

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

Tese de Doutorado

Biorremediação de HPAs em solo de área contaminada:  
riscos mutagênicos e degradação química

ROBERTA DE SOUZA POHREN

Porto Alegre, dezembro de 2015.

**Biorremediação de HPAs em solo de área contaminada:  
riscos mutagênicos e degradação química**

**Roberta de Souza Pohren**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia, do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências com ênfase em Ecologia.

Orientadora: Prof. Dra. Vera M<sup>a</sup> Ferrão Vargas

Comissão Examinadora:

Prof. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales  
Prof. Dra. Kelly Cristina Tagliari Brito  
Prof. Dra. Teresinha Guerra

Orientadora dos experimentos de biorremediação:  
Prof. Dra. Dejanira de Franceschi de Angeli

Porto Alegre, dezembro de 2015.

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico essa Tese à Força do Universo e Mãe Terra,  
representados pelo amor e apoio de minha sempre presente família.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, força divina que me mantêm firme e me fez conseguir chegar até aqui!

Aos pais mais maravilhosos que eu poderia ter: seres iluminados enviados por Deus para eu ter ao meu lado!! Não tenho palavras para agradecer por tudo que fizeram e fazem por mim, sempre buscando compreender minhas ausências e escolhas! Todo meu amor, mais sincero e grato!!

Ao meu irmão Maico: parceiro anjo presente no meu caminho! Muito obrigada pela disponibilidade e preocupação de sempre!! És exemplar!!!

À minha orientadora Vera M<sup>a</sup> Ferrão Vargas, por toda compreensão neste longo caminho, sempre presente e disponível. Aprendi muito contigo ao longo destes anos, admiro tua conduta pessoal e profissional. Muito obrigada!

À prof<sup>a</sup> Dejanira por ter disponibilizado seu laboratório na Universidade e ter me recebido para realização dos experimentos de Bartha. Obrigada prof<sup>a</sup>, sua disposição e força de vontade são exemplares!!

À querida Dilza, pessoa muito doce e especial! Sempre tão atenciosa e facilitando minha vida durante minhas estadas em Rio Claro;

À prof<sup>a</sup> Marin por ter aberto as portas da UNESP, por toda atenção e gentileza, sem a qual o estágio na Universidade não teria sido possível! Foi muito bom conhecer seu laboratório e ver a intensidade de trabalhos sendo desenvolvidos!

À Tita, Jocelita Rocha, muito obrigada de coração por ter dividido tantos momentos comigo ao longo destes anos: extrações, cálculos, risadas, dúvidas....Sempre com as palavras certas e serenas!!

Ao meu bolsista guerreiro: Kauê Hohn, muitíssimo obrigado pela disponibilidade, bom humor e força aí no lab. Tua ajuda foi muito importante!!

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica da UNESP, ao Richard Tomazella pelo auxílio inicial com a montagem dos Barthas; ao Márcio Rozin pela disponibilidade em auxiliar com os experimentos dos Barthas!

À Nair Conde Almeida pelo auxílio com os Barthas e todas as discussões quanto à eficiência da degradação. Valeu pelo auxílio!!

À querida Thaís Fernandes por toda ajuda e prontidão em me ensinar o teste de HepG2 e me auxiliar em Rio Claro; à Paula Suares pelo auxílio também com o teste de células!!

Agradeço àqueles que foram compreensivos durante esta jornada: minha querida e sempre compreensiva chefe na Fepam, Vanessa Isabel dos Santos Rodrigues, também à Fabiani Vitt pela receptividade e auxílio para que eu conciliasse todas as minhas atividades;

Aos meus colegas do Licenciamento Fepam - SELMI, pelo apoio e por me mostrarem como é possível trabalhar seriamente, e também se divertir... Às minhas colegas Shaiane Canabarro e Scheila Huber pelas dicas e motivações, e à Jaqueline Bolschi pelos desabafos nos últimos meses!

Agradeço imensamente pela acolhida da Grasi e Doug durante o período que fiquei em SP: vocês foram de uma hospitalidade e atenção ímpares! Nunca irei esquecer!

Às amigas que conseguiram compreender a jornada da escolha de fazer um Doutorado: perdoem-me pelos momentos de ausência! Irei recuperar todos eles!! Estou voltando Dani, Tanara, Rê, Carol, Déia!!!!

Às gurias que me ensinaram muito, Kelly Brito, Mariana Coronas e Andréia Lemos, mais distantes agora, mas, muito importantes no desenrolar desta história no laboratório de mutagênese!

Aos funcionários, bolsistas e estagiários da Divisão de Biologia da FEPAM que em algum momento desta caminhada estiveram presentes: ao pessoal da coleta, João, Nina, Rubem, Clarice, Kati, Ieda, equipe de amostragem...

À Duda, Eduarda Pantoja, pelo auxílio final com as referências!

À Márcia Kaffer pelo super auxílio, paciência e atenção com as análises estatísticas!

Ao meu colega de Doutorado Vinícius Bastazini pelas análises estatísticas super refinadas! Ainda pretendo usá-las!!

Ao meu colega de Doutorado Gustavo Hallwass pelos helps e dicas!

À Cris Matzenbacher pelo help com as lâminas no final do segundo tempo!!

À Fabi, Fabiane Lucheta, pelas risadas e desabafos lá no comecinho....

A outras pessoas especiais que cruzaram meu caminho neste período e que eu não tenha lembrado neste momento, muito obriagada: Thati Cappi, Monice, Cris Vaz, Pri, Cris...

À M<sup>a</sup> Lúcia Rodrigues e Karem A. Leal, da Química pelo apoio sempre que solicitado!!

À Jandyra Fachel (NAE-UFRGS), e Gilberto Mesquita pela consultoria estatística;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da UFRGS, aos coordenadores, aos professores sempre disponíveis, aos colegas de aula, à Silvana, sempre disponível e querendo auxiliar e à CAPES, pela concessão da bolsa durante maior parte do período de realização do Doutorado.

## RESUMO

Um dos grandes passivos ambientais na atualidade são as áreas contaminadas por preservativos de madeira. Ao longo do desenvolvimento desta atividade industrial fez-se uso de muitas substâncias tóxicas, entre as quais algumas de uso proibido hoje, como pentaclorofenol (PCP) e mais recentemente, de uso controlado, o creosoto. Esta substância trata-se de um óleo de composição complexa, predominando hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em sua formulação, sendo responsáveis pela alta toxicidade e conseqüentemente, altos riscos à saúde humana e a processos ecológicos. Neste contexto, surge a necessidade de intervenções para remediar estes locais com solo contaminado e recuperar sua qualidade ambiental. As estratégias de avaliação de risco durante e após processos de remediação têm sido através de parâmetros físicos e químicos, embora esses não detectem todos os possíveis efeitos da exposição. O presente estudo avalia a eficiência da biorremediação de solo contaminado de usina para tratamento de madeira desativada. Foram preparados dois consórcios de microrganismos autóctones a partir deste solo, para experimentos em escala de microcosmos, aplicando técnicas de bioaugmentação (Inóculo 1) ou de bioaugmentação/bioestimulação/enriquecimento (Inóculo 2). Extratos orgânicos de solo antes e após biorremediação foram monitorados através de produção de CO<sub>2</sub> pela respiração microbiana, decaimento de mutagênese pelo ensaio *Salmonella*/microssoma, método de microssuspensão (linhagens TA98, TA100, TA97a, YG1041 e YG1042) e dos 16 HPAs considerados prioritários pela USEPA. O solo foi caracterizado quanto a arsênio, cobre, cromo e PCP, estando este, acima do limite da legislação. Quanto aos HPAs, os experimentos indicaram altas taxas de redução para HPAs de alto e baixo PM. Os tratamentos apresentaram redução na mutagênese e concentração de HPAs em relação ao solo contaminado (SC) controle e correlação significativa entre potência mutagênica e concentração de HPAs. As análises de produção de CO<sub>2</sub> mostraram diferença significativa entre todos os tratamentos em relação ao solo controle, exceto um dos inóculos, 2SC, bioaugmentado, com expressiva redução da mutagênese comparado ao Inóculo 2, 9SC, embora esse com maior produção de CO<sub>2</sub> e degradação de HPAs. Pode-se considerar a possível geração de sub-produtos dos HPAs após biodegradação parcial. Os extratos com somatório de mutagênese mais baixos após o processo foram os tratamentos 2SC com Inóculo 1, 4SC com Inóculo 1 e pool de HPAs

e 10SC com Inóculo 2 associado a pool de HPAs. Em SC foi observada mutagênese nas linhagens sensíveis a nitrocompostos, YG1041 e YG1042, com valores antes da remediação de 747 e 567 rev/g solo, respectivamente, com completo decréscimo desses efeitos no experimento com o Inóculo 1; já com Inóculo 2, os efeitos se mantiveram apenas em YG1042. A presença desta classe de substâncias indica riscos persistentes, mesmo após reduções expressivas na concentração de HPAs. Os consórcios de bactérias e fungos da área se mostraram adaptados e eficazes na biodegradação em experimentos de microcosmos, sendo que o uso de bioaumentação e bioestimulação, além de monitoramento biológico, foi uma estratégia adequada na biorremediação dos HPAs. Os efeitos indicaram necessidade de avaliar a eficiência dos processos a partir da investigação da mutagênese persistente, prevenindo liberação de uso de áreas com potenciais riscos ecológicos e à saúde da população.

**Palavras chaves:** biorremediação; solos; mutagenicidade; HPAs, nitroarenos; oxi-HPAS; bioaumentação; bioestimulação

## ABSTRACT

One of the great environmental liabilities is areas contaminated by wood preservatives using toxic substances, some of which are currently forbidden, such as pentachlorophenol (PCP) or controlled, such as creosote. This is a complex oil formed by 85% polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) responsible for high toxicity, risks to human health and ecological processes, justifying remedial actions. The strategies for risk evaluation during and after these processes have been using physical and chemical parameters, although these do not detect the possible effects of exposure. The present study evaluates the efficiency of bioremediation of contaminated soil at the deactivated wood treatment plant. Two consortia of autochthonous microorganisms were prepared from this soil for small scale experiments with microcosms, applying bioaugmentation (1) or bioaugmentation/biostimulation/enrichment (2) techniques. Organic soil extracts before and after bioremediation were monitored through the production of CO<sub>2</sub> by microbial respiration, deay of mutagenesis by the *Salmonella*/microsome assay (microsuspension method; strains sensitive to nitroarenes) and dosage of the 16 PAHs considered a priority by USEPA. The soil was characterized as to arsenic, copper, chromium and PCP, and was within the legally established limits. As to the PAHs, the experiments indicated high rates of reductions for species with a high and low MW. The treatments presented a reduction in mutagenesis and concentration of PAHs in relation to the contaminated soils (CS), control and significant control and correlation between mutagenic potency and PAHs concentration. The CO<sub>2</sub> production analyses showed a significant difference between all treatments compared to the control soil, except for one of the inoculums, 2SC (1), with a marked reduction of mutagenesis compared to 9SC (2), although with a greater evolution of CO<sub>2</sub> and degradation of PAHs. The possible generation of PAHs by products after partial biodegradation can be considered. The extracts with lower sum total of mutagenesis after the process were treatments 2SC (1), 4SC (1) and 10SC (2) associated with a pool of PAHs. Mutagenesis was observed in the nitrocompound sensitive strains, YG1041 and YG1042, with values of 747 and 567 rev/g soil respectively before remediation, and with a complete decrease of the effects in YG1042 (1); on the other hand, with Inoculum (2) the effects remained only in YG1042. The presence of this class of substances indicates persistent risks, even after marked reduction in PAHs concentration. This evidence indicates that mutagenesis and



integrated chemical analyses allow the effective evaluation of the risks of the process. The relevance of the methodology is highlighted, beginning with soil contaminated by a complex mixture of PAHs, where the consortia of bacteria and fungi in the area prove adapted and efficient to perform biodegradation in microcosm experiments. The use of bioaugmentation and biostimulation, besides biological monitoring, was an appropriate strategy for the bioremediation of PAHs. The effects indicate the need to evaluate the efficiency of processes based on the investigation of persistent mutagenesis, avoiding the release for use of areas with potential hazards to the ecology and to population health.

**Key words:** bioremediation; microcosm; mutagenesis; PAHs, nitroarenes; oxy-PAHs; bioaugmentation; biostimulation

**LISTA DE ABREVIACÕES**

2AF	2-aminofluoreno
BaCl <sub>2</sub>	cloreto de bário
BH	meio <i>Buschell Hass</i>
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
CCA	arseniato de cobre cromatado
CC	capacidade de campo
CERCLA	Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DCM	diclorometano
DMSO	dimetilsulfóxido
EEA	Agência de Proteção Ambiental da Europa
FeCl <sub>3</sub>	cloreto de férrico
FEPAM	Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler
HCl	ácido clorídrico
HPAs/PAHs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
KOH	hidróxido de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato de potássio monobásico
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato de potássio dibásico
MeOH	metanol
MgSO <sub>4</sub>	sulfato de magnésio
NaOH	hidróxido de sódio
NA	ágar nutriente
NaCl	cloreto de sódio
2NF	2-nitrofluoreno
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	nitrato de amônio
NPL	lista de áreas contaminadas prioritárias para intervenção nos EUA
4NQO	4-oxidonitroquinolina
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCA	Análise de Componentes Principais

PCP	pentaclorofenol
PM	peso molecular
SC	solo da área contaminada
SDA	ágar <i>Sabouraud</i> dextrose
S9 mix	fração de metabolização exógena
tmutag	somatório de efeitos mutagênicos
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
UNESP	Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UFC	Unidade Formadora de Colônia

**LISTA DE FIGURAS****Artigo 1: DESEMPENHO DE BIORREMEDIAÇÃO DE HPAs POR BIOAUMENTAÇÃO E BIOESTIMULAÇÃO DE SOLO DE ÁREA CONTAMINADA**

- Figura 1.** Sítio de solo contaminado na cidade de Triunfo/RS com indicação dos pontos de coleta dos solos amostrados.....**56**
- Figura 2.** Quantificação média das UFC/g/ss de bactérias e de fungos após tratamentos respirométricos.....**64**
- Figura 3.** Produção acumulada de CO<sub>2</sub>/dia nos ensaios de biodegradabilidade através da respirometria de Bartha.....**68**
- Figura 4.** Produção acumulada de CO<sub>2</sub>/dia nos experimentos com acréscimo do *pool* de HPAs.....**72**
- Figura 5.** Concentração de HPAs totais antes e após biodegradação.....**74**
- Figura 6.** Desempenho de degradação dos HPAs após microcosmos.....**76**

**LISTA DE FIGURAS****Artigo 2: BIORREMEDIAÇÃO EM SOLOS CONTAMINADOS POR HPAS: MUTAGENICIDADE COMO FERRAMENTA PARA VALIDAR QUALIDADE AMBIENTAL**

- Figura 1.** Concentração de PCP em extratos orgânicos de solo antes e após experimentos de biorremediação.....**98**
- Figura 2.** Somatório da mutagenicidade de diferentes linhagens nos extratos orgânicos de solos antes e após experimentos de biodegradação.....**100**
- Figura 3.** Potência mutagênica no solo antes da biorremediação, e após no SC controle e no solo com inóculos frente às linhagens testadas.....**102**
- Figura 4.** Potência mutagênica nas linhagens TA98 e TA100 e suas derivativas.....**106**
- Figura 5.** Concentração de HPAs detectados antes e após realização dos experimentos de biodegradação.....**108**
- Figura 6.** Concentração de HPAs carcinogênicos antes e após os experimentos de biodegradação.....**110**
- Figura 7.** Concentração de HPAs totais antes e depois dos experimentos de biodegradação em relação ao somatório de efeitos mutagênicos – tmutag.....**111**
- Figura 8.** Análise de Componentes Principais (PCA).....**112**

**LISTA DE TABELAS****Artigo 1: DESEMPENHO DE BIORREMEDIAÇÃO DE HPAs POR BIOAUMENTAÇÃO E BIOESTIMULAÇÃO DE SOLO DE ÁREA CONTAMINADA**

<b>Tabela 1.</b> Protocolo experimental de biodegradação nos respirômetros.....	<b>60</b>
<b>Tabela 2.</b> Quantificação média das UFC/g/ss de bactérias identificadas no solo contaminado.....	<b>66</b>
<b>Tabela 3.</b> Degradação dos HPAs (BiodHPAs ) em cada um dos tratamentos em relação ao SC antes da Biorremediação e % Remanescente de HPAs após microcosmos (SC).....	<b>74</b>
<b>Tabela 4.</b> Concentração inicial de HPAs no solo contaminado antes da biodegradação nos ensaios de respirometria e taxa final de biodegradação individual .....	<b>78</b>

## LISTA DE TABELAS

### **Artigo 2: BIORREMEDIAÇÃO EM SOLOS CONTAMINADOS POR HPAS: MUTAGENICIDADE COMO FERRAMENTA PARA VALIDAR QUALIDADE AMBIENTAL**

**Tabela 1.** Citotoxicidade de extratos orgânicos de solos em presença e ausência de sistema de metabolização (S9).....**99**

**Tabela 2.** Concentrações dos 16 HPAs prioritários nos tratamentos de biodegradação e regulamentações aplicáveis para solos.....**113**

**Tabela 3.** Média Geométrica de Valores de Mutagenicidade em *Salmonella*.....**115**

**Tabela 4.** Mutagenicidade de Extratos Orgânicos de Solos e relação com categorias estabelecidas por White & Claxton (2004).....**116**

## SUMÁRIO

Agradecimentos .....	iii
<b>RESUMO .....</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ABREVIACÕES .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
1.1 Objetivos .....	40
1.2 Área de Estudo .....	41
1.3 Locais de Amostragem .....	42
1.4 Metodologia .....	43
1.4.1 Microrganismos autóctones do solo .....	43
1.4.2 Preparo dos Inóculos .....	44
1.4.3 Respirômetros de Bartha .....	45
1.4.4 Extração orgânica das amostras .....	47
1.4.5 Análises químicas dos HPAs .....	48
1.4.6 Mutagenicidade nas amostras de solo .....	48
1.5 Estruturação da tese .....	50
<b>2. Desempenho de biorremediação de HPAs por bioaumentação e bioestimulação de solo de área contaminada .....</b>	<b>52</b>
1. Resumo .....	52
2. Introdução .....	53
2. Material and Métodos .....	55
3. Resultados e Discussão .....	63
4. Conclusões .....	81



4. Referências Bibliográficas .....	82
<b>3. Biorremediação em solos contaminados por HPAs: mutagenicidade como ferramenta para validar qualidade ambiental .....</b>	<b>87</b>
1. Resumo .....	87
1. Introdução .....	89
2. Material e Métodos .....	92
3. Resultados e Discussão .....	97
4. Conclusões .....	116
4. Referências Bibliográficas .....	118
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>123</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>128</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A partir do desenvolvimento das atividades industriais e intensificação da exploração de recursos naturais, um dos compartimentos mais impactados é o solo. Este sistema dinâmico onde estão constantemente ocorrendo fluxos de matéria e energia entre microrganismos, plantas, compostos químicos e ambiente externo, é componente vital dos ecossistemas, no qual ocorrem processos e ciclos de transformações químicas, físicas e biológicas. Este compartimento ambiental pode ser definido como sistema natural que cobre a superfície terrestre, sendo constituído de materiais minerais e orgânicos, contendo organismos vivos e sustentando a vida na biosfera (Streck et al. 2008; Jones 1997). Entre suas principais funções estão: i) fornecimento de nutrientes e água para plantas; ii) reciclagem de nutrientes e resíduos orgânicos; iii) habitat para organismos vivos; iv) regulador e filtro da água no sistema hidrológico; v) meio para descarte de resíduos e rejeitos; e vi) meio e material para obras de engenharia (Streck et al. 2008). Associadas à riqueza de funções deste compartimento surgem as implicações na qualidade ambiental, haja vista sua utilização - por muito tempo indiscriminada e sem controle - como um sumidouro para os resíduos gerados pelas atividades humanas. Como resultado, hoje estão espalhadas pelo mundo todo, milhares de áreas contaminadas por diferentes rejeitos e produtos químicos indevidamente geridos pelo homem. Segundo a Norma brasileira para avaliação preliminar de passivo ambiental em solo e água subterrânea – ABNT NBR 15515-1:2007, uma área contaminada é “onde as concentrações de substâncias químicas de interesse estão acima de um valor de referência vigente na região, no país ou, na ausência desse, aquele internacionalmente aceito, que indica a existência de um risco potencial à segurança, à saúde humana ou ao meio ambiente”. Nota-se claramente a associação de áreas contaminadas com a possibilidade de risco ecológico e à saúde humana. O conceito da CETESB – órgão

ambiental do Estado de São Paulo, introduz uma série de elementos ao conceito de área contaminada, trazendo como: “área, local ou terreno onde há comprovadamente poluição ou contaminação causada pela introdução de quaisquer substâncias ou resíduos que nela tenham sido depositados, acumulados, armazenados, enterrados ou infiltrados de forma planejada, acidental ou até mesmo natural”. Nesta definição, também está inserido o enfoque à possibilidade de afetar à saúde humana e o meio ambiente. O surgimento destes locais está associado ao manejo indevido feito pela sociedade humana, de diferentes produtos químicos produzidos e utilizados, e ao desrespeito às legislações de proteção ambiental existentes. A própria publicação de normativas de proteção de qualidade dos solos no país é bastante recente, contando apenas a partir de 2009, com a publicação da Resolução CONAMA – Conselho Nacional de Meio ambiente – Nº 420, dispondo sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelecendo diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Esta normatização ampliou e favoreceu a atuação dos órgãos fiscalizadores no sentido de permitir a exigência e execução de medidas de intervenção nas áreas identificadas como contaminadas uma vez que trouxe valores balizadores permitindo a tomada de decisão e gestão destes locais contaminados.

No Brasil, a CETESB iniciou a publicação de listas com o número de áreas contaminadas a partir do ano de 2002. Este levantamento é constantemente revisado, e tem aumentado dada à fiscalização existente no estado de SP e identificação de novas áreas, totalizando em dezembro de 2014, 5.148 registros no Cadastro de Áreas Contaminadas e Reabilitadas no Estado de São Paulo. Nesta última divulgação, foram apresentados os principais grupos de contaminantes encontrados nas áreas contaminadas, sendo os principais responsáveis pelas contaminações evidenciadas, os

solventes aromáticos (oriundos de postos de combustível), combustíveis líquidos e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs ou HPAs), metais e solventes halogenados, conforme Figura 1:

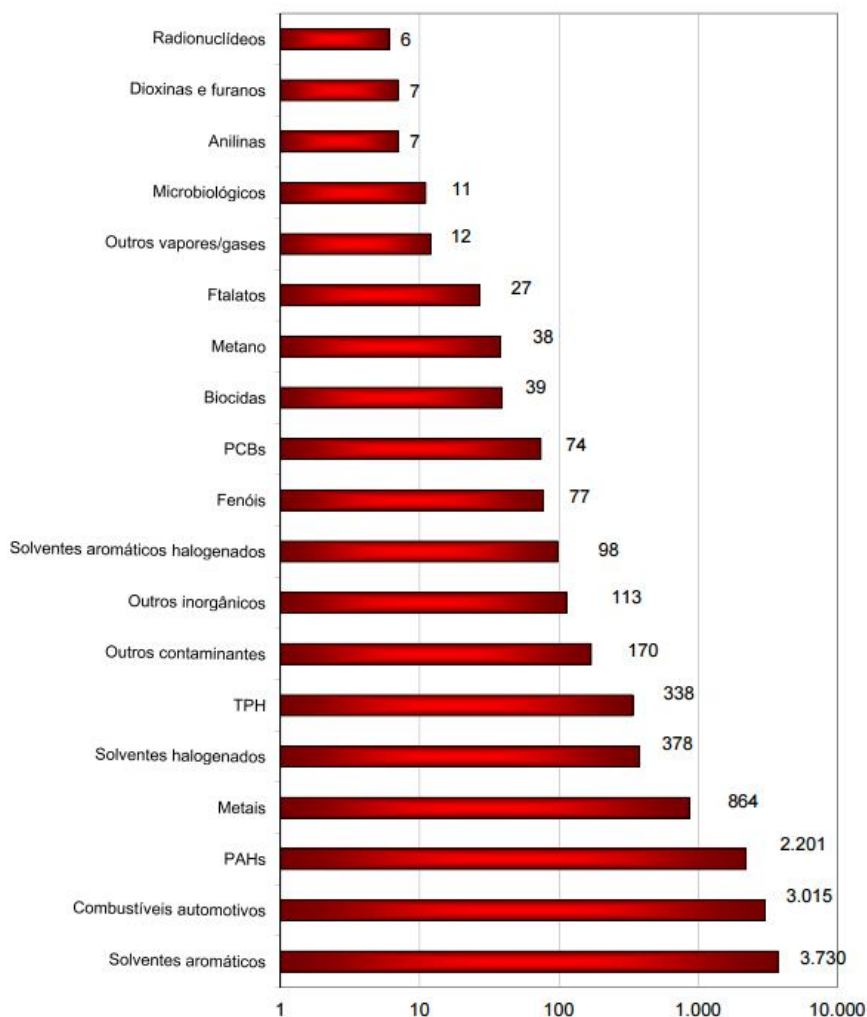


Figura 1. Constatações de grupos de contaminantes em SP - dezembro de 2014  
Fonte: CETESB, 2014.

Outros estados brasileiros têm levantamentos incipientes do número de áreas contaminadas em seus territórios, não os disponibilizando através de mecanismo oficial de divulgação. O RS tem iniciado dentro de seu órgão ambiental – FEPAM – a identificação e registro das áreas contaminadas associadas aos processos de

licenciamento. Contudo, ainda não há uma publicação oficial dos números cadastrados até este momento.

No cenário mundial, a Agência norte-americana de Proteção Ambiental – USEPA tem longo histórico de identificação e gestão de áreas contaminadas em seu território através de Programas específicos como *Superfund* ou CERCLA (*Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act*). Este programa aprovado pelo Congresso, em 1980 estabelece as áreas mais contaminadas da nação, priorizando-as quanto à necessidade de intervenções ambientais de emergência, resultando na NPL - *National Priorities List*. A lista atual dos locais mais seriamente contaminados traz 1.323 sites como prioritários para remediação, dentro de um conjunto de milhares de áreas identificadas pela Agência norte-americana.

Considerando o documento “*Progress in Management of Contaminated Sites*” da EEA (Agência Ambiental Européia) organizado pelo “*National Reference Centres for Soil*” em 39 países da Europa pertencentes à “*European Environment Information and Observation Network (EIO-NET)*” em campanha entre 2011 e 2012 do “*JRC European Soil Data Centre*”, há uma estimativa de 2.5 milhões de áreas potencialmente contaminadas na Europa, das quais 342.000 são reconhecidas como contaminadas e exigindo medidas de remediação ou sob este processo.

Este documento mostra que os custos para investigações em áreas contaminadas oscilam entre €5.000-50.000 (60 % dos casos), e restante entre €50.000-500.000, sendo pequenos projetos de custos inferiores a €5.000 ou casos extremos de mais de 5 milhões de euros, estimando um custo de €5 bilhões por ano.

Estes locais contaminados são geridos predominantemente por técnicas tradicionais, como escavação e disposição fora da área contaminada seguidos por técnicas de remediação *in-situ*, como tratamento químico e tratamento biológico *ex-situ*.

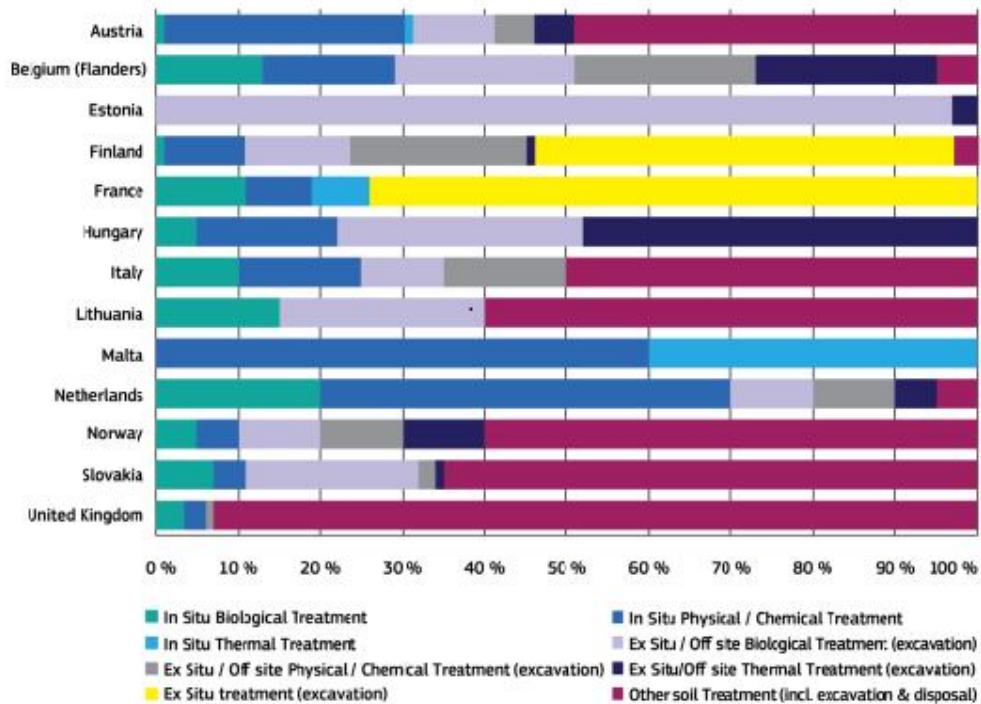


Figura 2. Técnicas de remediação mais frequentemente aplicadas  
 Fonte: EEA - Agência Ambiental Européia, 2014.

Este contexto indica que a contaminação dos solos por compostos químicos antropogênicos requer controle e monitoramento, podendo implicar em intervenções, uma vez que os solos têm resiliência limitada para conter e transformar produtos químicos, contaminantes dispostos indevidamente. Assim, podem ser caracterizadas alterações na qualidade do solo - definida como a capacidade do solo de manter suas funções, sustentar produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde animal, vegetal e humana (Jones 1997). Desta forma, uma vez que o solo é um recurso natural lentamente renovável, surge a necessidade de recuperar a qualidade ambiental nestes sistemas naturais.

Atualmente, uma das principais preocupações é justamente, reverter a degradação e/ou contaminação de solos. Os diferentes processos de remediação existentes atuam nesta interface, sendo que um dos desafios da atualidade é desenvolver estratégias de baixo custo, eficientes e ecologicamente favoráveis para recuperação da

qualidade ambiental dos solos. Destaca-se que não há uma única maneira correta de limpar um local contaminado, havendo uma ampla gama de tecnologias que podem ser utilizados individualmente ou complementados entre si. Muitos métodos de descontaminação convencionais como volatilização, oxidação, incineração e absorção podem ser utilizados. Contudo, muitas destas técnicas fazem uso de compostos químicos que podem até aumentar a toxicidade a ser tratada, como o processo de oxidação com  $H_2O_2$ , ou, a incineração, a qual produz contaminantes atmosféricos. Portanto, algumas destas opções além de possuírem custo elevado, podem não ser sustentáveis.

Entre as inúmeras técnicas disponíveis visando à remediação de solos contaminados, a biorremediação surge como uma biotecnologia de destaque, uma vez que através da ação de microrganismos – muitas vezes já existentes no solo, degrada contaminantes sem implicar no uso de produtos químicos e/ou outras estruturas físicas de controle. É um processo que emprega microrganismos com potencial para degradar ou transformar moléculas poluentes em compostos menos tóxicos e tem aplicação já reconhecida (Johnsen et al., 2005; Kanaly e Harayama, 2000; Gan et al., 2009). A biorremediação é uma tecnologia de remediação sustentável (Balba et al. 1998), sendo a estratégia de recuperação de solos mais ecológica e atrativa do ponto de vista de proteção e promoção das funções do solo, uma vez que muitos processos clássicos de remediação implicam em maior consumo de recursos naturais do que o próprio processo contaminação e/ou degradação em si. A ampliação do uso de processos de remediação baseados na ação de microrganismos implica uma mudança de paradigma, no sentido de estabelecer uma visão sistêmica ao se remediar uma área impactada. Isso se deve ao fato de que embora a biorremediação tem um tempo de resposta mais lento, implica em menor alteração das características do ecossistema solo, promovendo uma remediação

sustentável. O uso da biorremediação na recuperação dos solos contaminados ainda é pouco adotado no Brasil. Contudo, o uso desta biotecnologia vem crescendo mundialmente, sendo amplamente aplicada em áreas contaminadas nos EUA e Europa (Liedekerke et al. 2014; USEPA 2015).

