

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**BIODEGRADAÇÃO DE ANTRACENO ESTIMULADA POR FERRO**

EDER DA COSTA DOS SANTOS  
Engenheiro Agrônomo (UFSM)

Dissertação apresentada como  
Um dos requisitos à obtenção do  
Grau de Mestre em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil  
Fevereiro de 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**BIODEGRADAÇÃO DE ANTRACENO ESTIMULADA POR FERRO**

**Eder da Costa dos Santos  
(Dissertação)**

**Porto Alegre  
2004**



Aos meus pais, Oly e Éster.

Aos meus irmãos, Eduardo, Eneida, Elisandra e Everton.

À minha namorada, Deise.

Ao Professor Marcos Rubens Fries (*in memoriam*)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sempre iluminar meu caminho.

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

À Deise, pelas lágrimas e pela presença constante, mesmo estando longe.

Aos professores Flávio Camargo e Fátima Menezes Bento, pela grande amizade, confiança, paciência e sobre tudo, orientação segura.

Aos companheiros de moradia Kiko e Kcky, pelo companheirismo, paciência, amizade, solidariedade em todos os momentos.

Ao professor Pedro Alberto Selbach, pela orientação imprescindível durante o primeiro ano do mestrado.

Ao professor Enílson, pelos ensinamentos e preciosos conselhos.

Ao colega e acima de tudo grande amigo Rodrigo Jacques, pelas longas horas compartilhadas nas atividades do laboratório.

Aos colegas Rafael, Alejandra e Mariel pelo agradável convívio durante estes dois anos.

A todos professores do Departamento de Solos.

Às professoras Luciane Passaglia e Maria do Carmo Peralba, pelo auxílio em análises indispensáveis à realização do trabalho.

A Capes e CNPq pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Solos, pela oportunidade da realização do curso.

A todos que, de uma alguma forma, colaboraram para a concretização deste trabalho.

Ao Professor Marcos Rubens Fries, por ter sido meu mestre nos ensinamentos da microbiologia, a saudade e o vazio de uma perda irreparável.

# BIODEGRADAÇÃO DE ANTRACENO ESTIMULADA POR FERRO<sup>1/</sup>

Autor: Eder da Costa dos Santos  
Orientador: Flávio A. de Oliveira Camargo  
Co-Orientadora: Fátima Menezes Bento

## RESUMO

O antraceno pertence ao grupo dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) que apresentam elevado potencial poluente e de risco a saúde, e tem sido utilizado como modelo para o estudo da degradação dos HAP, devido à sua menor toxicidade. Para a eliminação dos HAP do ambiente, tem sido proposta a utilização de microrganismos heterotróficos, que apresentam complexos enzimáticos que necessitam do ferro como componente estrutural. A dinâmica do ferro no solo, influenciada por formas e concentrações, pode interferir na biodisponibilidade deste elemento, afetando o potencial de degradação dos HAP no ambiente. Para testar essa hipótese, os objetivos deste trabalho foram: a) isolar microrganismos com potencial de degradação de antraceno; b) caracterizar as condições ótimas para o crescimento; c) avaliar o efeito de fontes e de concentrações de ferro na degradação do antraceno *in vitro* e no solo. Foram isoladas 26 bactérias com potencial de crescimento em meio contendo antraceno e destas foram selecionadas três, pelo melhor desempenho. Os isolados selecionados apresentaram maior crescimento a pH 7,0, à temperatura de 30°C e em concentrações de até 2.000 mg L<sup>-1</sup> de antraceno. Todas as fontes de ferro testadas aumentaram o número de microrganismos crescendo em meio contendo 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno, à excessão do Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. O estímulo ao crescimento dos isolados ocorreu em até 0,2 mM de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. A adição de 0,1 mM desta fonte de ferro estimulou um dos isolados para a degradação de até 72% do antraceno e esta degradação foi relacionada, em parte, à diminuição da tensão superficial do meio pelo isolado até 26,2 dinas cm<sup>-1</sup>. O efeito mais pronunciado do ferro na degradação do antraceno no solo foi maior na presença dos isolados (bioaugmentação) e de nutrientes (bioestimulação). Os resultados demonstraram que o ferro estimula a degradação de antraceno, podendo este elemento ser utilizado nas estratégias de biorremediação dos HAP no ambiente.

<sup>1/</sup> Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (68p.) – Fevereiro, 2004.

# ANTHRACENE BIODEGRADATION STIMULATED BY IRON<sup>1/</sup>

Author: Eder da Costa dos Santos  
Advisers: Flávio A. de Oliveira Camargo  
Fátima Menezes Bento

## ABSTRACT

The anthracene, a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), presents a high polluting potential and health risk; it has been used as a model for the degradation studies of the PAHs, due to its lower toxicity. In order to study the PAH degradation, the use of heterotrophic microorganisms has been proposed, which present enzymatic complexes with iron in their structures. The iron behaviour in soil, as affected by its forms and concentrations, can influence the PAH degradation potential by microorganisms. This study aimed at: a) to isolate microorganisms with anthracene degradation potential; b) to establish optimum anthracene degradation conditions; and, c) to evaluate the iron forms and concentrations effects on anthracene degradation *in vitro* and in the soil. The three bacterial isolates that showed better growth were selected from 26 isolates that presented a good growth in the anthracene containing medium. These showed the best growth at pH 7.0, in 30°C temperature, up to 2,000mg/L anthracene concentration. Besides Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, all other iron forms tested increased the microorganisms' number in the medium containing 250 mg L<sup>-1</sup> of anthracene. The iron beneficial effect was observed up to 0.2 mM Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. This iron form at the 0.1 mM concentration promoted up to 72% anthracene degradation in one of the bacterial isolates related to decreasing the medium surface tension to 26.2 dynes cm<sup>-1</sup>. The iron effect on the anthracene degradation in soil was more effective with the addition of the microbial isolates (bioaugmentation) and of nutrients (biostimulation). The results showed that iron can stimulate anthracene degradation, and can be successfully used for PAH bioremediation in the environment.

<sup>1/</sup> M.Sc. Dissertation in Soil Science. Agricultural College, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre (68p.) – February, 2004.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	04
2.1 Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.....	04
2.1.1 Definições e características.....	04
2.1.2 Toxicologia e legislação.....	05
2.1.3 Geração, contaminação ambiental e remediação.....	06
2.2 Áreas locais com risco de contaminação ambiental por HAP.....	07
2.2.1 Postos de serviços e de combustíveis.....	07
2.2.2 Indústrias petroquímicas e refinarias de petróleo .....	08
2.3 Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.....	09
2.3.1 Microrganismos e processo de degradação microbiana.....	09
2.3.2 Enzimas e cofatores.....	10
2.3.3 Produção de biossurfactantes.....	12
2.4 Função metabólica do ferro e dinâmica no solo.....	13
2.4.1 Função do ferro para os microrganismos.....	13
2.4.2 Dinâmica do ferro no solo.....	15
2.5 Biorremediação de HAP no ambiente.....	16
2.5.1 Definições e estratégias.....	16
2.5.2 Uso do <i>landfarming</i> para a remediação de HAP no solo.....	18
2.5.3 Eficiência da biorremediação com <i>landfarming</i> .....	19
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
3.1 Isolamento de microrganismos degradadores de antraceno.....	21
3.1.1 Local e características da amostragem.....	21
3.1.2 Seleção de meios para o isolamento.....	21
3.1.3 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados.....	22
3.1.4 Seleção dos isolados.....	22
3.2 Caracterização e condições de cultivo dos isolados selecionados	23
3.2.1 Caracterização dos isolados selecionados.....	23
3.2.2 Condições ótimas de cultivo.....	23
3.3 Efeito do ferro na degradação de antraceno e hidrocarbonetos....	23
3.3.1 Efeito do ferro na degradação do antraceno <i>in vitro</i> .....	23
3.3.2 Efeito do ferro nos isolados em meio com hidrocarbonetos..	24
3.3.3 Efeito de ferro na degradação do antraceno no solo.....	24
3.4 Análises microbianas e cromatográficas.....	25
3.4.1 Análises microbianas.....	25
3.4.2 Análises cromatográficas.....	25
3.5 Análises de crescimento, cinética de degradação e estatística.....	26
3.5.1 Análise de crescimento.....	26
3.5.2 Cinética de degradação.....	26

3.5.3 Análise estatística.....	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
4.1. Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de antraceno.....	27
4.1.1 Isolamento de microrganismos degradadores de antraceno.....	27
4.1.2 Seleção de microrganismos degradadores de antraceno.....	29
4.2 Caracterização das condições de cultivo dos isolados.....	30
4.2.1 Temperatura.....	31
4.2.2 pH.....	32
4.2.3 Concentrações de antraceno.....	33
4.2.4 Degradação de antraceno pelos isolados.....	34
4.3 Efeito do ferro <i>in vitro</i> .....	36
4.3.1 Efeito de fontes de ferro.....	36
4.3.2 Efeito da concentração de ferro.....	38
4.3.3 Efeito do ferro em diferentes hidrocarbonetos.....	39
4.3.4 Efeito do ferro na degradação do antraceno.....	41
4.4 Efeito do ferro no solo.....	45
4.4.1 Efeito do ferro na degradação do antraceno (biorremediação passiva).....	46
4.4.2 Efeito do ferro e da bioaugmentação na degradação do antraceno.....	49
4.4.3 Efeito do ferro, da bioaugmentação e da bioestimulação na degradação do antraceno.....	50
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>54</b>
<b>7. APÊNDICES</b>	
Apêndice 01. Meios minerais e agar nutritivo utilizado.....	61
Apêndice 02. Análise química do solo Itapuã.....	64
Apêndice 03. Quadros das análises de variância.....	65
<b>8. VITA.....</b>	<b>68</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Log UFC no início e ao final da contagem dos isolados crescendo em meio mineral contendo antraceno, durante 96 horas e os parâmetros cinéticos do crescimento dos isolados.....	30
TABELA 2. Efeito de fontes de ferro no número de células de três isolados, crescendo em meio mineral contendo 250 mg L <sup>-1</sup> de antraceno, a pH 7,0 e a 30°C.....	37
TABELA 3. Efeito da adição de 250 mg L <sup>-1</sup> de diferentes hidrocarbonetos no número de células de três isolados crescendo na presença e na ausência de 0,1 mM de ferro [Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] a pH 7,0 e a 30°C.....	41
TABELA 4. Porcentagem de degradação do antraceno e detecção de biossurfactantes pelos isolados 222 A, 312 A e 332 C, na presença e na ausência de 0,1 mM de ferro [Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] após 48 dias de incubação a pH 7,0 e a 30°C.....	43
TABELA 5. Produção acumulativa de C-CO <sub>2</sub> , carbono potencialmente ineralizável (C <sub>O</sub> -CO <sub>2</sub> ), taxa de degradação (k) e meia vida da reação de degradação (t ½) por diferentes tratamentos (biorremediação passiva, bioaugmentação e bioestimulação) em relação ao controle, em presença diferentes concentrações de ferro, ao final de 64 dias de incubação.....	48

