até o nonagésimo dia de experimento. Para o dia 14 o índice de correlação correspondeu a 0,591, no dia 21 foi igual a 0,604, no dia 28, 0,548, no dia 60 o índice foi 0,608 e no dia 90 foi igual a 0,686. No dia 120 a correlação voltou a diminuir, e apresentou um índice de 0,455, enquanto o dia 150 apresentou 0,369. Observa-se ainda, uma baixa correlação entre os dias 120 e 150 ( $r_s=0,346$ ).

A análise de agrupamentos demonstrou um índice de correlação cofenética entre a matriz de dados e o dendrograma equivalente a 0,937 (Figura 22). Ao nível de 20% de similaridade foi possível observar a formação de dois *clusters*, o primeiro foi constituído apenas pelo dia 0, enquanto o segundo englobou os dias 7 a

150. O dia 14 encontrou-se no segundo *cluster* e apresentou 28% de similaridade com os demais dias. O dia 7 apresentou 32% de similaridade com os outros dias. Estes valores demonstraram que a comunidade bacteriana sofreu uma grande modificação com a entrada do petróleo a partir do dia 7. Houve uma redução da diversidade nos dias 7 e 14, corroborados pela queda no índice de diversidade de Shannon e aumento na dominância (Figuras 15b e 16b), acompanhada pelo aumento nas contagens bacterianas (Figuras 9 e 11). Os baixos valores dos índices de similaridade e correlação do dia 0 com os dias 7 e 14, provavelmente, podem ser atribuídos à pressão seletiva do petróleo sobre as bactérias, uma vez que a poluição por petróleo pode matar uma grande proporção da comunidade bacteriana (dos Santos *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2009; Ke *et al.*, 2005; Röling *et al.*, 2002). Outro fator a ser considerado é que este manguezal não possui histórico de contaminação por petroderivados, assim, as bactérias do sedimento possivelmente são mais sensíveis ao poluente, sofrendo grande variação com sua entrada, justificando a grande variação observada no início do experimento. Dentro do segundo *cluster*, observa-se ainda, que os dias 21 e 28 se agruparam com uma similaridade de 66%, e estes, se uniram ao dia 60, com 55% de similaridade. Estes se agruparam com os dias 90 e 120 ao nível de 52%, enquanto os últimos possuíram 58% de similaridade entre si. Finalmente, os dias 21 até o 120 se agruparam com o dia 150 ao nível de 42%. A maior similaridade observada entre os dias 21, 28, 60, 90, 120 e 150 indica que os filotipos encontrados neste período foram bastante distintos daqueles observados nos dias 0, 7 e 14. Assim, o baixo valor do índice de correlação observado na ACP entre os dias 0 e 150 foi coincidente com uma queda no índice de diversidade de Shannon, aumento da dominância e redução na contagem bacteriana. Provavelmente, neste período a presença de compostos mais pesados do petróleo foram os responsáveis pela diminuição na diversidade, visto que poucas espécies de bactérias são capazes de degradá-los (Brito *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2005b; Kanaly *et al.*, 2000; Harayama, 1997).

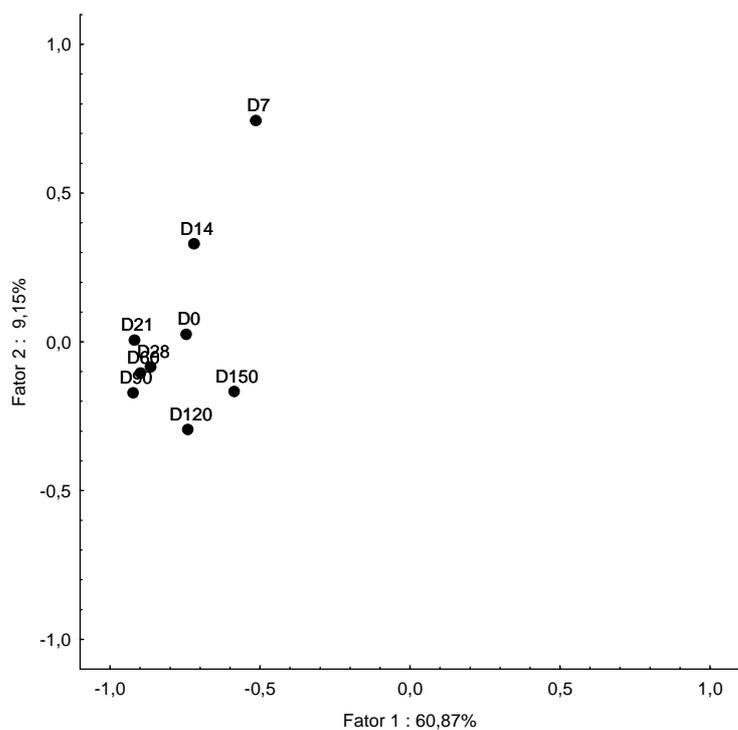


Figura 21: Análise de componentes principais dos dados de abundância e diversidade da amostra G1.