Esta técnica refere-se ao uso de microrganismos, como bactérias, fungos e algas, para transformar moléculas recalcitrantes, promovendo a quebra de compostos orgânicos através de sua utilização como fonte de carbono/nutriente. Este processo de biotransformação leva a metabólitos menos complexos, até mineralização a  $H_2O$  e  $CO_2$  em processos aeróbicos ou  $CH_4$ , se via anaeróbica (Haritash e Kaushik 2009; Trindade et al. 2005). Na biodegradação aeróbica, os compostos serão oxidados a compostos orgânicos tendo o oxigênio comoceptor de elétrons, enquanto que num sistema anaeróbico, os aceptores de elétrons serão nitrato, bicarbonato, sulfato, entre outros (Kumar e Gopal 2015; Gan et al. 2009).

De acordo com o Guia de Elaboração de Planos de Intervenção para o Gerenciamento de Áreas Contaminadas (2014) a biorremediação é a estimulação da atividade dos microrganismos autóctones para reforçar a degradação biológica de contaminantes orgânicos através da versatilidade metabólica dos microrganismos e/ou suas enzimas. É ressaltado que pode haver uma redução na concentração e/ou na toxicidade dos contaminantes em questão.

A biorremediação pode ocorrer através de diferentes estratégias. Pode ser utilizada a própria comunidade microbiana indígena do solo sem qualquer aporte artificial, trata-se de “biorremediação intrínseca” ou “atenuação natural”. Esta irá ocorrer sem qualquer intervenção e poderia ser considerada a melhor ação para remediação, se for eficiente – haja vista que para alguns contaminantes, a taxa de biodegradação é muito lenta (Kumar e Gopal 2015; Fernández-Luqueño et al. 2011). O



processo de biorremediação ocorrerá devido à adaptação natural da microbiota nativa do solo aos contaminantes existentes. Portanto, o sucesso da biodegradação e o tempo envolvido nas etapas de biotransformação dependem do período necessário de seleção da população microbiana estar adaptada ao contaminante. Esta “adaptação” refere-se ao aumento da capacidade oxidante da comunidade microbiana presente, podendo ocorrer através dos seguintes mecanismos: i) indução e/ou depressão de enzimas específicas; ii) mudanças genéticas as quais resultam em novas capacidades metabólicas e iii) enriquecimento seletivo de organismos capazes de transformar os compostos de interesse. Sendo esse último comumente explorado em experimentos com hidrocarbonetos, indicando que após exposição dos microrganismos ao contaminante, pode ou não ocorrer um aumento na proporção daqueles microrganismos hidrocarbonoclasticos. Este fenômeno pode estar associado com a predominância de poucos gêneros capazes de degradar os hidrocarbonetos. Desta forma, pode-se entender que os níveis de microrganismos capazes de metabolizar o contaminante irão refletir o grau de contaminação do ecossistema. Contudo, pode não haver modificações nas populações presentes, sendo os resultados altamente dependentes das condições locais do ambiente (Leahy e Colwell 1990).

Para os casos em que a contaminação é maior que a habilidade dos microrganismos de degradá-los, faz-se necessário o uso de estratégias complementares à biorremediação. Esta complementação pode ocorrer através de outras técnicas de remediação. Com esta finalidade, e para manter os benefícios da biorremediação, podem ser usadas as técnicas de bioaugmentação e bioestimulação. Quando é realizada a adição de agentes estimulantes como nutrientes, oxigênio e surfactantes tratando-se do processo conhecido como bioestimulação. Esta prática visa aumentar a população microbiana, considerando que aumentando sua presença na área a ser biorremediada,

maiores são as chances de eficiência no processo de remediação. Se ocorre a inoculação de consórcios microbianos, adição de populações microbianas autóctones ou exógenas ou ainda microrganismos geneticamente modificados, refere-se à técnica de bioaumentação (Jacques et al. 2007; Trindade et al. 2005; Sayara et al. 2011). Esta pode ser entendida também como enriquecimento, ou ainda, o enriquecimento pode ser com os contaminantes de interesse. Na bioaumentação, os microrganismos deverão utilizar os contaminantes orgânicos presentes no meio, como fonte de carbono e/ou energia, ou pelo menos produzir substâncias capazes de tornar o contaminante mais biodisponível. Os microrganismos a serem utilizados podem ser previamente isolados do meio ou selecionados de coleções de cultura (Moraes et al. 2014). Cabe destacar, quanto ao uso de microrganismos geneticamente modificados, sobre as implicações de risco em sua manipulação, e quanto à possibilidade de competição com aqueles nativos, ameaçando a composição das comunidades (Fernández-Luqueño et al. 2011).

A utilização de microrganismos autóctones em áreas contaminadas pode facilitar a seleção de agentes despoluidores eficientes para os estudos de biorremediação, uma vez que sua presença no sítio contaminado indicaria tolerância ao estresse. Microrganismos autóctones do solo, ou indígenas, se referem ao grupo microbiano que habita o solo naturalmente, sendo considerado nativo. Assim, caracterizam não uma única cultura, mas, uma mistura ou consórcio presente no solo, com potencial para biodegradação, devido a estes microrganismos serem fisiologicamente compatíveis e suas rotas metabólicas complementares. (Kumar e Gopal 2015). Muitos estudos revelam a utilização da microbiota pré-selecionada do ambiente contaminado para ser utilizada eficientemente na biorremediação (Trindade et al. 2005; Sun et al. 2010; Serrano et al. 2009).

Na bioestimulação, considera-se a possibilidade de os contaminantes de interesse ser degradados mais rapidamente do que no processo de degradação natural, uma vez que irá ocorrer um aumento da população de microrganismos em função do acréscimo de nutrientes (Sarkar et al., 2005).

Atualmente, muitas das estratégias de biorremediação propõem utilizar as técnicas de bioestímulo e bioaumento concomitantemente uma vez que dada à complexidade na recuperação de áreas contaminadas, o uso complementar das técnicas favorece à biorremediação. Assim, propostas de biorremediação onde as populações autóctones sejam bioestimuladas aliadas à bioaugmentação, seja com fungos ou bactérias, são propostas viáveis (USEPA 2015; Trindade et al. 2005; Hamdy et al. 2007). Ainda, como forma de biorremediação encontram-se as técnicas de fitorremediação, *landfarming*, compostagem e/ou associações destas (Gan e Ng 2009; Jacques et al. 2007; Haritash e Kaushik 2009).

A biorremediação pode ocorrer de duas formas: *ex situ* e *in situ*. Quando realizada *in situ* significa que o material contaminado será tratado onde está, no local de sua geração. Já a biorremediação *ex situ*, significa que o tratamento irá implicar na remoção do material contaminado para outro local/instalação adequado à realização do tratamento. Deve ser considerado que quando é realizada *in situ* não implica em escavação e transporte até o destino de tratamento, minimizando outras implicações ambientais.

Vários estudos têm sido descritos trazendo exemplos da atuação bem sucedida de técnicas de bioaugmentação e bioestimulação na remediação de contaminantes. Sayara et al. (2011) investigando o impacto da bioaugmentação e bioestimulação em solo artificialmente contaminado por HPAs, utilizou-se de fungo para promover o bioaumento e de composto orgânico para bioestimar a biorremediação, tendo

encontrado resultados superiores através da bioestimulação promovida pelo composto adicionado. Em estudo de Trindade et al. (2005) aplicando técnicas de bioestimulação e bioaumentação em solos com contaminação recente e com contaminação antiga de hidrocarbonetos, foi observado em todas as amostras submetidas às diferentes estratégias de biorremediação, eficiências superiores na biodegradação em relação ao tratamento do solo sob atenuação natural.

Destaca-se que nas diferentes técnicas de biorremediação, tanto na bioaumentação quanto na bioestimulação, os microrganismos desenvolvem seu ciclo de vida no solo a ser tratado, descontaminando-o. Os microrganismos são capazes de explorar várias fontes orgânicas e inorgânicas para seu crescimento, sendo esta versatilidade responsável por promover a degradação de compostos recalcitrantes. No caso da biodegradação de hidrocarbonetos complexos normalmente ocorre cooperação de mais de uma espécie, enquanto microrganismos individuais podem metabolizar apenas uma gama limitada de substratos de hidrocarbonetos. Pode ocorrer uma degradação sinérgica por fungos e bactérias, onde os fungos irão inicialmente quebrar o anel aromático e então as bactérias irão ser capazes de degradar os metabólitos resultantes (Sayara et al. 2011).

Quando a densidade do inóculo inicial é suficientemente alta, há uma grande probabilidade destes microrganismos se estabelecerem no solo e serem efetivos, mantendo as interações positivas e auxiliando nos processos de biodegradação. Assim, os microrganismos podem atuar de maneira efetiva e economicamente atrativa como solução para descontaminação de solos. Podem atuar isoladamente ou em combinação na forma de consórcios, onde as taxas e a extensão da biodegradação serão elevadas. Os microrganismos atuando individualmente irão metabolizar somente uma parte da carga de contaminantes, enquanto, os consórcios permitirão ação conjunta visando à

degradação de misturas complexas (Haritash e Kaushik 2009; Li et al. 2008; Moscoso 2012; Boonchan et al. 2000).

A atividade metabólica dos microrganismos presentes no solo pode ser avaliada mediante quantificação do CO<sub>2</sub> produzido pela respiração microbiana (Bartha e Pramer 1965). Através deste parâmetro indicativo da biodegradação, permite-se avaliar através de sua produção ao longo do tempo, a eficiência da biorremediação dos contaminantes sob tratamento (Cerniglia 1992; Jacques et al. 2005; Jacques et al. 2007). Desta forma, após transcorrido o período de degradação, ao quantificarmos a produção de CO<sub>2</sub> poderemos obter quanto do contaminante foi assimilado pelos microrganismos e se efetivamente houve ou não a mineralização dos compostos de interesse. Destaca-se assim, a relevância da respirometria como técnica para subsidiar estudos avaliando a eficiência da biorremediação.

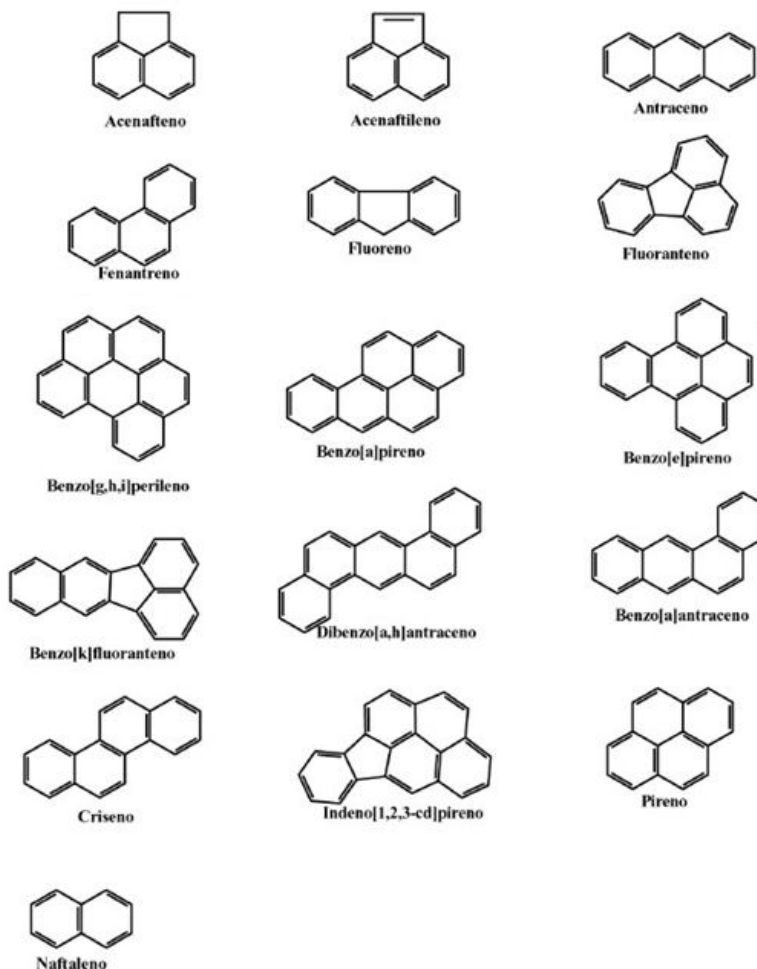
A eficiência dos processos de biorremediação está relacionada a condições ambientais, fatores físicos e químicos como, temperatura, pH, conteúdo de matéria orgânica, nutrientes, oxigênio disponível, propriedades de transporte celular, tipo e quantidade dos microrganismos, natureza e estrutura dos compostos químicos alvos da degradação (Cerniglia 1992; Kumar e Gopal 2015; Haritash e Kaushik 2009).

Um dos fenômenos importantes envolvidos na biodegradação é a *quimiotaxia*, onde os microrganismos podem migrar em direção ao estímulo químico, à presença do contaminante. O aumento da degradação ocorre devido à redução da distância entre os microrganismos e o contaminante - que costuma ser um obstáculo significativo para a degradação. É um fenômeno complexo, onde os microrganismos respondem comportalmente às mudanças na concentração de compostos químicos (Posada-Baquero e Ortega-Calvo 2011; Samanta et al. 2002).

Entre as principais classes de contaminantes de maior preocupação mundial estão os HPAs. Estes formam um grupo de centenas de compostos, sendo caracterizados pela presença de carbono e hidrogênio associados a dois ou mais anéis benzênicos condensados, os anéis aromáticos. Os compostos com até quatro anéis são ditos de baixo peso molecular (PM), já aqueles com mais de cinco anéis aromáticos são considerados de alto PM, sendo compostos recalcitrantes.

Entre o grande número de compostos existentes, os 16 considerados poluentes ambientais prioritários pela USEPA (Figura 03) e aqueles considerados pela IARC (2010) como: i) Grupo 1 (carcinogênico para humanos): benzo[a]pireno; Grupo 2A (provavelmente carcinogênico para humanos): dibenzo(ah)antraceno; e iii) Grupo 2B (possivelmente carcinogênico para humanos): benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, indeno[1,2,3-cd]pireno, criseno e naftaleno.

Estes compostos estão espalhados pelo globo e na grande maioria das áreas contaminadas, estando normalmente presentes no ambiente como misturas. São persistentes no solo devido a sua baixa solubilidade em água, representando riscos devido sua toxicidade e carcinogenicidade. (Gan e Ng 2009; Moscoso et al. 2012; Posada-Baquero e Ortega-Calvo 2011).



**Figura 3:** Estrutura dos 16 HPAs considerados prioritários (USEPA modificado).

Os tratamentos para solos contaminados com HPAs podem ser classificados como biológicos, químicos ou físicos, sendo que em muitos casos, a combinação destas técnicas é mais efetiva (Fernández-Luqueño et al. 2011). Apesar de esses compostos poderem sofrer volatilização, fotólise e degradação química, a degradação microbiana é o principal processo de degradação. Assim, mesmo com baixa solubilidade em água, o potencial de degradação microbiano de HPAs é bem conhecido. Os microrganismos podem aumentar a sua biodisponibilidade através da produção de biosurfactantes, ou biofilmes, os quais servirão para acumular os HPAs para subsequente degradação.

Ambas as estratégias de bioaumentação e bioestimulação são adequadas à capacidade de microrganismos do solo para dissipar PAHs (Fernández-Luqueño et al. 2011).

O mecanismo de biodegradação aeróbica requer a presença de oxigênio molecular para iniciar o ataque aos anéis aromáticos, tendo como passo inicial a oxidação dos arenos, através de enzimas mono ou dioxigenase, convertendo o composto aromático a intermediários aromáticos (Cerniglia 1992; Moscoso et al. 2012).

As bactérias são capazes de degradar os HPAs via metabolismo ou cometabolismo, assim como os fungos, os quais são fundamentais na degradação de compostos recalcitrantes como HPAs. Esses microrganismos irão iniciar a degradação de HPAs de alto PM, devido à sua capacidade de se difundir no solo através de suas hifas fúngicas e liberar enzimas extracelulares. Podem se difundir em direção aos HPAs, facilitando a degradação pelas bactérias (Li et al. 2008; Fernández-Luqueño et al. 2011; Wang et al. 2012). As hifas dos fungos podem atuar imobilizando as bactérias sobre os fungos em crescimento, facilitando o deslocamento das bactérias no solo (Li et al. 2008).

Assim, a inoculação de bactérias e fungos torna-se atrativa ampliando a degradação dos HPAs, inclusive os de alto PM, conforme estudo de Boonchan et al. (2012) que trabalhando com co-culturas, verificou aumento das taxas de degradação de benzo(a)pireno em relação ao uso de culturas puras.

Há registro de muitos microrganismos capazes de degradar HPAs, como por exemplo: os gêneros bacterianos de *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Rhodococcus*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium* e os fungos: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Bjerkandera adusta*, *Lentinus tigrinus*, *Monilia sp*, *Pleurotus ostreatus*, *Penicillium janthinelum*, *Phanerochaete chrysosporium* entre outros. (Li et al. 2008; Cerniglia 1992; Jacques et al. 2007; Johnsen et al. 2005).



A utilização de HPAs com quatro ou mais anéis aromáticos como única fonte de carbono para bactérias foi demonstrada já em 1989. No estudo, eles mostraram que sete membros de comunidade bacteriana de solos contaminados com creosoto foram capazes de utilizar fluoranteno como fonte de energia (Mueller et al. 1989). Quanto à biodegradação de benzo(a)pireno, HPA com cinco anéis aromáticos, e de comprovada carcinogenicidade, considera-se que a degradação ocorra sob condições de cometabolismo (Boonchan et al. 2000; Kanaly e Harayama 2000). Em estudo avaliando o potencial de degradação de *Burkholderia cepacia* crescendo em pireno como única fonte de carbono, foi observada degradação para fluoranteno e benz(a)antraceno (Juhász et al. 1997). Também são encontrados registros de trabalhos indicando a degradação de HPAs de alto PM por *P. putida*, *P. aeruginosa*, *Flavobacterium sp.* isolados de solo contaminado quando suplementado com outras formas de carbono (Balba et al. 1998).

Os HPAs apresentam grande variação molecular, diferente número de anéis, e moléculas de maior e menor complexidade. Em função disso, os processos de biodegradação envolvidos devem fazer uso de diferentes microrganismos visando obter a complementação das rotas metabólicas e ampliando as enzimas envolvidas na degradação. Neste contexto, o uso de consórcios microbianos se destaca e têm se mostrado mais efetivos na degradação comparativamente às culturas puras, justamente devido a maior possibilidade de utilização de diferentes tipos de HPAs como fonte de carbono.

Em trabalho de Boonchan et al. (2000) foi observada alta eficiência na degradação dos HPAs, mesmo os de alto PM, avaliada pela produção de CO<sub>2</sub> medida e reduções nas concentrações de HPAs quando utilizaram co-culturas de fungos e bactérias, além de redução na mutagenicidade dos extratos orgânicos avaliados em linhagem TA100 conforme Teste de Ames.

Em relação à avaliação de cepas isoladas a uso de consórcios, foram observados resultados significativamente mais rápidos utilizando consórcio adaptado aos HPAs num experimento após período de 40 dias de incubação. Nesses experimentos foram observadas taxas maiores de degradação para os HPAs de PM mais alto. Embora este achado seja conflitante com a consideração de maior resistência à biotransformação para HPAs mais complexos, os autores consideraram que o consórcio aeróbico foi bem adaptado, sendo eficiente à redução não apenas dos HPAs de baixo PM, quanto àqueles com mais de cinco anéis com taxa de 70 - 100% (Yuan et al. 2002).

Um importante fator a ser considerado é a sorção de HPAs à matriz solo como limitante para a disponibilidade microbiana. Sendo que esses compostos são facilmente adsorvidos à matéria orgânica das partículas sólidas, resultando em poluentes persistentes no ambiente, que podem afetar a efetividade da biorremediação em solos contaminados (Fernández-Luqueño et al. 2011; Gan e Ng 2009; Mihelcic 1993). Portanto, os HPAs podem ficar potencialmente indisponíveis à degradação microbiana (Johnsen et al. 2005).

A principal preocupação na biorremediação de locais contaminados por HPAs é a biodegradação dos HPAs de alto peso molecular e seus derivados, que possuem propriedades mutagênicas e carcinogênicas (Balba et al. 1998). Embora com potencial de degradação, os HPAs com quatro ou mais anéis podem ser resistentes à biodegradação microbiana ou podem persistir em concentrações residuais. Estas podem exceder os limites existentes, ou mesmo não ultrapassando o que está expresso em legislação, oferecer riscos associados. Compostos derivados de HPAs, como os oxigenados (oxi-HPAs), também têm sido reconhecidos como mutágenos potentes (Lundstedt et al. 2007). Estes compostos são HPAs com um ou mais oxigênio ligados à estrutura do anel aromático, podendo conter outros grupos químicos como alquilas,

hidroxilas, carbonilas, e carboxilas (Benjamin et al. 2010). Os oxi-HPAs podem ser formados através da pós-emissão de HPAs no ambiente, por oxidação química, foto-oxidação ou transformação biológica (Lundstedt et al. 2007). A maioria destes compostos é polar e mais móvel nos solos que os HPAs (Hartnik et al. 2007). Embora ainda existam poucos estudos sobre a toxicidade desta classe de compostos, tem sido verificado que possuem maior risco ambiental.

Outros derivados de HPAs, que apresentam pelo menos um grupo  $-NO_2$  são conhecidos como HPAs nitrados ou nitroarenos (nitro-HPAs) e são reconhecidos indutores mutagênicos: capazes de acarretar prejuízos aos ecossistemas e à saúde humana (Rosenkranz e Mermelstein 1998; Hagiwara et al. 1993).

Os HPAs de dois e três anéis aromáticos têm toxicidade aguda significativa, Contudo, são de quatro a seis anéis aromáticos que apresentam potencialidades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas (WHO 1983), sendo que para serem mutagênicos, necessitam sofrer ativação metabólica preliminar.

Em locais contaminados geralmente ocorrem misturas de compostos, mas, pouco é conhecido sobre a atividade destas misturas complexas, devendo ser considerado, que o comportamento e efeitos de químicos difere quando em misturas ou individualmente.

Assim, como há uma variedade de compostos químicos presentes no ambiente é possível que diferentes efeitos ambientais sejam resultantes. Desde sinérgicos, que aumentam a toxicidade/genotoxicidade a partir dos poluentes presentes, como antagonicos, onde a mistura de poluentes presentes pode ter um efeito menos tóxico que o resultante dos produtos usados isoladamente (Loibner et al. 2004).

Além disso, as áreas contaminadas raramente expõem os receptores ecológicos e humanos a contaminantes individuais. O aumento da preocupação sobre os riscos da

toxicidade associada aos nitrocompostos e outras classes tóxicas deve contribuir no desenvolvimento de tecnologias para remediação apropriadas.

Também cabe ressaltar que no Brasil, além da legislação pertinente à contaminação de solos e águas subterrâneas ser muito recente, esta Resolução (CONAMA 420/2009) não contempla critérios normativos para derivados de HPAs, tampouco regula as respostas de genotoxicidade que podem ser encontradas em solos contaminados.

Indiscutivelmente, as propriedades deletérias dos HPAs, tais como toxicidade e carcinogenicidade, tornam a remediação uma necessidade crítica (Sayara et al. 2011). Contudo, ocorrendo metabolismo incompleto dos HPAs em solos contaminados durante processos de biorremediação, podem ser formados subprodutos com toxicidade ainda maior (Hu et al. 2012), como nitro e oxi-HPAs, os quais são de difícil identificação e quantificação. E assim, as diferentes estratégias de biorremediação podem levar a diferentes resultados de toxicidade e genotoxicidade para solos contaminados com HPAs, associado a aumento da potencialidade mutagênica das amostras de solo analisadas após o processo parcial de biodegradação. Este contexto leva à necessidade de testes que sejam também sensíveis aos efeitos destes produtos formados.

Portanto, uma avaliação completa da efetividade do processo de biorremediação estará associada a uma avaliação prévia da toxicidade das amostras de solo envolvidas, comparadas com testes apropriados após a remediação empregada. Entre estes testes, é possível destacar: avaliação de ecotoxicidade em testes com plantas, através de ensaios de germinação e sobrevivência, *Microtox* com microrganismos para avaliar toxicidade e genotoxicidade em *Allium cepa*, além das linhagens, geneticamente selecionadas para avaliação de mutagenicidade através do ensaio de *Salmonella*/microsoma (Teste de Ames), entre outros (Balba et al. 1998; Mazzeo et al. 2015; Prokop et al. 2015; Cornelis

et al. 2001). Desta forma, têm sido desenvolvidos vários *endpoints* que avaliam os efeitos de misturas e suas implicações ecotoxicológicas. Contudo, não se faz ainda, uso rotineiro de avaliações de dano mutagênico para verificar a segurança quanto à exposição depois de realizados processos de remediação em áreas contaminadas.

A capacidade mutagênica e carcinogênica é mais significativa para aqueles HPAs que apresentam a região de “baía” ou *K-region/bay-region* – locais na molécula altamente reativos (Samanta et al. 2002). Entre os HPAs, os que possuem mais de quatro anéis aromáticos são os que possuem essa estrutura, justamente os mais recalcitrantes durante os processos de remediação. Assim, salienta-se a relevância do uso de biomarcadores que permitem avaliar o risco potencial ao material genético.

São observados efeitos genotóxicos quando os compostos são capazes de reagir com a molécula de DNA causando alterações.

Salienta-se que embora as mutações sejam fontes de variabilidade genética em uma população - e portanto, fundamentais para evolução e manutenção das espécies - ocorrem frequentemente, mutações deletérias. Estas são causadas pelo excesso de danos induzidos pela exposição à contaminantes em curto espaço de tempo, levando a efeitos prejudiciais aos indivíduos e a seus descendentes, alterando o equilíbrio dos ecossistemas. Neste sentido, a detecção a nível de danos genotóxicos torna-se, portanto, um alerta à essas conseqüências.

Assim, o teste *Salmonella*/microsoma, que mede modificações genéticas em nível molecular, tem sido escolhido como metodologia básica para estudos do potencial genotóxico de amostras ambientais, devido à eficiência e reconhecimento internacional recomendando-o como ensaio para a avaliação de solos impactados por diferentes contribuições antrópicas (White e Claxton 2004). O ensaio *Salmonella*/microsoma permite identificar tipos de danos moleculares diferentes, associado a linhagens

específicas sensíveis a determinados grupos de compostos, além de permitir expressar os resultados em dano/unidade de amostra em análises de curvas dose-resposta para os diferentes extratos da amostra de interesse. Entretanto, em processos de biorremediação ainda não está incorporada, entre as estratégias de trabalho, a necessidade de avaliação dos solos através de testes de genotoxicidade e mutagenicidade. A aplicação de biomarcadores de genotoxicidade em amostras de solos submetidos a processos de remediação não apresenta um histórico, na literatura, tão abrangente, tornando-se necessário um fortalecimento nesta área de pesquisa.

Os biomarcadores de genotoxicidade, utilizados no diagnóstico de áreas contaminadas, também podem ser empregados no acompanhamento da eficiência e efetiva biodegradação dos poluentes através da biorremediação. No caso dos HPAs, sua atividade biológica pode ser avaliada por testes de genotoxicidade (Alexander et al. 2002). Portanto, podem ser uma alternativa dentre as avaliações clássicas de qualidade do solo, uma vez que atuam na previsão de danos precoces ao conteúdo genético dos seres vivos, causados por concentrações e interações que podem não ser detectadas através de outros testes.

No ensaio *Salmonella*/microsoma algumas linhagens como as derivativas YG1041 e YG1042 tem sensibilidades aumentadas para tipos específicos de compostos (Rosenkranz e Mermelstein 1983). Estas cepas têm altos níveis das enzimas nitroreductase e acetiltransferase, enzimas envolvidas na ativação metabólica intracelular de nitroarenos e aminas aromáticas. Esta modificação as torna extremamente sensíveis à detecção de danos causados por compostos nitro-aromáticos, como 1-nitropireno e 2-nitrofluoreno, e outros potentes mutágenos (Hagiwara et al. 1993; Rosenkranz e Mermelstein 1983). Desta forma, uso destas linhagens torna possível a relação de danos mutagênicos observados e causa associada a esta tipologia de contaminante presente.

Em trabalho de Hu et al. (2012) com linhagens celulares avaliando toxicidade e genotoxicidade após simulação de dois tipos de processo de biorremediação de solos contaminados por HPAs, os autores observaram indução de danos após tratamento, os quais não foram observados no solo não tratado. Efeitos genotóxicos de solos contaminados com HPAs foram avaliados por Alexander et al. (2002) em solos antes e após tratamento biológico, tendo sido encontrado um aumento na mutagenicidade durante o processo de biorremediação seguido de um decaimento. Estes autores ainda salientam que poucos estudos têm demonstrado que a toxicidade de solos poluídos diminui como resultado da biorremediação, e quando o faz, refere-se à toxicidade aguda. Em outro estudo de solo contaminado por creosoto, Hughes (1998) também verificou efeitos mutagênicos em solos após processos de biorremediação utilizando extratos brutos das amostras. Brooks et al. (1998) também encontrou fortes respostas de mutagenicidade nos solos submetidos a diferentes tipos de tratamentos.

Outra limitação atual, é que a maioria dos estudos sobre toxicidade e biodegradação de HPAs são conduzidas com um único composto ou alguns representantes com objetivo de minimizar as variáveis. No entanto, os HPAs estão presentes nas áreas contaminadas como misturas complexas (Cerniglia 1992). Desta forma, é necessário realizar estudos com amostras reais de solos contaminados, onde a mistura destes contaminantes esteja presente, a fim de verificar o efetivo potencial de biodegradação e riscos associado.

Assim, os ensaios para avaliar a eficiência de processos de biorremediação devem incluir ensaios biológicos que avaliem a minimização ou não dos efeitos ambientais da técnica aplicada com vistas à efetiva remediação do solo contaminado.

A área de interesse deste estudo é uma antiga usina desativada de preservação de madeira desativada, onde durante mais de 40 anos foram utilizados diferentes produtos

químicos para aumentar a vida útil de postes de madeira. Dentre o histórico de produtos químicos utilizados no tratamento de madeira, encontra-se solução de pentaclorofenol em óleo e/ou óleo de creosoto e hidrossal CCA - arseniato de cobre. Estes compostos com características químicas altamente tóxicas caracterizam os riscos potenciais existentes na área de estudo (Fepam 2010).

O pentaclorofenol, composto organoclorado, foi o principal pesticida usado como preservativo de madeira no mundo todo, sendo persistente e cumulativo. É considerado pela USEPA como poluente prioritário desde 1977, com uso proibido no Brasil desde 2007, possuindo degradação lenta, sendo hidrofóbico e persistente nos ambientes. É considerado pela IARC como possivelmente carcinogênico para humanos (IARC 2010).

O creosoto também é considerado um dos preservativos de madeira mais utilizados no mundo todo. Sua constituição é uma mistura complexa formada por aproximadamente 85% de HPAs, 10% de fenóis e compostos heterocíclicos oxigenados, sulfurados e nitrogenados (Brooks et al. 1998; CCME 2008), sendo portanto a fonte de contaminação principal para a área em questão em relação a fonte dos HPAs presentes no solo. É considerado pela IARC como provavelmente carcinogênico para humanos (IARC 2010).

A biorremediação tem sido selecionada como uma das principais técnicas adotadas para degradação dos compostos orgânicos presentes nos solos contaminados com preservativos de madeira identificados pelo *Superfund*. Desta forma, tem sido considerada pela USEPA como um tratamento efetivo e relativamente de baixo custo, podendo ser complementada quando necessário (USEPA 1995).