## RELAÇÃO DE FIGURAS

FIGURA 1. Curvas de crescimento dos 26 isolados bacterianos em meio mineral contendo 250 mg L <sup>-1</sup> de antraceno.....	28
FIGURA 2. Efeito de diferentes temperaturas no número de células de três isolados crescendo em meio mineral contendo 250 mg L <sup>-1</sup> de antraceno, após 24 horas de incubação.....	31
FIGURA 3. Efeito de diferentes pH no número de células de três isolados crescendo em meio mineral contendo 250 mg L <sup>-1</sup> de antraceno, à 30°C, após 24 horas de incubação.....	32
FIGURA 4. Efeito de concentrações de antraceno no número de células de três isolados crescendo em meio mineral a pH 7,0 e a 30°C, após 24 horas de incubação.....	34
FIGURA 5. Degradação do antraceno pelos isolados 222 A (b), 312 A (c) e 332 C (d) em relação à concentração inicial (a).....	35
FIGURA 6. Efeito de concentrações de ferro [Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] no número de células de três isolados, crescendo em meio mineral contendo 250 mg L <sup>-1</sup> de antraceno, a pH 7,0 e a 30°C.....	39
FIGURA 7. Degradação do antraceno em presença de 0,1 mM de [Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ] pelos isolados 222 A (b), 312 A (c) e 332 C (d) em relação à concentração inicial (a).....	42
FIGURA 8. Produção acumulativa de CO <sub>2</sub> do solo contaminado com antraceno (biorremediação passiva), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro, durante 64 dias.....	47
FIGURA 9. Produção acumulativa de CO <sub>2</sub> do solo contaminado com antraceno, inoculado pelos isolados selecionados (biaumentação), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro, durante 64 dias.....	49
FIGURA 10. Produção acumulativa de CO <sub>2</sub> do solo contaminado com antraceno, inoculado pelos isolados selecionados e pela adição de fertilizantes (bioestimulação), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro, durante 64 dias.....	51

## 1. INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) são um grupo de compostos químicos constituídos unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, arranjados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Devido a possibilidade da fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si, há atualmente mais de 100 HAP reconhecidos pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), dos quais se destaca o antraceno. Este composto tem sido utilizado como modelo para o estudo da dinâmica dos HAP no ambiente, devido a sua menor toxicidade relativa. Os HAP são lipossolúveis na membrana e prontamente absorvidos no intestino dos mamíferos via inalação, exposição oral e dérmica, com posterior acúmulo no tecido adiposo. O metabolismo dos HPA no organismo humano gera compostos epóxidos com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e na pele, devido a presença destes compostos.

Muitos dos HAP são semi-voláteis, o que os tornam altamente móveis e dispersos no ar, água e solo, através de processos de deposição e de revolatilização. Como situação específica de áreas de risco de contaminação por HAP ou já contaminadas, destacam-se os postos de serviços e de combustíveis, as indústrias petroquímicas e uma refinaria de petróleo, localizadas na zona urbana da grande Porto Alegre. Além dos resíduos oleosos contendo hidrocarbonetos que são dispostos diretamente na rede pluvial e da contaminação por vazamento de tanques e de tubulações submersas nos postos de serviços e combustíveis, existe uma grande produção de efluentes contendo HAP pelo Pólo Petroquímico de Triunfo e pela Refinaria Alberto Pasqualini. O tratamento deste efluente em lagoas aeróbias gera uma borra oleosa contendo elevadas concentrações de HAP que, se disposta

inadequadamente, pode contaminar o ambiente e a população.

Entre as estratégias para a eliminação de efluentes ou de borras oleosas produzidas pelos setores de serviços e da indústria, têm-se utilizado microrganismos para a remediação destes contaminantes do ambiente. Entretanto, os resultados de campo têm demonstrado uma baixa eficiência de remoção destes contaminantes. Entre os vários fatores responsáveis pela baixa taxa de degradação dos hidrocarbonetos contidos nos efluentes e nas borras oleosas no solo, pode-se destacar como os mais importantes a baixa biodisponibilidade destes compostos, a baixa seletividade dos microrganismos aos compostos e uma provável limitação de nutrientes à biota degradadora. Estudos preliminares demonstraram que a adição de macronutrientes incrementou a degradação, mas não o suficiente para eliminar a carga anual de resíduos e efluentes gerado no sistema de tratamento.

Para melhorar a eficiência de degradação destes compostos é necessária a seleção de microrganismos adaptados e a avaliação da possibilidade do requerimento de outros nutrientes ou de fatores de crescimento não existentes no ambiente contaminado. Entre os nutrientes, destaca-se o ferro pelas várias funções que desempenha no metabolismo celular e entre elas, como cofator e/ou grupo prostético de todas as enzimas envolvidas na degradação de HAP. Nas condições de campo em que os experimentos de degradação têm sido realizados, a grande maioria do ferro presente encontra-se na forma de óxidos, hidróxidos e oxihidróxidos de baixa solubilidade e, conseqüentemente, indisponíveis para a utilização pela biota degradadora. Deste modo, é possível que fontes mais solúveis e concentrações adequadas de ferro, associadas à seleção de microrganismos com maior habilidade de degradar os HAP presentes em resíduos e efluentes oleosos, possam incrementar significativamente a degradação destes compostos para níveis superiores aos verificados atualmente.

Com base nessas hipóteses, utilizou-se o antraceno como modelo de estudo no presente trabalho, com o objetivo de isolar microrganismos de ambientes contaminados com HAP e de selecionar os mais eficientes através do crescimento em meio contendo antraceno como única fonte de carbono e energia. A partir desta seleção, objetivou-se ainda, avaliar o efeito de fontes e de concentrações de ferro na degradação *in vitro* e no solo do antraceno e de outros hidrocarbonetos (pireno,

fenantreno, gasolina, diesel, benzeno, tolueno, xileno, etilbenzeno) com a finalidade de fornecer subsídios ou indicações para o aumento da degradação dos HAP e a eliminação destes compostos de ambientes contaminados.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

#### 2.1.1 Definições e características

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) são compostos químicos formados durante a combustão incompleta de carvão, óleo cru, creosoto, gás, madeira, lixo e outras substâncias orgânicas (USDHS, 1995). Estes compostos são constituídos de carbono e de hidrogênio e formados pela fusão de dois ou mais anéis aromáticos em diferentes posições na mesma molécula. Estas características conferem aos HAP uma grande variação nas propriedades químicas e físicas, principalmente na massa molecular e na solubilidade (Peters, 1999).

Entre os mais de 100 HAP atualmente conhecidos, apenas alguns são considerados, em função de informações existentes como: efeito tóxico, níveis de exposição a humanos, concentração no ambiente e produção industrial. Entre os HAP enquadrados nesta descrição, destacam-se os seguintes: acenaftaleno, acenaftileno, antraceno, benzoantraceno, benzopireno, benzofluoranteno, bezopirileno, criseno, dibenzoantraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno, naftaleno e pireno (Kanaly & Harayama, 2000).

O antraceno é um dos poucos HAP produzidos industrialmente. É recuperado do processo de destilação do carvão, numa fração conhecida como “óleo de antraceno” ou “óleo verde”. O antraceno ( $C_{14}H_{10}$ ), também conhecido como antracin ou paranaftaleno é formado por três anéis benzênicos, apresentando uma massa molecular de 178,2 g e uma solubilidade em água de  $0,076 \text{ mg L}^{-1}$  (IARC, 1973). O antraceno é usado como um intermediário na produção de corantes, na produção de fibras sintéticas e como diluente de preservante de madeira, além de outros usos (Hawley, 1993). Devido a sua menor toxicidade em relação aos demais HAP, o antraceno tem sido utilizado como modelo para estudos envolvendo a

dinâmica dos HAP no ambiente.

### **2.1.2 Toxicologia e legislação**

A exposição de humanos e animais a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos ocorre via inalação, oral e dermal. Tem sido descrito que a inalação e a exposição dermal de HAP por humanos tem efeito genotóxico e cancerígeno, com diferentes níveis de intensidade, ao passo que a exposição oral apresenta efeito sistêmico crônico. As informações sobre a toxicologia de HAP em animais são mais abundantes, com indicações até de morte por inalação ou por ingestão. Além disso, existem informações de que os HAP podem afetar o sistema imunológico e reprodutivo de forma branda a crônica, levando a mutagênese e a carcinogênese em alguns casos (USDHS, 1995).

Os HAP são lipossolúveis na membrana e prontamente absorvidos no trato intestinal de mamíferos, com posterior acúmulo no tecido adiposo. O processo metabólico dos HAP envolve várias rotas e o predomínio de uma rota específica é dependente da atividade e da afinidade das enzimas envolvidas. O metabolismo do benzo(a)pireno tem sido estudado mais intensivamente e deste modo, utilizado como modelo para o metabolismo dos HAP (IARC, 1983).

O benzo(a)pireno é metabolizado inicialmente a óxidos areno pelo citocromo P-450. Uma vez formados, estes óxidos podem se rearranjar espontaneamente a fenóis e, posteriormente serem hidratados para transdihidrodióis, em uma reação catalisada por hidrolases epóxidas. Podem ainda reagir covalentemente com glutathione, tanto espontaneamente, como em reação catalisada por uma transferase citosólica (Hall & Grover, 1988). Os fenóis podem também ser formado pelo sistema P-450 por inserção direta de oxigênio ou podem ser oxidados, tanto metabólica como espontaneamente a quinonas (Bossert et al., 1988). Estas quinonas podem ainda serem metabolizadas a glutathionas ou a ésteres de sulfato (Agarwal et al., 1991).