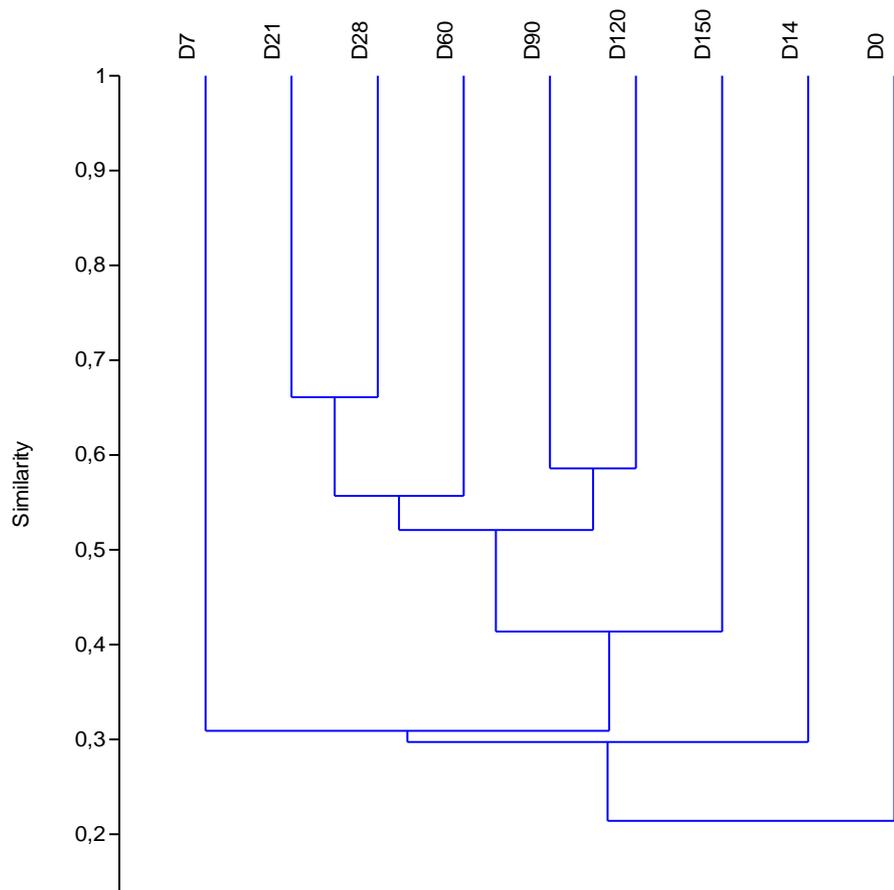


Figura 22: Análise de agrupamento usando o método UPGMA para os dados de diversidade da amostra G1.

Para a amostra G2, a ACP explicou apenas 55,5% da variação dos dados. O Fator 1 foi responsável por, aproximadamente, 42,5%, enquanto o Fator 2 explicou cerca de 13% da variação (Figura 23). A maioria das amostras apresentou uma baixa correlação com o dia 0. O dia 7 apresentou o maior índice, que correspondeu a 0,537. Entre os dias 14 e 60, a correlação com o dia 0 permaneceu baixa. Para o dia 14, o índice foi correspondente a 0,349, no dia 21 foi 0,171, no dia 28 foi igual a 0,239, e no dia 60, foi 0,293. Aos 90 dias se observou um aumento na correlação com o dia 0 ( $r_s=0,472$ ), seguido por uma nova queda aos 120 ( $r_s=0,195$ ) e 150 dias ( $r_s=0,254$ ). Além disso, entre os dias 120 e 150 houve uma baixa correlação ( $r_s=0,313$ ).