Dentro deste contexto, foi investigada a aplicação de processo de biorremediação para solos da área interna de um sítio contaminado por preservativos de



madeira na região de Triunfo/RS. O presente trabalho foi realizado no Programa de Pós Graduação em Ecologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com a Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler – FEPAM dentro de um estudo mais amplo avaliando a área em questão (Fepam 2010; Pohren 2012).

### **1.1 Objetivos**

O objetivo geral da presente tese foi apresentar uma proposta de biorremediação baseada no perfil de classes químicas existentes em sítio de solo contaminado por agentes mutagênicos, avaliando a eficiência pelo ensaio *Salmonella*/microsoma, focalizando e relacionando diferentes classes de HPAs e sua degradação durante o processo.

Os objetivos específicos foram:

- i) avaliar microrganismos autóctones de solo contaminado e preparo de inóculos potencialmente eficientes para degradação dos HPAs e seus derivados,
- ii) realizar experimento de biodegradação em laboratório em escala de microcosmos através de bioaugmentação, bioestimulação e enriquecimento;
- iii) avaliar atividade mutagênica em extratos orgânicos de amostras de solos obtidas antes e após experimento de biorremediação;
- iv) ampliar o conhecimento sobre o perfil de HPAs e seus derivados antes e após processo de remediação de sítio de solo contaminado relacionando classes químicas identificadas a potenciais danos biológicos;
- v) relacionar classes químicas de contaminantes e nível de efeitos mutagênicos em linhagens bacterianas específicas;

vi) propor alternativa de biorremediação adequada ao perfil de HPAs identificado nos solos contaminados;

vii) monitorar o processo de biorremediação de HPAs do solo as concentrações de pentaclorofenol presentes;

viii) avaliar a eficiência do processo de biodegradação, quanto à capacidade de promover redução dos efeitos mutagênicos dos contaminantes presentes no solo de sítio contaminado por meio dos ensaios *Salmonella*/microsoma e análises químicas dos 16 HPAs prioritários.

## **1.2 Área de estudo**

Foi escolhida como região de investigação, um sítio com contaminação de solo oriundo de Usina de Preservação de Madeira, em estudo na FEPAM. As atividades no local foram iniciadas em 1960, tendo sido realizadas até desativação da usina em 2006. Durante o período de operação transcorrido, a empresa fez uso de produtos químicos para a preservação dos postes de madeira, através de banhos quentes e frios, com solução de pentaclorofenol em óleo ou óleo de creosoto, até o ano de 1982, quando passou a utilizar também no processo a solução do hidrossal CCA (cobre-cromo-arsênio). Estas substâncias foram responsáveis pela contaminação identificada a partir do ano de 2004 através de solicitações de investigação feitas pelo órgão ambiental do Estado, e confirmada em estudos posteriores. Em 2012 a empresa iniciou atividades de remediação na área dada à gravidade do passivo detectado. A partir deste período foram iniciadas intervenções na área contaminada para remoção de fontes ativas de contaminação. Foram removidos resíduos sólidos e solo contaminado, destinados para aterro de resíduo perigoso ou unidade de incineração. As áreas escavadas e que

sofreram intervenções ainda estão sob monitoramento para acompanhamento, e poderão ser submetidas à continuidade de medidas de intervenção.

Assim, em função da atividade industrial realizada durante mais de 40 anos de operação da Usina, e características extremamente tóxicas dos produtos utilizados nos processos produtivos nesse período, buscou-se encontrar microrganismos com potencial de biodegradação adaptados aos contaminantes em questão.

Ressalta-se que o período de coleta das amostras foi anterior à realização de qualquer intervenção na área. Assim, as amostras de solo coletadas representam o potencial de atividade de todos os microrganismos ativos na área. Cabe destacar também, que dada às altas concentrações de contaminantes detectadas no sítio em questão, uma proposta de biorremediação torna-se mais apropriada para uma etapa de polimento da remediação, ou seja, após a retirada dos produtos químicos presentes ainda como fontes primárias de contaminação.

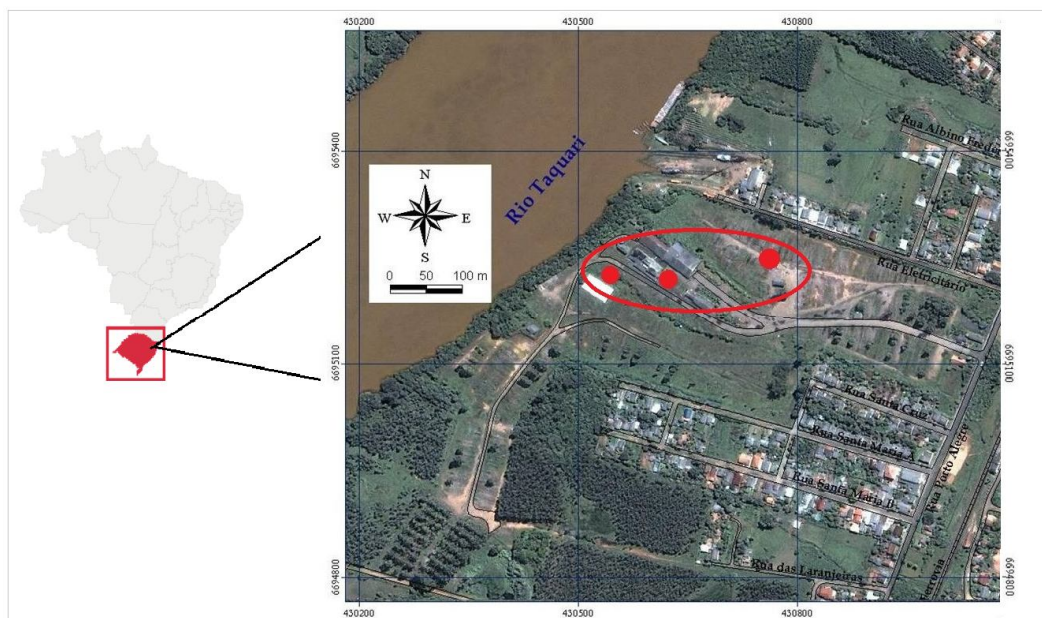
A área de estudo localiza-se no município de Triunfo, no do Rio Grande do Sul, a cerca de 80 km a oeste de Porto Alegre, estando próximo à confluência dos rios Taquari e Jacuí, em sua planície de inundação.

O solo investigado possui contaminação originada também por metais pesados, uma vez que estes foram usados na área de estudo. No entanto, a contaminação pelos compostos orgânicos, HPAs, mostrou maior relevância na região em estudos realizados previamente conforme Pohren et al. (2012).

### **1.3 Locais de Amostragem**

Os pontos de amostragem destes solos foram: S 29° 52' 17.13", W 51° 43' 7.26"; S 29° 52' 17.27", W 51° 43' 8.8"; S 29° 52' 17.94", W 51° 42' 56.32", sendo priorizados

os locais com valores mais elevados para HPAs potencialmente carcinogênicos, formando um *pool* representativo dos solos mais contaminados da área (Figura 4).



**Figura 4:** Sítio de solo contaminado na cidade de Triunfo/RS, com indicação dos pontos de coleta de solos amostrados.

## 1.4 Metodologia

### 1.4.1 Microrganismos autóctones do solo

Dentro deste estudo inicialmente foram avaliados microrganismos presentes no solo. As bactérias foram cultivadas em meios de contagem geral e meios seletivos a partir de amostras de 10 g do solo contaminado (SC), em erlenmeyers contendo solução salina esterilizada. Os frascos foram submetidos à agitação em *shaker*, e as alíquotas diluídas em séries decimais e submetidas aos plaqueamentos.

Para contagem das bactérias empregou-se o meio PCA contendo ciclohexamida e para contagem dos fungos filamentosos o meio SDA com clorafenicol em técnica de superfície. Após incubação, as colônias foram contadas e referenciadas como Unidades

Formadoras de Colônias/g de solo seco (UFC/g/ss). As colônias morfológicamente idênticas foram isoladas e submetidas à identificação. Após isolamento as placas foram reservadas para compor os inóculos dos ensaios de biodegradação.

Para contagem em meios seletivos, amostra de 1g de SC foi adicionada em solução salina estéril e após agitação, alíquotas diluídas em série decimais foram inoculadas nos meios seletivos para contagem das UFC/mL/g. Após 24 horas e, quando necessário, até sete dias de incubação, as placas foram analisadas quanto ao número de UFC. Os biótipos morfológicos diferentes das colônias foram identificados por meio de testes bioquímicos padronizados em Laboratório do Dr. Carlos E Levy at UNICAMP/SP.

#### **1.4.2 Preparo dos Inóculos**

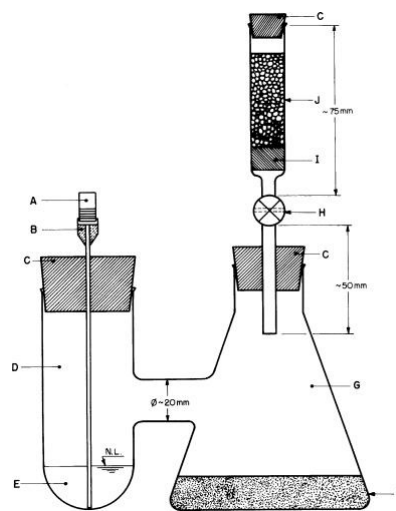
Para os ensaios de biodegradação foram preparados inóculos a partir das suspensões de SC descrito conforme item anterior. Das placas semeadas foram selecionadas colônias com biótipos predominantes dos meios para serem utilizadas para compor os “Inóculos 1 e 2”. Também foram preparadas placas da suspensão do SC sem diluição e procedeu-se uma lixiviação dos microrganismos crescidos para compor os inóculos. Esta etapa resultou numa fração líquida rica em microrganismos, da qual 300 µL foram inoculados em meio *Buschell Hass* – BH. A esta cultura mista de fungos e bactérias, foram acrescentadas também as suspensões de contagem dos microrganismos e também das colônias representativas, resultando num *pool* de microrganismos autóctones, o chamado “Inóculo1”, referente à bioaugmentação. Este consórcio foi incubado a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  em *shaker* a 200 rpm por 7 dias.

O “Inoculo 2” foi constituído do Inoculo 1, meio mineral BH, adicionando-se *pool* dos HPAs fenantreno, fluoranteno, 1-nitropireno, pireno e 2-nitrofluoranteno. Ao

meio BH adicionou-se ainda glicose e extrato de levedura. O Inoculo 2 foi mantido em *shaker* com agitação durante 7 dias a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , para adaptação dos microrganismos frente aos HPAs, representando bioaugmentação e enriquecimento.

### 1.4.3 Respirômetros de Bartha

Os experimentos de biorremediação em escala de laboratório foram realizados através de respirômetros de Bartha & Pramer (Figura 5), seguindo a metodologia de biodegração descrita na Norma NBR ABNT 142831 e Norma Técnica CETESB L6.350 (Bartha e Pramer 1965; NBR 1999; CETESB 1990). Os ensaios foram realizados na UNESP - Rio Claro/SP.



**Figura 5:** Vista em corte de um respirômetro (Fonte: NBR 14283:1999)

Aos frascos de respirometria (Figura 6) acrescentou-se 50 g de SC com umidade ajustada a 60% CC. Cada frasco de microcosmo recebeu 0,2 mL de inoculo contendo  $1 \times 10^7$  UFC/g solo nos tratamentos correspondentes.



**Figura 6:** Exemplo de respirômetros de Bartha e Pramer montados em laboratório para a realização do experimento (Fonte: própria autora)

A Tabela 1 apresenta o protocolo experimental realizado em triplicatas. Os tratamentos 5SC e 7SC receberam o acréscimo de um composto sólido (estabilizado, proveniente de compostagem) e 6SC e 8SC receberam fertilizante líquido, oriundo da degradação de resíduo de vitivinicultura.

**Tabela 1. Protocolo experimental de biodegradação nos respirômetros**

<b>Tratamentos</b>	<b>Experimentos respirométricos</b>
<b>1SC</b>	solo contaminado – Controle
<b>2SC</b>	solo + Inóculo 1
<b>3SC</b>	solo + <i>pool</i> HPAs
<b>4SC</b>	solo + Inóculo 1+ HPAs <i>pool</i>
<b>5SC</b>	solo + Composto Sólido
<b>6SC</b>	solo + Fertilizante Líquido
<b>7SC</b>	solo + Inóculo 1 + Composto Sólido
<b>8SC</b>	solo + Inóculo 1 + Fertilizante Líquido
<b>9SC</b>	solo + Inóculo 2
<b>10SC</b>	solo + Inóculo 2 + <i>pool</i> HPAs

SC: solo contaminado

Os frascos respirômetros foram incubados a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  no escuro, pelo período de 60 dias e avaliados periodicamente quanto à produção de  $\text{CO}_2$  como um indicativo da atividade microbiana relativa à degradação de compostos orgânicos no solo. A medição do  $\text{CO}_2$  produzido é possível através da neutralização deste gás em solução de KOH no respirômetro. É feita a quantificação do  $\text{CO}_2$  mediante a titulação do KOH residual com HCl e adição de  $\text{BaCl}_2$ . Durante a avaliação da biodegradação, em cada dia de medição da produção de  $\text{CO}_2$  foi realizada prova em branco.

Ao término do experimento, após período de 60 dias, todo SC das triplicatas foi submetido à contagem microbiana e à extração orgânica para análise do desempenho de biodegradação dos HPAs, a fim de verificar a eficiência da biorremediação.

Na análise dos dados foram considerados os valores de produção acumulada de  $\text{CO}_2$  ao longo do experimento.

#### **1.4.4 Extração orgânica das amostras**

A extração foi realizada com o *pool* das amostras do SC coletados no sítio industrial e do solo dos microcosmos de Bartha após o experimento de degradação. Os extratos foram preparados segundo método USEPA 3550C (2007): o solo foi homogeneizado por 15 minutos com espátula de inox e em 15 g dessa amostra foi adicionado o solvente diclorometano – DCM – levando-se para extração em ultrassom (10 minutos) por duas vezes. O líquido obtido é filtrado em coluna cromatográfica de sulfato de sódio e celite, concentrado em rota-vapor a  $40^{\circ}\text{C}$  e armazenados sob refrigeração até utilização nos ensaios de mutagenicidade e de quantificação de HPAs.



#### 1.4.5 Análises químicas de HPAs

Foi realizada a quantificação dos 16 HPAs nas amostras de solos dos microcosmos após o período de 60 dias e comparados com os resultados do solo contaminado da área (SC) antes de ser submetido aos experimentos de degradação. Para tanto, os extratos orgânicos de solo foram analisados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa. Foram quantificadas as principais espécies de HPAs presentes, focalizando os 16 classificados como poluentes prioritários pela USEPA: Acenafteno, Acenaftleno, Antraceno, Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluorantreno, Benzo(g,h,i)perileno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Benzo(k)fluorantreno, Criseno, Dibenzo(a,h)antraceno, Fenantreno, Fluorantreno, Fluoreno, Naftaleno, Pireno, segundo método USEPA SW846/8270-D. Os resultados foram expressos como HPAs totais presentes. Foi avaliada a taxa de degradação em relação à concentração inicial dos HPAs (Sayara et al. 2011; Sun et al. 2010).

#### 1.4.6 Mutagenicidade nas amostras de solo

A avaliação da mutagenicidade foi realizada no SC antes dos ensaios respirométricos e após o término dos microcosmos para degradação nos diferentes tratamentos (1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10).

Como metodologia usada na verificação de possíveis danos devido à persistência de moléculas de HPAs durante os processos de biorremediação foram realizadas avaliações de mutagenicidade no ensaio *Salmonella*/microsossomam pelo método de microsossuspensão, Teste de Kado (Kado et al.; Umbuzeiro e Vargas 2003), uma modificação do ensaio (Maron e Ames 1983), a qual permite analisar pequenas

quantidades de amostras. Foram utilizadas as linhagens *Salmonella typhimurium*, TA98 e TA97a, que detectam a ação de mutagênicos que causam erro no quadro de leitura, sendo a TA97a descrita como mais sensível a metais pesados (Pagano e Zeiger 1992) e HPAs (Maron e Ames 1983) e a TA100 que detecta mutagênicos por substituição de pares de bases. Foram testadas também linhagens com alta produção das enzimas nitroreductase e O-acetiltransferase, as quais são específicas para diagnóstico de nitrocompostos (Hagiwara et al. 1993) YG 1041 (derivada da TA98) e YG 1042 (derivada da TA100).

A mutagênese dos extratos foi avaliada em seis concentrações (10 - 160 mg equivalente de solo seco), sendo os testes realizados em presença e ausência de sistema de metabolização P450 *in vitro* induzido por Aroclor 1234 (MOLTOX SA), *S9 mix*, exceto para as linhagens YG1041 e YG1042, utilizadas no diagnóstico de nitroarenos, uma vez que as bactérias testadoras apresentam as enzimas necessárias para a redução dos nitrocompostos.

As amostras foram analisadas em duplicatas e com a inclusão de controles (meio nutriente e o solvente utilizado no ensaio) e positivos de acordo com a linhagem e tratamento (Maron e Ames 1983).

A análise dos resultados foi realizada através da atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes por grama seca equivalente de solo, calculados através da porção linear de curva dose-resposta, pelo programa estatístico SALANAL (*Salmonella Assay Analysis*, versão 1.0 - RTP, North Carolina, USA) selecionando o modelo linear ou Bernstein et al. (1982). A amostra foi considerada mutagênica quando observada significância estatística na análise de regressão ( $p \leq 0.05$ ) e na ANOVA ( $p \leq 0.05$ ).

Desta forma, foi avaliada a eficiência do processo de biorremediação para HPAs, realizando o acompanhamento dos efeitos mutagênicos por meio do ensaio *Salmonella*/microsossoma nas diferentes linhagens específicas e análises químicas.

### 1.5 Estruturação da tese

A presente Tese de doutorado estrutura-se nos seguintes capítulos correspondentes aos dois artigos científicos produzidos:

**Capítulo 2:** O primeiro artigo “**Desempenho de biorremediação de HPAs por bioaugmentação e bioestimulação de solo de área contaminada**” (a ser submetido para publicação na Revista *Water, Air, & Soil Pollution*) apresenta os resultados obtidos a partir da realização de experimentos simulados de biorremediação em escala de microcosmos utilizando respirômetros de Bartha. Neste trabalho foram obtidos diferentes inóculos a partir de microrganismos autóctones da área contaminada, e preparados tratamentos visando avaliar efeitos da bioaugmentação, bioestimulação e enriquecimento na biodegradação dos 16 HPAs prioritários conforme USEPA. O desempenho dos tratamentos foi verificado através da produção de CO<sub>2</sub> nos respirômetros e avaliação das concentrações dos HPAs antes e após serem submetidos ao experimento de biorremediação.

**Capítulo 3:** O segundo artigo “**Biorremediação em solos contaminados por HPAs: mutagenicidade como ferramenta para validar qualidade ambiental**” (a ser submetido para Revista *Chemosphere*) trata da avaliação da eficiência dos experimentos de biorremediação simulados em laboratório através do acompanhamento dos efeitos mutagênicos em diferentes linhagens sensíveis nas amostras de solos contaminados depois de submetidas à biodegradação. O perfil de mutagenicidade e HPAs associados a

danos biológicos encontrados ao final do período dos experimentos foi comparado com efeitos observados no solo pré-biorremediação e solo representativo de remediação intrínseca, sem receber os inóculos testados.

## 2. DESEMPENHO DE BIORREMEDIAÇÃO DE HPAs POR BIOAUMENTAÇÃO E BIOESTIMULAÇÃO DE SOLO DE ÁREA CONTAMINADA

**Roberta de Souza Pohren<sup>a,b</sup>, Dilza Aparecida Nalin de Oliveira Leite<sup>c</sup>, Dejanira de Franceschi de Angelis<sup>c</sup> e Vera Maria Ferrão Vargas<sup>a,b\*</sup>**

<sup>a</sup>Departamento de Pesquisas e Análises Laboratoriais, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), Avenida Salvador França, 1707, CEP: 90690-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>b</sup>Programa de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>c</sup>Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Av. 24-A, 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

### RESUMO

Uma das possibilidades de recuperação da qualidade ambiental de solos contaminados é o processo de biorremediação, onde pela ação de microrganismos é promovida a biodegradação de poluentes do solo. Assim, a eficiência da biorremediação foi analisada a partir de consórcios de microrganismos autóctones em solo de área contaminada com preservativos de madeira. Foram realizados experimentos de microcosmos, aplicando bioaumentação, enriquecimento e bioestimulação. Estes testes foram monitorados pela produção de CO<sub>2</sub> e presença dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) como contaminantes de interesse. Foram preparados extratos orgânicos deste solo antes e após o processo, analisando os HPAs considerados poluentes prioritários pela USEPA e comparados às respostas de respiração microbiana. Análises estatísticas da produção de CO<sub>2</sub> foram significantes entre os tratamentos frente ao solo controle, exceto para o Inóculo 1 (bioaumentado). Comparando Inóculos 1 e 2 (bioaumentado, bioestimulado e enriquecido), o segundo apresentou maior produção de CO<sub>2</sub> e degradação de HPAs, sendo mais eficiente na biorremediação. Assim, o inóculo com cultura mista enriquecida (Inóculo 2) mostrou maior potencialidade em processos de biorremediação.

**Palavras-chave:** biodegradação, respiração microbiana, enriquecimento, pentaclorofenol, microcosmos

\*Departamento de Pesquisas e Análises Laboratoriais, FEPAM, Avenida Salvador França, 1707 CEP: 90690-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.: +55 51 33346765; vera.vargas@pq.cnpq.br

### Highlights:

- Consórcio autóctone tem alto desempenho na degradação de HPAs de alto e baixo PM;
- Inóculo bioaumentado, bioestimulado e enriquecido é mais eficiente que inóculo apenas bioaumentado;
- Solo com contaminação antiga de creosoto e pentaclorofenol tem potencial de atenuação natural, mostrando população ativa de microrganismos;
- Biorremediação de HPAs no solo pode gerar também compostos intermediários polares antes da completa mineralização.

\*\*Artigo a ser submetido para publicação na Revista *Water, Air, & Soil Pollution*.

## 1 Introdução

A contaminação dos solos é um dos principais problemas ambientais resultantes da má gestão sobre os recursos naturais existentes. Entre as principais classes de contaminantes de preocupação ambiental, encontram-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - HPAs. Estes compostos estão presentes em milhares de áreas contaminadas em todo mundo, sendo 16 deles classificados como poluentes prioritários pela USEPA. Estas substâncias são consideradas tóxicas e persistentes (Sayara et al. 2011; Mizwar e Yulinah 2015; Posada-Baquero e Ortega-Calvo 2011), sendo seu processo de degradação no solo complexo e não integralmente compreendido (Serrano et al. 2009). Uma das alternativas para remediação de áreas contaminadas por HPAs é a biorremediação. Esta técnica é considerada promissora e apresenta-se mais sustentável que outras tecnologias de descontaminação (Sayara et al. 2011; Moscoso et al. 2012; Sun et al. 2010; Trindade et al. 2005). Contudo, ainda é aplicada em menos de 10% dos casos de recuperação da qualidade do solo (Gillespie et al. 2013), sendo necessário realizar experimentos de biodegradação em escala de laboratório para fortalecer a credibilidade desta técnica (Haritash e Kaushik 2009; Posada-Baquero e Ortega-Calvo 2011).

A biorremediação pode ser desenvolvida aplicando-se processos de bioestimulação e da bioaugmentação. Na bioaugmentação ocorre o acréscimo de microrganismos selecionados capazes de tolerar e metabolizar os contaminantes de interesse (Li et al. 2009; Gillespie e Philp 2013). Enquanto que a bioestimulação ocorre mediante o aporte de nutrientes ou receptores de elétrons com objetivo de aumentar a atividade autóctone do solo, podendo também as duas técnicas serem aplicadas em conjunto. A utilização de microbiota autóctone como inóculo torna-se relevante, uma vez que os microrganismos presentes estarão pré-adaptados e supostamente capazes de

metabolizar os contaminantes existentes. Dentro deste contexto, conhecem-se as vantagens da utilização de consórcios de bactérias e fungos, os quais mediante sinergia otimizam a biodegradação, através da quebra dos anéis aromáticos por fungos seguida da ação das bactérias sobre os metabólitos gerados (Sayara et al. 2011; Li et al. 2009). Deve-se considerar que os organismos quando empregados isolados podem não apresentar os mesmos mecanismos de ação que apresentariam em meio natural, porque eventualmente um microrganismo sozinho possui todas as enzimas necessárias para a metabolização completa de um xenobiótico, sendo por isso importante a complementação entre as rotas metabólicas (Jacques et al. 2007; Gaylarde et al. 2005).

Uma das estratégias para avaliar a atividade metabólica dos microrganismos existentes no solo sob um processo de biorremediação é quantificar a produção de CO<sub>2</sub> resultante da respiração microbiana do solo. Este parâmetro indica a biodegradação, permitindo-se que se estime a quantidade total de contaminantes, como os HPAs mineralizados sob a ação dos microrganismos (Bartha e Pramer 1965; Mariano et al. 2009; Serrano et al. 2009).

A maioria dos estudos a respeito da biodegradação de HPAs trabalha com a possibilidade de uso de microrganismos autóctones dos locais com contaminantes afins. Contudo, a maioria faz uso de microrganismos isolados (Sun et al. 2010) ou mesmo consórcios para degradar não o grupo de HPAs – como se apresentariam de fato nos ambientes contaminados, mas, apenas algum HPA específico ou frente a dois, três compostos representantes desta classe química (Li et al. 2008; Cerniglia 1992) em solos artificialmente contaminados. Nesta situação criam-se lacunas na investigação da biorremediação frente ao comportamento destas misturas complexas em solos realmente representativos do ambiente após longos períodos de contaminação (Li et al. 2009),

simplificando o processo de degradação que em ambientes naturais ocorre na presença de comunidades de bactérias (Sun et al. 2010).

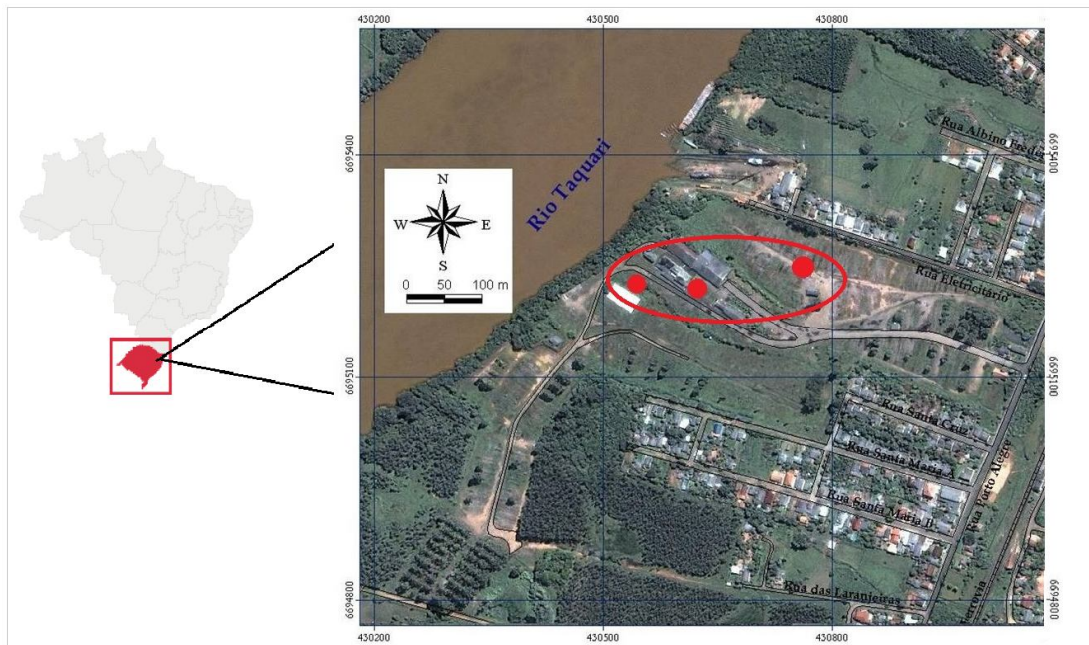
Os objetivos neste trabalho foram: (i) preparar um consórcio de microrganismos autóctones de solo contaminado por HPAs; (ii) examinar o efeito da bioaugmentação, do enriquecimento e de bioestimulação na biodegradação e (iii) avaliar eficiência de processo de biorremediação de solo contaminado em escala de microcosmos através da produção de CO<sub>2</sub> como indicativo do metabolismo microbiano e quantificação das concentrações de HPAs totais presentes.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Área contaminada e amostragem de solo**

As amostras de solo foram coletadas em área contaminada localizada no município de Triunfo, no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. No local, funcionou uma indústria de preservantes de madeira por mais de 40 anos, atualmente desativada. Estudos realizados anteriormente indicaram a presença dos contaminantes pentaclorofenol, creosoto, metais (As, Cu e Cr) e HPAs (Pohren et al. 2012; Fepam 2010). Neste estudo, a contaminação por HPAs foi priorizada. Efetuou-se uma amostragem composta (*pool*) a partir de áreas com os valores mais elevados para os poluentes de interesse: os HPAs, embasado em estudos anteriores (Pohren et al. 2012).





**Figura 1:** Sítio de solo contaminado na cidade de Triunfo/RS, com indicação dos pontos de coleta de solos amostrados.

Os pontos de coleta para compor o *pool* de amostras de solos amostrados na área foram georreferenciados (S 29° 52' 17.13", W 51° 43' 7.26"; S 29° 52' 17.27", W 51° 43' 8.8"; S 29° 52' 17.94", W 51° 42' 56.32").

Para realizar a amostragem observou-se o período mínimo de sete dias sem chuva, tendo sido seguidas as recomendações conforme USEPA (1996). As amostras foram coletadas em pontos de 0 a 20 cm de profundidade, reunidas e homogêneas compondo um *pool* representativo do solo contaminado da área (SC), que foi armazenado em frascos de vidro escuro e mantido a 4°C até o momento da sua utilização. As análises de granulometria do solo foram realizadas pelo método de classificação simples, resultando em 48,3% de areia, 17,6% silte, 12,9 argila e 21% cascalho; conteúdo de água de 15,2%, por gravimetria e capacidade de campo de 24% corrigida conforme EMBRAPA (1997). O pH de 6,3 foi analisado por potenciometria/pHmetro DIGIMED/DM-22; carbono orgânico pelo método de combustão úmida/*Walkey Black* e digestão básica/EAM, encontrando 2,4% e 3,4% de

matéria orgânica (m.o.) e cromo hexavalente com concentração menor que 1mg/Kg por método colorimétrico. Este solo foi submetido à quantificação de microrganismos e à análise química de HPAs.

## 2.2 Meios e reagentes químicos

Os HPAs fenantreno, fluoranteno, pireno, 1-nitropireno, 2-nitrofluoreno (todos com pureza > 98 %) (Sigma–Aldrich), foram selecionados e usados nos experimentos de degradação. As soluções estoque dos HPAs individuais foram preparadas em solvente grau cromatográfico (Acetona - Merck do Brasil) e utilizadas para formar o “*pool*” de HPAs empregado nos experimentos. Após o solo receber o *pool*, o solvente foi evaporado sob corrente de N<sub>2</sub>, resultando numa concentração final no solo de 4 mg/Kg de cada HPA. O *pool* de HPAs acrescentado corresponde a alguns representantes da classe de contaminantes presentes no solo da área deste estudo, entre eles HPAs de alto e baixo PM visando promover co-metabolismo e alguns derivados de HPAs.

Utilizaram-se os seguintes meios de cultivo: Agar nutriente (NA) 1,8%; *Plate Count Agar* (PCA) 39 g/L; Agar *Sabouraud* dextrose (SDA) 65 g/L e Meio BH - *Buschell Hass* (Difco®), Ágar Sangue, Ágar *MacConkey* e Cromoágar UriSELECT 4 (*Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquette, França*), contendo (g/L): MgSO<sub>4</sub>, 0.2; CaCl<sub>2</sub>, 0.02; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.0; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1.0; FeCl<sub>3</sub>, 0.05; NaCl 0,85%; KOH, 0,2M; HCl, 0,1M; BaCl<sub>2</sub>, 0,5M. Após o preparo, os meios de cultivo e as soluções de diluição foram autoclavados a 120°C por 20 min.