De modo geral, o metabolismo dos HAP ocorre em todos os tecidos do organismo e muitos dos compostos e derivados gerados apresentam características epóxidas com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, tendo sido relatados inúmeros casos de câncer no pulmão, intestino, fígado, pâncreas e

na pele, devido a presença destes compostos (Chakradeo et al., 1993). E m termos de legislação e de regulamentação sobre as concentrações limites de HAP no ambiente, existe grande variação de valores entre as agências. Para o ar, os limites dependem do tipo de HAP, variando desde 0,1 até 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  ao passo que para a água, os limites são mais estreitos, ficando entre 0,0028  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 0,031  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Para meios não específicos, a Agência de Proteção Ambiental Americana estabeleceu as doses de referência para a exposição oral para o antraceno (0,3  $\text{mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ), acenafteno (0,06  $\text{mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ), fluoranteno (0,04  $\text{mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ), fluoreno (0,04  $\text{mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) e pireno (0,03  $\text{mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ ) (USDHS, 1995). Mais recentemente, a Comissão das Comunidades Européias (2003) estabeleceu a concentração de 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de benzo(a)pireno como limite máximo permitido para a presença de HAP no ambiente (ar, água e solo).

### **2.1.3 Geração, contaminação ambiental e remediação**

As fontes primárias de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) são geradas a partir da combustão incompleta de resíduos orgânicos, tais como, combustíveis fósseis, carvão mineral e vegetal (Atlas & Cerniglia, 1995). Como fonte secundária de HAP, destaca-se a produção comercial e as fontes naturais existentes no ambiente. Somente para o antraceno, existem cerca de 70 empresas americanas produzindo de 500 a 25.000 kg de antraceno/empresa/ano, num total aproximado de 800 t ano<sup>-1</sup> (USDHS, 1995). Da produção americana, somente em 1984 foram exportadas 502 Mg de antraceno para vários países (USDOC, 1985), representando um volume considerável de um HAP específico, que, durante o processo de industrialização ou da utilização direta, pode apresentar grande potencial como contaminante ambiental.

Entre as várias fontes geradoras de HAP em ambientes urbanos pode-se destacar, especificamente, as refinarias de petróleo e os postos de combustíveis e de serviços, como os grandes responsáveis pela introdução destes resíduos no solo e nas águas subterrâneas. A concentração de HAP no ambiente varia em função do local. Na zona rural, as concentrações estão abaixo de 0,005  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , aumentando estes valores para 0,03 e 1,8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  em solos próximos de centros urbanos e de áreas industriais, respectivamente (Jones, 1989).

Os HAP são introduzidos na biosfera juntamente com moléculas emitidas nos processos de combustão ou em derrames de óleos, vegetais ou minerais. Além disso, devido ao caráter semi-volátil de alguns dos HAP, são altamente móveis no ambiente, distribuindo-se no ar, água e solo por deposição e revolatilização. Alguns HAP podem ser transportados a longa distância, e por esta razão encontram-se amplamente distribuídos na biosfera (Cerniglia, 1988).

Apesar da recalcitrância dos HAP, é possível a remediação destes compostos no ambiente pela degradação abiótica. Entre os processos abióticos pode-se destacar a degradação química e física, que ocorrem pela interação de moléculas e íons, ou pela excitação da molécula por efeitos da luz e temperatura, que diminuem a estabilidade estrutural da molécula, conduzindo ao rompimento de ligações. Entretanto, estes processos são lentos e muitas vezes geram compostos intermediários com características mais indesejáveis que as substâncias originais, havendo a necessidade de se buscar alternativas mais eficientes para eliminação dos HAP do ambiente (Melo & Azevedo, 1997).

## **2.2 Áreas locais com risco de contaminação ambiental de HAP**

### **2.2.1 Postos de serviços e de combustíveis**

Os resíduos produzidos pelos postos de serviços e de combustíveis, são as principais fontes geradoras de HAP nos centros urbanos e representam a maior fonte de contaminação do solo, sub-solo e água subterrânea. Além destes postos, destacam-se como áreas de contaminação ambiental, as adjacentes a locais de lavagem de automóveis, oficinas mecânicas, retíficas de motores, transportadoras de cargas e de empresas de ônibus, etc. (Lima et al., 1998a).

Em 1997, existiam em Porto Alegre 254 postos de serviços e de combustíveis, com cerca de 1.280 tanques subterrâneos, com uma capacidade total de estocagem de 20 milhões de litros de combustível (Lima et al., 1998b). De acordo com estes autores, a maioria dos tanques subterrâneos são suscetíveis a corrosão nos 20 primeiros anos após a instalação. De modo geral, cerca de 50% dos vazamentos ocorrem antes dos 15 anos e grande parte das tubulações são atingidas com vazamentos antes dos 10 anos após a instalação.

Além dos postos de combustíveis, as trocas de óleo realizadas no

comércio varejista e, principalmente, em domicílios, são responsáveis pela disposição direta nos esgotos e efluentes domésticos. O levantamento realizado das áreas urbanas de Porto Alegre com potencial de risco ou já contaminadas por empresas de transporte coletivo, posto de serviços e retíficas foi feito em 1998 (Lima et al., 1998b), onde se verificou um alto potencial de carga poluente na sub-bacia Almirante Tamandaré (entre o centro e o bairro Navegantes) e na sub-bacia do Arroio Dilúvio.

Combustíveis e derivados são fontes de hidrocarbonetos, cujo vazamento provoca a contaminação ambiental do solo e de águas subterrâneas, além de poluir o ar pelas emissões através da volatilização. Deste modo, a população pode estar exposta a contaminação de hidrocarbonetos, entre eles os HAP, não havendo nenhuma informação ou indicação a respeito dos níveis de contaminação de HAP, uma vez que a legislação exige apenas a análise de benzeno, etil-benzeno, tolueno e xileno nos locais de prováveis vazamentos.

O diagnóstico superficial destas áreas pode indicar uma grande contaminação já existente ou com grande risco de contaminação por hidrocarbonetos. Até o presente momento, não existe nenhuma informação sobre a concentração de HAP na zona urbana de Porto Alegre, bem como não existe ainda legislação a respeito, devido ao total desconhecimento do efeito dos HAP na saúde humana, tanto pela população como pelas agências de proteção ambiental. Além disso, os limites de detecção das metodologias existentes para a determinação da concentração de HAP são elevados, não sendo adequados para detectar concentrações limites, como as descritas pelas agências americanas e europeias ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

### **2.2.2 Indústrias petroquímica e refinarias de petróleo**

A grande Porto Alegre (RS) e o delta do Rio Jacuí estão sob influência de duas grandes fontes consumidoras e geradoras de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Trata-se da Refinaria de Petróleo Alberto Pasqualini, em Canoas, e o Polo Petroquímico, em Triunfo. Durante o processo de tratamento de efluentes líquidos gerados pelas refinarias de petróleo e indústrias petroquímicas é produzido um resíduo sólido, com elevada carga orgânica, denominado de borra oleosa. A

composição deste resíduo sólido é variável devido à quantidade e a qualidade dos produtos que a geraram, aos processos a que o resíduo é submetido, e aos vazamentos contínuos e os que ocorrem durante o processo industrial (Mielniczuk, 1991).

O Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos (SITEL-CORSAN) do Polo Petroquímico de Triunfo, RS, gera anualmente 2.500 m<sup>3</sup> de uma borra oleosa, contendo 40,3% de carbono em uma mistura complexa de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP). Em estudo realizado por Karr & Lysyj (1985) os HAP foram encontrados em vários resíduos oleosos provenientes do separador água/óleo de indústrias petroquímicas, e a correlação química /toxicológica revelaram que estas moléculas contribuem significativamente para as propriedades toxicológicas da borra oleosa, por apresentarem elevado potencial mutagênico e carcinogênico (Kanaly et al, 1997).

A borra produzida no SITEL apresenta potencial de contaminação no ambiente, pois geralmente é tratada pelo processo de *landfarming*, ou seja, a borra é disposta no solo não contaminado e manejada para aumentar a degradação. Entre os vários compostos orgânicos presentes na borra oleosa incluem-se os alcanos, cicloalcanos, aromáticos, benzeno, xileno, além de outros compostos como fenóis e os HAP. Durante o processo industrial, os HAP podem sofrer substituições do carbono do anel aromático por nitrogênio, oxigênio ou enxofre, potencializando a toxicidade e representando um grande risco à segurança das populações adjacentes (Cerniglia, 1993).

## **2.3 Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos**

### **2.3.1 Microrganismos e processo de degradação microbiana**

Além da degradação química (volatilização e fotodegradação), a biodegradação é uma das principais vias de eliminação de HAP no solo (Sims et al., 1990). A biota do solo, tanto em termos de biomassa como de diversidade microbiana e fisiológica, é potencialmente capaz de metabolizar compostos orgânicos considerados perigosos, durante a conversão destes em energia e nutrientes. Deste modo, o solo é um ambiente relativamente favorável à biodegradação de resíduos como os HAP (Alexander, 1997).

A contagem microbiana de células viáveis em solos férteis varia entre  $10^7$  e  $10^8$  por grama de solo, sendo as bactérias, o grupo mais numeroso de microrganismos, com os fungos apresentando a maior biomassa, entre outros grupos de actinomicetos, algas e protozoários (Mielniczuk, 1991). Todavia, a degradação de resíduo oleoso, contendo HAP, é resultado quase que exclusivo da atividade bacteriana, em condições aeróbias (Richard & Vogel, 1999).

Os HAP são compostos recalcitrantes degradados por um grupo restrito de microrganismos, ao contrário de compostos alifáticos (Watkinson & Morgan, 1990) e de hidrocarbonetos não aromáticos que são degradados por um número maior de microrganismos do solo. Por outro lado, quando populações microbianas são expostas a estes compostos (HAP) pode ocorrer o crescimento seletivo, tornando-os mais eficientes para a utilização destes compostos (Kanaly et al., 1997).

Os microrganismos degradam os compostos aromáticos através da clivagem dos anéis na posição orto ou meta (Hara et al., 2003). A clivagem orto ocorre entre os átomos de carbono hidroxilados, enquanto que, a clivagem meta ocorre adjacente aos átomos de carbonos hidroxilados. Em função das diferenças entre as clivagens, estas têm sido denominadas de intradiol e extradiol respectivamente (Kanaly & Harayama, 2000).