A análise de agrupamento apresentou um índice de correlação cofenética de 0,858 e as amostras se dividiram em dois *clusters* com 20% de similaridade (Figura 24). O primeiro cluster foi formado pelos dia 28, que apareceu isolado de todos os outros dias. Dentro do segundo *cluster*, observa-se um sub-grupo formado pelos dias 0, 7 e 150. Os dois primeiros se agruparam com 42% de similaridade. O dia 150 se juntou a eles, com uma similaridade igual a 28%. Este cluster se une aos dias 14 a 120 com 25% de similaridade. A seguir, observou-se o grupo formado pelos dias 14 e 21, que apresentaram uma similaridade de 35%. Outro agrupamento foi formado pelos dias 60, 90 e 120, em que o dia 90 se uniu aos dias 60 e 120 com 34% de similaridade, e os dois últimos se agruparam ao nível de 54%. A alta correlação observada na ACP entre os dias 0 e 7 e seu agrupamento na análise de *cluster* foram acompanhados por uma queda no índice de diversidade de Shannon, pelo aumento da dominância e das contagens de bactérias, indicando que apesar da toxicidade do petróleo para as espécies bacterianas nativas e do desaparecimento de alguns picos, os filotipos presentes no dia 7 foram os mais semelhantes aos do dia 0. Segundo Yu *et al.* (2011) e Röling *et al.* (2004) é possível que a presença do petróleo cause a inibição de alguns filotipos e a estimulação de outros, conforme pode ser observado na Tabela 9. O padrão observado na análise de agrupamento e na ACP demonstraram que houve uma mudança constante no processo de sucessão bacteriana durante o tempo de incubação, e que os filotipos presentes a partir do 14<sup>o</sup> dia de incubação até o final do experimento foram muito diferentes daqueles observados inicialmente no sedimento. A presença do dia 150 no mesmo cluster que os dia 0 e 7 demonstra que, no final do experimento, os filotipos que compunham a comunidade se assemelharam aos iniciais, entretanto, a baixa similaridade (28%), sugere que houve a exclusão de filotipos sensíveis e estímulo de

outros, que não estavam presentes inicialmente. Corroborando estes resultados, Alonso-Gutiérrez *et al.* (2009) relatam que o petróleo provoca uma redução inicial na diversidade bacteriana, que é recuperada depois de algum tempo, no entanto, após a contaminação, as espécies presentes na comunidade são muito distintas daquelas encontradas antes da entrada do poluente.

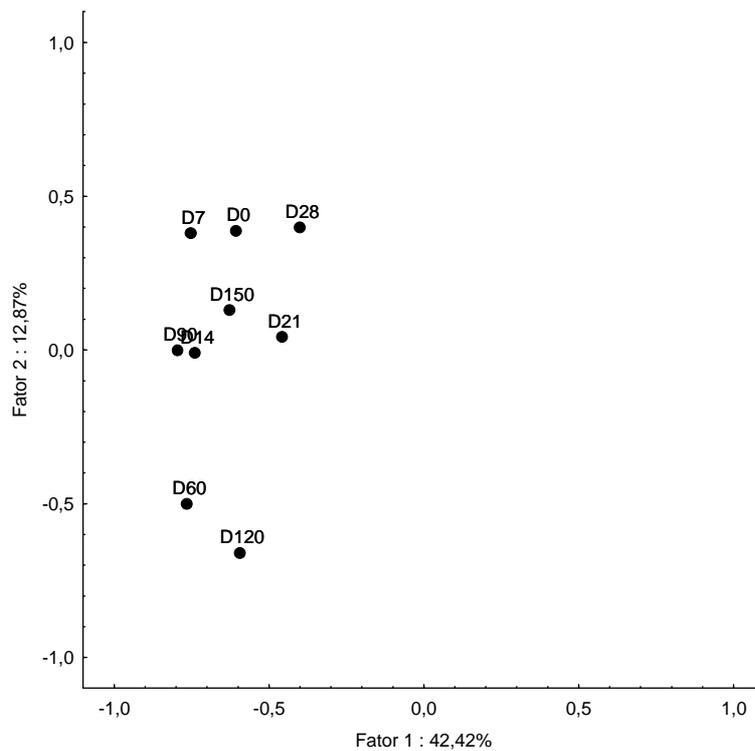


Figura 23: Análise de componentes principais dos dados de abundância e diversidade da amostra G2.