### 2.3 Microrganismos autóctones presentes

As bactérias foram cultivadas em meios de contagem geral e meios seletivos. Para contagem geral as amostras de 10 g do solo contaminado (SC) foram colocadas em erlenmeyers contendo 90 mL de solução salina NaCl 0,85 % esterilizada. Os frascos foram submetidos à agitação em *shaker* a 140 rpm durante 10 minutos, temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . A seguir, alíquotas foram diluídas em séries decimais e submetidas aos plaqueamentos. O restante foi mantido sob refrigeração para posterior uso no preparo dos inóculos a serem avaliados.

Para contagem das bactérias (aeróbias/semi-aeróbias e mesófilas) empregou-se o meio de cultura PCA contendo ciclohexamida  $15 \mu\text{g/mL}$  e para contagem dos fungos filamentosos o meio SDA com clorafenicol  $10 \mu\text{g/mL}$  em técnica de superfície. As placas em triplicatas foram a seguir incubadas durante 48 horas a  $35^\circ\text{C}$  e 5 dias a  $28^\circ\text{C}$ , respectivamente para bactérias e fungos. Após incubação as colônias foram contadas e referenciadas como Unidades Formadoras de Colônias/g de solo seco (UFC/g/ss). As colônias morfolologicamente idênticas foram isoladas e submetidas à identificação. Após isolamento as placas com PCA e SDA foram reservadas para compor os inóculos dos ensaios de biodegradação.

Para contagem em meios seletivos, amostra de 1g de SC foi adicionada a 10 mL de solução salina estéril a 0,85 %, e após agitação alíquotas diluídas em série decimais foram inoculadas nos meios seletivos para contagem das UFC/mL/g. Após 24 horas e, quando necessário, até sete dias de incubação, as placas foram analisadas quanto ao número de UFC. Os biótipos morfológicos diferentes das colônias foram identificados por meio de testes bioquímicos padronizados em Laboratório do Dr. Carlos E Levy da UNICAMP/SP.

## 2.4 Preparo de Inóculos para ensaios de biodegradação

Para os ensaios de biodegradação foram preparados os Inóculos 1 e 2 a partir das suspensões de solo preparadas para a contagem geral de microrganismos. Das placas contendo diluições decimais foram selecionadas colônias com biotipos diferentes predominantes dos meios. Estas colônias foram utilizadas posteriormente para compor os “Inóculos 1 e 2”, mediante transferência para solução salina esterilizada. Também foram preparadas placas da suspensão do SC sem diluição e procedeu-se uma lixiviação dos microrganismos crescidos para compor os inóculos.

A lixiviação foi feita mediante a raspagem com lâmina de vidro das bactérias e dos fungos utilizando-se NaCl 0,85 %. Da fração líquida resultante, rica em microrganismos do solo, 300 µL foram inoculados em erlenmeyer contendo meio BH. Aos microrganismos, compondo uma cultura mista de fungos e bactérias, foram acrescentadas juntamente as suspensões de contagem dos microrganismos e também das colônias representativas. Isto resultou num *pool* de microrganismos autóctones, compondo o chamado “Inóculo 1” caracterizando o inóculo bioaumentado. Este consórcio foi incubado a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  em shaker a 200 rpm por 7 dias.

O “Inóculo 2” foi constituído acrescentando-se 10 mL do “Inóculo 1”, 90 mL do meio BH, adicionando-se 2 mL do *pool* dos HPAs. Ao meio BH adicionou-se ainda, 0,05 g de glicose e 0,05 g de extrato de levedura. O Inóculo 2 foi mantido em *shaker* com agitação durante 7 dias a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ , para adaptação dos microrganismos frente aos HPAs, sendo caracterizado como bioaumentado, bioestimulado e enriquecido.

## 2.5 Experimentos de Biorremediação

### 2.5.1 Atividade metabólica microbiana

Os experimentos de biorremediação em escala de laboratório foram realizados em respirômetros de Bartha & Pramer, seguindo a metodologia de biodegradação descrita na Norma NBR ABNT 142831 e Norma Técnica CETESB L6.350 (Bartha e Pramer 1965; NBR 1999; CETESB 1990). Os ensaios foram realizados na UNESP - Rio Claro/SP. Aos frascos de respirometria acrescentou-se 50 g de SC com umidade ajustada a 60% CC. Cada frasco de microcosmo recebeu 0,2 mL de inóculo contendo  $1 \times 10^7$  UFC/g solo nos tratamentos correspondentes. A Tabela 1 apresenta o protocolo experimental realizado em triplicatas.

**Tabela 1. Protocolo experimental de biodegradação nos respirômetros**

<b>Tratamentos</b>	<b>Experimentos respirométricos</b>
<b>1SC</b>	solo contaminado - Controle
<b>2SC</b>	solo + Inóculo 1
<b>3SC</b>	solo + <i>pool</i> HPAs
<b>4SC</b>	solo + Inóculo 1 + HPAs <i>pool</i>
<b>5SC</b>	solo + Composto Sólido
<b>6SC</b>	solo + Fertilizante Líquido
<b>7SC</b>	solo + Inóculo 1 + Composto Sólido
<b>8SC</b>	solo + Inóculo 1 + Fertilizante Líquido
<b>9SC</b>	solo + Inóculo 2
<b>10SC</b>	solo + Inóculo 2 + <i>pool</i> HPAs

SC: solo contaminado

Aos tratamentos 5SC e 7SC acrescentou-se um composto sólido, já estabilizado oriundo de compostagem e a 6SC e 8SC foi acrescentado fertilizante líquido, proveniente da degradação agrícola do resíduo de videira. O solo dos microcosmos foi ajustado para manter a CC de 60% do solo.

Os respirômetros foram incubados a  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  (escuro) durante 60 dias e examinados periodicamente quanto ao teor de  $\text{CO}_2$  como indicador da respiração microbiana relativa à degradação de compostos orgânicos no solo. O  $\text{CO}_2$  produzido durante o experimento é neutralizado em solução de KOH (0,2 M) localizada no respirômetro. A quantidade de gás liberado é quantificada pela titulação do KOH residual com HCl e adição de  $\text{BaCl}_2$ . Durante este procedimento, os respirômetros foram aerados através de filtros com cal sodada com reposição de nova solução de KOH. Em cada dia da avaliação da geração de  $\text{CO}_2$  durante a biodegradação, foi realizada prova em branco em béquer contendo 10 mL de solução de KOH, fenolftaleína e  $\text{BaCl}_2$ .

Para efetuar os cálculos subtraiu-se a produção de  $\text{CO}_2$  controle da produção média dos demais do experimento. O  $\text{CO}_2$  foi quantificado pela produção diária e referenciado pela produção acumulada para cada um dos tratamentos. Utilizou-se a equação:  $\text{umol CO}_2\text{solo} = (A-B) \times 50 \times f_{\text{HCl}}$ , onde: A = volume de HCl 0,1 M para titular KOH do SC/Controle, em mL; B = volume de HCl 0,1 M para titular KOH do respirômetro com o solo dos tratamentos, em mL; 50 = fator para transformar equivalente em umol de  $\text{CO}_2$ ;  $f_{\text{HCl}}$  = fator de correção da solução de HCl 0,1M.

Após o período de incubação dos respirômetros, o SC das triplicatas foi reunido e submetido à contagem microbiana e à extração orgânica para recuperação dos HPAs residuais, a fim de verificar a eficiência da biorremediação.

Os dados de produção acumulada de  $\text{CO}_2$  produzido durante 60 dias nos diferentes tratamentos foram submetidas à análise de Variância (Anova) para Medidas Repetidas e Teste de Comparações Múltiplas de *Bonferroni*. Com o objetivo de verificar a relação entre a produção de  $\text{CO}_2$  e a concentração dos diferentes HPAs foram realizadas correlações de Pearson. Os programas estatísticos utilizados foram o

“*Statistical Analysis System*” (SAS), versão 9.2 e o “*Statistical Package For The Social Sciences*” (SPSS/PASWSTAT), versão 18.

### 2.5.2 Avaliação dos HPAs totais presentes no solo

Os extratos orgânicos dos solos antes e após efetuar o ensaio respirométrico de biodegradação foram obtidos conforme método USEPA 3550C (2007): homogeneizou-se 15 g de solo, ao qual se adicionou solvente diclorometano – DCM, submetido à extração utilizando-se ultrassom. Estes extratos foram filtrados em coluna cromatográfica de sulfato de sódio e celite. A seguir, concentrados em rota-vapor e armazenados sob refrigeração. Os HPAs foram quantificados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC/MS Perkin Elmer modelo Clarus 600 sistema Quadrupolo modo SIR), focalizando 16 espécies classificadas como poluentes prioritários pela USEPA (1996): Acenafteno, Acenafteno, Antraceno, Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluorantreno, Benzo(g,h,i)perileno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Benzo(k)fluorantreno, Criseno, Dibenzo(a,h)antraceno, Fenantreno, Fluorantreno, Fluoreno, Naftaleno, Pireno, segundo método USEPA SW846/8270-D. Os resultados foram expressos como HPAs totais presentes.

A taxa de degradação foi calculada como: % BiodHPAs =  $[(C_{Hi} - C_{Hf})/C_{Hi}] \times 100$ , onde  $C_{Hi}$  é a concentração inicial dos HPAs e  $C_{Hf}$  é a concentração final dos HPAs (Sayara et al. 2011; Sun et al. 2010).

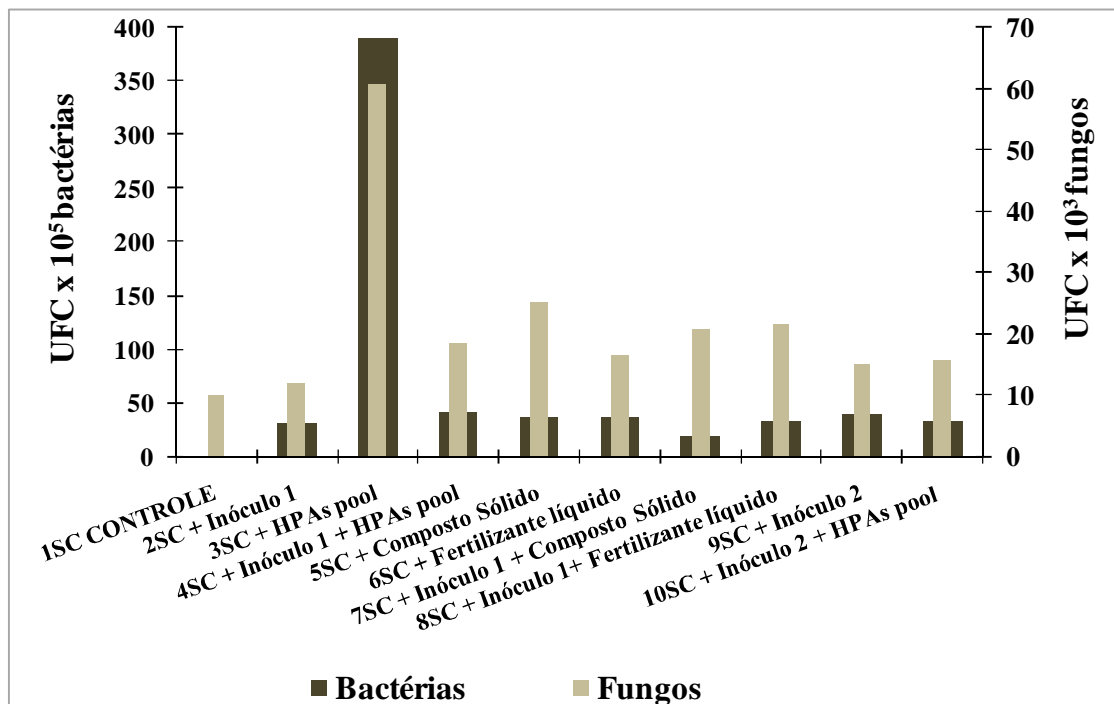
### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Bactérias e fungos presentes no solo contaminado

O número de bactérias e fungos presentes no SC antes dos experimentos foi  $5,35 \times 10^7$  UFC/g/ss e  $1,25 \times 10^4$  UFC/g/ss, respectivamente. Ao se avaliar, em iguais condições, um mesmo solo da região, utilizado como referência (S 29° 52' 40.6", W 51° 42' 3.7"), encontrou-se para bactérias e fungos, respectivamente:  $1,2 \times 10^6$  UFC/g/ss e  $1,4 \times 10^2$  UFC/g/ss. Esta diferença do número de microrganismos pode indicar que algum substrato orgânico está sendo utilizado.

Registrou-se que houve decréscimo do número das UFC/g/ss das bactérias em todos os tratamentos quando se compara as contagens no SC antes e após o término dos experimentos de biodegradação (Figura 2). Pode-se inferir que os valores encontrados mesmo naqueles tratamentos onde foram adicionados estímulos nutricionais podem estar relacionados a fatores limitantes como a biodisponibilidade de matéria orgânica e/ou minerais. Embora, tenha ocorrido esse decréscimo, os resultados mostram, em termos de degradação dos contaminantes, que não foram apresentados efeitos inibitórios à população de bactérias e fungos capazes de degradar os contaminantes de interesse. Mesmo com estas variações em relação à população inicial, numericamente os microrganismos autóctones foram suficientes para promover a biodegradação. Em estudos realizados com os respirômetros de Bartha & Pramer (Mariano et al. 2009), com frequência o número de microrganismos obedece a curva de Gauss. Dentre as razões possíveis pode-se destacar a competição, o esgotamento de nutrientes, a produção de metabólitos antagônicos e a própria condição dos respirômetros.





**Figura 2.** Quantificação média das UFC/g/ss de bactérias e de fungos após tratamentos respirométricos

No solo controle (1SC), assim como nos demais tratamentos, ocorreu decréscimo do número de bactérias após 60 dias. Considerando-se que houve restrição para o desenvolvimento da população autóctone, indicando a necessidade de aporte de nutrientes e/ou enriquecimento para manter a população viável.

Em relação a 1SC, houve semelhança na contagem de bactérias e fungos (Figura 2) nos tratamentos com bioaugmentação e/ou bioestimulação (2SC e 9SC), indicando possivelmente, a necessidade de alguma fonte de carbono adicional para promover o desenvolvimento da população, uma vez que o solo é pobre em matéria orgânica (m.o.).

Pelos valores de fungos encontrados em SC 1, 2 e 9, avalia-se que o acréscimo dos inóculos não induziu grande influência. Nos demais tratamentos com bioestimulação e enriquecimento os valores foram superiores e podem estar associados ao crescimento da própria população presente em função da adição de nutrientes.

No caso do solo que recebeu aporte do *pool* de HPAs (3SC) houve maior desenvolvimento de bactérias e fungos em comparação aos demais tratamentos, demonstrando que, mesmo com a concentração do *pool* de HPAs adicionada ao SC, não ocorreu inibição do crescimento da microbiota nativa, mas, ao contrário, promoveu o seu estímulo. Esta proporção destacadamente superior em 3SC indica que os outros tratamentos podem ter favorecido algumas espécies de bactérias/fungos ou terem tido condições mais limitadas para o desenvolvimento do mesmo número encontrado no solo controle. Pode-se considerar que o maior número de microrganismos foi resultante da população autóctone bem adaptada ao tipo de contaminante usado para fazer o enriquecimento. Desta forma, pode-se afirmar que as bactérias e os fungos encontrados no solo da área contaminada conseguiram se adaptar à nova concentração de HPAs. Esse padrão de resposta indica que o solo mostra possuir, naturalmente, uma população diversificada resistente e adaptada aos contaminantes de interesse no estudo, e detectada durante o período do experimento.

Após semeadura de microrganismos nos meios seletivos, as bactérias foram identificadas a partir das placas inoculadas com alíquotas diluídas de  $1 \times 10^{-3}$  para bactérias e  $1 \times 10^{-2}$  para fungos. As colônias isoladas nos meios seletivos foram identificadas e inseridas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Quantificação média das UFC/g/ss de bactérias identificadas no solo contaminado

<b>Microrganismos</b>	<b>Contagem final</b>
<i>Bacillus sp.</i>	8,0x10 <sup>6</sup>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	5,8x10 <sup>7</sup>
<i>Pseudomonas sp.</i>	3,0x10 <sup>7</sup>
<i>Pseudomonas putida 1</i>	1,6x10 <sup>7</sup>
<i>Pseudomonas putida 2</i>	1,1x10 <sup>7</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,3x10 <sup>7</sup>
<i>Enterobacter cloacae</i>	>10 <sup>7</sup>
<i>Pantoea sp.</i>	>10 <sup>7</sup>
<i>Burkholderia cepacia</i>	2,0x10 <sup>6</sup>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3,8x10 <sup>4</sup>
<i>Serratia sp.</i>	1,8x10 <sup>4</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7,0x10 <sup>4</sup>

As colônias dominantes de fungos foram isoladas e identificadas como: *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.*, *Trichoderma sp.*, *Fusarium sp.* e *Aspergillus fumigatus*. Entre estes, é conhecida a ação dos gêneros *Cladosporium*, *Aspergillus sp.* e *Fusarium* na biodegradação de alguns tipos de HPAs como benzo(a)antraceno e benzo(a)pireno (Giraud et al. 2001; Serrano et al. 2009; Haritash e Kaushik 2009; Lladó 2013). Além destes, algumas espécies de *Trichoderma* são conhecidas pela capacidade de metabolizar naftaleno, fenetreno, crieseno, pireno e benzo(a)pireno (Zafra e Cortés-Espinosa 2015).

As linhagens de bactérias e fungos com capacidade de degradação de HPAs frequentemente relatadas na literatura, são *Pseudomonas sp.*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Actinetobacter sp.*, *Flavobacterium sp.*, entre outras, (Jacques et al. 2005; Haritash e Kaushik 2009; Cerniglia 1992), assim como alguns fungos como

*Arpergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Phanerochaete*, *Lentinus*, etc. (Serrano et al. 2009; Haritash e Kaushik 2009; Guiraud et al. 2001).

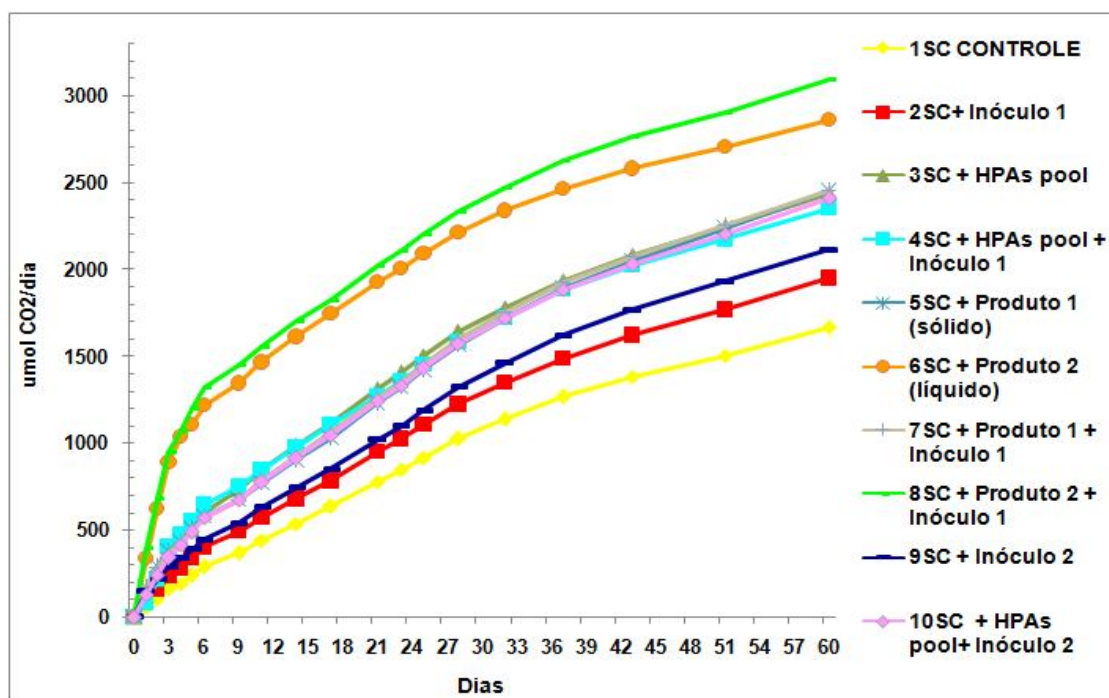
Em estudos de biodegradação, destaca-se a relevância de inoculação de culturas mistas – associando espécies de fungos e bactérias – as quais irão agir com estratégias diferentes, mas, complementares na degradação de substratos incluindo os HPAs. Dentre as bactérias identificadas, a *Pseudomonas sp.*, *P. putida* e *P. aeruginosa* são conhecidas por apresentarem alto potencial de degradação frente a criseno, fluoranteno, pireno e benzo(a)antraceno em meios suplementados (Trzesicka-Mlynarz e Ward 1995). Outra bactéria entre as que foram identificadas, *Burkholderia cepacia* é capaz de degradar fluoranteno e benzo(a)antraceno, e ainda fluoreno em HPAs oriundos de creosoto (Juhasz 1997). Para oxidação de fenantreno, conforme Kim et al. (2009) *A. baumannii* foi capaz de degradar fenantreno; também foram encontrados resultados concordantes em estudo de Aitken et al. (1998) pelos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas*, entre outros evidenciados pelo estudo citado.

A identificação microbiana ainda que simples, permite uma visão da riqueza deste solo com contaminação tão diversa e submetida aos poluentes durante décadas num ambiente real, o que não ocorre na maioria dos estudos de avaliação de técnicas de bioaugmentação e bioestimulação quando são realizados experimentos com amostras de solos sintéticos, contaminadas artificialmente e/ou esterilizadas (Semple et al. 2007).

### **3.3 Avaliação da eficiência dos Inóculos 1 e 2**

A quantificação contínua de CO<sub>2</sub> durante o experimento indica a atividade metabólica dos microrganismos, permitindo comparar o desempenho dos consórcios preparados. Verificou-se que a curva de produção de CO<sub>2</sub> não apresentou a “fase lag” (Figura 3), que indicaria o período de adaptação dos microrganismos ao substrato

adicionado. A Figura 3 indica que os microrganismos estavam em condições de metabolizar as moléculas de HPAs presentes nos solos dos respirômetros. Pelo padrão das curvas de produção de CO<sub>2</sub>, o metabolismo microbiano obedeceu a uma produção de CO<sub>2</sub> constante não se esgotando nos 60 dias de acompanhamento do experimento.



**Figura 3.** Produção acumulada de CO<sub>2</sub>/dia nos ensaios de biodegradabilidade através da respirometria

As respostas de produção de CO<sub>2</sub> foram significativamente diferentes da quantidade gerada pelo solo controle (1SC), exceto a resposta para o tratamento 2SC (solo bioaumentado com o Inóculo 1). Salienta-se, contudo, que o Inóculo 2 (tratamento 9SC) melhorou significativamente a biodegradação. No decorrer dos dias, a diferença na produção de CO<sub>2</sub> entre os tratamentos 2 e 9 (com os inóculos) e 1SC vai se acentuando, favorecida pela adição dos microrganismos e pela bioestimulação. O Inóculo 2 mostra maior geração de carbono biodegradado desde o início do experimento quando pode ter acontecido a degradação de algumas substâncias mais lábeis; a

evolução seguiu paralela e contínua em relação ao Inóculo 1. Os microrganismos do Inóculo 2 foram previamente expostos aos HPAs, este enriquecimento pode ter induzido uma pré-adaptação ou seleção de microrganismos com maior tolerância aos HPAs que os do Inóculo 1. Até o 24º dia, as curvas de produção de CO<sub>2</sub> tiveram comportamento semelhante, contudo, o tratamento 1SC indicou decréscimo na produção de CO<sub>2</sub>. Considerando o experimento projetado no tempo, provavelmente as curvas dos Inóculos 1 e 2 tenderiam a se estabilizar, indicando comportamentos similares dos inóculos preparados, frente ao solo contaminado – diferentemente do que aconteceria com o tratamento controle da própria área (1SC), que tende a se estabilizar mais rapidamente, como indica a Figura 3.

O solo controle (1SC) pode ser considerado como sítio submetido à atenuação natural. Contudo, avaliando-se a produção de CO<sub>2</sub> nos experimentos de microcosmos observou-se maior produção onde houve enriquecimento microbiano nas amostras a serem biodegradadas, podendo-se inferir que o solo da área se beneficia dos inóculos adicionados. Destaca-se que os Inóculos 1 e 2 (tratamentos 2 e 9, respectivamente) têm desempenho metabólico semelhante, e mais eficiente que o próprio solo contaminado (1SC). Isto demonstra que o aumento da quantidade de microrganismos pré-adaptados no substrato propicia maior velocidade de degradação dos contaminantes como registrados em 2SC, 7SC e 8SC. Ressalta-se, neste experimento, que o composto sólido e o fertilizante líquido são produtos estabilizados e a resposta encontrada nos 6SC e 8SC - tratamentos que receberam estes nutrientes - reflete a degradação dos contaminantes presentes no solo da área contaminada, cuja diferença entre si não foi estatisticamente significativa. Verifica-se, entretanto, que a ação dos nutrientes oferecidos pelo fertilizante associada ao inóculo adicionado favoreceu a geração do CO<sub>2</sub> (Figura 3). O solo ao qual se adicionou apenas o fertilizante líquido respondeu com menor produção

de CO<sub>2</sub>. Ressalta-se que este comportamento do Inóculo 1 frente ao acréscimo do fertilizante líquido justifica-se, uma vez que esse inóculo não recebeu o aporte de extrato de levedura e glicose, e a comunidade microbiana, mesmo assim, manteve-se viável. Contudo, deve-se considerar a possibilidade do aumento da biodegradação devido ao aporte de material húmico que pode facilitar a dessorção de HPAs (Sayara et al. 2011; Semple 2007).

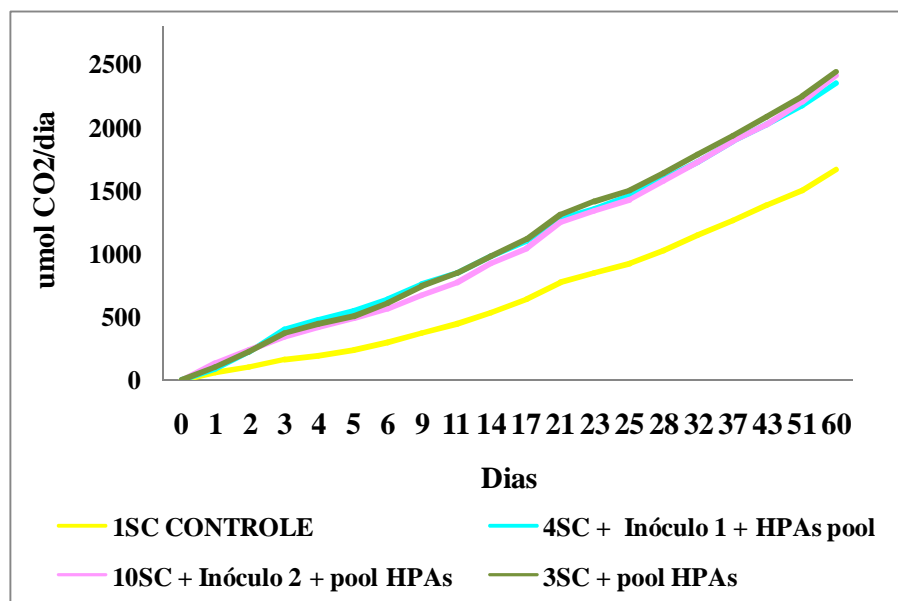
A presença dos nutrientes provenientes do fertilizante líquido acrescido ao solo da área (8SC) muda o padrão de resposta da ação do Inóculo 1 com produção de CO<sub>2</sub> acelerada a partir do sexto dia. A presença dos micronutrientes deste produto pode ter favorecido o crescimento dos microrganismos que estão originalmente no solo facilitando a biodegradação nos seis primeiros dias. Os experimentos com adição de compostos e fertilizantes podem significar presença de materiais húmicos, os quais induzem aumento da estabilidade, agindo como surfactante, e liberando HPAs sorvidos no solo (Megharaj et al. 2011; Sayara et al. 2011), tendo o Fertilizante Líquido utilizado no experimento a concentração de 6,4% de ácidos húmicos. Neste estudo foram inoculadas culturas microbianas mistas potencialmente produtores de biosurfactantes - ainda que não evidenciados analiticamente. Esta inoculação aliada à adição de fertilizante líquido pode induzir formação natural de moléculas como biosurfactantes. A presença de biosurfactantes induz a mobilidade e biodisponibilidade de compostos insolúveis favorecendo a biodegradação dos poluentes (Rahman et al. 2003).

Da mesma forma, quando se enriquece um substrato com nutrientes metabolizáveis pelos microrganismos, a atividade respiratória será associada a este bioestímulo. Assim, a introdução do *pool* de HPAs para o consórcio microbiano existente no solo – mesmo quando não sofre adaptação proveniente da manipulação de laboratório - mostrou contribuir para maior produção de CO<sub>2</sub>, conforme registrado pela

resposta do tratamento 3SC. Isso demonstra que os microrganismos autóctones presentes no solo coletado, mesmo sem serem bioaumentados são capazes ao longo do tempo de degradar os contaminantes nas condições do experimento e auxiliados pela adaptação natural dos microrganismos frente às moléculas de HPAs. No período de acompanhamento da produção de CO<sub>2</sub>, os tratamentos com *pool* de HPAs produziram mais CO<sub>2</sub> que o solo controle. Verificou-se que não houve inibição da atividade metabólica, e pela produção de CO<sub>2</sub> contínua, pode-se julgar que houve degradação dos contaminantes.

O Inóculo 2 com o *pool* – 10SC enriquecido e adaptado - apontou maior produção de CO<sub>2</sub> em relação ao Inóculo 1 (4SC) previamente bioaumentado. Nos tratamentos 3SC, 9SC e 10SC detectou-se maior produção de CO<sub>2</sub> em relação a 1SC, assim como encontrado para biodegradação no mesmo tipo de microcosmos com solos artificialmente contaminados com HPAs (Serrano et al. 2009). Embora a taxa de degradação com a adição do *pool* de HPAs tenha aumentado em relação a 1SC, a Figura 4 indica que quando comparado ao solo com adição do *pool* de HPAs, os inóculos não conferem aumento de biodegradação aos tratamentos. Entretanto, em condições de maior tempo do experimento, os microrganismos poderiam conseguir maior adaptação, podendo mostrar efeitos diferenciados.





**Figura 4.** Produção acumulada de CO<sub>2</sub>/dia nos experimentos com acréscimo do *pool* de HPAs

Conforme observado, a atividade metabólica dos microrganismos pode variar durante a biodegradação. De acordo com estudo avaliando a degradação de TPHs em solo com contaminação recente (Trindade et al. 2005) submetidos à bioaugmentação e bioestimulação, decréscimos provavelmente se devam ao início da degradação de outro perfil de moléculas, as mais recalcitrantes, como no caso dos HPAs de alto peso molecular, com 4 ou mais anéis aromáticos. Desacelerações durante o processo podem indicar a dificuldade dos microrganismos presentes no microcosmo para continuarem suas rotas metabólicas de degradação dos poluentes disponíveis. Muitos fatores poderiam estar associados a este padrão de comportamento dos microrganismos na degradação, podendo ter relação com limitações quanto à transferência dos contaminantes, ocorrendo maior sorção dos contaminantes orgânicos hidrofóbicos - como os HPAs - à matriz do solo, diminuindo a taxa e extensão da biodegradação por impedir a biodisponibilidade dos contaminantes existentes (Kottler et al. 2001; White et al. 2007).