A clivagem orto tem sido evidenciada na degradação de compostos em que os metabólitos intermediários centrais são catecol e o protocatecuato. Compostos que apresentam o gentisato como metabólito intermediário tem sido relatado como degradado pela via orto modificada. A ocorrência da via meta tem sido predominante para compostos aromáticos com substituintes metil (Mars et al., 1997).

### **2.3.2 Enzimas e cofatores**

A clivagem dos anéis benzênicos dos HAP é catalisada por complexos enzimáticos conhecidos como oxigenases, as quais estão divididas em monoxigenases e dioxigenases (Mason & Commarck, 1992). As monoxigenases apresentam função de oxidase e de redutase, adicionando um átomo do dioxigênio atmosférico ( $O_2$ ) no anel aromático, reduzindo o excesso de  $O_2$  a água (Mason,

1988). As dioxigenases incorporam dois átomos de oxigênio no anel aromático, havendo necessidade de cofatores como NADH ou NADPH os quais recebem elétrons provenientes de uma flavoproteína contendo ferro-enxofre e os transferem para uma ferredoxina 2Fe e 2S. A redução da proteína ferro-enxofre terminal irá catalisar a oxidação do composto aromático (Haigler & Gibson, 1990).

Com a incorporação de oxigênio nos compostos aromáticos pelas oxigenases, é produzido um composto cis-dihidrodiol, que servirá de substrato para enzimas desidrogenases que farão a rearomatização do composto, formando intermediários comuns, tais como: catecol, protocatecuato e gentisato (Choudhry, 1991). Sobre estes intermediários atuarão dioxigenases específicas, que poderão clivá-los nas posições orto e meta, descritas anteriormente. Nesta condição, o catecol, protocatecuato e o gentisato serão oxidados até a formação de intermediários utilizados no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Ciclo de Krebs), como o succinato, piruvato e a acetil-CoA (Atlas & Bartha, 1998).

Devido à complexidade e ao número de anéis aromáticos presentes nas moléculas dos HAP, a oxidação até intermediários do ciclo de Krebs, é realizada por um complexo enzimático, normalmente presente em consórcios bacterianos. Nesses consórcios bacterianos, os isolados apresentam normalmente sucessões de populações, onde as que possuem as oxigenases darão início a oxidação dos HAP, cujos produtos serão utilizados por outras populações, dando seqüência a oxidação do composto até a completa degradação (Bouchez et al., 1995).

O complexo enzimático das oxigenases é geralmente formado por três diferentes componentes: um terminal oxigenase, que é também chamado de proteína ferro-enxofre ou proteína hidroxilase, que consiste de duas diferentes subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ ; uma ferridoxina e uma NADPH-ferridoxina redutase. Este multicomponente de proteínas formam uma cadeia curta de transporte de elétrons com flavinas e grupos de ferro-enxofre como componentes redox. O componente inicial da cadeia é uma flavoproteína que se oxida reduzindo nucleotídeos da piridina e, transfere os elétrons para o terminal dioxigenase via uma ferridoxina carreadora de elétrons. Esta ferridoxina possui um centro redox também conhecido como centro Rieske, do tipo ferro-enxofre. A última proteína do multicomponente contém um sítio ativo para incorporação de oxigênio no substrato aromático (Mishra, 2001).

Por outro lado, as enzimas de fissão que atacam os metabólitos intermediários centrais gerados pelo ataque das oxigenases são classificadas como enzimas extra e intradiol. Ambas as enzimas têm em comum o ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) como cofator enzimático e  $\text{Fe}^{+3}$  como grupo prostético (Harayama, 1999). Desta forma, a importância do ferro fica evidenciada por participar da cadeia de transporte de elétrons nas oxigenases (periféricas), bem como por fazer parte da estrutura molecular das enzimas de fissão, tanto como cofator como grupo prostético.

### **2.3.3 Produção de biossurfactantes**

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas que conferem o caráter de bipolaridade à molécula e, por essa razão se posicionam, preferencialmente, sempre na interface de compostos com diferentes polaridades. Assim estas substâncias são capazes de diminuir a tensão superficial e formar microemulsões, nas quais os HAP podem ser solubilizados na água e vice-versa (Greek, 1991). Muitos hidrocarbonetos que podem servir como fonte de carbono e energia para os microrganismos possuem baixa solubilidade em água, e por conseqüência tornam-se bioindisponíveis.

Várias espécies de microrganismos são capazes de produzirem estes surfactantes com a finalidade de aumentar a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos, favorecendo assim a cinética de crescimento (Barkay et al., 1999). Em geral, os biossurfactantes são classificados por sua composição química e sua origem microbiana, sendo que as maiores classes de biossurfactantes incluem glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos e ácidos graxos. A produção de biossurfactantes está distribuída em uma ampla variedade de gêneros microbianos (Garcia-Junco, 2001).

Em ambientes como o solo, onde ocorrem muitas interações químicas, entre os hidrocarbonetos, o solo e a matéria orgânica, a bioindisponibilidade é ainda mais acentuada pelo efeito da sorção (Edwards et al., 1994). No solo, os biossurfactantes aumentam a solubilidade e liberam os contaminantes adsorvidos nos minerais e na matéria orgânica (Karami-Lotfabad et al., 1996). O aumento da biodisponibilidade dos compostos aos microrganismos pode resultar em maior biodegradação (Clarke et al., 1994).

## **2.4 Função metabólica do ferro e dinâmica no solo**

### **2.4.1 Função do ferro para os microrganismos**

O ferro é essencial aos microrganismos pois é requerido para diversas funções celulares. Apesar de ser um dos metais mais abundantes na Terra, apresenta baixa solubilidade em ambientes aeróbios e no pH fisiológico da célula. Além disso, quando em solução, são formados complexos de hidróxido férrico insolúveis, limitando a quantidade de ferro solúvel. Como consequência, o ferro encontra-se em baixa biodisponibilidade no ambiente e, geralmente, não atende a demanda celular dos microrganismos (Crichton, 1991).

A reatividade dos átomos de ferro tornam seu uso indispensável nas mais diferentes aplicações biológicas. Em geral, o ferro reage com radicais hidroxil tóxicos convertendo-os em peróxido de hidrogênio, que surge espontaneamente da combinação de ânions de superóxidos, criados pelo metabolismo oxidativo nas células. Estes radicais são altamente oxidativos e danificam lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos presentes na célula. Desta forma, o ferro participa do mecanismo de proteção da célula, bem como da estrutura de várias enzimas de oxi-redução como cofator e como grupo prostético (Stojiljkovic et al., 1996). Conforme descrito no item anterior, o ferro é essencial em todas as etapas de degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, pois integram a maioria das enzimas envolvidas no processo de catálise destes compostos (Dinkla et al., 2001).

Devido a grande demanda do ferro para os mais distintos processos metabólicos, este elemento encontra-se, geralmente, no limite da disponibilidade celular, sendo então retirado do ambiente e estocado em proteínas, para evitar deficiências que podem conduzir à morte celular. Para isso, os microrganismos utilizam mecanismos e reações com alta afinidade por ferro entre os quais destaca-se a ligação celular direta ao ferro, a utilização de proteínas que se ligam ao ferro e o uso de agentes quelantes que complexam o ferro solúvel (sideróforos) (Brickman & Armstrong, 1995).

A maior parte dos microrganismos utilizam proteínas como a transferrina, a lactoferrina e a hemoglobina, para aumentar a captura do ferro (Bonnah & Schryvers, 1998). Além disso, o ferro pode ser complexado por alguns microrganismos através de sideróforos, que são pequenas moléculas, de baixa

massa molar, que permitem a retirada do ferro do ambiente e o transporte através da membrana. Neste transporte são necessárias duas proteínas, sendo uma permease que facilita a entrada do ferro na membrana e uma hidrolase que fornece energia para o transporte. Após a passagem do ferro pela membrana para o citoplasma, o  $\text{Fe}^{3+}$  é reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  por sideróforos redutores, com menor afinidade por ferro, sendo então regenerados e extruídos para fora da célula para complexar o ferro novamente (Wolz et al., 1994).

Dentro do citoplasma, o ferro se distribui para as suas múltiplas funções através de mecanismos não bem descritos. Entretanto, sabe-se que este é requerido no componente heme de citocromos (5%), nas proteínas ferro-enxofre (10%), bem como compõe 10% das bacterioferritinas. De modo geral, cerca de 40% do ferro intracelular está ligado (na forma de  $\text{Fe}^{2+}$ ) a um carboidrato ácido. O balanço interno do ferro na célula é mantido pela entrada e saída do elemento das proteínas estoque, como a ferritina. Esta proteína solúvel pode se ligar com mais de 4.500 átomos de ferro, formando um complexo não tóxico a célula (Crichton, 1991).

A regulação da expressão dos sistemas de captura e de transporte do ferro são processos complexos do tipo inibição por *feedback*, com a finalidade de garantir a presença do ferro na célula e a disponibilidade dos sideróforos no ambiente. A expressão dos genes do sistema bacteriano para captura do ferro é regulado em nível de transcrição, sendo que na maioria dos casos, a transcrição dos genes envolvidos no mecanismo é regulada por uma proteína repressora, cuja máxima expressão ocorre em condições de deficiência de ferro (Crosa, 1997).

Além dos efeitos do ferro no metabolismo celular e nas enzimas envolvidas na degradação de HAP, foi demonstrado que a adição de sais de ferro no meio de cultivo de *Bacillus subtilis* aumentou, significativamente, a produção do surfactante surfactina (Wei & Chu, 1998). Neste trabalho, a adição de 2 mM de ferro resultou em 3 g L<sup>-1</sup> de surfactina a mais do que no meio sem adição do ferro. Esse aumento na produção do biosurfactante pela adição de ferro, é resultado, provavelmente, do aumento da biomassa celular seguido da diminuição do pH do meio, pela ação de metabólitos ácidos, fazendo com que os biosurfactantes precipitem e desta forma não saturem a fase solúvel. Este fenômeno ou mecanismos e reações envolvidas não foram elucidados (Wei et al., 2003).