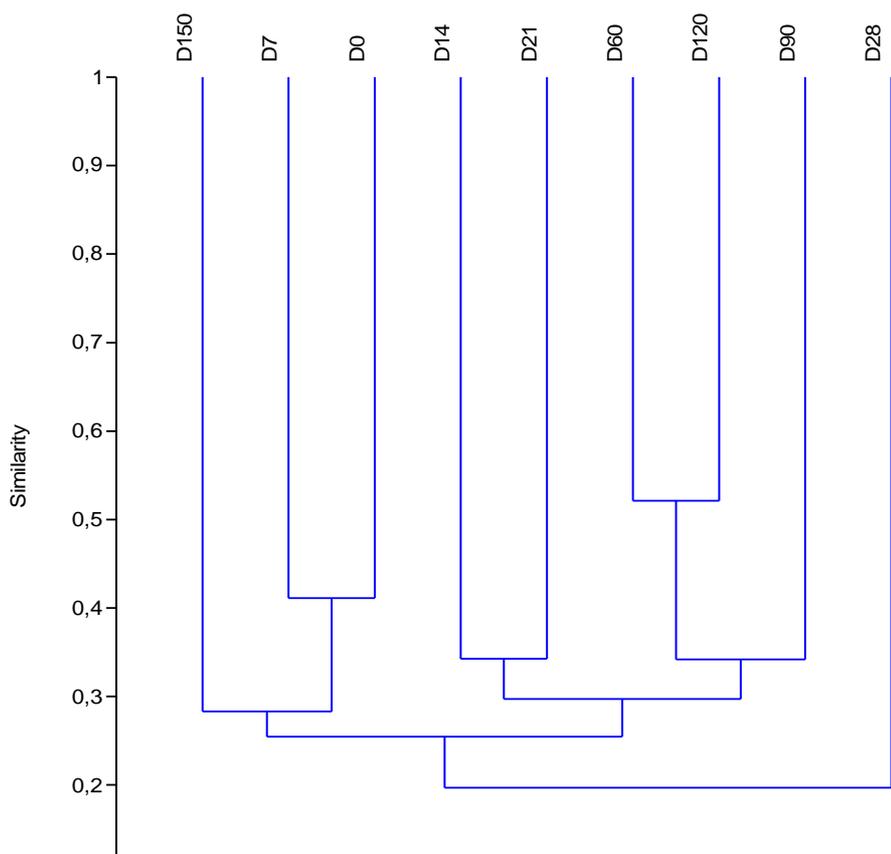


Figura 24: Análise de agrupamento usando o método UPGMA para os dados de diversidade da amostra G2.

As amostras não apresentaram um padrão quanto à composição de filotipos e mudança da diversidade, entretanto, aparentemente a análise de *cluster* demonstrou que todas as amostras apresentaram um padrão de sucessão dos filotipos que se dividiu em fases, que provavelmente, se relacionam ao estado de degradação do petróleo. A primeira fase consistiu no momento inicial do experimento, em que a amostra foi analisada sem a adição do petróleo, representando as espécies que compunham a comunidade bacteriana original do ambiente (dia 0). A seguir, observou-se uma fase caracterizada pela entrada do petróleo em que houve intensa modificação da comunidade. Para BG1, BG2 e G1 esta fase durou do dia 7 até o dia 14, enquanto para G2, durou um pouco mais, permanecendo do dia 7 até o dia 28. Um terceiro momento é caracterizado pela estabilização da comunidade, e também apresentou variação entre as amostras. Para BG1, a fase durou do dia 21 até o dia 60; para BG2, foi um pouco mais longa, se iniciou no dia 21 e permaneceu até o dia 90; na amostra G1, este estágio se prolongou ainda mais, permanecendo até o dia 120; enquanto para G2, a estabilização se iniciou mais tardiamente, aos 60 dias e

permaneceu até o dia 120. Posteriormente é possível notar uma fase de nova diferenciação da comunidade bacteriana, que foi registrada a partir dos 90 dias de incubação e permaneceu até o final do experimento para BG1 e a partir do dia 120 até o dia 150 para BG2; nas amostras G1 e G2, esta fase foi detectada aos 150 dias de incubação.

## 7. CONCLUSÕES

Apesar do histórico de poluição da Baía de Guanabara por poluentes do petróleo, nenhuma das áreas de estudo deste manguezal e do manguezal de Gargaú pode ser considerada poluída por petroderivados, a partir dos níveis de HPAs observados nos sedimentos. Entretanto, a análise de HPAs normalizada pelo conteúdo de  $C_{org}$  das amostras demonstrou que os pontos estudados na Baía de Guanabara possuem maior concentração de hidrocarbonetos do que os pontos do manguezal de Gargaú.

Os cálculos dos índices de diversidade de Shannon demonstraram que, conforme esperado, as amostras da Baía de Guanabara possuem características físico-químicas menos favoráveis ao crescimento de bactérias, apresentando assim, menor diversidade bacteriana do que os sedimentos do manguezal de Gargaú.

Logo após a incubação com o petróleo houve redução da diversidade em três áreas, e aumento apenas na amostra com granulometria arenosa (BG2), indicando que a granulometria foi o fator determinante para este comportamento.

Houve o aumento da contagem de bactérias degradadoras de petróleo e produtoras de biossurfactante após a incubação com o poluente, demonstrando a pressão seletiva do poluente sobre a comunidade bacteriana.