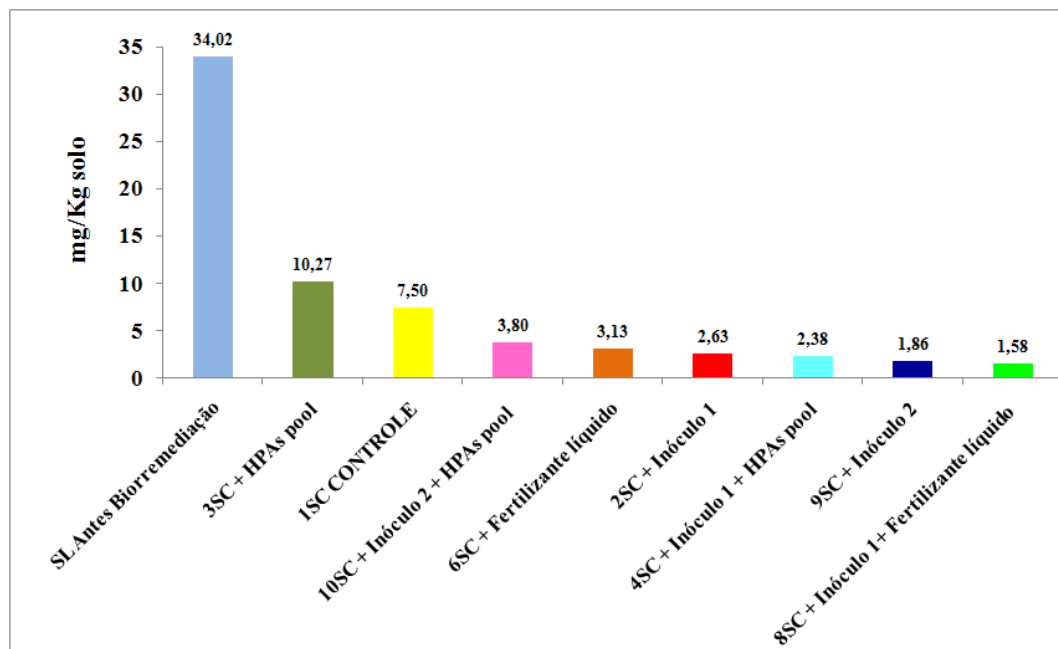
As propriedades do solo como conteúdo de m.o. e a fração granulométrica predominante desempenham papel determinante na biodegradação dos contaminantes. Os HPAs são hidrofóbicos, portanto, tendem à sorção à fase sólida do solo (Haritash e Kaushik 2009). Assim, a fração que está sorvida torna-se inacessível para os microrganismos. A presença de areia (48,3%) pode ter influenciado na biodegradação dos principais HPAs analisados, embora não tenha se expressado na conversão à CO<sub>2</sub> – uma vez que podem ter sido gerados outros produtos de degradação. A habilidade dos solos de dessorver os poluentes determina sua susceptibilidade à degradação microbiana e a efetividade da biorremediação, sendo que os poluentes e demais substratos devem estar disponíveis (Megharaj et al. 2011). Devido ao fato de tratar-se de um solo arenoso, os poluentes presentes estão mais acessíveis e disponíveis à biodegradação (Guerin 1999; Trindade et al. 2005). Esta situação pode ser confirmada pela abordagem referente às baixas concentrações de m.o. presentes, o que pode ter facilitado a disponibilização para metabolização pelos microrganismos.

Neste trabalho, os melhores resultados foram obtidos com o inóculo bioaumentado e bioestimulado, o que direciona para maior potencial de biodegradação em processos de biorremediação.

### **3.3.3 Análise de HPAs**

A concentração inicial total dos 16 HPAs foi de 34 mg/Kg (Figura 5). Todos os tratamentos alcançaram taxa de remoção acima de 60%, sendo a média de eficiência de degradação de 88%. Este desempenho traz um indicador de potencial efetivo para uso em biorremediação. O maior percentual de degradação detectado após a realização dos testes respirométricos foi observado no tratamento 8SC (Solo + Inóculo 1 + Fertilizante Líquido), apresentando menor valor residual de 1,58 mg/Kg de HPAs totais, estando de

acordo com a resposta de maior atividade respiratória, como demonstrado pela produção de CO<sub>2</sub> neste tratamento no ensaio de biodegradação em microcosmos.



**Figura 5.** Concentração de HPAs totais antes e após experimentos de biodegradação

Os valores obtidos nos tratamentos que receberam os inóculos preparados apresentaram o maior decréscimo dos poluentes alvos. Isto foi comprovado quando comparados os percentuais de degradação do somatório de HPAs totais do solo antes da biorremediação e após os tratamentos (Tabela 3).

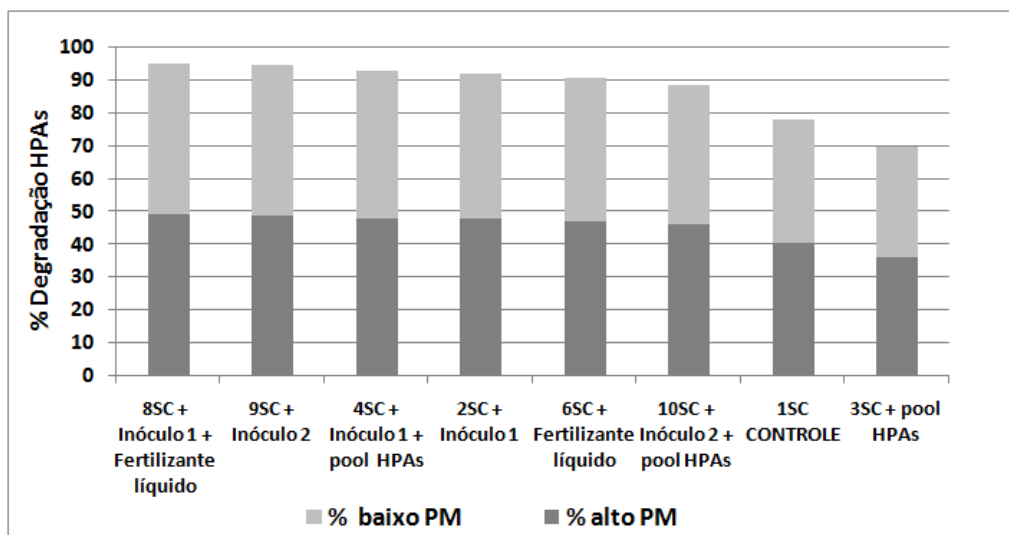
**Tabela 3.** Degradação dos HPAs (BiodHPAs) em cada um dos tratamentos em relação ao SC antes da Biorremediação e % Remanescente de HPAs após microcosmos (SC)

	BiodHPAs (%)	% alto PM	% baixo PM
8SC + Inóculo 1 + Fertilizante líquido	95,4	34,8	65,2
9SC + Inóculo 2	94,5	44,5	55,5
4SC + Inóculo 1 + pool HPAs	93,0	51,7	48,3
2SC + Inóculo 1	92,3	54,1	45,9
6SC + Fertilizante líquido	90,8	53,3	48,7
10SC + Inóculo 2 + pool HPAs	88,8	42,9	57,1
1SC CONTROLE	78,0	66,5	33,5
3SC + pool HPAs	69,8	17,2	82,8

PM = peso molecular

Em condições de escassez de nutrientes prevalecem as populações de crescimento lento o que facilitaria a degradação de HPAs mais recalcitrantes, especialmente os de maior massa molecular (Johnsen e Karlson 2007). Embora, em 1SC predomine compostos de alto peso molecular como remanescentes (Tabela 3), este solo não tenha recebido nenhum aporte, registra-se uma considerável taxa de biodegradação. Isto sinaliza que microrganismos da área contaminada após longo tempo de seleção adaptativa a este perfil de contaminantes, conseguem biodegradar contaminantes ou metabólitos mais recalcitrantes. As respostas obtidas demonstram a necessidade da bioaugmentação, da bioestimulação, bem como do enriquecimento mesmo em solos por longo tempo expostos aos contaminantes a fim de maximizar a eficiência de processos de biorremediação. Para os HPAs recalcitrantes (de cinco e seis anéis), a menor taxa de biodegradação ocorre no solo controle, sem adição nutricional ou bioaugmentação. Por outro lado, os tratamentos que receberam bioestímulo com *pool* de HPAs, apresentaram altas taxas de degradação, indicando - mediante outro mecanismo - que o enriquecimento favorece a ativação dos microrganismos autóctones. Este bioestímulo pode ter ativado a microbiota resistente a metabolizar HPAs de diferentes massas moleculares, inclusive os de alto PM – assim como no estudo de Li et al. (2009) com baixas concentrações de HPAs em solo de área contaminada por longo tempo, onde uma das possibilidades consideradas foi o contato favorecido entre micélios de fungo e contaminantes devido ao longo tempo de contaminação.

A Figura 6 compara os perfis de degradação dos HPAs de baixo e alto PM em relação às concentrações iniciais dos contaminantes e finais do experimento, indicando que os consórcios atuaram tanto sobre os HPAs mais facilmente degradáveis quanto sobre aqueles mais complexos.



**Figura 6.** Desempenho de degradação dos HPAs após microcosmos

A contaminação do solo estudado é antiga, sendo que ao se observar que as concentrações atuais de HPAs de alto peso molecular são maiores, deve-se considerar que as grandes concentrações dos poluentes caracterizados por frações mais leves e voláteis devem ter sido primeiramente degradados ou transformados mediante biodegradação ou transformações físicas como volatilização e lixiviação. Assim, devido ao tempo transcorrido, a biodisponibilidade das moléculas que permaneceram deve ter sido diminuída e os contaminantes residuais ficaram mais intimamente sorvidos à fase sólida do solo (Elgh-Dalgren et al. 2011; Semple et al. 2007; Guerin 1999). Neste perfil de contaminação é essencial fazer uso da microbiota bacteriana associada a fungos mediante processos de bioaugmentação. Este tipo de consórcio tem maior possibilidade de promover biodegradação mais eficiente (Boonchan et al. 2000; Lladó et al. 2013; Li et al. 2008). Fungos como: *Corioloopsis*, *Bjerkandera*, *Penicillium*, entre outros, têm se mostrado eficientes frente à biodegradação de HPAs de alta massa molecular. Considera-se que as exoenzimas de fungos são mais eficientes que as bactérias no ataque inicial dos HPAs mais complexos. As exoenzimas fúngicas tem maior alcance de se difundirem e atingirem os compostos. Nos ambientes naturais há coexistência destes

microrganismos no solo, havendo cooperação catalítica e sinérgica entre estes. Assim como neste trabalho, em outros estudos (Boonchan et al. 2000; Li et al. 2009; Li et al. 2008) foram encontradas altas taxas de biodegradação de HPAs de alta massa molecular a partir da inoculação de microrganismos autóctones, sugerindo que a inoculação de culturas mistas provenientes do solo contaminado pode ter sido responsável pela biodisponibilização e conseqüentemente o decréscimo na concentração dos HPAs. Considera-se que as condições do respirômetro podem facilitar o contato entre microrganismos existentes, contaminantes, umidade, nutrientes e aceptores de elétrons, levando à eficiência na biorremediação.

Através da análise de correlação realizada, observou-se que apenas os HPAs criseno, naftaleno, acenaftileno, antraceno, fenantreno, fluoreno e pireno estariam relacionados à produção de CO<sub>2</sub>, com valores de  $r = 0,76502$ ;  $0,72567$ ;  $0,75951$ ;  $0,81288$ ;  $0,81081$ ;  $0,78288$  e  $0,80677$ , respectivamente. Assim, poder-se-ia considerar que os HPAs recalcitrantes (de cinco e seis anéis) não estão associados à geração de CO<sub>2</sub> medida; a biodegradação destes compostos estaria gerando sub-produtos intermediários ao invés de atingir rota de mineralização integral.

Considerando os HPAs individualmente em relação à concentração inicial em SC (Tabela 4), verificou-se que a maior taxa de degradação ocorreu para o naftaleno (99,6 %). Devido às propriedades físico-químicas, por ser um HPA leve, este composto possui altas taxas de degradação sob ação de microbiota adaptada. Ressalta-se que nos casos dos compostos como naftaleno e outros compostos leves, dada suas características físico-químicas, suas altas taxas de degradação possivelmente estão sendo influenciadas por perdas devido à volatilidade inerente a estas moléculas. As altas taxas de degradação também foram observadas por Lladó (2013), em estudo com solos

impactados durante anos com creosoto, onde HPAs de alta massa molecular, como fenantreno, por exemplo apresentaram degradação de 95% sob ação de fungos.

**Tabela 4.** Concentração inicial de HPAs no solo contaminado antes da biodegradação nos ensaios de respirometria e taxa final de biodegradação individual

<b>Composto</b>	<b>Nº anéis</b>	<b>mg/Kg</b>	<b>Taxa biodegradação(%)</b>
<b>Acenafteno</b>	3	0,0971	94,12
<b>Acenaftileno</b>	3	0,2337	79,62
<b>Antraceno</b>	3	0,3357	88,63
<b>Benzo (a)antraceno</b>	4	2,7873	91,12
<b>Benzo (a)pireno</b>	5	2,1496	93,54
<b>Benzo (b)fluoranteno</b>	5	5,8541	92,93
<b>Benzo (g,h,i)Ppirileno</b>	6	2,9744	97,54
<b>Benzo (k)fluoranteno</b>	5	3,6323	99,03
<b>Criseno</b>	4	3,8234	98,68
<b>Dibenzo (a,h)antraceno</b>	5	3,2359	95,86
<b>Fenantreno</b>	3	0,4929	61,82
<b>Fluoranteno</b>	4	3,6776	91,50
<b>Fluoreno</b>	3	0,1621	93,15
<b>Indeno (1,2,3,c,d)pireno</b>	6	0,8687	83,52
<b>Naftaleno</b>	2	0,6800	99,59
<b>Pireno</b>	4	3,6957	98,75
<b>Somatório</b>	-	34,0205	-

Outros compostos com as maiores taxas de degradação foram benzo(k)fluoranteno com 99 % (5 anéis), pireno com 98,8 % (4 anéis), criseno com 98,7 % (4 anéis) e benzo(g, h, i) perileno com 97,5 % (6 anéis). Altas taxas de degradação também foram encontradas para compostos como pireno e fluoranteno: 82,8% e 96,2%, respectivamente, em estudos através de culturas bacterianas autóctones de solo de área contaminada por HPAs (Sun et al. 2010). Destaca-se que esse desempenho demonstrado para HPAs recalcitrantes pode ser resultado de co-metabolismo, onde o composto não é

utilizado diretamente como nutriente ou fonte de energia; os metabólitos intermediários produzidos por alguns organismos servirão como substratos para o crescimento de outros (Serrano et. al, 2009; Li et al. 2008). Como consequência, pode ocorrer a partir daí uma degradação parcial se não existirem enzimas capazes de transformar os metabólitos gerados. Neste caso, a população co-metabolizante degrada o substrato, mas não se beneficia para seu crescimento, não ocorrendo aumento da população microbiana – situação evidenciada pelo decréscimo no número de microrganismos estimados mediante a contagem.

Os processos co-metabólicos são mais prováveis diante do aumento do número de anéis aromáticos, ou seja, na degradação de HPAs de alto peso molecular, uma vez que são poucos microrganismos capazes de usar estes compostos diretamente como fonte de carbono. O benzo(a)pireno por exemplo, apresentou 93,5 % de degradação, sua biotransformação por bactérias é descrita como possível sempre que ocorre co-metabolismo: bactérias conseguem se desenvolver no pireno, podendo degradar o benzo(a)pireno por co-metabolismo (Boonchan et al. 2000; Kanaly e Bartha 1999). A presença do consórcio ao invés de uma cultura pura representa uma vantagem, uma vez que ao inocular co-culturas ocorre complementaridade de ações entre as suas rotas metabólicas. Estes resultados estão de acordo com trabalho em solo contaminado com esgoto oleoso (Lia X. et al. 2008), no qual altas taxas de degradação foram encontradas para HPAs, inclusive para HPAs com 5 anéis aromáticos ao se utilizar consórcio de bactérias e fungos.

O composto aromático que apresentou menor taxa de degradação, de 62 %, foi o fenantreno, conhecida molécula com potencial de riscos. De acordo com Kiyohara (Kiyohara et al. 1994), naftaleno e fenantreno são degradados pela mesma rota metabólica, podendo ter ocorrido competição e limitado as taxas de degradação para o



fenantreno. Possivelmente, as concentrações iniciais existentes foram tóxicas a alguns microrganismos nativos. Contudo, após tempo maior de adaptação, as populações capazes de degradá-los se estabeleceram com sucesso evolutivo, tanto que os tratamentos de maneira geral, mostraram um desempenho satisfatório na degradação dos 16 HPAs.

Assim como observado por Trindade et al. (2005) devido ao fenômeno de mineralização ser mais lento que a rota de transformação incompleta de compostos orgânicos, a eficiência da biodegradação identificada pela produção de CO<sub>2</sub>, será mais baixa que as concentrações químicas detectadas analiticamente. Desta forma, ao se analisar os resultados da degradação de HPAs deve-se considerar os diferentes aspectos na transformação, uma vez que pode haver também a formação de compostos intermediários polares (Trindade et al. 2005; Lundstedt 2003) e na escala de tempo do experimento, pode não ser suficientemente bem quantificado a correspondência entre a produção de CO<sub>2</sub> e a magnitude da biodegradação dos HPAs.

Confirmou-se neste estudo que 9SC, com o Inóculo 2, mostrou ação considerável sobre a classe de contaminantes investigadas na área em relação a sua concentração inicial, antes do solo ser submetido ao experimento de degradação em escala de microcosmos, ainda que com uma produção de CO<sub>2</sub> não tão expressiva. Estes resultados trazem mais clareza às respostas obtidas, uma vez que a análise estatística dos dados de produção de CO<sub>2</sub> mostrou diferença significativa entre todos os tratamentos com relação ao solo controle. Contudo, quando se compara o Inóculo 1 (bioaumentado), e o Inóculo 2 (bioaumentado, bioestimulado e enriquecido), verifica-se que o Inóculo 2 apresentou maior produção de CO<sub>2</sub> e melhor desempenho na degradação dos contaminantes de interesse.

#### 4 Conclusões

Pode-se destacar a relevância do uso de microrganismos nativos da área contaminada em questão uma vez que o preparo de inóculos adaptados indicou melhor desempenho quando associado a enriquecimento e bioestimulação. É inegável a constatação do potencial de degradação de HPAs do próprio solo sem nenhuma intervenção experimental, indicando que o solo da área contaminada pode estar sob processo de atenuação natural, uma vez que as comunidades microbianas da área contaminada mostraram-se ativas na degradação dos contaminantes investigados. Contudo, ficou evidente que com o aporte de nutrientes e bioaumentação, a capacidade de biodegradação da microbiota autóctone é ampliada, firmando-a como processo eficiente e sustentável.

Importa salientar também que o uso de consórcios qualifica os processos de biorremediação, uma vez que o método de isolamento convencional para posterior uso consegue empregar somente uma fração dos diversos microrganismos degradadores presentes no ambiente, sendo que nos experimentos, dada às altas taxas de degradação, possivelmente houve complementação entre as rotas metabólicas. Assim, ao utilizarmos a microbiota de maneira integral, na forma de consórcios bioaumentados e/ou bioestimulados e enriquecidos se promoveu a ação dos microrganismos efetivos para biodegradação dos compostos de interesse – os HPAs, indicando potencial uso como proposta na biorremediação dos mesmos.

## **Agradecimentos**

À CAPES pela bolsa de estudos em nível de Doutorado, ao PPG em Ecologia da UFRGS. Ao Márcio Olivio Rozin, à Nair Conde Almeida, e Richard Tomasella da UNESP de Rio Claro/SP pelo auxílio na montagem e execução dos ensaios de respirometria e esclarecimentos de dúvidas técnicas; ao Dr. Carlos E Levy da UNICAMP/SP pela identificação inicial das bactérias, à Dra. Derlene Attili de Angelis também da UNICAMP/SP pela identificação dos fungos, ao Dr. Rodrigo Leygue pela disponibilização do Fertilizante líquido e à Prof. Jandyra Fachel e Gilberto P. Mesquita pela realização das análises estatísticas.

## **Referências Bibliográficas**

Aitken MD, Stringfellow WT, Nagel RD, Kazunga C, Chen SH (1998) Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can J Microbiol* 44: 743–752. doi: 10.1139/w98-065

Bartha R, Pramer D (1965) Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides. *Soil Science* 100:68–70. doi: 10.1097/00010694-196507000-00011

Boonchan S, Britz ML, Stanley GA (2000) Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures. *Appl Environ Microb* 66(3): 1007-1019. doi: 10.1128/AEM.66.3.1007-1019.2000

Cerniglia, CE (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3: 351–368. doi: 10.1007/978-94-011-1672-5\_16

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL Norma Técnica L6.350 - Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha. São Paulo, 1990, 9p.

Elgh-Dalgren K, Arwidsson Z, Ribé V, Waara S, Kronhelm T, Hees PAW (2010) Bioremediation of a Soil Industrially Contaminated by Wood Preservatives - Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Monitoring of Coupled Arsenic Translocation *Water Air Soil Poll* 214 (1-4): 275-285. doi: 10.1007/s11270-010-0422-0

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Manual de métodos de análise do solo. 2.ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA CNPS, 1997. 212p.

FEPAM/CNPq, Vargas, V.M.F. (coord.). Estratégias ecotoxicológicas para caracterizar áreas contaminadas como medida de risco à saúde populacional. Porto Alegre: FEPAM, 2010. Relatório do Projeto 555187/2006-3.

Gaylarde CC, Bellinaso MDL, Manfio GP (2005) *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. 34 - janeiro/junho.

Gillespie IMM, Philp JC (2013) *Biotechnology policy series. Bioremediation and Environmental Remediation, Technology for the Bioeconomy*. *Trends Biotechnol* 31(6): 329–332. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.01.015

Giraud F, Guiraud P, Kadri M, Blake G, Steiman R (2001) Biodegradation of anthracene and fluoranthene by fungi isolated from an experimental constructed wetland for wastewater treatment. *Water Res.* 35(17):4126-4136. doi:10.1016/S0043-1354(01)00137-3

Guerin TF (1999) Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ landtreatment. *J Hazard Mater* 65(3): 305-315. doi: 10.1016/S0304-3894(99)00002-3

Haritash AK, Kaushik CP (2009) Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review. *J Hazard Mater* 169:1–15. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.03.137

Iain MM, Gillespie, Jim CP (2013) Bioremediation, an environmental remediation technology for the bioeconomy. *Trends in Biotechnology* 31(6). doi:10.1016/j.tibtech.2013.01.015

Jacques RJS et al. (2005) Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge Landfarming. *Int Biodeter Biodegr* 56(3): 150-156. doi: 10.1016/j.ibiod.2005.06.005

Jacques, RJS, Bento FM, Antonioli ZI, Camargo, FAO (2007) Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Cienc Rural* 37(4): 1192-1201. doi: 10.1590/s0103-84782007000400049

Johnsen AR, Karlson U (2007) Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 76: 533-543. doi: 10.1007/s00253-007-1045-2

Juhasz AL, Britz ML, Stanley GA (1997) Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz [a,h] anthracene by *Burkholderia cepacia*. *J Appl Microbiol* 83:189–198. doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.00220.x

Kanaly RA, Bartha R (1999) Cometabolic mineralization of benzo[a]pyrene caused by hydrocarbon additions to soil. *Environ Chem* 18 (10): 2186–2190.

- Kim YM, Ahn CK, Woo SH, Jung GY, Park JM (2009) Synergic degradation of phenanthrene by consortia of newly isolated bacterial strains. *J Biotechnol* 144: 293–298. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2009.09.021
- Kiyohara H, Torigoe S, Kaida N, Asaki T, Iida T, Hayashi H, Takizawa N (1994) Cloning and Characterization of a Chromosomal Gene Cluster, *pah*, That Encodes the Upper Pathway for Phenanthrene and Naphthalene Utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. *J Bacteriol* 176(8): 2439-2443.
- Kottler BD, Alexander M (2001) Relationship of properties of polycyclic aromatic hydrocarbons to sequestration in soil. *Environ Pollut* 113: 293–298. doi: 10.1016/S0269-7491(00)00189-5.
- Li X, Li P, Lin X, Zhang C, Li O, Gong Z (2008) Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *J Hazard Mater* 150(1):21-6. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.04.040
- Li X, Lin X, Li P, Liu W, Wang L, Ma F, Chukwuka KS (2009) Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *J Hazard Mater* 172: 601–605. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.044
- Lladó S, Covino S, Solanas AM, Vinas M, Petruccioli M, D’annibaled A (2013) Comparative assessment of bioremediation approaches to highly recalcitrant PAH degradation in a real industrial polluted soil. *J Hazard Mater*. 15: 248– 249, 407– 414. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.01.020
- Lladó S, Gràcia E, Solanas AM, Viñas M (2013) Fungal and bacterial microbial community assessment during bioremediation assays in an aged creosote-polluted soil. *Soil Biol Biochem* 67: 114-123. doi: 10.1016/j.soilbio.2013.08.010
- Loibner, A.P., Szolar, O.H.J., Braun, R., Hirmann, D., 2004. Toxicity testing of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons using Lumistox. *Environ Toxicol Chem* 23(3): 557-564
- Lundstedt S (2003) Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes. Department of Chemistry Environmental Chemistry Umeå University SE-901 200387, Umea SWEDEN.
- Mariano AP, Angelis DF, Piróllo MPS, Contiero J, Bonotto (2009) Investigation about the Efficiency of the Bioaugmentation Technique when Applied to Diesel Oil Contaminated Soils. *Braz Arch Biol Techn* 52(5): 1297-1312. doi: 10.1590/S1516-89132009000500030
- Megharaj M, Ramakrishnane B, Venkateswarlu K, Sethunathan N, Naidu R (2011) Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ Int* 37: 1362–1375. doi: 10.1016/j.envint.2011.06.003
- Mizwar A, Triha Y (2015) PAH Contamination in Soils Adjacent to a Coal-Transporting Facility in Tapin District, South Kalimantan, Indonesia. *Arch Environ Contam Toxicol* 69:62–68. doi: 10.1007/s00244-015-0141-z

- Moscoso F, Teijiz I, Deive FJ, Sanroman MA (2012) Efficient PAHs biodegradation by bacterial consortium at flask and bioreactor scale. *Bioresour Technol* 119: 270-276. doi: 10.1016/j.biortech.2012.05.095
- NBR 14283: Resíduos em solos: determinação da biodegradação pelo método respirométrico, 1999. RJ.
- Pohren R, Rocha J, Leal K, Vargas V (2012) Soil mutagenicity as a strategy to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. *Environ Int* 44: 40-52. doi: 10.1016/j.envint.2012.01.008
- Posada-Baquero R, Ortega-Calvo JJ (2011) Recalcitrance of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil contributes to background pollution. *Environ Pollut* 159: 3692-3699. doi: 10.1016/j.envpol.2011.07.012.
- Rahman KSM, Thahira J, Kourkoutas Y, Petsas I, Marchant R, Banat IM (2003) Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour Technol* 0(2): 159–168. doi: 10.1016/S0960-8524(03)00114-7
- Sayara T, Borràs E, Caminal G, Sarrà M, Sánchez A (2011) Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. *Int Biodeter Biodegr* 65: 859–865. doi: 10.1016/j.ibiod.2011.05.006
- Semple KT, Kieron JD, Wick LY, Harms H (2007) Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. *Environ Pollut* 150: 166 - 176. doi: 10.1016/j.envpol.2007.07.023
- Serrano IS, dos Santos EC, Menezes CR, de Faria AF, Franciscon E, Grossman M, Durrant LR (2009) Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresour Technol* 100: 4669-4675. doi: 10.1016/j.biortech.2009.03.079
- Suja F, Rahim F, Taha MR, Hambali N, Razali MR, Khalid A, Hamzah A (2014) Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. *Int Biodeter Biodegr* 90: 115-122. doi: 10.1016/j.ibiod.2014.03.006
- Sun R, Jin J, Sun G, Liu Y, Liu Z (2010) Screening and degrading characteristics and community structure of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterial consortium. *J Environ Sci* 22(10):1576-85. doi: 10.1016/S1001-0742(09)60292-8
- Trindade PV, Sobral LG, Rizzo AC, Leite SG, Soriano AU (2005) Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere* 58(4):515-22. doi: 10.1016/j.chemosphere.2004.09.021
- Trzesicka-Mlynarz D, Ward OP (1995) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Can J Microbiol* 41:470–476. doi: 10.1139/m95-063

USEPA–U.S. Environmental Protection Agency. Soil screening guidance: user’s guide. Publication 9355.4-23. Office of Solid Waste and Emergency Response. Washington, DC, 1996 39p

USEPA–U.S. Environmental Protection Agency, Method 3550C, Ultrasonic extraction, 2007. <http://www.epa.gov/sw846/pdfs/3500.pdf>

USEPA, 1996. Method 8270C: semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).

Vargas VMF (2010) Estratégias ecotoxicológicas para caracterizar áreas contaminadas como medida de risco à saúde populacional. FEPAM/CNPq, Relatório de Projeto 555187/2006-3

Wellington (1997) Health and Environmental Guidelines for Selected Timber Treatment Chemicals. Available at: <http://www.mfe.govt.nz/publications/hazardous> Acessado em 15/08/2010.

White PA, Lemieux CL, Lynes KD, Lambert IB, Öberg L, Haglund P, Tysklind M (2007) Sources, Fate, and Toxic Hazards of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) at PAH- contaminated Sites. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*. 36(6): 475-485. doi: 10.1579/0044-7447(2007)36[475:SFATHO]2.0.CO;2

Zafra G., Cortés-Espinosa DV (2015) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review, *Environ Sci Pollut Res*. DOI 10.1007/s11356-015-5602-4

### 3. BIORREMEDIAÇÃO EM SOLOS CONTAMINADOS POR HPAS: MUTAGENICIDADE COMO FERRAMENTA PARA VALIDAR A QUALIDADE AMBIENTAL

**Roberta de Souza Pohren<sup>a,b</sup>, Jocelita Aparecida Vaz Rocha<sup>a</sup> e Vera Maria Ferrão Vargas<sup>a,b\*</sup>**

<sup>a</sup>Departamento de Pesquisas e Análises Laboratoriais, Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luís Roessler (FEPAM), Avenida Salvador França, 1707, CEP: 90690-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>b</sup>Programa de Pós-graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

#### RESUMO

Entre as possibilidades de remediação de áreas contaminadas, está a biorremediação. Uma biodegradação efetiva de compostos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) deve considerar os possíveis efeitos tóxicos e mutagênicos que podem persistir mesmo após o processo. Neste trabalho, foi avaliado o potencial mutagênico de amostras de solo de área contaminada por preservantes de madeira já submetidas a processo de biorremediação simulado em laboratório, utilizando dois diferentes Inóculos, e comparados ao decaimento de HPAs. Foram preparados extratos orgânicos antes e após a biorremediação, onde foram analisados os 16 HPAs considerados prioritários pela USEPA e testados frente ao ensaio *Salmonella*/microssoma - método de microssuspensão. Os extratos foram analisados em linhagens que detectam erro no quadro de leitura (TA98 e TA97a), substituição de pares de bases do DNA (TA100), em presença e ausência de *S9 mix*, além das linhagens YG1041 e YG1042, sensíveis a nitroarenos. Todos os tratamentos apresentaram redução na potência mutagênica e na concentração de HPAs analisada em relação ao solo controle (não submetido a nenhum tratamento) após experimento de biorremediação. Foi encontrada relação entre potência mutagênica e concentração de HPAs nas amostras. O solo antes da biodegradação mostrou resposta positiva para todas as linhagens. Considerando o Inóculo 1 apenas bioaumentado e o Inóculo 2 ainda bioestimulado e enriquecido, as concentrações de HPAs e efeito mutagênico foram diversos. O primeiro identificou maior redução da mutagênese e menor decréscimo de HPAs enquanto o segundo mostrou maior potência mutagênica mesmo associada à maior redução de HPAs, com valores entre 146 – 1891 rev/g de solo. Neste caso, pode-se considerar a reatividade dos diferentes tipos de HPAs na mistura e a possível geração de sub-produtos de degradação com elevada potência mutagênica após processo parcial de biodegradação. Foram observados efeitos nas linhagens sensíveis ao diagnóstico de nitrocompostos: YG1041 e YG1042, com valores antes da biorremediação de 747 e 567 rev/g solo, respectivamente. Sob a ação do Inóculo 1 houve completo decréscimo dos efeitos em YG1042; já com Inóculo 2, os efeitos se mantiveram apenas em YG1042. Embora, observada eficiência na biorremediação, os danos associados indicam que a análise dos contaminantes e sua relação com efeitos mutagênicos, torna-se etapa fundamental para efetiva avaliação dos riscos e eficiência de processos de biorremediação.