### 2.4.2 Dinâmica do ferro no solo

O ferro encontra-se entre os elementos mais estáveis no ambiente, sendo o elemento mais abundante na Terra e o quarto mais abundante na crosta terrestre, com uma concentração média na crosta de aproximadamente 5,1% da massa, correspondendo a 1,87% do total dos átomos (Morel & Hering, 1993). No solo, o conteúdo de ferro varia de 0,7 a 55 %, mas apresenta, em média um conteúdo de 3,8% (Lindsay, 1979). O ferro ocorre nos minerais primários do solo como silicatos ferromagnesianos, na forma de ferro reduzido ( $\text{Fe}^{+2}$ ). O intemperismo destes minerais libera o ferro que, é oxidado e precipitado na forma de óxidos, hidróxidos e oxihidróxidos de  $\text{Fe}^{+3}$ . Como resultado do processo de intemperismo e de formação do solo, verifica-se a predominância e o aumento da concentração de óxidos de ferro no solo, tais como hematita, goethita, leptocrocita, magnetita (Kabata-Pendias & Pendias, 1992).

Nos solos brasileiros, verifica-se uma grande variação nos teores de óxidos de ferro em função do material de origem dos solos e, principalmente, pela grande variabilidade climática. Nestes ambientes, os óxidos sofrem dissolução liberando ferro e mantendo-o em equilíbrio com a solução do solo. Esta dissolução é regulada, principalmente, pelo gradiente de concentração de ferro na solução do solo e pela solubilidade dos óxidos de ferro presente no mesmo (Morel & Hering, 1993).

No solo, a solubilidade dos óxidos de ferro ( $\text{Fe}^{+3}$ ) diminui na seguinte ordem:  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  (amorfo) >  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  (cristalino) >  $\delta\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (magnetita) >  $\delta\text{-FeOOH}$  (leptocrocita) >  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (hematita) >  $\alpha\text{-FeOOH}$  (goethita) (Bodek et al., 1998). A atividade destes óxidos é dependente do pH do meio, diminuindo mil vezes a cada aumento de unidade. Desta forma, a solubilidade do  $\text{Fe}^{+3}$  na forma de  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  (amorfo) é 3.631 vezes maior do que a apresentada por  $\alpha\text{-FeOOH}$  (goethita). Por outro lado, algumas formas de ferro como o  $\text{FeCl}_3$  (molisita) e o  $\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2$  possuem solubilidade tão alta no solo que podem atingir concentrações tóxicas ao metabolismo microbiano (Lindsay, 1979).

Em solução aquosa, o  $\text{Fe}^{+3}$  coordena seis moléculas de água [ $\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$ ] e com o aumento de pH ocorre a hidrólise do ferro, que remove o  $\text{H}^+$

das águas solvatadas, formando espécies como:  $\text{FeOH}^{+2}$ ,  $\text{Fe(OH)}_2^+$ ,  $\text{Fe(OH)}_3^0$ ,  $\text{Fe(OH)}_4^-$ , e polímeros de  $\text{Fe(OH)}_4^-$ . Estas reações de hidrólise no solo determinam a solubilidade do ferro, observando-se a menor solubilidade em solos com pH na faixa entre 7,4 a 8,5 (Schwertmann, 1998). Os óxidos de ferro que predominam nos solos do Rio Grande do Sul são a goethita e a hematita, sendo os outros encontrados em menores quantidades.

## **2.5 Biorremediação de HAP no ambiente**

### **2.5.1 Definições e estratégias**

Biorremediação é por definição a utilização de processo ou de atividade biológica para a transformação de contaminantes em substâncias inertes (Hollinger et al., 1997). Esta biotecnologia pode ser aplicada a distintos locais e contaminantes, mas para o sucesso da biorremediação é necessário a interação com outras disciplinas como a microbiologia, a genética, a engenharia, a geologia e a físico-química, entre outras (Boopathy, 2000).

Os HAP estão entre os principais compostos dispostos no ambiente que necessitam ser remediados (Accioly & Siqueira, 2000). Porém, para haver a degradação destes compostos através de processos biológicos, é necessário o atendimento de alguns critérios como: a) existência de microrganismos com capacidade catabólica para degradar o contaminante; b) disponibilidade e acessibilidade do composto ao ataque microbiano ou enzimático; c) condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade do agente biorremediador (Bewley, 1996).

Quanto ao local, a biorremediação pode ser realizada *in situ* e *ex situ*, onde as técnicas *in situ* envolvem tratamento no local onde ocorreu a contaminação, enquanto que as técnicas *ex situ* envolvem a remoção física do material contaminado para realização do processo de biorremediação (Skipper, 1998). Após atendido os critérios e definido o local, são estabelecidas as estratégias para a biorremediação.

Entre as estratégias usadas para a biorremediação de HAP no ambiente, destacam-se a biorremediação passiva, a bioestimulação, a bioaugmentação e o *landfarming*. Na biorremediação passiva ou intrínseca o HAP é

biodegradado pelos microrganismos nativos do solo, ao passo que na bioestimulação a biota degradadora recebe aporte de nutrientes entre outros, para estimular o seu crescimento. A bioaumentação envolve a inoculação de culturas puras e ou de consórcios microbianos, contendo microrganismos pré-selecionados, com comprovada capacidade de degradação e competição, para degradar compostos específicos (Struthers, 1998).

A seleção dos microrganismos usados na bioaumentação ocorre em estudos *in vitro*, nos quais são avaliados os potenciais metabólicos para a máxima degradação (Kastner et al., 1997). Em geral, a bioaumentação é mais apropriada para eliminar contaminantes muito recalcitrantes, em contaminações recentes e onde se pretende acelerar a degradação (Pradhan et al., 1998). Para seleção de microrganismos degradadores de determinados compostos, é necessário o crescimento em meio seletivo, contendo o composto desejado.

Para que ocorra a biodegradação é necessário que ocorra a síntese de enzimas pela microbiota do ambiente poluído (Leahy & Colwell, 1990). Desta forma, existem mecanismos inter-relacionados que podem contribuir para esta adaptação, como a indução e/ou desrepressão de enzimas específicas, as alterações genéticas que resultam em novas atividades metabólicas e o enriquecimento seletivo de organismos capazes de transformar os compostos (Cerniglia, 1993).

A degradação de vários compostos aromáticos do tipo naftaleno, xileno e tolueno são codificadas por plasmídeos, que podem ser transferidos para microrganismos com ou sem capacidade limitada de utilização de alguns destes compostos. Desta forma, a exposição de populações microbianas aos hidrocarbonetos pode conferir uma vantagem seletiva aos microrganismos, que possuem plasmídeos contendo genes catabólicos, resultando no aumento populacional destas espécies em relação às demais (Melo & Azevedo, 1997).

### **2.5.2 Uso do *landfarming* para a remediação de HAP no solo**

Conforme descrito anteriormente, o Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos (SITEL) do Polo Petroquímico, trata a borra oleosa produzida nas indústrias através do *landfarming*. Esta técnica de biorremediação pode ser definida como um sistema aberto, onde atuam processos físicos, químicos e

biológicos para degradar, transformar ou imobilizar resíduos orgânicos perigosos, adicionados a um solo não contaminado (Mielniczuk, 1991).

Os resíduos orgânicos perigosos, sólidos ou líquidos, são adicionados na camada arável do solo, onde se encontram a maioria da população heterotrófica, que realizarão a biodegradação (Boopathy, 2000). Estes microrganismos utilizam os compostos orgânicos presentes na borra oleosa, como única fonte de carbono e energia, oxidando-os até CO<sub>2</sub> e água. Muitos desses microrganismos são responsáveis pelo cometabolismo do resíduo, transformando moléculas recalcitrantes em moléculas intermediárias, que poderão ser utilizadas como fonte de carbono e energia pela maioria da microbiota presente no solo.

Para maximizar o potencial de degradação dos microrganismos heterotróficos, se faz necessário a incorporação e homogeneização do resíduo no solo. A incorporação dos resíduos ao solo, normalmente, é realizada por aração e gradagem para melhorar as condições de aeração, distribuição de água e de nutrientes (Song et al., 1985). Forma-se deste modo, uma camada com intensa atividade microbiana, funcionando como um biorreator natural. Contudo, a camada reativa com alta atividade microbiana é bastante variável, dependendo da profundidade da incorporação e das condições ambientais do local (Moreira & Siqueira, 2002).

O sucesso da biodegradação no sistema *landfarming* está relacionado a diversidade metabólica dos microrganismos e às limitações intrínsecas, do local, como depleção de nutrientes, baixa difusão de oxigênio, pH, temperatura, além da quantidade e frequência de aplicação de resíduos (Leahy & Colwell, 1990). Para a degradação destes resíduos é necessário a bioestimulação com nutrientes, onde se destacam o nitrogênio e fósforo como os mais exigidos. Uma relação C:N:P de 70:5:1 é considerado uma condição ótima de nutrientes para que ocorra a biodegradação da borra oleosa no sistema *landfarming*.

### **2.5.3 Eficiência da biorremediação com *landfarming***

Embora a bibliografia apresente uma série de vantagens do uso da técnica do *landfarming*, a biodegradação de resíduos neste sistema é um processo lento, e, em curto prazo, incompleto, com acúmulo dos resíduos mais recalcitrantes

no solo quando há reaplicações sucessivas. Assim, mesmo em áreas com vários anos de implantação do sistema *landfarming* é necessário melhorar a eficiência do processo de biodegradação, pressupondo uma população bem adaptada e condições ótimas de nutrição e aeração (Mielniczuk, 1991).

Após 14 anos da instalação do *landfarming* do SITEL, onde foi aplicado a borra em diferentes quantidades e frequências, o processo se mostrou ineficaz devido a baixa taxa de degradação observada (6% ao ano). Uma avaliação preliminar mostrou que esta baixa degradação é decorrente da grande quantidade de HAP presente na borra e de que a característica apolar deste resíduo, resultou em um composto de baixa solubilidade e de rápida sorção na matriz hidrofóbica do solo, com conseqüente baixa disponibilidade para a biota degradadora.