A incubação com o petróleo alterou a estrutura da comunidade bacteriana presente em todas as amostras de sedimento estudadas, favorecendo o crescimento de filotipos com capacidade degradativa e excluindo os filotipos sensíveis à toxicidade do contaminante, assim, a composição bacteriana no final da incubação foi distinta daquela encontrada originalmente no sedimento (índice de similaridade menor ou igual a 34%).

O uso do T-RFLP permitiu observar a permanência e o surgimento de filotipos resistentes a compostos específicos do petróleo, bem como a exclusão de filotipos sensíveis a alguns de seus componentes, indicando que existe um processo de

sucessão ao longo do tempo de incubação, e que tal mudança está relacionada com os tipos de HPAs presentes nos diferentes estágios de degradação do óleo

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO-GUTIÉRREZ, J.; FIGUERAS, A.; ALBAIGÉS, J.; JIMÉNEZ, N.; VIÑAS, M.; SOLANAS, A. M. & NOVOA, B. (2009) Bacterial Communities from Shoreline Environments (Costa da Morte, Northwestern Spain) Affected by the *Prestige* Oil Spill. *Applied and Environmental Microbiology*, V. 75, N. 11, pp. 3407–3418.

ATLAS, R. M. (1995) Bioremediation of Petroleum Pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Louisville: University of Louisville, pp. 317-327.

ATLAS, R.M. (1981) Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. *Microbiological Review*, V. 45, pp. 180–209.

BERNINI, E. (2008) Estrutura da cobertura vegetal e produção de serapilheira da floresta de mangue do estuário do Rio Paraíba do Sul, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, RJ, 134p.

BERNINI, E.; FERREIRA, R.; CARVALHO E SILVA F. L.; MAZUREC, A. P.; NASCIMENTO M. T. & REZENDE, C. E. (2010) Alterações na cobertura vegetal do manguezal do estuário do rio Paraíba do Sul no período de 1976 a 2001 *Revista da Gestão Costeira Integrada*, V. 8, Número Especial 2, Manguezais do Brasil.

BERNINI, E. & REZENDE, C. E. (2004) Estrutura da vegetação em florestas de mangue do estuário do rio Paraíba do Sul, Estado do Rio de Janeiro, Brasil *Acta Botanica Brasilica* 18(3): 491-502.

BLOTT, S. J.; CROFT, D. J.; PYE, K.; SAYE, S. E. & WILSON, H. E. (2004). Particle size analysis by laser diffraction. *Geological Society, London, Special Publications 2004*, v. 232, p. 63-73.

BODOUR, A. A., DREES, K. P. & MAIER R. M. (2003) Distribution of Biosurfactant-Producing Bacteria in Undisturbed and Contaminated Arid Southwestern Soils *Applied and Environmental Microbiology*, V. 69, N. 6, pp. 3280–3287.

BOOPATHY, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74: 63-67.

BRADDOCK, J. F.; LINDSTROM, J. E.; YEAGER, T. R.; RASLEY, B. T.; BROWN, E.G. (1996) Patterns of microbial activity and uniled sediments in Prince William Sound. In: EXXON VALDEZ. *Proceedings of the Exxon Valdez oil spill symposium*. Bethesda: American Fisheries Society. V. 18, pp. 94-108.

BRITO, E. M. S.; DURAN, R.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; OTEYZA, T. G.; CRAPEZ, M. A. C.; ALELUIA, I. & WASSERMAN, J. C. A. (2009) A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, V. 58, 418–423

BRITO, E. M. S.; GUYONEAUD, R.; GOÑI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRAPEZ, M. A. C.; WASSERMAN, J. C. A. & DURAN, R. (2006) Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in Microbiology*, V. 15, N. 8, pp. 752–762

BUGG, T. D. H. & WINFIELD, C. J. (1998) Enzymatic cleavage of aromatic rings: mechanistic aspects of the catechol dioxygenases and later enzymes of bacterial oxidative cleavage pathways. *Natural Product Reports*, V. 15, pp. 523-530.

BUCHMAN, M. F. (1999) NOAA Quick Screening Reference. Coastal Protection and Restoration Division, *National Oceanic and Atmospheric Administration*, Seattle, 12p.

CAMEOTRA, S. S.; SINGH P. (2009). Synthesis of rhamnolipid biosurfactant and mode of hexadecane uptake by *Pseudomonas* species. *Microbial Cell Factories*, V. 8, N. 16.

CARDOSO, A. M. (2007) Sistema de Informações para Planejamento e Resposta a Incidentes de Poluição Marítima por derramamento de petróleo e derivados [Rio de Janeiro]. *Dissertação de Mestrado*, Planejamento Energético, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 138p.