**Palavras-chave:** biodegradação, inóculos autóctones, genotoxicidade, compostos orgânicos, carcinogênicos, *Salmonella*/microssoma

\*Departamento de Pesquisas e Análises Laboratoriais, FEPAM, Avenida Salvador França, 1707 CEP: 90690-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Tel.: +55 51 33346765; vera.vargas@pq.cnpq.br

\*\*Artigo a ser submetido para publicação na Revista *Chemosphere*.



**Highlights:**

- Pode haver aumento da mutagênese do solo após processo de biorremediação;
- Há limitação na mineralização integral durante os processos de biorremediação;
- Com biodegradação parcial podem surgir sub-produtos tóxicos e mutagênicos.

## 1 Introdução

Nas últimas décadas tem se tornado evidente as implicações ambientais decorrentes do aumento no número de áreas contaminadas no mundo. Entre as principais classes de poluentes orgânicos de preocupação mundial estão os HPAs - hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Estas substâncias estão presentes em um grande número de áreas contaminadas, tornando urgente a necessidade de intervenção para remediá-las. A preocupação deve-se ao risco gerado devido às características de toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade de alguns representantes destas substâncias, como os 16 HPAs listados como poluentes prioritários pela USEPA (Baquero-Posada et al. 2011; Keith e Telliard 1979; Simarro et al. 2011). Estes compostos são persistentes no ambiente devido a sua hidrofobicidade (Moscoso et al. 2012; Baquero-Posada et al. 2011), apresentando comumente baixa biodisponibilidade nos solos e efeitos recalcitrantes.

Algumas tecnologias existentes são capazes de removê-los dos ambientes, entre elas, uma das principais é através da biorremediação (Baquero-Posada et al. 2011; Silva et al. 2009; Anderson et al. 2009), onde pela ação de microrganismos se promove a biodegradação das moléculas de interesse. Esta pode ser considerada a principal rota para a completa degradação deste tipo de contaminante, uma vez que a atividade dos microrganismos pode levar à mineralização destes compostos à CO<sub>2</sub> e água (Cerniglia 1992; Moscoso et al. 2015). Contudo, durante o processo de biorremediação, podem ser formados sub-produtos resultantes da oxidação inicial dos anéis aromáticos existentes nos HPAs, ou seja, os HPAs comumente monitorados não são os únicos produtos presentes durante um processo de biorremediação, podendo surgir efeitos destes outros compostos não investigados (Anderson et al. 2009; Hu et al. 2012). Alguns destes

metabólitos formados na degradação podem ser tão tóxicos quanto os HPAs, ou até mais, como nitro e oxi-HPAs formados (Lundstedt 2003; Lemieux et al. 2009; Lundstedt et al. 2007). Uma estratégia mais efetiva de pesquisa indica a necessidade de acompanhamento dos processos de biorremediação com avaliação de possíveis efeitos biológicos (Moscoso et al. 2012; Loibner et al. 2004), uma vez que monitorar centenas destes compostos ao longo dos processos de biorremediação via análises químicas não é uma estratégia prática, sendo também dispendiosa (Hu et al. 2012).

Portanto, fica evidente que a avaliação e monitoramento quanto ao risco persistente após processos de remediação - historicamente realizada apenas através de análise química dos 16 HPAs como compostos alvo, não é suficiente, uma vez que suas reduções não necessariamente irão garantir redução de toxicidade e/ou mutagenicidade na amostra considerada (Anderson et al. 2009).

Destaca-se, assim, que a avaliação da eficiência de processos de biorremediação deve prever as possíveis conseqüências tóxicas e mutagênicas, considerando os efeitos totais dos contaminantes, tais como suas interações, sinergismo, ou antagonismo (Loibner et al. 2004). Entre os bioensaios que permitem esta avaliação integral está o ensaio *Salmonella*/microsoma – Teste de Ames, o qual avalia o risco potencial ao material genético e possui sensibilidade para diversos compostos desta classe de orgânicos (Vargas et al. 2008; Tagliari et al. 2004; Courty et al. 2008; Pohren et al. 2012; Coronas et al. 2013). O teste *Salmonella*/microsoma é largamente utilizado em diagnóstico ambiental (Coronas et al. 2008; da Costa et al. 2012; Da Silva Jr and Vargas 2009; Meyer et al. 2015; Vargas et al. 1993; Vargas et al. 2003; White e Claxton 2004). Contudo, nos processos de biorremediação ainda não está totalmente incorporada, entre as estratégias de trabalho, a necessidade de avaliação dos solos através de testes de genotoxicidade e mutagenicidade. Este ensaio, além de poder ser utilizado no

diagnóstico de áreas contaminadas, também pode ser empregado no acompanhamento da eficiência e efetiva biodegradação dos poluentes através da biorremediação. Destaca-se, que ao se avaliar a mutagenicidade de solos contaminados submetidos a processos de biorremediação, se amplia as avaliações de risco, comumente baseadas nas análises químicas, e se qualifica os processos de avaliação da eficiência da biorremediação (Anderson 2009; Lundstedt et al. 2007). Desta forma, pode ser uma alternativa dentre as avaliações clássicas de qualidade do solo, uma vez que atua na previsão de danos precoces ao conteúdo genético dos seres vivos, causados por concentrações e interações que podem não ser detectadas através de outros testes.

Entre alguns trabalhos já realizados com relação à avaliação de biorremediação, é possível notar que nem todos evidenciam uma redução nos efeitos tóxicos e ou mutagênicos: Alexander et al. (2002) encontraram aumento de genotoxicidade após avaliar solo submetido a tratamento biológico, embora com mudanças significativas na concentração de HPAs presentes; também avaliando-se solo contaminado após experimentos de biorremediação em escala de laboratório, foram encontradas taxas de redução de HPAs de até 74%, sendo as diferentes estratégias de biorremediação equivalentes. Contudo, houve aumento da potência mutagênica em algumas linhagens testadas indicando processos de biorremediação mais seguros e eficientes (Brooks et al. 1998; Hughes et al. 1998). Em estudo de Hu et al. (2012) ao se testar linhagens celulares para avaliar variação de toxicidade e de genotoxicidade após biorremediação, foram observados aumento de danos, embora com considerável redução na concentração dos 14 HPAs prioritários analisados por eles.

Destaca-se que os resultados encontrados para mutagenicidade irão refletir os efeitos biológicos quando os contaminantes forem totalmente degradados, ou seja, mineralizados, ou apenas parcialmente transformados (Cerniglia 1992; Lundstedt 2003),

permitindo avaliar a geração de sub-produtos formados do metabolismo incompleto dos HPAs, e seus riscos associados.

Além disso, a maioria dos estudos sobre toxicidade e biodegradação de HPAs é conduzida com um único composto, ou alguns representantes da classe com objetivo de minimizar as variáveis. No entanto, os HPAs estão presentes nas áreas contaminadas como misturas complexas (Cerniglia 1992; Hwang e Cutright 2002). Desta forma, é necessário realizar estudos com amostras reais de solos contaminados, onde a mistura destes contaminantes esteja presente, a fim de verificar o efetivo potencial de biodegradação e os riscos associado.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de riscos mutagênicos e concentração dos HPAs prioritários em amostras de solos de área contaminada após serem submetidas a experimentos de biorremediação previamente realizados em microcosmos.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Solo contaminado**

As amostras de solo utilizadas foram obtidas após finalização de experimentos de simulação de biorremediação após período de 60 dias como descrito em Pohren et al., (2016). Neste processo, quantidades de solos coletados em sítio contaminado por preservantes de madeira, conforme Pohren et al., (2016), foram submetidas a ensaios de biodegradação em respirômetros e monitoradas quanto à respiração microbiana pela produção de CO<sub>2</sub>. Nestes experimentos foram testados dois inóculos preparados a partir de microrganismos da própria área – bactérias e fungos autóctones – sendo o Inóculo 1

bioaumentado e o Inóculo 2 bioestimulado com nutrientes inorgânicos e enriquecido com HPAs representantes da contaminação. Estes solos eram oriundos originalmente de uma antiga fábrica de preservantes de madeira desativada, localizada em Triunfo, no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A atividade industrial fez uso de vários produtos químicos como pentaclorofenol, creosoto e arseniato de cobre cromatado, sendo o solo submetido aos experimentos e às investigações neste estudo, priorizado a contaminação por HPAs (Pohren et al. 2012; Fepam 2010).

O solo utilizado nos experimentos de biorremediação (Pohren et al. 2016) foi avaliado no presente estudo quanto à mutagenicidade e análise química de HPAs totais, tendo apresentado inicialmente as seguintes características: 48,3 % de areia, 17,6 % de silte, 12,85 % de argila, pH de 6,3, conteúdo de matéria orgânica de 3,4 %, 26 mg/Kg de As, 40 mg/Kg de Cu, 43 mg/Kg de Cr e concentração de Cr<sup>6+</sup> menor que 1 mg/Kg.

Após o término do período de biodegradação os solos submetidos aos experimentos foram reunidos e homogêneos e armazenados a 4°C protegido da luz até a realização das extrações orgânicas, a fim de verificar a eficiência da biorremediação.

As amostras de solos avaliadas quanto à mutagenicidade e risco de HPAs totais foram identificadas de acordo com os experimentos de biorremediação realizados previamente, sendo: 1SC solo contaminado – Controle; 2SC (solo + Inóculo 1); 3SC (solo + *pool* HPAs); 4SC (solo + Inóculo 1+ HPAs *pool*); 6SC (solo + Fertilizante Líquido); 8SC (solo + Inóculo 1 + Fertilizante Líquido); 9SC (solo + Inóculo 2) e 10SC (solo + Inóculo 2 + *pool* HPAs).

Nestes experimentos de biorremediação previamente realizados, destaca-se que aos tratamentos 6SC e 8SC foi acrescentado fertilizante líquido oriundo de degradação agrícola de resíduo de videira. E aos tratamentos 3SC, 4SC e 10SC, foi acrescentado como

“pool”, os HPAs fenantreno, fluoranteno, pireno, 1-nitropireno, e 2-nitrofluoreno (todos com pureza > 98%) (Sigma–Aldrich) com concentração final no solo de 4 mg/Kg de cada HPA. Quanto aos Inóculos adicionados ao solo, indicando o uso dos microrganismos inerentes aos experimentos de biorremediação, estes são caracterizados por representarem: i) Inóculo 1: efeito de bioaugmentação ii) Inóculo 2: efeito de bioaugmentação + bioestimulação e enriquecimento. A bioaugmentação foi realizada com os microrganismos do solo contaminado, a bioestimulação através da adição de nutrientes inorgânicos e o enriquecimento com o pool de HPAs conforme descrito em Pohren et al., (2016).

## **2.2 Extração orgânica dos solos**

Foram preparados extratos orgânicos do SC coletado no sítio industrial e dos solos submetidos aos experimentos de biorremediação em microcosmos após os experimentos de biodegradação. Estes extratos foram obtidos conforme método USEPA 3550C (2007): o solo, para teste, foi homogeneizado com espátula de inox e em 15 g dessa amostra foi adicionado o solvente diclorometano - DCM - levando-se para extração em ultrassom. O líquido foi filtrado em coluna cromatográfica de sulfato de sódio e celite, concentrado em rota-vapor a 40°C e armazenado em freezer até o uso nos ensaios biológicos para avaliar potencial mutagênico e em testes para quantificar HPAs.

## **2.3 Análises químicas**

Foi realizada a quantificação de HPAs nas amostras de solos dos microcosmos após o período de 60 dias sob biodegradação e comparados com os resultados do solo

contaminado da área antes de ser submetido aos experimentos de biodegradação. Para tanto, os extratos orgânicos de solo foram analisados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC/MS Perkin Elmer modelo Clarus 600 sistema Quadrupolo modo SIR), sendo quantificados os 16 HPAs classificados como poluentes prioritários pela USEPA (Iarc 2011): benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluorantreno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(k)fluorantreno, naftaleno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno, acenafteno, acenaftleno, antraceno, fenantreno, fluorantreno, fluoreno, pireno, segundo método USEPA SW846/8270-D (1996). Foi avaliada também a concentração do contaminante pentaclorofenol (PCP) antes e após alguns dos experimentos de biodegradação. Este contaminante foi analisado por GC/MS, após extração orgânica conforme USEPA SW846-8270D, 3550C. Ainda na caracterização inicial a amostra do solo contaminado, foi analisada quanto ao teor dos metais de interesse - As, Cu e Cr - através de espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP-OES/PERKIN ELMER/OPTIMA 7300 DV).

## **2.7 Avaliação de Mutagenicidade com Ensaio *Salmonella*/microsoma**

A avaliação da mutagenicidade foi realizada no solo contaminado – SC antes de ser submetido aos ensaios respirométricos e, em amostras após o término dos microcosmos para biodegradação, identificados de 1SC a 10 SC. Assim, as amostras utilizadas foram os extratos orgânicos desses solos nos seguintes tratamentos: SC, 1SC, 2SC, 3SC, 4SC, 6SC, 8SC, 9SC e 10SC.

Para a avaliação da mutagenicidade foi utilizado o teste *Salmonella*/microsoma pelo método de microsuspenção, Teste de Kado (Kado et al. 1983; Umbuzeiro e



Vargas 2003), que é uma modificação do Teste de Ames (Maron e Ames 1983), utilizando a linhagem de teste dez vezes concentrada, o que permite analisar pequenas quantidades de amostras. Foram utilizadas as linhagens de *Salmonella typhimurium*, TA98 e TA97a, que detectam a ação de mutagênicos que causam erro no quadro de leitura, sendo a TA97a descrita como mais sensível a metais pesados (Pagano e Zeiger 1992) e HPAs (Maron e Ames 1983), e a TA100 que detecta mutagênicos por substituição de pares de bases. Foram testadas também linhagens com alta produção das enzimas nitroredutase e O-acetiltransferase (Hagiwara et al. 1993), as quais são específicas para diagnóstico de nitrocompostos: YG1041 e YG1042.

A mutagênese dos extratos foi avaliada em seis concentrações: 10, 20, 40, 80, 120 e 160 mg equivalente de solo, como definido em estudos anteriores (Pohren et al. 2012). Todos os testes foram realizados em presença e ausência de sistema de metabolização P450 in vitro, *S9 mix* (MOLTOX SA) induzido por AROCLOR 1234, com exceção das linhagens YGs realizadas sem sistema de metabolização.

Os ensaios foram realizados em duplicata e com a inclusão de controles negativos (meio nutriente - 100µl/placa, e o solvente utilizado no ensaio: 5µl DMSO/placa) e positivos de acordo com a linhagem e tratamento utilizado (4-oxido-nitroquinoleína: 4NQO, 0.5µg/placa, CASRN. 56-57-5 Sigma Chemical Company; azida sódica: SAZ, 0.5µg/placa, CASRN. 26628-22-8 Sigma Chemical Company; 2-nitrofluoreno: 2NF, 0.15µg/placa, CASRN. 607-57-8 Merck do Brasil; e 2-aminofluoreno: 2AF, 1µg/placa, CASRN. 153-78-6 Sigma Chemical Company).

A análise dos resultados foi realizada através da atividade mutagênica expressa pelo número de revertentes por grama seca equivalente de solo (rev/g equivalente de solo), calculados através da porção linear de curva dose-resposta, pelo programa estatístico SALANAL (*Salmonella Assay Analysis*, versão 1.0 - RTP, North Carolina,

USA) selecionando o modelo linear ou *Bernstein* (Umbuzeiro e Vargas 2003; Bernstein et al. 1982). A amostra foi considerada mutagênica quando observada significância estatística na análise de regressão ( $p \leq 0.05$ ) e na ANOVA ( $p \leq 0.05$ ). Com objetivo de verificar a relação entre as respostas mutagênicas e a concentração de HPAs foram realizadas correlações de Pearson no Programa estatístico “*Statistical Package For The Social Sciences*” (SPSS/PASWSTAT), versão 18. Foi também realizada Análise de Componentes Principais (PCA) no Software PC-Ord.

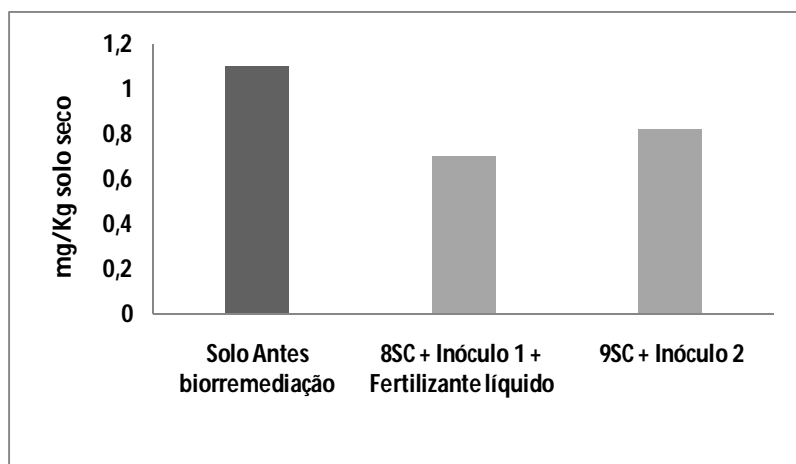
Previamente ao teste de mutagenicidade foi realizado o ensaio de sobrevivência celular, onde a porcentagem de colônias que se desenvolvem em meio completo em diferentes concentrações testadas da amostra comparativamente com o número de colônias formadas na placa controle. Amostras que apresentam um percentual de sobrevivência das células inferior a 60% em pelo menos uma das dosagens, quando comparadas com o controle negativo são consideradas citotóxicas (Vargas et al. 1993).

### **3 Resultados e Discussão**

#### **3.1 PCP no solo**

O contaminante da área, PCP, apresentou concentração igual a 1,1 mg/Kg antes da realização dos testes de biorremediação, valor considerado acima do limite previsto em legislação para prevenção (0,16 mg/Kg) - Resolução CONAMA N° 420 (2009) - nas amostras analisadas após a biodegradação. Os valores detectados nos tratamentos estão abaixo do valor orientador de 3 mg/Kg de solo, considerado para investigação em área industrial conforme Resolução supracitada (Figura 1).

Contudo, ressalta-se que foi observada ação dos inóculos sobre o contaminante PCP em relação a sua concentração inicial antes de o solo ser submetido ao experimento de biodegradação, evidenciado pela resposta dos tratamentos 8SC (0,7mg/Kg) e 9SC (0,82mg/Kg) dos experimentos. Portanto, a presença de PCP no solo não inibiu o crescimento microbiano, podendo ser considerada a ação do Inóculo 1 quando bioestimulado (e não apenas bioaumentado como em 2SC) e do Inóculo 2 adaptado em estratégias de biorremediação de solos contaminados com este tipo de contaminante orgânico. A degradação de PCP estaria associada ao acréscimo de nutrientes indicado pelas reduções em sua concentração nos tratamentos 8SC e 9SC, os quais receberam, respectivamente, aporte de nutrientes do fertilizante adicionado e do bioestímulo e enriquecimento feito ao Inóculo 2. Atualmente o uso de PCP está proibido em muitos países, inclusive no Brasil, uma vez que é considerado pela IARC como possível cancerígeno para o ser humano (Grupo 2B).



**Figura 1.** Concentração de PCP em extratos orgânicos de solo antes e após experimentos de biorremediação

### 3.2 Citotoxicidade

Na avaliação de sobrevivência celular o solo contaminado antes de ser submetido ao experimento de biorremediação mostrou citotoxicidade em concentrações intermediárias tanto em presença quanto na ausência de *S9 mix* (Tabela 1). Quando consideradas as amostras avaliadas após os ensaios de biodegradação, 83% das amostras foram citotóxicas nas concentrações mais altas testadas. Contudo, muitas das respostas observadas foram de ausência de citotoxicidade. Na análise dos resultados, foram consideradas somente as concentrações não tóxicas para as amostras.

**Tabela 1.** Citotoxicidade de extratos orgânicos de solos em presença e ausência de sistema de metabolização (S9)

Citotoxicidade	SC Antes								
	biorremediação	1SC	2SC	3SC	4SC	6SC	8SC	9SC	10SC
-S9	<sup>a</sup> T 40mg	T 80mg	NT	T 40mg	NT	NT	NT	NT	T 120mg
+S9	T 80mg	<sup>b</sup> NT	NT	NT	T 80mg	NT	T 120mg	NT	T 80mg

<sup>a</sup>T = concentração de amostra citotóxica com % sobrevivência celular inferior a 60% em relação ao controle negativo.

<sup>b</sup> NT = não citotóxica.

S9 = sistema de metabolização exógeno. Citotoxicidade avaliada frente à linhagem TA98.

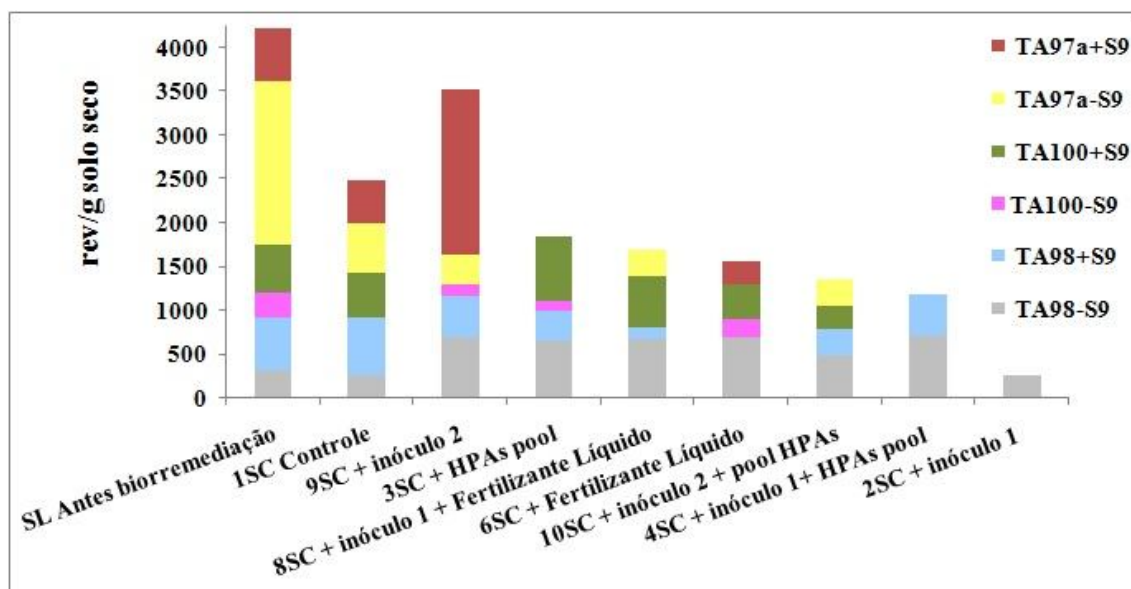
### 3.3 Atividade Mutagênica e HPAs

Nos extratos orgânicos, o padrão de mutagenicidade observado foi diversificado - conforme observado na Figura 2. O solo contaminado antes de ser submetido aos experimentos de degradação mostrou resposta positiva para todas as linhagens testadas, com percentual de 42% de respostas em presença de S9 e de 58% na ausência de sistema de metabolização, com efeito total de danos igual a 4223 rev/g equivalente de solo. Este maior percentual de respostas sem sistema de metabolização pode estar associado a compostos como 1,6 e 1,8-pirenoquinonas, indicados por Sakai et al. (1985), como altamente mutagênicos tanto em presença quanto em ausência de sistema de metabolização frente à linhagem TA97a - que detecta substâncias que causam erro

no quadro de leitura – destacando a implicação que compostos como derivados de HPAs podem apresentar.

No tratamento 1 - controle do experimento - observou-se que três linhagens testadas apresentaram respostas praticamente iguais após o experimento (TA98-S9mix e +S9mix e TA100+S9mix); para as outras linhagens os danos observados diminuíram. Contudo, há o mesmo padrão das linhagens com maiores efeitos no solo antes de se ser submetido aos experimentos de degradação. Desta forma, evidencia-se que no solo da área poderia estar ocorrendo atenuação natural, indicando que a comunidade microbiana está adaptada à degradação dos contaminantes, embora esta estivesse ocorrendo numa taxa inferior à necessária para inibir a manifestação de efeitos biológicos e possíveis riscos existentes.

Após os testes de biorremediação em laboratório (Pohren et al. 2016), os extratos orgânicos testados que mostraram somatório de efeitos mutagênicos mais baixos foram os tratamentos 2SC, 4SC e 10SC variando de 254 – 1184 rev/g equivalente de solo.



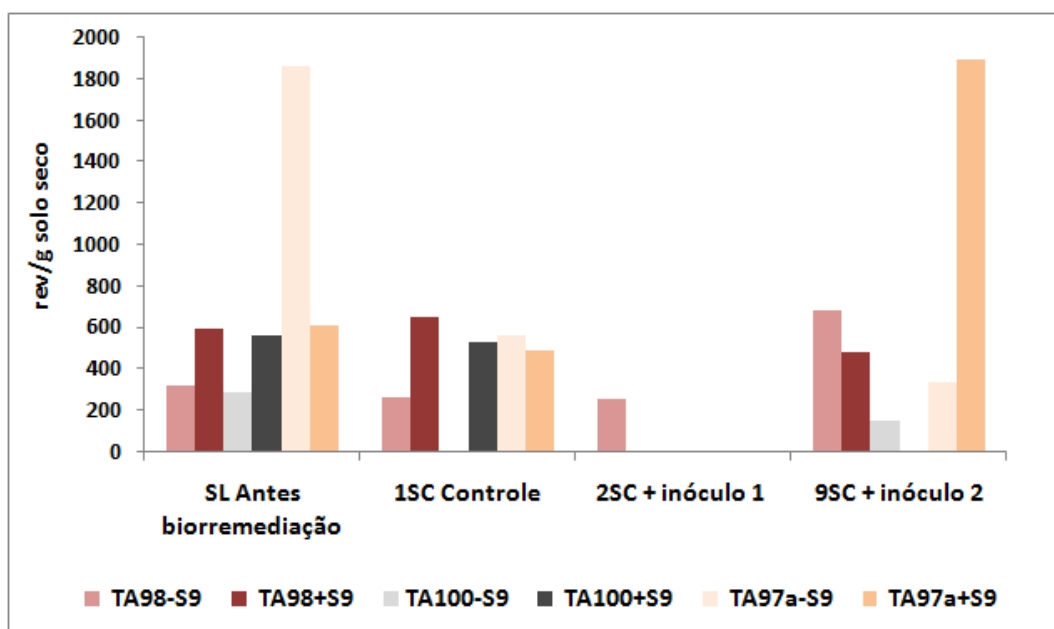
**Figura 2.** Somatório da mutagenicidade de diferentes linhagens nos extratos orgânicos de solos antes e após experimentos de biodegradação

Foi encontrada correlação entre o somatório de efeitos biológicos - potência mutagênica e a concentração de HPAs totais nas amostras de solo ( $r = 0,733$ ,  $p < 0,05$ ). Esta potência mutagênica indica o total de mutagenicidade calculado através do somatório do número de rev/g equivalente de solo seco observado por tratamento, para cada linhagem e condição de metabolização. Para efeitos observados em TA98-S9 e TA100-S9, caso as respostas obtidas nas linhagens nitrosensíveis (YG1041 e YG1042, respectivamente) fossem mais elevadas, estes valores representaram os efeitos da classe de mutágenos.

Destaca-se que no solo bioaumentado com o Inóculo 1 (2SC), ocorreu a maior redução dos efeitos mutagênicos, uma vez que após o experimento de biodegradação, foi observado apenas efeitos na linhagem TA98-S9mix, indicando mutágenos causadores de erro no quadro de leitura do DNA. Nas outras linhagens testadas, houve ausência de danos, inferindo-se, portanto, que o Inóculo 1 foi efetivo no decréscimo do padrão da mutagenicidade do solo. Pode-se dizer que os efeitos observados não estão associados aos HPAs, uma vez que a ação causada por esta classe de compostos precisaria de sistema de metabolização para ser expressa. Portanto, alguns sub-produtos da biotransformação dos HPAs, mutágenos diretos ou outros contaminantes existentes na área contaminada podem estar atuando neste solo. Entre esses, poderíamos considerar os efeitos dos metais, de dioxinas e furanos e/ou da ação sinérgica do PCP – já que este não é considerado mutagênico (Barbee et al. 1996). Deve-se destacar também que alguns hidrocarbonetos policíclicos nitrados têm efeito mutagênico de ação direta em várias linhagens bacterianas de *Salmonella typhimurium* (Möller 1994; Rosenkranz e Mermelstein 1983). Assim, poder-se-ia considerar a ação de nitrocompostos em TA98-S9mix – o que ficou comprovado pela ação em sua linhagem

derivativa YG1041 que apresentou média de danos aproximada, com valor de 249 rev/g equivalente de solo (Figura 3).

Quando analisados isoladamente os tratamentos testados com os inóculos comparativamente a SC antes da biorremediação, nota-se claramente as diferenças na ação dos consórcios preparados (Pohren et al. 2016) frente às linhagens testadas. Desta forma é nítido o decréscimo da atividade mutagênica no tratamento com o Inóculo 1 bioaumentado (2SC). Da mesma forma, em estudo de Wu et al. (2008) avaliando a genotoxicidade com *Salmonella typhimurium* em teste com microplacas, foi encontrado fator de genotoxicidade mais baixo para amostra de solo em microcosmo bioaumentado com fungos, bem como maior redução na concentração dos 15 HPAs prioritários analisados, do que para solo bioestimulado.



**Figura 3.** Potência mutagênica no solo antes da biorremediação, e após em SC controle e solo com inóculos frente às linhagens testadas

Considerando o tratamento 9, após ação de microrganismos do Inóculo 2 (bioaumentado e enriquecido), o decréscimo das mutações foi observado para todas as linhagens testadas exceto em TA97+S9mix e TA98-S9mix, mostrando valores entre 146

– 1891 rev/g equivalente de solo. Nesta condição pode-se registrar mudança no tipo das respostas biológicas identificadas pelas cepas com relação ao solo antes da biorremediação. Assim, ressalta-se que principalmente os efeitos aumentados em TA97a, podem estar associados a danos causados pela ação de derivados de HPAs, como observado por Sakai et al. (1985), sendo que a linhagem TA97 em presença de S9, pode ser mais sensível que TA98 ou TA100 à ação de compostos como 1-metilfenantreno, fluoranteno, pireno, benzo(a)pireno, benzo(e)pireno e perileno. Alguns estudos demonstram que compostos como o pireno - embora não carcinogênico - pode apresentar mutagenicidade durante sua rota metabólica, uma vez que são formadas pirenoquinonas, as quais possuem caráter de toxicidade. Também, conforme observado por Levin et al. (1982), após ativação metabólica, o HPA benzo(a)pireno pode induzir ambos danos do tipo frameshift como de substituição de pares de bases, sendo a linhagem TA97a a mais sensível à ação de hidrocarbonetos aromáticos - concordando com o aumento observado para a linhagem no tratamento 9SC, onde pode ter aumentado a concentração para algum derivativo de HPAs durante o experimento. Portanto, embora com adição do inóculo bioaumentado e bioestimulado, este solo manteve alta potência mutagênica, indicando que não houve uma biodegradação integral.

Pondera-se que é a forma dissolvida dos contaminantes que fica biodisponível e os compostos ligados não exercem efeitos biológicos diretos (Megharaj et al. 2011). No caso do extrato do tratamento 9SC com Inóculo 2 ter apresentado alta potencialidade mutagênica, pode-se inferir que talvez a ação microbiana não tenha conseguido acessar todos os poluentes e não ocasionando biodegradação integral. Além disso, podem ter sido gerados produtos intermediários que possuam toxicidade associada, sendo responsáveis pelo aumento da mutagenicidade e possível risco decorrente, ou devido ao



aumento da biodisponibilidade dos contaminantes inicialmente existentes que não expressavam sua toxicidade antes do experimento (Barbee et al 1996; Lundstedt et al. 2007; Sayles et al. 1999).