Para ocorrer a oxidação dos HAP é necessário que os microrganismos degradadores possuam mecanismos que aumentam a biodisponibilidade, em função da baixa solubilidade apresentada por estes compostos, como o caso do antraceno (que é de  $0,076 \text{ mg L}^{-1}$ ). Assim, a sua biodegradabilidade está diretamente relacionada à taxa de dissolução (Wick et al., 2001), mecanismos de aderência ao composto (Bastiens et al., 2000) ou produção de biosurfactantes (Garcia-Junco et al., 2001).

A bioestimulação com nitrogênio, fósforo e potássio, aumentou significativamente a degradação da borra oleosa e de seus componentes. Entretanto, o estímulo não foi suficiente para melhorar a eficiência de degradação, de modo a atender a demanda de borra gerada no SITEL. Por tratar-se de um resíduo contendo basicamente carbono e hidrogênio, é provável que a adição apenas de alguns macronutrientes não seja suficiente para a máxima expressão da atividade da biota degradadora. Em vista da importância metabólica do ferro para as reações catabólicas envolvidas na degradação de HAP e a baixa disponibilidade deste elemento no solo, é possível que fontes mais solúveis de ferro adicionadas ao solo estimulem a degradação dos HAP presentes na borra oleosa, aumentando, desta forma, a eficiência do *landfarming* e o volume e a freqüência de adição deste resíduo ao solo.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Isolamento de microrganismos degradadores de antraceno**

##### **3.1.1 Local e características da amostragem**

Para a amostragem de ambientes contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos foi escolhida a área de *landfarming* do Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes (SITEL) do Pólo Petroquímico de Triunfo, RS. Esta área apresenta um histórico de 14 anos com a disposição de resíduos sólidos do SITEL, e mais recente, de resíduos da Refinaria Alberto Pasqualini (REFAP), ambos com elevada carga de HAP. Foram selecionadas três células que recebiam os resíduos (borra oleosa) de diferentes destinos, sendo que duas células recebiam resíduos provenientes do SITEL e uma célula recebia resíduos da REFAP.

Dentro de cada célula foram escolhidos aleatoriamente dois pontos, onde se realizaram as coletas de solo. As coletas foram feitas em uma profundidade (de 0 a 30 cm) resultando em duas subamostras de solo por célula. Estas foram trazidas para o laboratório de solos da UFRGS em caixas de isopor e armazenadas à 4°C por uma noite. No dia seguinte, cada subamostra foi peneirada em malha de 2 mm e homogeneizada, retirando-se uma alíquota de 10 g. As alíquotas provenientes de cada célula foram misturadas para então formar uma amostra composta.

##### **3.1.2 Seleção de meios para o isolamento**

Inicialmente, foi feita a seleção de meios minerais adequados a biota do meio. Adicionaram-se 50 mL de três meios minerais (MM), com pH 7,0 (Apêndice 01), em frascos de 125 mL. Os meios foram esterilizados por autoclavagem a 121°C por 20 min, sendo posteriormente inoculados com 1 g de solo (amostra composta), proveniente das células do *landfarming*. As amostras foram incubadas sob agitação orbital à 150 rpm, em temperatura de 30°C, por um período de oito dias.

Após este período de incubação, foi retirada uma alíquota de 1 mL dos meios, que depois de diluída, foi inoculada 0,1 mL das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , em placas de Petry contendo ágar nutritivo (Apêndice 01) e incubadas a 30°C por 24 h. Após a verificação do crescimento de microrganismos, o meio Tanner foi selecionado e 1 mL deste meio, inoculado com solo, foi adicionado a frascos contendo o meio, mais 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno como única fonte de carbono. Os frascos foram incubados de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Após a incubação, foram realizadas transferências sucessivas das culturas, a cada 7 dias, durante 60 dias.

### **3.1.3 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados**

Após o período de transferências, foi retirado 1 mL do meio Tanner que foi diluído, plaqueado (0,1 mL das diluições  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) e incubado a 30°C por 24 horas. As colônias crescidas, que apresentaram diferenças visuais tais como: aspecto, tamanho, coloração, forma e borda da colônia, foram purificadas em placas de Petry, contendo agar nutritivo. Após a obtenção das culturas puras em meio sólido, estas foram repicadas para tubos de ensaio contendo agar inclinado e armazenadas sob refrigeração a 4°C.

### **3.1.4 Seleção dos isolados**

Durante o isolamento foram obtidos 26 isolados que apresentaram crescimento em meio contendo antraceno. Para selecionar os mais eficientes foi feita a análise da cinética de crescimento, onde foram estimados a taxa de crescimento, o tempo de geração e o número de gerações. A presença de surfactantes foi detectada pela diminuição da tensão superficial do meio mineral após o crescimento dos microrganismos.

## **3.2 Caracterização e condições de cultivo dos isolados selecionados**

### **3.2.1 Caracterização dos isolados selecionados**

Para a caracterização inicial dos isolados selecionados, foram realizados testes para avaliar a morfologia celular por microscopia ótica e o teste

de coloração de Gram.

### **3.2.2 Condições ótimas de cultivo**

As condições ótimas de cultivo dos isolados foram obtidas pela avaliação do crescimento em frascos de 125 mL. À estes frascos foram adicionados 50 mL do meio Tanner selecionado, contendo  $250 \text{ mg L}^{-1}$  de antraceno (exceto para o teste de concentrações), como única fonte de carbono, e foram avaliados o pH, a temperatura e a concentração de antraceno em um período de 24 horas de incubação em shaker sob agitação de 180 rpm. As curvas de crescimento foram obtidas pela contagem das unidades formadoras de colônias por mililitro ( $\text{UFC mL}^{-1}$ ) do meio Tanner incubado, em placas de Petry, após 24 horas. O crescimento foi avaliado em função de faixas de pH (5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 e 10), faixas de temperatura (20, 25, 30, 35 e  $40^\circ\text{C}$ ) e concentrações de antraceno (0, 125, 250, 500, 1000 e  $2000 \text{ mg L}^{-1}$ ). A degradação do antraceno pelos isolados foi avaliada pela cromatografia gasosa. Além da cromatografia gasosa, foi realizada a medida da tensão superficial dos meios de cultivo para a detecção da presença de biossurfactantes.

## **3.3 Efeito do ferro na degradação de antraceno e hidrocarbonetos**

### **3.3.1 Efeito do ferro na degradação do antraceno *in vitro***

O efeito do ferro na degradação de antraceno ( $250 \text{ mg L}^{-1}$ ) foi avaliado através do crescimento dos isolados selecionados, usando diferentes fontes e concentrações de ferro. Para avaliar o efeito das fontes no crescimento, foi adicionado 0,1 mM de  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , FeEDTA,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{FeSO}_4$  e Fe reduzido, mais um controle sem ferro. Deste teste foi escolhido a fonte  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  que foi adicionada ao meio Tanner, em diferentes concentrações (0; 0,01; 0,02; 0,1; 0,5 e 1 mM). Além da contagem dos isolados, o efeito do ferro na degradação do antraceno foi avaliado por cromatografia gasosa e pela detecção de biossurfactantes após 48 dias de incubação.

### **3.3.2 Efeito do ferro nos isolados em meio com hidrocarbonetos**

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial de

crescimento dos isolados em diferentes hidrocarbonetos. Para tal, foi adicionado ao meio Tanner 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno, fenantreno, pireno, gasolina, óleo diesel, benzeno, tolueno, xileno e etilbenzeno, como única fonte de carbono, com e sem adição de 0,1 mM de ferro [Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] e com a inoculação dos isolados pré-selecionados.

### 3.3.3 Efeito de ferro na degradação do antraceno no solo

O efeito do ferro na degradação do antraceno foi avaliado no solo em um experimento com quatro tratamentos submetidos a três concentrações de ferro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (0; 5 e 10%). Os tratamentos constaram de uma testemunha controle, da adição de antraceno (250 mg kg<sup>-1</sup>) (biorremediação passiva), da adição de antraceno e do consórcio dos isolados selecionados (222 A, 312 A e 332 C) (bioaugmentação) e da adição de antraceno, isolados e de fertilizantes (NPK) (bioestimulação). Como controles, foram adicionados ao experimento dois frascos sem solo e dois controles com acetona. As quantidades de NPK adicionadas, foram equivalentes a 20 Kg ha<sup>-1</sup>.

As adições dos tratamentos ao solo foram realizadas da seguinte maneira: O Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foi pesado em quantidades necessárias para alcançar os percentuais desejados e misturado ao solo. O antraceno foi solubilizado com acetona (10 mL) e posteriormente adicionado ao solo. A acetona foi volatilizada por um dia e, após este período, todos isolados pré-selecionados (222 A, 312 A e 332 C) foram adicionados ao solo, via 1 mL de meio Tanner, por isolado, contendo o número de células previamente contadas (10<sup>7</sup> UFC).

Como unidade experimental foi utilizado um frasco de 2 L, hermeticamente fechado, contendo 100 g de um Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico arênico (Unidade de mapeamento Itapuã, Apêndice 02). Este solo foi misturado e homogeneizado com os tratamentos em triplicata e a umidade ajustada e mantida em 80% da capacidade de campo. O experimento foi conduzido por 64 dias e durante este período foram feitas avaliações periódicas do CO<sub>2</sub> liberado pela decomposição do C-orgânico presente no solo. Os dados da respirometria foram submetidos a equações matemáticas para estimar o carbono potencialmente mineralizável, a taxa e a meia vida da decomposição (Alef, 1995).

### **3.4 Análises microbianas e cromatográficas**

#### **3.4.1 Análises microbianas**

Para a determinação da contagem de colônias (UFC) foi retirada alíquota de 1 mL do meio contendo as culturas, sendo esta submetida à diluição seriada em 9 mL de solução salina de (0,85%), e posteriormente plaqueada em meio ágar nutritivo, usando as três maiores diluições. As placas inoculadas eram incubadas a 30°C por 24 horas e após este período, as colônias eram contadas. Foram utilizadas 100 UFC mL<sup>-1</sup> como inóculo inicial. A análise respirométrica foi obtida pela liberação do CO<sub>2</sub> que reagiu com NaOH de acordo com a metodologia descrita por Alef (1995).

A detecção de biossurfactantes foi obtida pela medida da tensão superficial do meio de crescimento dos isolados crescendo em antraceno livre de células. Para isto foi realizada uma centrifugação a 10.000 rpm por 30 min a 4°C, onde o conteúdo do sobrenadante da centrifugação foi submetido à medida da tensão superficial em tensiômetro Leconte Du Nouy (Desai & Banat, 1997).