CAVALCANTE, R. M.; SOUSA, F. W.; NASCIMENTO, R. F.; SILVEIRA, E. R.; FREIRE, G. S. S. (2009) The impact of urbanization on tropical mangroves (Fortaleza, Brazil): Evidence from PAH distribution in sediments. *Journal of Environmental Management*, V. 91, pp. 328 – 335.

CHOSSON, P.; LANAU, C.; CONNAN, J.; DESSORT, D. Biodegradation of refractory hydrocarbon biomarkers from petroleum under laboratory conditions. **Nature**, London, v.351, pp. 640 – 642, 1991.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. (2002). Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. *Ciência hoje*, V. 30, N.179, pp. 32-37.

CURY, J. C. (2002) Atividade microbiana e diversidade metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. *Dissertação de mestrado*, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, SP, 95p.

DOS SANTOS, H. F.; CURY, J. C.; DO CARMO, F. L.; DOS SANTOS, A. L.; TIEDJE, J.; VAN ELSAS, J. D.; ROSADO, A. S. & PEIXOTO, R. S. (2011) Mangrove Bacterial Diversity and the Impact of Oil Contamination Revealed by Pyrosequencing: Bacterial Proxies for Oil Pollution. *PLoS ONE*, V. 6, N.3, e16943, 8 p.

EPA – U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1986) SW-846 Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods; Method 8270C - Semivolatile organic compounds by gas chromatography / massspectrometry – CD-ROM Internet Edition, [www.epa.gov/SW-846/main.htm](http://www.epa.gov/SW-846/main.htm).

EPA – U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1986) SW-846 Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods; Method 3540C: Soxhlet Extraction - – CD-ROM Internet Edition, [www.epa.gov](http://www.epa.gov).

ESSIEN, J. P.; EDUOK, S. I.; OLAJIRE, A. A. (2011) Distribution and ecotoxicological significance of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Iko River estuary mangrove ecosystem. *Environmental Monitoring and Assessment*, V. 176, pp. 99–107.

FARIAS, C. O. (2006) Avaliação da degradação de óleo em sedimentos de manguezal: Estudo de Caso, Baía de Guanabara, RJ. *Tese de doutorado*, Programa de Pós Graduação em Química, PUC-Rio, RJ, 301p.

FOGHT, J. (2008). Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects *Journal of Molecular and Microbiology and Biotechnology*, 15: 93–120.

FONTANA, L. F.; SILVA, F. S.; FIGUEIREDO, N. A. G.; BRUM, D. M.; NETTO, A. D. P.; FIGUEIREDO JUNIOR, A. G. & CRAPEZ, M. A. C. (2010) Superficial distribution of aromatic compounds and geomicrobiology of sediments from Suruí Mangrove, Guanabara Bay, RJ, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, V. 82, N. 4, pp. 1013-1030.

GANESHALINGAM, S.; LEGGE, R.L.; ANDERSON, W. A. (1994). Surfactant enhanced leaching of polyaromatic hydrocarbons from soil. *Process Safety and Environmental Protection*, V. 72b, pp. 247-251.

GARCIA, K. S.; OLIVEIRA, O. M. C.; QUEIROZ, A. F. DE S.; ARGÔLO, J. L. (2007) Geoquímica de sedimentos de manguezal em São Francisco do Conde e Madre de Deus – BA. *Geochimica Brasiliensis*, V. 21, N. 2, pp. 167-179.

GOMES, N. C. M.; BORGES, L. R.; PARANHOS, R.; PINTO, F. N.; KRÖGERRECKLENFORT, E.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. S. & SMALLA, K. (2007) Diversity of *ndo* Genes in Mangrove Sediments Exposed to Different Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Pollution. *Applied and Environmental Microbiology*, V. 73, N. 22, pp. 7392–7399.

HAMAMURA, N.; OLSON, S. H.; WARD, D. M. & INSKEEP, W. P. (2006) Microbial Population Dynamics Associated with Crude-Oil Biodegradation in Diverse Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, V. 72, N. 9, pp. 6316–6324.

HARAYAMA, S. (1997) Polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation design. *Current Opinion in Biotechnology*, V. 8, pp. 268–273.

HERBES, S. E. & SCHWALL, L. R. (1978) Microbial Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Pristine and Petroleum-Contaminated Sedimentst. *Applied and Environmental Microbiology*, V. 35, N. 2, pp. 306-316.

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

JOHNSEN A. R.; WICK, L. Y.; HARMS, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, V. 133, pp. 71-84.