Este padrão diferenciado também foi encontrado por Hughes 1998 (Hughes et al. 1998) avaliando solo contaminado com creosoto antes e após processo de biorremediação, onde foi observado aumento na genotoxicidade – sem, contudo ser determinado sua origem. Destaca-se que respostas biológicas são dependentes de aspectos como os efeitos da matriz solo, os comportamentos de sorção/dessorção de contaminantes, a biodisponibilidade e possíveis interações químicas (Chibwe et al. 2015), podendo implicar na manifestação de efeitos variáveis e difíceis de mensurar.

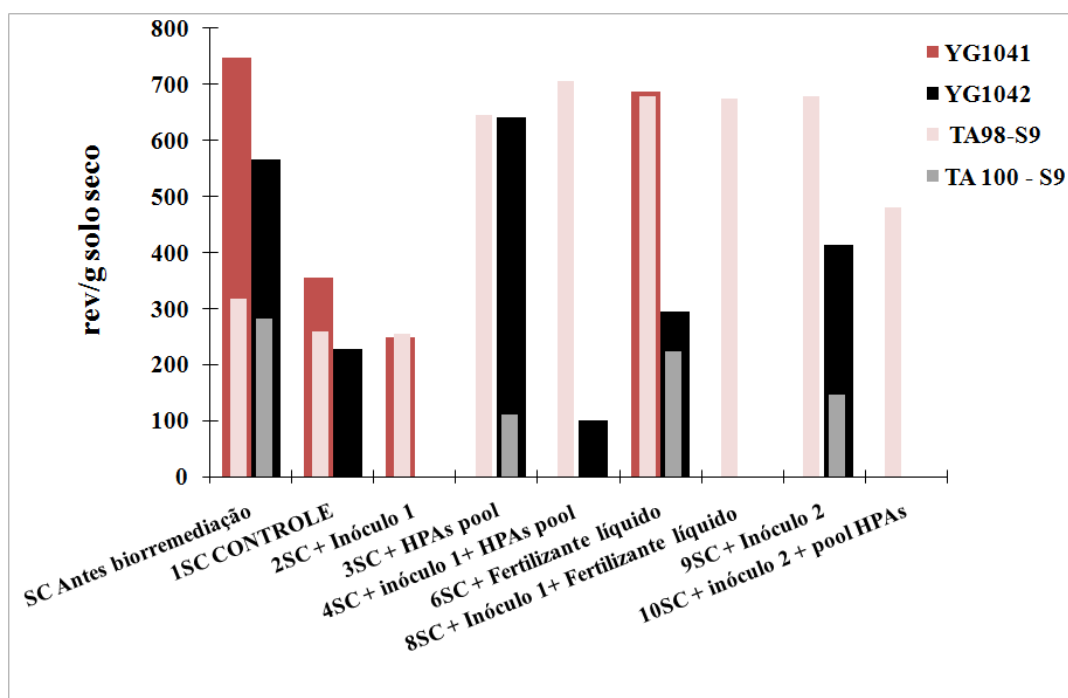
No caso dos solos 4SC e 10SC, nota-se que o aporte do *pool* de HPAs ao solo não inibiu a ação dos inóculos adicionados, ao contrário, o enriquecimento promoveu estímulo dos microrganismos favorecendo a redução da atividade mutagênica em relação aos outros tratamentos testados (Figura 2).

Após realização dos ensaios de mutagenicidade nas linhagens sensíveis a efeitos diferenciados, registrou-se que, embora resultados positivos permaneçam após biorremediação, há indicativo de que o perfil geral de contaminação decresceu. A adição de inóculo mostrou-se fundamental, pois, um dos inóculos (2SC), contribuiu na eliminação da mutagenicidade, enquanto no tratamento controle a biodegradação não reduziu integralmente os efeitos biológicos (Figura 2).

De acordo com as respostas encontradas em algumas das linhagens, verificou-se que, embora com reduções expressivas nos tratamentos realizados como processo de biorremediação, como, por exemplo, para 8SC 95% de biodegradação dos HPAs totais e para 9SC, com 94% (Pohren et al. 2016), as amostras de solo ao serem submetidas aos testes biológicos, apresentaram efeitos mutagênicos consideráveis. Devido a este

aumento da potencialidade mutagênica após o processo de biodegradação – como no caso de 9SC, ressalta-se que o processo de degradação pode estar contribuindo para o surgimento e/ou manutenção de contaminantes de risco. Outra possibilidade seria que a etapa avaliada pelos testes realizados neste estudo tenha contemplado fases intermediárias do processo de degradação dos contaminantes presentes, sendo que as respostas observadas poderiam fazer parte de uma das rotas onde os processos de quebra de compostos com geração de sub-produtos ainda não estariam finalizados. Assim, estaria presente mutagenicidade representativas do risco ainda persistente. Em recente estudo de Chibwe et al. (2015), quando considerado o extrato de solo bruto obtido pós-biorremediação, foi encontrada taxa de redução de 45% para os 16 HPAs prioritários, contudo, aumento significativo na toxicidade avaliado com linhagem celular, sendo considerado responsável pelo aumento de toxicidade e genotoxicidade, compostos formados na transformação de HPAs, tais como derivados hidroxilados, carboxilados e quinonas.

Foram observados efeitos especificamente nas linhagens sensíveis para diagnóstico de nitrocompostos: YG1041 (derivada da TA98) e YG1042 (derivada da TA100). Constataram-se no solo antes da biorremediação danos em ambas as linhagens com respectivamente, valores de 747 e 567 rev/g solo equivalente (Figura 4).



**Figura 4.** Potência mutagênica nas linhagens TA98 e TA100 e suas derivativas

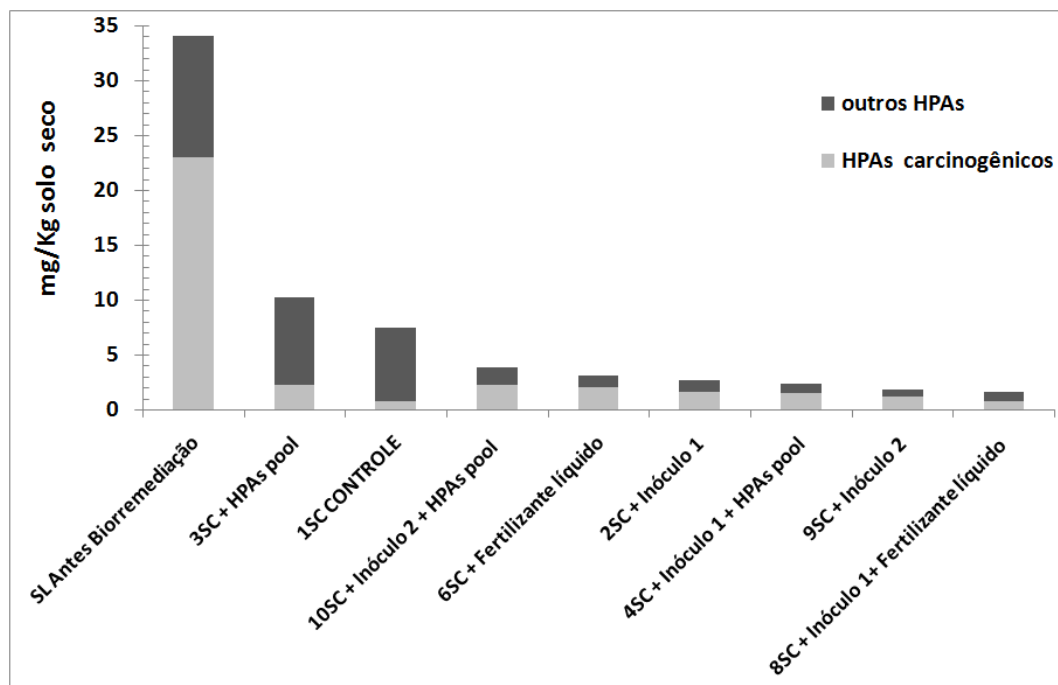
O tratamento 1SC, considerado solo sob atenuação natural, uma vez que não recebeu nenhum aporte para a realização do experimento, manteve efeitos significativos nas duas linhagens após o tempo transcorrido do experimento, indicando a permanência e ampliando a visualização de danos causados por nitroarenos. Sob a ação dos Inóculos, verifica-se que no microcosmo com o Inóculo 1 houve completo decréscimo dos efeitos na linhagem YG1042; já com o Inóculo 2, os efeitos se mantiveram apenas em YG1042. Este padrão inverso poderia ser compreendido a partir de suas linhagens de origem: o tratamento 2SC com o Inóculo 1 apresentou danos somente na cepa TA98, o que condiz com sua manifestação de efeitos somente em YG1041 também, indicando a exposição a compostos que causam o mesmo tipo de dano genético, erro no quadro de leitura do DNA. Em relação a 9SC, foram observados danos tanto em TA98 quanto em TA100, sendo predominantes efeitos em TA98 – o que resultaria em maior potencialidade mutagênica frente à YG 1041. O comportamento diverso observado indica que as respostas obtidas previamente frente às linhagens TA98 estão sendo

causadas por compostos diferentes da classe de nitro-HPAs. No entanto, com o resultado na YG1042 superior à TA100, confirma-se a presença desses nitrocompostos atuando na amostra de solo.

Pode-se ainda observar os valores do tratamento 6SC, que expressam em suas linhagens derivativas danos específicos indicando a ação dos nitroderivados em acordo com os valores encontrados quando avaliadas as potências mutagênicas frente às linhagens TA98 e TA100. Como o padrão de respostas é semelhante àquele do solo antes da biorremediação, fica indicado que esta mutagenicidade detectada não seria em decorrência do fertilizante adicionado. Quanto a 8SC, foi verificada a redução total nas linhagens derivativas. Poder-se-ia considerar que neste solo, os remanescentes responsáveis pela mutagenicidade não são os nitro-HPAs, mantendo-se a ideia da ação dos próprios HPAs, ou outros contaminantes da área em efeito sinérgico como PCP ou os metais potencialmente tóxicos.

O indicativo da presença desta classe de substâncias feito através da observação dos efeitos nas linhagens sensíveis - YG1041 e 1042 - indica preocupação decorrente de riscos persistentes nas amostras de solo, mesmo após terem apresentado excelentes reduções na concentração de HPAs (Figura 5). Os HPAs nitrados representam grande risco entre os contaminantes ambientais, uma vez que além dos efeitos mutagênicos – aqui observados – apresentam também propriedades carcinogênicas (Rosenkranz e Mermelstein 1983; Sayara et al. 2011). Desta forma, fica evidente a necessidade de avaliação da eficiência pós-biorremediação considerando também toxicidade e mutagenicidade na minimização do risco a partir de solos contaminados.

Foram realizadas as extrações e quantificação de HPAs nas amostras de solos após período em experimento de biodegradação e comparados com os resultados da área de solo contaminado (SC) antes de ser submetido à biorremediação (Figura 5).



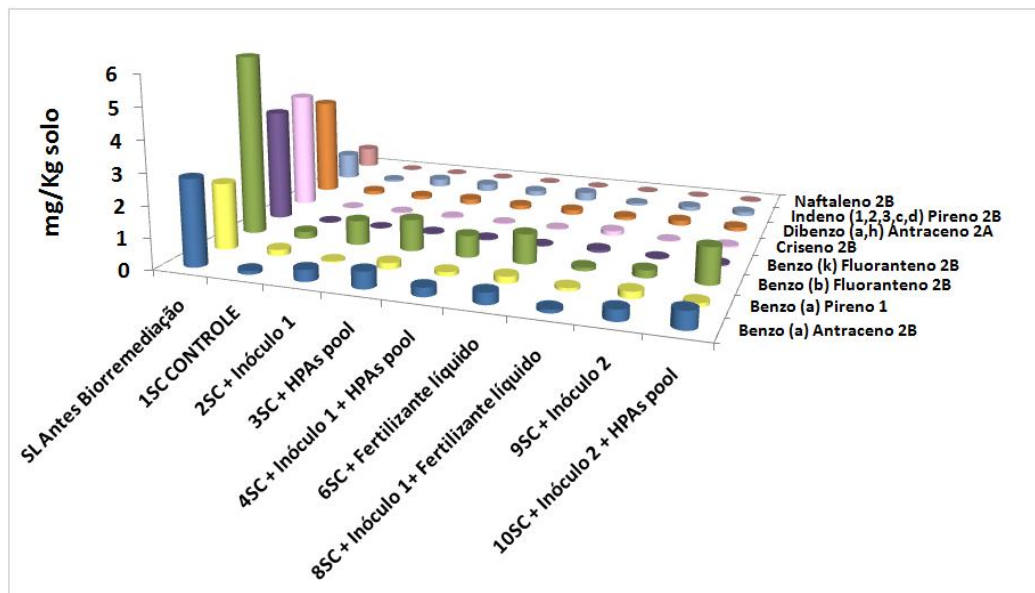
**Figura 5.** Concentração de HPAs detectados antes e após realização dos experimentos de biodegradação

Quando consideramos a concentração dos HPAs observa-se que estas diminuíram em todos os tratamentos. Houve destaque nos valores obtidos após os experimentos de biorremediação para 8SC e 9SC, tendo o solo controle mostrado ótima redução em relação aos HPAs carcinogênicos mesmo sem ter recebido inóculos – evidenciando mais uma vez a possibilidade de atenuação natural.

Em 8SC o acréscimo do fertilizante líquido favoreceu a degradação de contaminantes conjuntamente com a ação do Inóculo 1. A presença dos nutrientes provenientes da degradação agrícola de resíduo de videira pode ter contribuído com a presença de ácidos húmicos - detectados na concentração de 6,4% - facilitando a ação

do inóculo sobre os HPAs presentes. Portanto, nota-se que a adição de nutrientes pode auxiliar no desempenho de inóculo bioaumentado – Inóculo 1, o qual foi preparado recebendo um consórcio aumentado dos microrganismos da área contaminada em questão. Conforme apresentado por Hwang e Cutright (2002), em estudo com bioaumentação e bioestimulação em solo contaminado, foram encontrados melhores resultados na redução de fenantreno e pireno com a técnica de bioaumentação, e quando estes foram avaliados em conjunto ao invés de isoladamente em solução. Outro efeito a ser considerado é a produção de biosurfactantes por bactérias utilizadas no consórcio bioaumentado. Uma das bactérias presentes nos inóculos utilizados (Pohren et al. 2016), *Pseudomonas aeruginosa* é reconhecida como produtora de estrutura lipopetídica que atua como biosurfactante (Bezza e Chirwa 2016), favorecendo processo de biorremediação.

Entre os 16 HPAs prioritários listados pela USEPA, somente oito são considerados carcinogênicos (Figura 6). Sendo classificados pela IARC (2011) como: comprovadamente carcinogênicos (Grupo A), prováveis carcinogênicos (Grupo 2A) e possíveis carcinogênicos (2B). Entre estes, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e indeno(1,2,3,c,d)pireno são considerados possíveis carcinogênicos - classificação 2B. Devido ao perfil de risco destes HPAs, as respostas biológicas encontradas devem estar associadas com as concentrações dos HPAs carcinogênicos que persistiram após os experimentos de biorremediação (Figura 6).

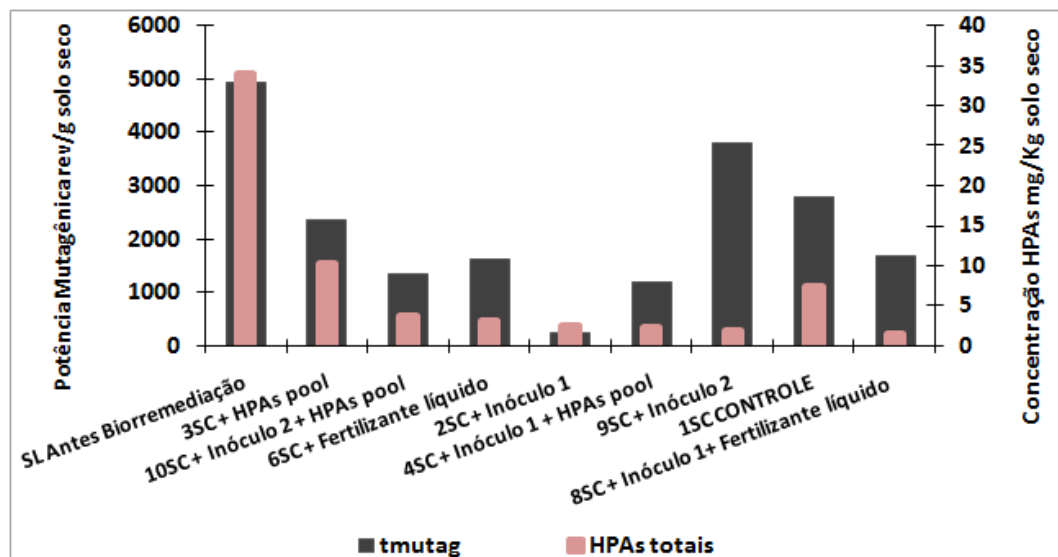


**Figura 6.** Concentração de HPAs carcinogênicos antes e após os experimentos de biodegradação

Contudo, trabalho de White (2002) sobre genotoxicidade de misturas complexas de HPAs é salientado que algumas substâncias poderiam modular os efeitos de mutágenos reconhecidos, como no caso da ação de antraceno e naftaleno que poderiam interferir nos efeitos de compostos como benzo(a)pireno. Assim, deve ser pontuado que as respostas de mutagenicidade irão depender de toda carga de poluentes presentes nas amostras de solos contaminados, e os potenciais efeitos antagônicos, sinérgicos e/ou aditivos decorrentes da mistura complexa.

Ao considerarmos a ação dos inóculos, o Inóculo 2 mostrou-se mais efetivo na redução dos contaminantes, inclusive dos carcinogênicos. Contudo, neste mesmo tratamento foi verificada maior mutagenicidade, com manutenção de respostas mutagênicas neste solo mesmo após a biorremediação - inclusive aumento considerável em uma das linhagens (Figura 2). De acordo com Cerniglia (1992) acenafteno, pireno, benzo(a)antraceno e benzo(a)pireno são genotóxicos em Teste de Ames, sendo estes últimos também carcinógenos. Em outro estudo, foram encontradas potências mutagênicas em TA98+S9 causadas por fenantreno, fluoranteno, pireno e

benzo(g,h,i)perileno (Maertens et al. 2008). Assim, as respostas mutagênicas encontradas podem estar relacionadas com estes outros compostos (Figura 7).



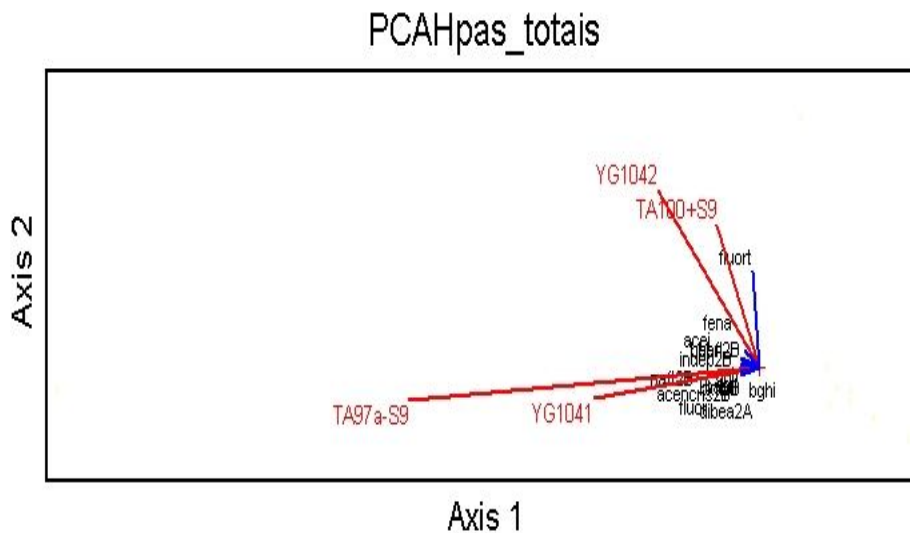
**Figura 7.** Concentração de HPAs totais antes e depois dos experimentos de biodegradação em relação ao somatório de efeitos mutagênicos - tmutag

Para os compostos individualmente, observou-se relação entre o total de mutagenicidade e os seguintes compostos: benzo(a)antraceno ( $r=0,677$ ), benzo(a)pireno ( $r = 0,758$ ), benzo(k)fluorantreno ( $r = 0,708$ ), naftaleno ( $r = 0,707$ ), criseno ( $r = 0,703$ ), dibenzo(a,h)antraceno ( $r = 0,716$ ), todos com  $p < 0,01$ . Desta forma, fica claro que a mutagenicidade observada está correlacionada com a concentração dos compostos carcinogênicos.

De acordo com os resultados obtidos na PCA, o percentual de variação explicada nos dois primeiros eixos foi de 95,9%, com significância dos eixos de  $P=0.025$ . Esta análise permitiu visualizar como as linhagens testadas estão correlacionadas com alguns dos HPAs. As linhagens TA97a-S9, TA100+S9, YG1041 e YG1042 mostraram relação inversa com as respostas de HPAs, indicando, portanto, que os efeitos observados nestas linhagens estariam sendo causados por outros compostos diferentes de HPAs. Contudo,



os compostos benzo(a)antraceno, benzo(k)Fluoranteno indeno(1,2,3,c,d)pireno, acenaftileno, fenantreno e fluoranteno estão associado aos eixo 2, às linhagens TA100+S9 e YG1042. Esta análise permitiu visualizar como as linhagens testadas estão correlacionadas com alguns HPAs (Figura 8).



**Figura 8.** Análise de Componentes Principais (PCA)

Segundo os valores orientadores para solos na legislação brasileira - Resolução CONAMA 420 (2009) (Tabela 2), referente aos compostos benzo(a)antraceno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(a)pireno e indeno(1,2,3,c,d)pireno, as concentrações finais após os experimentos de biorremediação e que apresentavam inicialmente valores maiores que o limite de prevenção (VP) - mesmo tendo diminuído bastante suas concentrações, continuam ultrapassando os valores orientadores de alerta. Esta condição sinaliza que em decorrência das concentrações persistentes destes compostos no solo, este não estaria apto a sustentar suas funções principais. Esta limitação deve ser entendida dentro do conceito de multi-funcionalidade do solo, onde de acordo com a Lei de Proteção do Solo do governo federal holandês (1994), devem ser consideradas as funções de solo sob o ponto de vista ecológico, de suprimento de água, alimentos, da agricultura, entre outras.

Já os compostos benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno e naftaleno que já tinham concentração superior ao valor de prevenção, reduziram a níveis inferiores ao VP em todos os microcosmos avaliados. Quando considerados os valores adotados pela USEPA (2012) para avaliar locais com potencial de risco que requeiram investigação – através dos “Regional Screening Levels” para áreas industriais, nota-se que os compostos benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno e dibenzo(a,h)antraceno com valores superiores ao limite de risco à saúde humana, após os tratamentos passam a ter níveis inferiores a esta condição (Tabela 2). Dentro desta perspectiva pode-se observar que a atividade mutagênica detectada poderia estar associada aos efeitos sinérgicos dos compostos, uma vez que individualmente alguns destes HPAs estariam em concentrações consideradas seguras.

**Tabela 2.** Concentrações dos 16 HPAs prioritários nos tratamentos de biodegradação e regulamentações aplicáveis para solos

	SC Antes									Valor de Prevenção	Valor de Investigação Industrial	Screening Levels Industrial
	Biorremediação	1SC	2SC	3SC	4SC	6SC	8SC	9SC	10SC			
Acenafteno	0,10	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	NA	NA	45.000
Acenaftileno	0,23	0,03	0,05	0,08	0,05	0,05	0,08	0,04	0,07	NA	NA	NA
Antraceno	0,34	0,00	0,02	0,04	0,03	0,03	0,11	0,03	0,04	0,039	NA	230.000
Benzo (a) Antraceno	2,79	0,11	0,37	0,54	0,29	0,37	0,11	0,35	0,56	0,025	65	2,9
Benzo (a) Pireno	2,15	0,20	0,04	0,20	0,14	0,22	0,10	0,22	0,12	0,052	3,50	0,29
Benzo (b) Fluoranteno	5,85	0,22	0,79	1,02	0,70	0,96	0,11	0,25	1,18	NA	NA	2,9
Benzo (g,h,i) Pirileno	2,97	0,01	0,22	0,09	0,04	0,03	0,06	0,03	0,02	0,570	NA	NA
Benzo (k) Fluoranteno	3,63	0,02	0,00	0,04	0,04	0,02	0,09	0,02	0,05	0,380	NA	29
Criseno	3,82	0,01	0,03	0,05	0,03	0,03	0,15	0,03	0,05	8,10	NA	290
Dibenzo (a,h) Antraceno	3,24	0,13	0,12	0,18	0,14	0,16	0,11	0,17	0,13	0,080	1,30	0,29
Fenantreno	0,49	0,04	0,18	0,25	0,28	0,22	0,34	0,11	0,27	3,300	95,00	NA
Fluoranteno	3,68	0,13	0,49	7,46	0,42	0,68	0,11	0,41	1,09	NA	NA	30.000
Fluoreno	0,16	0,00	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	NA	NA	30.000
Indeno (1,2,3,c,d) Pireno	0,87	0,07	0,26	0,24	0,17	0,28	0,08	0,14	0,14	0,031	130	2,9
Naftaleno	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	90	17
Pireno	3,70	0,01	0,05	0,06	0,03	0,05	0,09	0,04	0,06	NA	NA	23.000

Concentrações em mg/Kg.

Valores Orientadores para Solos - Resolução CONAMA Nº 420 – Brasil: VP: valor de prevenção e VI: valor de investigação industrial.

Regional Screening Levels for Chemical Contaminants at Superfund Sites - USEPA

NA = valor não atribuído na Norma.

Para o composto considerado Grupo 2A, provável carcinogênico, o dibenzo(a,h)antraceno, sua concentração inicialmente era superior ao limite para investigação em área industrial (VI), sendo que após os experimentos de degradação,

houve considerável redução, embora todos tratamentos ainda mostrem valores superiores ao limite de prevenção. O composto de ação mais preocupante, por ser de comprovada ação cancerígena (Grupo 1), o benzo(a)pireno, que possuía concentração na faixa de VI, apresentou redução em todos os microcosmos, contudo, mantendo-se a níveis superiores ao valor de prevenção para todos tratamentos, exceto no tratamento 2SC, com o Inóculo 1, reduzindo à concentração inferior ao VP. Este composto tem sua biotransformação descrita por bactérias quando ocorre co-metabolismo: as bactérias crescendo no pireno – considerado não-carcinogênico e fracamente mutagênico – podem degradar o benzo(a)pireno por co-metabolismo (Kanaly e Harayama ).

Portanto, fica claro que apenas considerando o melhor desempenho na degradação de HPAs carcinogênicos, não se tem segurança na avaliação quanto aos riscos do solo após o experimento de biorremediação, evidenciado pela manutenção de forte mutagenicidade associada decorrente de outros compostos ou metabólitos de degradação dos HPAs. Estes produtos de degradação irão conferir maior ou menor mutagenicidade, durante o período de degradação e/ou estabilização dos poluentes. Desta forma, por exemplo, o composto benzo(a)antraceno, o qual é considerado um fraco carcinogênico, apresenta como um de seus produtos de transformação, o carcinógeno potente 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno (Chibwe et al. 2015). Assim, é nas diferentes fases de quebra do anel aromático que podem surgir intermediários com mutagenicidade associada. Um processo efetivo de biorremediação dependerá diretamente da habilidade dos microrganismos em degradar compostos alvo até à mineralização ou a níveis tão baixos e com geração de produtos que sejam seguros sob a perspectiva de risco.

De acordo com White & Claxton (2004), foram estabelecidos valores da potência mutagênica para extratos orgânicos de amostras de solo observados para as

linhagens TA98 e TA100, em presença (+S9) e ausência (-S9) de sistema de metabolização e relacionados a diferentes categorias de influência antrópica, a saber, rural, urbana e industrial. Estes autores observaram variação de 0,001 rev/mg de solo seco, em áreas rurais, a 1000 rev/mg, em áreas industriais altamente contaminadas.

Visando a definição de valores de média geométrica em áreas rural, urbana/suburbana e industrial, os autores analisaram a distribuição logarítmica dos resultados de potência mutagênica para diferentes linhagens e através da análise de diferenças significantes entre as categorias (ANOVA,  $p < 0,0001$ ), estabeleceram um sumário descritivo da potencia mutagênica para cada categoria, conforme Tabela 3.

**Tabela 3.** Média Geométrica de Valores de Mutagenicidade em *Salmonella*

Linhagem	Categorias		
	Rural	Urbana/suburbana	Industrial
<b>TA98+S9</b>	<sup>a</sup> 60±5	470±50	950±170
<b>TA98-S9</b>	57±6	430±100	770±180
<b>TA100+S9</b>	96±10	460±40	3180±1460
<b>TA100-S9</b>	120±10	260±30	130±130

<sup>a</sup>n° de rev/g solo seco ± DP

Conforme Revisão de White e Claxton (2004)

Para permitir a comparação com esses valores foram considerados para a linhagem TA97a os valores observados para TA98, uma vez que ambas detectam eventos de erro no quadro de leitura. Assim, levando em consideração estes valores da literatura internacional, em relação à categoria industrial, todos os solos a excedem em pelo menos uma das linhagens - com exceção de 2SC, o tratamento que recebeu o inóculo bioaumentado (Tabela 4).

**Tabela 4.** Mutagenicidade de Extratos Orgânicos de Solos e relação com categorias estabelecidas rural, urbana e industrial

	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9	TA97a-S9	TA97a+S9
<b>SL Antes biorremediação</b>	317	595	283	556	1865	607
<b>1SC Controle</b>	258	647	NS	527	562	485
<b>2SC + inóculo 1</b>	254	NS	NS	NS	NS	NS
<b>3SC + HPAs pool</b>	645	349	111	731	NS	NS
<b>4SC + inóculo 1+ HPAs pool</b>	705	479	0	0	-	NS
<b>6SC + Fertilizante Líquido</b>	678	NS	224	384	NS	272
<b>8SC + inóculo 1 + Fertilizante Líquido</b>	675	121	NS	590	299	NS
<b>9SC + inóculo 2</b>	679	474	146	NS	333	1891
<b>10SC + inóculo 2 + pool HPAs</b>	480	293	NS	274	308	NS

número de revertentes/g de solo seco

NS: não significativo

Categorias: Cinza claro: Rural, cinza médio: urbana/suburbana, cinza escuro: industrial conforme White e Claxton (2004)

#### 4 Conclusões

Através dos resultados do estudo fica evidenciado que a avaliação dos processos de biorremediação com testes de genotoxicidade amplia as informações da eficiência do processo, uma vez que se consideram efeitos diferenciados através deste tipo de teste biológico. Essa avaliação integrada, possibilita a visualização do dano devido à persistência de alguns contaminantes ao longo das etapas de descontaminação e/ou formação de sub-produtos de maior toxicidade associada, mesmo após o período de biodegradação.

Ressalta-se que a escolha do ensaio *Salmonella*/microsoma como ferramenta nesta avaliação integrada, foi embasada em estudos que mostram a sensibilidade e aplicabilidade de diferentes linhagens como biomarcadores para HPAs e seus nitro derivados, permitindo definir curva dose-resposta e quantificando os efeitos.

Embora a eficiência da biodegradação possa ser limitada pela presença de contaminantes tóxicos como PCP, os resultados evidenciam que embora este

contaminante clorado ainda tenha sido detectado em baixa concentração, este não inibiu a ação hidrocarbonoclástica dos microrganismos existentes nos inóculos preparados.