#### **3.4.2 Análises cromatográficas**

O antraceno foi inicialmente extraído para posterior análise no cromatógrafo. A extração do antraceno do meio de cultura foi feita, inicialmente, pela acidificação até pH 2,0, seguido de três extrações, em funil de decantação, com 20 mL de diclorometano cada. Após as extrações foi adicionado NaSO<sub>4</sub> ao diclorometano para retirar o excesso de água (Shuttleworth & Cerniglia, 1996).

O material extraído foi analisado em cromatógrafo gasoso (Agilent 6890), equipado com coluna 5% Fenil Metil Polisiloxano e detector de massas, no qual foi injetado 0,2 µL das amostras, com uma razão de split de 1:50 com injetor automático. A temperatura do forno foi de para 40°C por um minuto, seguido de 6°C min<sup>-1</sup> até 220°C, mantendo isotérmica por um minuto e aquecimento de 15°C min<sup>-1</sup> até 300°C.

### **3.5 Análise de crescimento, cinética de degradação e estatística**

#### **3.5.1 Análise de crescimento**

Os resultados da contagem dos isolados foram utilizados para a

estimativa da cinética de crescimento. A taxa de crescimento, o número de gerações e o tempo de gerações foram estimados pelas fórmulas:  $K = (\log N_t - \log N_0) / 0,301 \cdot t$ ,  $N = (\log N_t - \log N_0) / 0,301$  e  $G = 1/k$ , respectivamente, onde:  $N_0$  = número inicial de células,  $N_t$  = número total de células (Prescott et al., 1997).

### 3.5.2 Cinética de degradação

Os resultados da respirometria no experimento com solo foram submetidos a uma equação exponencial ( $C - CO_2 = C - CO_{2max} \cdot e^{-kt}$ ) para a estimativa da taxa de degradação ( $k$ ) e a uma equação hiperbólica ( $C - CO_2 = C - CO_{2max} [t] / [t]_{1/2} + [t]$ ) para a estimativa da meia-vida da reação ( $t_{1/2}$ ). Os dados foram ajustados utilizando-se o programa Sigma Plot 8.02 (Jandel Scientific Software, San Rafael, Califórnia).

### 3.5.3 Análise estatística

O efeito das formas e concentrações do ferro no crescimento dos isolados na presença de antraceno, fenantreno, pireno, gasolina, óleo diesel, benzeno, tolueno, xileno e etilbenzeno, foi avaliado pela análise de variância e as diferenças comparadas pelo teste de médias de Tuckey, ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados da respirometria no experimento com solo também foram submetidos aos mesmos testes estatísticos (F e de médias) descritos anteriormente, utilizando o programa SANEST (Sistema de Análise Estatística). Os quadros de análise de variância são apresentados no Apêndice 03.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de antraceno**

#### **4.1.1 Isolamento de microrganismos degradadores de antraceno**

Para o isolamento de microrganismos com habilidade de degradar antraceno foram utilizadas áreas com um histórico de disposição de resíduos no solo contendo este composto e outros hidrocarbonetos. O solo foi inoculado em meio mineral contendo antraceno como única fonte de carbono e de energia. Após 60 dias de transferências sucessivas em condições controladas foram pré-selecionados 26 isolados que apresentaram crescimento no meio com antraceno e pela diversidade morfológica.

Todos os isolados eram bactérias, onde 23 apresentaram forma de bastonetes, sendo 18 Gram negativos e 5 Gram positivos. Os outros 3 isolados apresentaram a forma de cocos, sendo 2 Gram negativos e 1 Gram positivo. De modo geral, todos os isolados apresentaram um bom crescimento em meio mineral contendo antraceno, com o número máximo de UFC apresentado pelo isolado 332 C (12,82 Log UFC) e o mínimo, pelo isolado 231 B (7,00 Log UFC), partindo ambos de um inóculo médio inicial de, aproximadamente, 1,60 Log UFC (Figura 1). O aumento do número de células dos isolados ocorreu em uma escala logarítmica até as 48 horas de incubação, seguido de uma fase linear até o final do experimento.

Em termos de número, o comportamento apresentado pelos isolados após as 48 horas, quando cessou a fase logarítmica e iniciou a fase linear, foi inicialmente interpretado como uma provável diminuição dos nutrientes no meio e uma possível diminuição da disponibilidade do antraceno. A adição de glicose em substituição ao antraceno (concentração igual de carbono) apresentou um maior número, sugerindo que não havia limitação nutricional. O aumento do número de

bactérias (UFC) de forma linear em presença de antraceno estaria relacionado a uma provável baixa disponibilidade para os microrganismos.

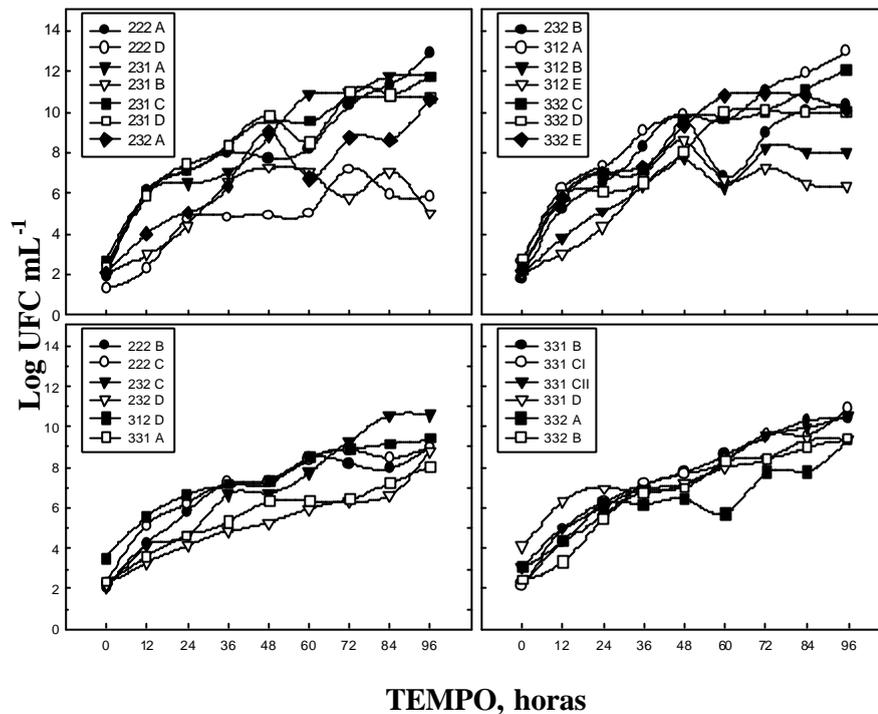


FIGURA 1. Curvas de crescimento de 26 isolados bacterianos em meio mineral contendo 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno.

Compostos como antraceno possuem baixa solubilidade em água, o que dificulta o ataque enzimático dos degradadores. Porém, muitos microrganismos degradadores possuem mecanismos que aumentam a sua disponibilidade às células. Entre os mecanismos destaca-se a produção de biossurfactantes, a presença de um sistema de absorção por alta afinidade pelo substrato (aumentando o fluxo de dissolução do substrato) e a redução da distância entre a célula e o substrato por meio de estruturas de adesão na superfície das células (Harms & Bosna, 1997).

Para avaliar a provável existência de mecanismos envolvidos na captação de substrato pela célula, foi avaliada a produção de biossurfactantes. Estes compostos surfactantes foram detectados, pela redução na medida da tensão

superficial do meio de cultivo livre de células, após o crescimento em antraceno. Os resultados indicaram que não houve produção de surfactantes pelos isolados selecionados neste período. É possível que esta ausência se justifique devido ao curto período de incubação a que os isolados foram submetidos (4 dias).

O menor número de bactérias a partir de 48 horas deve-se provavelmente, a equivalência entre a taxa de dissolução do antraceno em equilíbrio com a atividade metabólica dos isolados. Resultados semelhantes foram obtidos por Wick et al. (2001), onde observaram que a cinética de crescimento era proporcional a taxa de dissolução do antraceno, sendo esta proporcional a quantidade de antraceno no meio. No mesmo trabalho, para concentrações de 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 g L<sup>-1</sup> de antraceno houve uma fase lag de 60 horas, que não foi observado no presente trabalho. Isto provavelmente é devido ao longo período de enriquecimento (60 dias), precedido por transferências semanais, visando a não limitação por nutrientes e a eliminação de um possível efeito tóxico por compostos intermediários produzidos durante a degradação.

O aumento exponencial do número de bactérias nas primeiras 48 horas pode estar relacionado à taxa máxima do fluxo da dissolução, compartilhado com o contínuo crescimento celular. Após este período, a necessidade metabólica da biomassa celular supera o fluxo da dissolução, demonstrando a forte dependência da concentração do antraceno no meio com a cinética de crescimento, conforme observado por Harms (1996).

#### **4.1.2 Seleção de microrganismos degradadores de antraceno**

Para dar continuidade aos estudos com um menor número de isolados, foi necessário uma nova seleção entre os 26 isolados obtidos. Utilizou-se como critério de seleção, o melhor desempenho em meio mineral, contendo antraceno, a partir da estimativa dos parâmetros cinéticos de crescimento, utilizando os resultados do número de bactérias (UFC), durante 96 horas de incubação (Tabela 1). Os isolados 222 A, 312 A e 332 C foram os únicos a apresentarem números de células acima de 12 Log UFC, bem como apresentaram os maiores números de gerações por hora e o maior número de gerações. Além disso, os isolados apresentaram diferenças morfológicas distintas, que podem qualificá-los como

pertencentes a espécies diferentes e, conseqüentemente, maior potencial para a utilização em consórcios microbianos.

TABELA 1. Log UFC no início e ao final da contagem dos isolados crescendo em meio mineral contendo antraceno, durante 96 horas e os parâmetros cinéticos de crescimento dos isolados.