KANALY, R. A.; BARTHA, R.; WATANABE, K.; SHIGEAKI, H. (2000) Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. *Applied and Environmental Microbiology*, V. 66, N. 10, pp. 4205-4211.

KAPLAN, C. W. & KITTS, C. L. (2004) Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. *Applied and Environmental Microbiology*, V. 70, N. 3, pp. 1777–1786.

KE, L.; YU, K. S. H.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. (2005) Spatial and vertical distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments. *Science of the Total Environment*, V. 340, pp. 177–187.

KJERFVE, B.; RIBEIRO, C. H. A.; DIAS, G. T. M.; FILIPPO, A. M. & QUARESMA, V. S. (1997) Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. *Continental Shelf Research*, V. 17, N. 13, pp. 1609-1643.

LANGWORTHY, D. E.; STAPLETON, R. D.; SAYLER, G. S. & FINDLAY, R. H. (1998) Genotypic and Phenotypic Responses of a Riverine Microbial Community to Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, V. 64, N. 9, pp. 3422–3428.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological Reviews*, V. 54, N. 3, pp. 305-315.

LI, G.; HUANG, W.; LERNER, D. N. & ZHANG, X. (2000) Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. *Water Research*, V. 34, pp. 3845-3853.

MACENO, M. M. C. (2010) Avaliação da presença, toxicidade e da possível biomagnificação de HPAs. *Dissertação de mestrado*, Programa de Pós- Graduação em Engenharia de Recursos Hídricos e Ambiental Universidade Federal do Paraná, PR, 82p.

MACIEL, B. M. (2004) Estudos prospectivos de microrganismos de solo de *landfarm* com potenciais aplicações em estratégias de biorremediação de áreas contaminadas por petróleo. *Dissertação de Mestrado*, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, BA, 77p.

MACIEL-SOUZA, M. C.; MACRAE, A.; VOLPON, A. G. T.; FERREIRA, P. S.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. (2006) Chemical and microbiological characterization of mangrove sediments after a large oil-spill in Guanabara Bay - RJ – Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, V. 37, pp. 262-266.

MARIANO, A. P.; KATAOKA, A. P. A. G.; ANGELIS, D. F. & BONOTTO, D. M. (2007) Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*, V. 38, pp. 346-353.

MATER, L.; ALEXANDRE, M. R.; HANSEL F. A. & MADUREIRA, L. A. S. (2004) Assessment of Lipid Compounds and Phosphorus in Mangrove Sediments of Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Journal of Brazilian Chemical Society*, V. 15, N. 5, pp. 725-734.

MCCAIVE, I. N.; BRYANT, R. J.; COOK, H. F.; AND COUGHANOWR, C. A. (1986). Evaluation of a laser-diffraction-size analyzer for use with natural sediments. *Journal of Sedimentary Research*, V. 56; N. 4; pp. 561-564.

MEIRE, R. O.; AZEREDO, A.; PEREIRA, M. S.; MACHADO TORRES, J. P. & MALM, O. (2008) Polycyclic aromatic hydrocarbons assessment in sediment of national parks in southeast Brazil. *Chemosphere*, V. 73(1 Suppl): S180–S185.

NITSCHKE, M. & PASTORE, G. M. (2002) Biossurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química Nova*, V. 25, N. 5, pp. 772 – 776.

NUDI, A. H.; WAGENER, A. L. R.; FRANCONI, E.; SCOFIELD, A. L.; SETTE, C. B.; VEIGA, A. (2007) Validation of *Ucides cordatus* as a bioindicator of oil contamination and bioavailability in mangroves by evaluating sediment and crab PAH records. *Environment International*, V. 33, pp. 315–327.

PUCCI, G.; TIEDEMANN, MA.C.; ACUÑA A. AND PUCCI, O. (2011). Change in Bacterial Diversity After Oil Spill in Argentina, The Importance of Biological Interactions in the Study of Biodiversity, Jordi Lopez Pujol (Ed.), InTech. Available from: <http://www.intechopen.com/articles/show/title/change-in-bacterial-diversity-after-oil-spill-in-argentina>

RAMSAY, M. A.; SWANNELL, R. P. J.; SHIPTON, W. A.; DUKE, N.C.; HILL, R. T. (2000) Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, V. 41, N. 7-12, pp. 413-419.

RINGELBERG, D. B.; TALLEY, J. W.; PERKINS, E. J.; TUCKER, S. G.; LUTHY, R. G.; BOUWER, E. J. & FREDRICKSON, H. L. (2001) Succession of Phenotypic, Genotypic, and Metabolic Community Characteristics during In Vitro Bioslurry Treatment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Contaminated Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, V. 67, N. 4, pp. 1542–1550.