Verificou-se que a inoculação de co-culturas provenientes de solos contaminados pode ter sido responsável pelas altas taxas de diminuição dos HPAs e contribuído (no caso do Inóculo 1) para o decaimento de sua potencialidade mutagênica. Contudo, para o outro inóculo testado (9SC), houve aumento considerável e manutenção de respostas mutagênicas neste solo mesmo após a biorremediação. Assim, ainda que com alta taxa de degradação encontrada para os HPAs neste solo, a mutagenicidade detectada indica que pode ter ocorrido a geração de outras espécies químicas e/ou intermediárias de HPAs com efeitos biológicos.

De acordo com as respostas encontradas em algumas das linhagens, verificou-se que pode haver um aumento da potencialidade mutagênica das amostras de solo analisadas após o processo parcial de biodegradação. Assim, ressalta-se que o processo de degradação pode estar contribuindo para o surgimento e/ou manutenção de contaminantes com risco associado - cujas condições de atenuação ainda são desconhecidas. Isto indica que a análise dos contaminantes e, sua relação com efeitos mutagênicos torna-se etapa fundamental para efetiva avaliação da eficiência de processos de biorremediação antes de considerar o solo efetivamente remediado e livre dos riscos que possam ser decorrentes da contaminação.

### **Agradecimentos**

Este trabalho foi desenvolvido através da concessão de bolsa de estudos em nível de Doutorado disponibilizada pela CAPES dentro do Programa de Pós-Graduação

em Ecologia da UFRGS. Os autores agradecem ao bolsista acadêmico Kauê Assis Horn (bolsista PIBIC, com apoio CNPq) pelo auxílio nos testes de mutagenicidade.

### Referências Bibliográficas

Alexander, R.R., Tang, J., Alexander, M., 2002. Genotoxicity is Unrelated to Total Concentration of Priority Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils Undergoing Biological Treatment. *Journal of Environmental Quality*. 31: 150-154.

Anderson, E., Rotander, A., von Kronhelm, T., Berggren, A., Ivarsson, P., Hollert, H., Engwall, M., 2009. AhR agonist and genotoxicant bioavailability in a PAH-contaminated soil undergoing biological treatment. *Environ. Sci. Pollut. R.* 16(5): 521-530.

Baquero-Posada, R., Ortega-Calvo, J.J., 2011. Recalcitrance of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil contributes to background pollution. *Environ. Pollut.* 159: 3692-3699.

Barbee, G.C., Brown, K.W., Thomas, J.C., Donnelly, K.C., Murray H.E., 1996. Mutagenic activity (Ames Test) of wood-preserving waste sludge applied to soil. *Bull Environ Contam Toxicol.* 57: 54-62.

Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J., Pike, M.C., 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. *Mutat. Res.* 97: 267-281.

Bezza F.A., Chirwa, E.M.N., 2016. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere* 144: 635-644.

Brooks, L.R., Hughes, T.J., Claxton, L.D., Austern, B., Brenner, R., Kremer, F., 1998. Bioassay - directed fractionation and chemical identification of mutagens in bioremediated soils. *Environ. Health Perspect.* 106(6): 1435-1440.

Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* 3:351-368.

Chibwe, L., Geier, M.C., Nakamura, J., Tanguay, R.L., Aitken, M.D., Simonich, S.L.M., (2015) Aerobic Bioremediation of PAH Contaminated Soil Results in Increased Genotoxicity and Developmental Toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 49 (23):13889-98. *Environ Sci Technol.* 2015 Dec 1;. Epub 2015 Jul 22.

Coronas M.V, Bavaresco J., Rocha J.A.V., Geller A.M., Caramão A.B., Rodrigues M.L.K., Vargas V.M.F., 2013. Attic dust assessment near a wood treatment plant: Past air pollution and potential exposure. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 2013-09-01.

Courty, B., Le Curieux, F., Belkessamc, L., Laboudiguec, A., Marzina, D., 2008. Mutagenic potency in *Salmonella typhimurium* of organic extracts of soil samples originating from urban, suburban, agricultural, forest and natural areas. *Mutat. Res.* 653(1-2):1-5.

Da Costa, T.C., de Brito, K.C.T., Rocha, J.A.V., Leal, K.A., Rodrigues, M.L.K., Minella, J.P. G., Matsumoto, S.T., Vargas, V.M.F., 2012. Runoff of genotoxic compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 75: 63-72.

Da Silva Jr. F., Vargas V., 2009. Using the *Salmonella* assay to delineate the dispersion routes of mutagenic compounds from coal wastes in contaminated soil. *Mutat. Res.* 673:116–123. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.12.005

Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental  
<http://laboratorios.cetesb.sp.gov.br/wpcontent/uploads/sites/47/2013/11/pentaclorofenol.pdf>

FEPAM/CNPq, Vargas, V.M.F. (coord.). Estratégias ecotoxicológicas para caracterizar áreas contaminadas como medida de risco à saúde populacional. Porto Alegre: FEPAM, 2010. Relatório do Projeto 555187/2006-3.

Hagiwara Y., Watanabe M., Oda W., Sofuni T, Nohmi T. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutat. Res.*, 291(1993) 171-180.

Hu, J., Nakamura, J., Richardson, S.D., Michael, D., 2012. Evaluating the Effects of Bioremediation on genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil using genetically engineered, higher eukaryotic cell lines. *Environ. Sci. Technol.* 46(8): 4607-4613.

Hughes, T.J., Claxton, L.D., Brooks, L., Warren, S., Brenner, R., Kremer, F., 1998. Genotoxicity of bioremediated soils from the Reilly Tar site, St. Louis Park, Minnesota. *Environ. Health Perspect.* 106(6):1427–1433.

Hwang, S., Cutright, T.J., 2002. Biodegradability of aged pyrene and phenanthrene in a natural soil. *Chemosphere.* 47(9): 891-899.

IARC (International Agency For Research On Cancer). Monographs, Supplement. Available at: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php> acessado em 08/02/2011.

Johnsen, A.R., Karlson U., (2007) Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76: 533-543.

Kado, N.Y., Langley, D., Eisentadt, E., 1983. A simple modification of the *Salmonella* liquid incubation assay: increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. *Mutat. Res.* 121: 25-32.



Kanally R.A., Harayama, S., Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182(8): 2059-2067.

Keith, L.H., Telliard, W.A., 1979. Priority pollutants I. A perspective view. *Environ. Sci. Technol.* 13:416-423.

Lemieux, C.L., Lynes, K.D., White, P.A., Lundstedt, S., Oberg, L., Lambert, I.B., 2009. Mutagenicity of an aged gasworks soil during bioslurry treatment. *Environ. Mol. Mutagen.* 50(5): 404-412.

Loibner, A.P., Szolar, O.H.J., Braun, R., Hirmann, D., 2004. Toxicity testing of 16 priority polycyclic aromatic hydrocarbons using Lumistox. *Environ. Toxicol. Chem.* 23(3): 557-564.

Lundstedt, S., Haglund, P., Oberg, L., 2003 Degradation and formation of polycyclic aromatic compounds during bioslurry treatment of an aged gasworks soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(7): 1413-1420.

Lundstedt, S., White, P.A., Lemieux, C.L., Lynes, K.D., Lambert, L.B., Oberg, L., Haglund, P., Tysklind, M., 2007. Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated sites. *Ambio.* 36(6):475-485.

Maertens, R.M., Gagné, R.W., Douglas, G.R., Zhu, J., White, P.A., 2008. Mutagenic and carcinogenic hazards of settled house dust II: Salmonella mutagenicity. *Environ. Sci. Technol.* 42: 1754:1760.

Maron, D.M., Ames B.N., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 11: 173-215.

Megharaj M., Ramakrishnane B., Venkateswarlu K., Sethunathan N., 2011. Naidu R., Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ. Int.* 37:1362-1375.

Meyer, D.D., da Silva F.M Jr., Souza, J.W., Pohren, R.S., Rocha, J.A., Vargas V.M., 2015. Pointing to potential reference areas to assess soil mutagenicity. *Environ. Sci. Pollut. R.* 22:5212-5217.

Möller, L., 1994. In vivo metabolism and genotoxic effects of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Health Perspect.* 102(4): 139-146.

Moscoso, F., Deive, F.J., Longo M.A., Sanromán M.A., 2015. Insights into polyaromatic hydrocarbon biodegradation by *Pseudomonas stutzeri* CECT 930: operation at bioreactor scale and metabolic pathways. *Int. J. Environ. Sci. Te.* 12: 1243-1252.

Moscoso, F., Tejjiz, I., Deive, F.J., Sanroman, M.A., 2012. Efficient PAHs biodegradation by bacterial consortium at flask and bioreactor scale. *Bioresour. Technol.* 119: 270-276.

Pagano A.D., Zeiger E., 1992. Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutagen* 19: 139-146.

Pohren, R., Rocha, J., Leal, K., Vargas, V., 2012. Soil mutagenicity as a strategy to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. *Environ. Int.* 44: 40-52.

Pohren R.S., Leite D.A.N.O, Angelis D.F., Vargas V.M.F., 2016. Desempenho de biorremediação de HPAs por bioaugmentação e bioestimulação de solo de área contaminada, submetido à *Environ. Sci. Pollut. R.*

Resolução 420/2009 CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Diário oficial da União, Brasília, nº 249, de 30/12/2009, p. 81-84. Available in: [http://homologa.ambiente.sp.gov.br/aquiferos/CONAMA%20Resolucao%202009\\_420.pdf](http://homologa.ambiente.sp.gov.br/aquiferos/CONAMA%20Resolucao%202009_420.pdf)

Rosenkranz, H.S., Robert Mermelstein, R., 1983. Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes: all nitro-containing chemicals were not created equal. *Mutat. Res.* 114: 217-267.

Sakai, M., Yoshina D., Mizusaki S., 1985. Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and quinones on *salmonella typhimurium* TA97. *Mutat. Res.* 156: 61-67.

Sayara, T., Borràs, E., Caminal, G., Sarrà, M., Sánchez., 2011. Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. *Int. Biodeterioration Biodegrad.* 65(6): 859-865.

Sayles G.D., Acheson, C.M., Kupferle, M.J., Shan, Y., Zhou, Q., Meier, J.R., Chang, L., Brenner R.C., 1999. Land Treatment of PAH-Contaminated Soil: Performance Measured by Chemical and Toxicity Assays. *Environ. Sci. Technol.* 33: 4310-4317.

Semple, K.T., Kieron J.D., Wick L.Y., Harms, H., 2007. Microbial interactions with organic contaminants in soil: Definitions, processes and measurement. *Environ. Pollut.* 150: 166-167.

Silva, I.S., dos Santos E.C., de Menezes, C.R., de Faria, A.F., Franciscon, E., Grossman M., Durrant L.R., 2009. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresour. Technol.* 100: 4669-4675.

Simarro, R., González., N., Bautista, L.F., Sanz, R., Molina, M.C., 2011. Optimisation of key abiotic factors of PAH (naphthalene, phenanthrene and anthracene) biodegradation process by a bacterial consortium. *Water Air Soil Pollut.* 217: 365-374.

Tagliari, K.C., Cecchini, R., Rocha, J.A.V., Vargas V.M.F., 2004. Mutagenicity of sediment and biomarkers of oxidative stress in fish from aquatic environments under the influence of tanneries. *Mutat. Res.* 561: 101-117.

Umbuzeiro, G.A., Vargas, V.M.F., 2003. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) com indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. (Orgs.) Mutagênese ambiental. Canoas: Ed. ULBRA, 356p.

USEPA, 2007. Environmental Protection Agency, Method 3550C, Ultrasonic extraction. <http://www.epa.gov/sw846/pdfs/3500.pdf>

USEPA, 1996. Method 8270C: semivolatile organic compounds by gas chromatography /mass spectrometry (GC/MS).

USEPA, 2012. Regional Screening Levels (RSL) for Chemical Contaminants at Superfund Sites: November, 2012. Risk-Based Screening Table - Generic Tables <http://www2.epa.gov/risk/risk-based-screening-table-generic-tables>

Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P., Henriques, J.A.P., 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.* 319: 31-45.

Vargas V.M.F.; 2003. Mutagenic activity as a parameter to assess ambient air quality for protection of the environmental and human health. *Mutat. Res.* 544:313–319. doi:10.1016/j.mrrev.2003.06.020

Vargas, V.M.F., Migliavaca, S.M.B., Horn, R.C., Terra, N.R., 2008. Comparative temporal ecotoxicological study in a river basin influenced by petrochemical industries. *Sci. Total Environ.* 392: 79-92.

VROM, Ministry of Housing, Spatial Planning and Environment. Intervention values and target values: soil quality standards. The Hague: VROM, 1994, 19p. (DBO/07494013)

White, P.A., 2002. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic Hydrocarbons in complex mixtures. *Mutat. Res.* 51: 585-598.

White, P.A., Claxton L.D., 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat. Res.* 567: 227-345.

Wu Y., Luo Y., Zou D., Ni J., Liu W., Teng Y., Li Z., 2008. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil with *Monilinia* sp.: degradation and microbial community analysis. *Biodegradation.* 19: 247-257.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados encontrados com o desenvolvimento do trabalho, foi constatado que a partir da realização dos ensaios de biorremediação em escala de microcosmos, com acompanhamento da respiração microbiana pela produção de CO<sub>2</sub> e foi possível avaliar a eficiência dos consórcios preparados comparando-se o decaimento de HPAs e potencial mutagênico. E embora a atividade mutagênica persista após os experimentos de biorremediação, ocorreu decréscimo na potência e no perfil geral de efeitos biológicos.

Este estudo demonstrou que as diferentes estratégias de biorremediação adotadas para solo contaminado com HPAs, podem levar a diferentes perfis de mutagenicidade, indicando a persistência de danos decorrentes. Contudo, um dos inóculos testados (2SC), mostrou quase eliminação total da mutagênese, havendo persistência de danos em apenas uma das linhagens avaliadas, enquanto no tratamento controle, foi mantida a potência mutagênica com valores expressivos. Desta forma, torna-se evidente a relevância da adição de microrganismos sob a forma de consórcio bioaumentado de bactérias e fungos autóctones.

Contudo, frente à ação sobre contaminantes em relação a sua concentração inicial antes do solo ser submetido ao experimento em escala de microcosmos, foi o inóculo bioaumentado, bioestimulado e enriquecido (9SC), que mostrou melhor desempenho na diminuição de HPAs. Concordantemente, também apresentou a maior produção de CO<sub>2</sub>. Este tratamento parece ter sido favorecido através da bioestimulação, onde os nutrientes básicos adicionados (extrato de levedura, glicose) auxiliaram no desenvolvimento dos microrganismos. Portanto, há necessidade de controlar a escassez de nutrientes como um limitante do desenvolvimento das espécies autóctones capazes de degradar os poluentes em questão. No entanto, este inóculo mostrou forte

mutagenicidade associada, com manutenção de respostas mutagênicas neste solo mesmo após a biorremediação. Assim, ainda que com alta taxa de degradação encontrada para os HPAs neste solo, a mutagenicidade detectada indica que pode ter ocorrido geração de outras espécies químicas e/ou intermediárias de HPAs com efeitos biológicos. Pode-se considerar um possível uso deste inóculo adaptado em estratégias de biorremediação de solos contaminados com este perfil de contaminação orgânica, desde que monitorada mutagenicidade.

Ficou evidente que o uso de consórcios de fungos e bactérias qualifica processos de biorremediação, uma vez que ocorre complementaridade metabólica entre membros de consórcio necessários para biorremediação. Neste contexto, o uso de microbiota autóctone, devido ao processo de adaptação natural da microbiota nativa existente no solo, mesmo sem acréscimo de nutrientes a redução dos contaminantes pode acontecer ao longo do tempo – como indicado pelo tratamento 2SC (Inóculo1).

Salienta-se assim, que apesar de ter sido evidenciado que no solo da área pudesse ocorrer atenuação natural - indicando que a comunidade microbiana está adaptada à degradação dos contaminantes, este fenômeno estaria ocorrendo numa taxa inferior à necessária para inibir a manifestação de efeitos biológicos e possíveis riscos associados.

Em relação ao aumento de potencialidade mutagênica, observado para algumas linhagens após o processo de biodegradação, esta modificação pode ser decorrente do processo de degradação. Ressalta-se que algumas respostas podem refletir processos intermediários da rota de degradação dos contaminantes presentes, sendo que as respostas observadas poderiam fazer parte de uma das fases onde a quebra de compostos e geração de sub-produtos ainda não estaria concluída. Assim, estariam

presentes potencialidades mutagênicas representativas do risco ainda persistente, mesmo após o processo de biodegradação.

Destaca-se a necessidade de monitorar outras espécies químicas decorrentes da degradação de HPAs, como seus derivados, nitro e oxi-HPAs, os quais podem ser formados durante os processos de biorremediação de solos contaminados. Estes compostos são considerados móveis por serem mais polares, sendo, portanto, responsáveis por aumento de toxicidade e/ou mutagenicidade, e implicando na persistência de riscos.

Destaca-se que o enriquecimento promovido com os HPAs representativos de alto e baixo peso molecular favoreceu a ação dos dois tipos de inóculos preparados, sendo evidenciado tanto na biorremediação com bioaumento e bioestímulo (Inóculo 2) quanto na biorremediação apenas com bioaumento (Inóculo 1), uma vez que o aporte do *pool* de HPAs ao solo não inibiu a ação dos microrganismos adicionados - ao contrário, esse enriquecimento promoveu o estímulo dos microrganismos favorecendo a redução da atividade mutagênica.

Ficou evidente que o uso de consórcios de fungos e bactérias qualifica processos de biorremediação, uma vez que ocorre complementaridade metabólica entre membros de consórcio necessários para biorremediação. Neste contexto, com uso de microbiota autóctone, devido ao processo de adaptação natural no solo, pode acontecer redução dos contaminantes ao longo do tempo, mesmo sem acréscimo de nutrientes – como indicado pelo tratamento 2SC.

Com relação às quantidades de CO<sub>2</sub> produzidas pela atividade metabólica dos microrganismos, considera-se que o período do experimento pode ter influenciado na visualização da ação da microbiota. Assim, a manutenção dos experimentos por período

de tempo mais longo poderia ter mostrado maior produção nas respostas de CO<sub>2</sub> medidas.

Importa destacar também, que neste trabalho foi utilizado um solo real, representativo de contaminação por mistura complexa – decorrente da atividade de preservação de madeira – diferindo da maioria dos estudos sobre toxicidade e biodegradação de HPAs, os quais são conduzidos com um solo sintético e/ou contaminados artificialmente com um único composto ou alguns de seus representantes. Nestes casos, a representação dos danos e efeitos causados pela mistura de HPAs fica comprometida, uma vez que as interações ficam limitadas ou até mesmo inexistentes, não representando a realidade dos locais contaminados. Desta forma, a realização de estudos com amostras coletadas de antigos sítios de solos contaminados, onde a mistura de HPAs esteja presente, permite a verificação efetiva do potencial de biodegradação dos microrganismos e decréscimo de riscos associados, favorecendo a aproximação com as populações microbianas que existem num ambiente real.

Este método de remediação pode ser utilizado em fases de polimento para descontaminação de solo, e/ou associado a outras técnicas já consagradas, requerendo monitoramento continuado.

Assim, associar estudos do potencial de biodegradação dos consórcios preparados a partir de microrganismos autóctones de solo de área contaminada, à produção de CO<sub>2</sub>, à marcadores de danos genéticos como mutagênese no ensaio *Salmonella*/microsoma e o decaimento dos HPAs na mistura, ampliam a avaliação de possíveis riscos decorrentes de processos de biorremediação e qualificação de áreas contaminadas.

Futuros estudos para avaliar o efeito das melhores condições de ação dos inóculos e sua atividade biodegradativa são importantes, bem como, com a identificação

e quantificação dos compostos tóxicos e mutagênicos detectados no solo contaminado durante o processo de bioremediação; avaliação do uso dos microrganismos em sua forma livre ou encapsulada; uso de padrões isotopicamente marcados e ampliação da avaliação com uso de outros bioensaios que complementem a avaliação ecotoxicológica, como, testes de germinação, testes com organismos de outros níveis tróficos, complementares ao estudo.

E com vistas a qualificar a avaliação dos microrganismos realizada, é importante promover a identificação e caracterização molecular das bactérias e fungos presentes no consórcio capazes de mineralizar os HPAs recalcitrantes e potencialmente carcinogênicos. Neste contexto, salienta-se a aplicação de ferramentas de seqüenciamento como o piroseqüenciamento, visando a uma melhor compreensão quanto às comunidades de fungos e bactérias resistentes, presentes em solos de sítios contaminados e com reconhecido uso potencial em processos de biorremediação.

Ressalta-se que o processo de biodegradação pode estar contribuindo para o surgimento e/ou manutenção de contaminantes com risco associado - cujas condições de atenuação ainda são desconhecidas. Portanto, a avaliação dos processos de biorremediação com testes de mutagenicidade amplia as informações da eficiência do processo, uma vez que se consideram efeitos diferenciados através deste tipo de teste biológico – antecipando-se a visualização do dano devido à persistência de alguns contaminantes ao longo das etapas de descontaminação.



## 5 Referências Bibliográficas

Alexander, R.R., Tang, J., Alexander, M., 2002. Genotoxicity is Unrelated to Total Concentration of Priority Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils Undergoing Biological Treatment. *Journal of Environmental Quality*. 31: 150-154.

ABNT NBR 15515-1:2007 Versão Corrigida:2011- Passivo ambiental em solo e água subterrânea - Parte 1: Avaliação preliminar.

Bartha R, Pramer D (1965) Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides. *Soil Science* 100:68–70. doi: 10.1097/00010694-196507000-00011.

Balba, M.T., Al-Awadhi, N., Al-Daher, R., 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*. 32: 155-164.

Baquero-Posada, R., Ortega-Calvo, J.J., 2011. Recalcitrance of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil contributes to background pollution. *Environmental Pollution* 159: 3692-3699.

Benjamin, M. Bandowe, N. Shukurov, M. Kersten, W. Wilcke, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their oxygencontaining derivatives (OPAHs) In soils from the Angrenindustrial area, Uzbekistan *Environ Pollut*. 158 (2010) 2888 e 2899.

Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J., Pike, M.C., 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test. *Mutation Research*. 97: 267-281.

Boonchan S., Britz M.L., Stanley G.A., 2000, Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(3): 1007-1019. doi: 10.1128/AEM.66.3.1007-1019.2000.

Brooks, L.R., Hughes, T.J., Claxton, L.D., Austern, B., Brenner, R., Kremer, F., 1998. Bioassay - directed fractionation and chemical identification of mutagens in bioremediated soils. *Environmental Health Perspectives*. 106(6): 1435–1440.

Cerniglia, C.E., 1992, Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*. 3: 351–368.

CETESB - Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. Norma Técnica L6.350 - Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha. São Paulo, 1990, 9p.

CETESB - Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. Gerenciamento de áreas contaminadas: investigação para remediação no Estado de São Paulo. Dezembro de

2013. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>. Acesso em: 7 dez. 2013. Disponível em: <http://areascontaminadas.cetesb.sp.gov.br/>

CETESB -Texto explicativo – Relações de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo. São Paulo: CETESB, 2014.

FEPAM, 2010b. Estratégias ecotoxicológicas para caracterizar áreas contaminadas como medida de risco à saúde de populacional. Vargas, V.M.F. (coord.) Eco-Risco Saúde Project Report., FEPAM, Porto Alegre, Brazil.

Fernández-Luqueño, F., Valenzuela-Encinas, C., Marsch, R., Martínez-Suárez, C., Vázquez-Núñez, E., Dendooven, L., 2011. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: a review. *Environ Sci Pollut Res Int.* 18:12-30. DOI 10.1007/s11356-010-0371-6.

Gan, S., Lau, E.V., Ng, H.K., 2009. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials.* 172:532–549.

Guia de elaboração de planos de intervenção para o gerenciamento de áreas contaminadas. Organizadores Sandra Lúcia de Moraes, Cláudia Echevengúá Teixeira, Alexandre Magno de Sousa Maximiano. 1.ed. rev. São Paulo : IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo: BNDES, 2014.

Hagiwara Y., Watanabe M., Oda W., Sofuni T, Nohmi T. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutation Research*, 291(1993) 171-180.

Handi H., Benzarti S., Manusadzianasc L., Aoyama I., Jedidi N., 2007, Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 39, 1926–1935.

Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* 169: 1–15.

Hartnik T., Norli H.R., Eggen T, Breedveld G.D., 2007. Bioassay-directed identification of toxic organic compounds in creosote-contaminated groundwater *Chemosphere* 66, 435–443.

Hu, J., Nakamura, J., Richardson, S.D., Michael, D., 2012. Evaluating the Effects of Bioremediation on genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil using genetically engineered, higher eukaryotic cell lines. *Environmental Science & Technology.* 46(8): 4607-4613.

Hughes, T.J., Claxton, L.D., Brooks, L., Warren, S., Brenner, R., Kremer, F., 1998. Genotoxicity of bioremediated soils from the Reilly Tar site, St. Louis Park, Minnesota. *Environmental Health Perspectives.* 106(6):1427–1433.

IARC International Agency for Research on Cancer (2010) Agents Classified by the IARC Monographs Volumes 1–102, IARC: Lyon, France. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>

Jacques RJS et al, 2005, Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petrochemical sludge Landfarming. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 56(3): 150-156. doi: 10.1016/j.ibiod.2005.06.005.

Jacques, R.J.S., Bento, F.M., Antonioli, Z.I., Camargo, F.A.O. 2007, Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, Santa Maria. 37: 1192-1201.

Johnsen AR, Wick LY, Harms H., 2005, Principles of microbial PAHdegradation in soil. *Environ Pollut* 133:71–84. doi:10.1016/j. envpol.2004.04.015

Jones, A.J., Doran, J.W., 1997. Methods for assessing soil. Special Publication Number 49, Soil Science Society of America Inc. 410, Wisconsin, USA (January 1, 1997), 410 p.

Juhasz A.L., Britz M.L., Stanley G.A., 1997, Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a] anthracene and dibenz [a,h] anthracene by *Burkholderia cepacia*. *J. Appl. Microbiol.* 83:189–198. doi: 10.1046/j.1365-2672.1997.00220.x.

Kanally R.A., Harayama, S., Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*. 182(8): 2059-2067.

Kumar, B.L., D.V.R. Sai Gopal, 2015. Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. *Biotech*. 5:867–876. DOI: 10.1007/s13205-015-0293-6.

Leahy .J.G., Colwell, R.R., 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *American Society for Microbiology*. 54: 305-315.

Li X, Li P, Lin X, Zhang C, Li O, Gong Z., 2008, Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *Journal of Hazardous Materials*. 150(1):21-6. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.04.040.

Liedekerke, M., Prokop, G., Rabl-Berger, S., Kibblewhite, M., Louwagie, G., 2014. Progress in the Management of Contaminated Sites in Europe. Institute for Environment and Sustainability, Luxembourg: Publications Office of the European Union, DOI: 10.2788/4658. Disponível em: [http://eusoiils.jrc.ec.europa.eu/ESDB\\_Archive/eusoiils\\_docs/other/EUR26376EN.pdf](http://eusoiils.jrc.ec.europa.eu/ESDB_Archive/eusoiils_docs/other/EUR26376EN.pdf)

Maron, D.M., Ames B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 11: 173-215.

Lundstedt, S., White, P.A., Lemieux, C.L., Lynes, K.D., Lambert, L.B., Oberg, L., Haglund, P., Tysklind, M., (2007) Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated

polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated sites. *Ambio*. 36(6):475–485.

Mazzeo D.E.C., Fernandes T.C.C, Levy C.E., Fontanetti C.S., Marin-Morales M.A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test, *Ecological Indicators* 56 (2015) 60–69

Mihelcic JR, Lueking DR, Mitzell JR, Stapleton MJ (1993) Bioavailability of sorbed- and separate-phase chemicals. *Biodegradation* 4:141–153

Möller, L., 1994. In vivo metabolism and genotoxic effects of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Health Perspectives*. 102(4): 139-146.

Moscoso F., Tejjiz I., Deive F.J., Sanroman M.A., 2012, Efficient PAHs biodegradation by bacterial consortium at flask and bioreactor scale. *Bioresour Technol* 119: 270-276. doi: 10.1016/j.biortech.2012.05.095.

NBR 14283: Resíduos em solos: determinação da biodegradação pelo método respirométrico, 1999. RJ.

Pagano A.D., Zeiger E.. Conditions for detecting the mutagenicity of divalent metals in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutagen* 19 (1992) 139-146.

Pohren, R., Rocha, J., Leal, K., Vargas, V., 2012. Soil mutagenicity as a strategy to evaluate environmental and health risks in a contaminated area. *Environmental International*. 44: 40-52.

Posada-Baquero R, Ortega-Calvo JJ (2011) Recalcitrance of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil contributes to background pollution. *Environmental Pollution* 159: 3692-3699. doi: 10.1016/j.envpol.2011.07.012.

Prokop Z., Nečasová A., Klánová J., Čupr P., Bioavailability and mobility of organic contaminants in soil: new three-step ecotoxicological evaluation. *Environ Sci Pollut Res*. DOI 10.1007/s11356-015-5555-7

Resolução 420/2009 CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Diário oficial da União, Brasília, nº 249, de 30/12/2009, p. 81-84. Disponível em: [http://homologa.ambiente.sp.gov.br/aquiferos/CONAMA%20Resolucao%202009\\_420.pdf](http://homologa.ambiente.sp.gov.br/aquiferos/CONAMA%20Resolucao%202009_420.pdf)

Rosenkranz, H.S., Robert Mermelstein, R., 1983. Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes: all nitro-containing chemicals were not created equal. *Mutation Research*. 114: 217-267.

Samanta S.K., Singh O.V., Jain R.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*. Volume 20, Issue 6, p243–248,

1 June 2002 Institute of Microbial Technology, Sector-39A, Chandigarh-160036, India  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)01943-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(02)01943-1)

Sayara, T., Borràs, E., Caminal, G., Sarrà, M., Sánchez, A., 2011. Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65: 859–865.

Silva, I.S., Santos, E.C., Menezes, C.R., Francisco, E., Grossman, M., Durrant, L.R., 2009. Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology*. 100: 4669-4675.

Streck, E.V., Kampf, N., Klamt, E., Schneider, P., Nascimento, P.C., Giasson, E., Pinto, L.F.S., Dalmolin, R.S.D., 2008. Solos do Rio Grande do Sul. *Emater*. E: 222.

Sun, R., Jin J., Sun G., Liu Y., Liu Z., 2010. Screening and degrading characteristics and community structure of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterial consortium. *Journal of Environmental Sciences*. 22: 1576–1585.

Trindade, P.V, Sobral, L.G., Rizzo, A.C., Leite S.G., Soriano, A.U., 2005. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere*. 58(4): 515-22.

Umbuzeiro, G.A., Vargas, V.M.F., 2003. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) com indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: Ribeiro, L.R., Salvadori, D.M.F., Marques, E.K. (Orgs.) *Mutagênese ambiental*. Canoas: Ed. ULBRA, 356p.

USEPA–U.S., 2007. Environmental Protection Agency, Method 3550C, Ultrasonic extraction. <http://www.epa.gov/sw846/pdfs/3500.pdf>

USEPA–U.S., 1996. Method 8270C: semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).

USEPA–U.S.,2015. Environmental Protection Agency, EPA Home, Superfund - NPL Site Totals by Status and Milestone. Disponível em: <http://www2.epa.gov/superfund/npl-site-totals-status-and-milestone>

USEPA–U.S.,1996. Environmental Protection Agency. Soil screening guidance: user's guide. Publication 9355.4-23. Office of Solid Waste and Emergency Response. Washington, DC, 39p.

Yuan S.Y., Shiung L.C, Chang B.V. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Inoculated Microorganisms in Soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, July 2002, Volume 69, Issue 1, pp 66-73

White, P.A., Claxton L.D., 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutation Research*. 567: 227-345.

WHO - World Health Organization. Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, chemical environmental and experimental data. International Agency for Research on Cancer. 477 pp, 1983.

Vangestel C.M., Derwaarde J.V., Derksen J., Derhoek E., Veul M.X.W., Benrusch S., Kronenburgr., Stokman G., 2001, The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 20, No. 7, pp. 1438–1449.

Vargas, V.M.F., 2010. Estratégias ecotoxicológicas para caracterizar áreas contaminadas como medida de risco à saúde populacional. Relatório do Projeto 555187/2006-3, FEPAM/CNPq.