RÖLING, W. F. M.; MILNER, M. G.; JONES, D. M.; FRATEPIETRO, F.; SWANNELL, R. P. J.; DANIEL, F. & HEAD, I. M. (2004) Bacterial Community Dynamics and Hydrocarbon Degradation during a Field-Scale Evaluation of Bioremediation on a Mudflat Beach Contaminated with Buried Oil Applied and Environmental Microbiology, V. 70, N. 5, pp. 2603–2613.

RÖLING, W. F. M.; MILNER, M. G.; JONES, D. M.; LEE, K.; DANIEL, F.; SWANNELL, R. J. P. & HEAD, I. M. (2002) Robust Hydrocarbon Degradation and Dynamics of Bacterial Communities during Nutrient-Enhanced Oil Spill Bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, V. 68, N. 11, pp. 5537–5548.

RON, E. Z. & ROSENBERG, E. (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environmental Microbiology*, V.3, N. 4, pp. 229-236.

SANTOS, H. F.; CARMO, F. L.; PAES, J. E. S.; ROSADO, A. S. & PEIXOTO, R. S. (2011) Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum. *Water, Air and Soil Pollution*, V. 216, N. 1-4, pp. 329-350.

SEO, J.; KEYN, Y; LI, Q. X. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research. and Public Health*, V. 6, pp. 278-309.

SILVA, R. F. (2008) Estratégias de bioestímulo de sedimento de manguezal contaminado com hidrocarbonetos empregando fertilizantes de liberação lenta. *Dissertação de mestrado*, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 116p.

SILVA, T. F.; AZEVEDO, D. A. & AQUINO NETO F. R. (2007) Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments and Waters from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Brazilian Chemical Society*, V. 18, N. 3, pp. 628-637.

SUGGIO, K. (1973) Introdução à Sedimentologia. São Paulo, Ed-Gard Blucher. Universidade Estadual de São Paulo.

TAM, N. F. Y.; KE, L.; WANG, X. H. & WONG, Y. S. (2001) Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangrove swamps. *Environmental Pollution*, V. 114, pp. 255 – 263.

TIAN, Y.; LIU, H. J.; ZHENG, T. L.; KWON, K. K.; KIM, S. J. & YAN, C. L. (2008), PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary. *China Marine Pollution Bulletin*, V. 57, pp. 707–715.

TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P. & LEAL, E. S. (2004) Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova*, V. 27, N. 3, pp. 441-446.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R. & CASE, C.L. (2005) Microbiologia. 8ª Edição, Editora Artmed.

UDOTONG, I. R.; EDUOK, S. I.; ESSIEN, J. P. & ITA, B. N. (2008) Density of Hydrocarbonoclastic Bacteria and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Accumulation in Iko River Mangrove Ecosystem. *Nigeria World Academy of Science, Engineering and Technology*, V. 44, pp. 830-836.

VANE, C. H.; HARRISON, I.; KIM, A. W.; MOSS-HAYES, V.; VICKERS, B. P. (2009) Organic and metal contamination in surface mangrove sediments of South China. *Marine Pollution Bulletin*, V. 58, pp. 134-144.

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

WANG, X. & BARTHA, R. (1990) Effects of bioremediation on residues, activity and toxicity in soil contaminated by fuel spills. *Soil Biology and Biochemistry*, V. 22, N. 4, pp. 501-505.

WETLER, R. M. C. (2006) Prospecção de microrganismos responsáveis pela degradação de compostos de petróleo no sedimento de um manguezal localizado no sul da Bahia (Brasil). *Dissertação de Mestrado*. Universidade Estadual de Santa Cruz, BA, 85p.

WIDDEL, F. & RABUS, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, V. 12, pp. 259–276.

YU, K. S., WONG, A. H., YAU, K. W., WONG, Y. S. & TAM, N. F. (2005a). Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, V. 51, pp. 1071–1077.

YU, S. H., KE, L., WONG, Y. S., & TAM, N. F. (2005b). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International*, V. 31, pp. 149–154.

YU, S.; LI, S.; TANG, Y. & WU, X. (2011) Succession of bacterial community along with the removal of heavy crude oil pollutants by multiple biostimulation treatments in the Yellow River Delta, China. *Journal of Environmental Sciences*, V. 23, N. 9, pp. 1533–1543.

ZHOU, H. W.; WONG, A. H. Y.; YU, R. M. K.; PARK, Y. S. & TAM, N.F.Y. (2009). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Structural Shift of Bacterial Communities in Mangrove Sediment. *Microbial Ecology*, V. 58, pp. 153–160.