<b>Isolado</b>	<b>Log UFC<sub>0</sub></b>	<b>Log UFC<sub>1</sub></b>	<b>K</b>	<b>G</b>	<b>N</b>
<b>222 A</b>	<b>1,90</b>	<b>12,31</b>	<b>0,36</b>	<b>2,80</b>	<b>34,58</b>
222 D	1,00	7,96	0,24	4,15	23,12
231 A	2,28	10,81	0,30	3,39	28,34
231 B	1,00	7,00	0,21	4,82	19,93
231 C	2,68	10,68	0,28	3,61	26,58
231 D	2,28	10,81	0,30	3,39	28,34
232 A	2,00	10,60	0,30	3,36	28,57
231 B	1,85	10,38	0,30	3,39	28,34
<b>312 A</b>	<b>2,66</b>	<b>12,63</b>	<b>0,34</b>	<b>2,9</b>	<b>33,12</b>
312 B	1,00	8,23	0,25	4,00	24,02
312 E	1,00	7,26	0,22	4,62	20,80
<b>332 C</b>	<b>2,26</b>	<b>12,82</b>	<b>0,36</b>	<b>2,76</b>	<b>35,08</b>
332 D	2,78	10,11	0,25	3,94	24,35
332 E	2,20	10,08	0,27	3,67	26,18
222 B	2,00	8,95	0,24	4,16	23,09
222 C	2,32	8,95	0,23	4,36	22,03
232 C	2,08	10,60	0,29	3,39	28,31
232 D	2,18	8,78	0,23	4,38	21,93
312 D	3,52	9,40	0,20	4,91	19,53
331 A	2,32	8,04	0,20	5,05	19,00
331 B	2,32	10,40	0,28	3,58	26,84
331 CI	2,11	10,90	0,30	3,29	29,2
331 CII	3,11	10,52	0,26	3,90	24,62
331 D	3,08	9,40	0,22	4,57	21,00
332 A	3,11	9,30	0,21	4,67	20,56
332 B	2,49	9,45	0,24	4,15	23,12

Log UFC<sub>0</sub> = UFC no início; Log UFC<sub>1</sub> = Log UFC ao final; K = gerações por hora; G = tempo de geração; N = número de gerações.

#### 4.2 Caracterização das condições de cultivo dos isolados

Com base na cinética de crescimento e na morfologia celular foram escolhidos três isolados (222 A, 312 A, 332 C) com maior potencial de crescimento em meio mineral contendo antraceno, como única fonte de carbono e energia. Na continuidade do estudo, estes isolados foram avaliados quanto às condições ótimas

de cultivo, dando ênfase ao efeito da temperatura, pH e de concentrações de antraceno.

#### 4.2.1 Temperatura

O primeiro teste realizado com o objetivo de analisar os principais fatores que afetam o crescimento dos isolados foi à avaliação de diferentes temperaturas (Figura 2). Ambos isolados apresentam maior número em temperaturas próximas

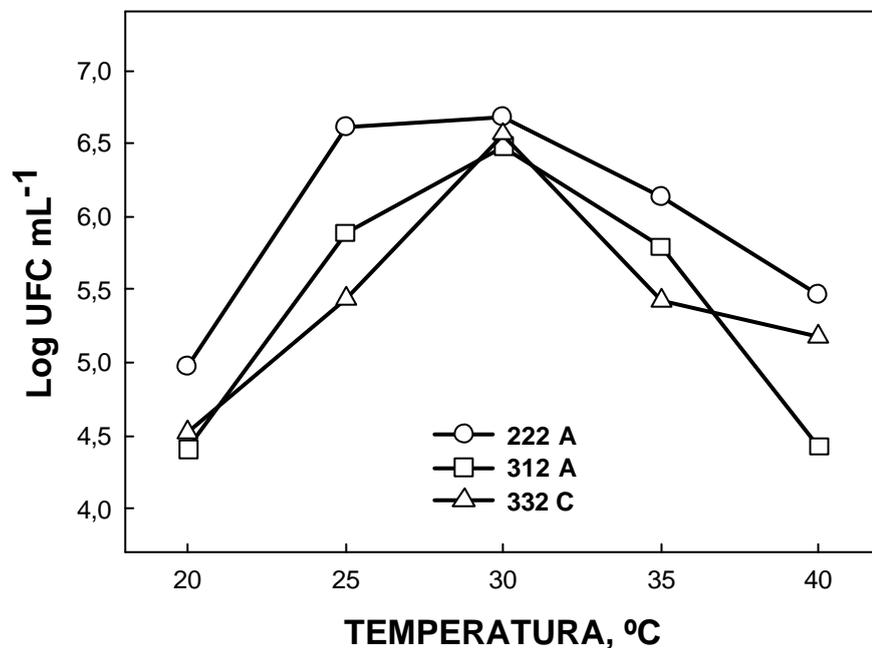


FIGURA 2. Efeito de diferentes temperaturas no número de células de três isolados crescendo em meio mineral contendo 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno, após 24 horas de incubação.

a 30°C, tendo o isolado 222 A apresentado o maior número em relação aos demais. De modo geral, a biodegradação de HAPs pode ocorrer em uma ampla faixa de temperatura, variando de 0° a 70°C, tendo o máximo metabolismo em temperaturas entre 30° e 40°C (Sorkhoh et al., 1993).

A temperatura influencia a biodegradação tanto pela característica estrutural do HAP, como também pela alteração na população microbiana. A temperatura com melhor resposta ao crescimento obtida no presente trabalho pode

ter sido influenciada pela época da coleta do solo contaminado, utilizado como inóculo inicial. Esta coleta foi realizada no mês de janeiro, período em que as temperaturas médias do solo se aproximaram da temperatura que apresentou melhor resposta ao crescimento dos isolados em presença de antraceno.

A temperatura varia no ambiente em função das estações do ano, causando mudanças cíclicas na composição da comunidade microbiana existente em locais contaminados. O efeito da variação da temperatura ao longo do ano foi verificado por Atlas & Bartha (1972), os quais observaram que microrganismos isolados no inverno possuíam maior capacidade de degradar petróleo à 5°C.

#### 4.2.2. pH

Para avaliar o pH em que os três isolados selecionados apresentavam o ótimo de crescimento, foram utilizados seis faixas de pH (5,0 a 10,0) na temperatura de 30°C, em presença de 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno (Figura 3). Foi

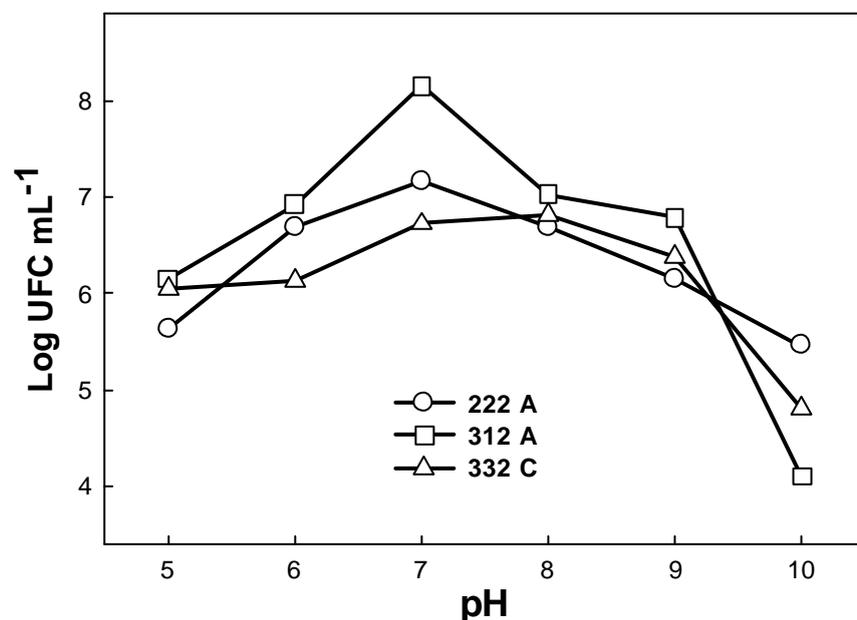


FIGURA 3. Efeito de diferentes pH no número de células de três isolados crescendo em meio mineral contendo 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno, à 30°C, após 24 horas de incubação.

verificado que ao final do experimento, todos os isolados apresentaram o maior número de colônias em pH próximo de 7,0, decrescendo significativamente quando testados nas faixas extremas de pH (5,0 e 10,0).

O isolado 312 A apresentou o maior número de células em relação aos demais em todas as faixas de pH testadas, com exceção do pH 10,0. A variação do número do isolado 222 A entre os pH testados foi menor do que a variação apresentada pelos demais. Esta maior resistência do isolado em alterar o seu crescimento em função das mudanças de pH pode representar uma vantagem para o uso em outros ambientes com pH diferentes da neutralidade.

O valor de pH em que os isolados apresentaram o maior número de células, deve-se, provavelmente, a faixa de pH da área de *landfarming* onde foi feita a coleta do inóculo. Nesta área foi adicionado durante 14 anos, borra oleosa com pH variando entre 6,9 e 7,1. Além disso, no meio em que foram feitas as transferências sucessivas e a seleção dos isolados, estava ajustado inicialmente para pH 7,0.

#### **4.2.3. Concentrações de antraceno**

O teste das concentrações de antraceno, visando a obtenção de indicadores de resistência dos isolados ao composto e a estimativa da degradação pela análise cromatográfica foi realizada após a obtenção dos valores de temperatura e pH ótimos para o crescimento dos isolados. Neste ensaio, pode-se observar que até a concentração de 2.000 mg L<sup>-1</sup> de antraceno, não houve efeito inibitório ao crescimento (Figura 4). Entre os isolados, não houve diferenças em número de células em função do aumento das concentrações de antraceno no meio mineral após às 24 horas de ensaio.

Os isolados apresentaram um maior número, obedecendo uma cinética de primeira ordem, em concentrações de até 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno, seguido de uma fase estacionária, obedecendo a uma cinética de ordem zero. Este comportamento pode indicar que a quantidade de antraceno disponível foi suficiente para a necessidade metabólica dos isolados e neste caso, o crescimento dos diferentes isolados foi máximo e, equivalente para as diferentes concentrações. Provavelmente, se o ensaio tivesse sido conduzido por um maior período de tempo,

as maiores concentrações apresentariam os maiores crescimentos, em função da maior taxa de dissolução, o que não ocorreria para as concentrações menores. Com base nestes resultados, a concentração de 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno foi à escolhida para os testes subsequentes, pois a mesma não foi inibitória e nem tampouco limitante ao crescimento.

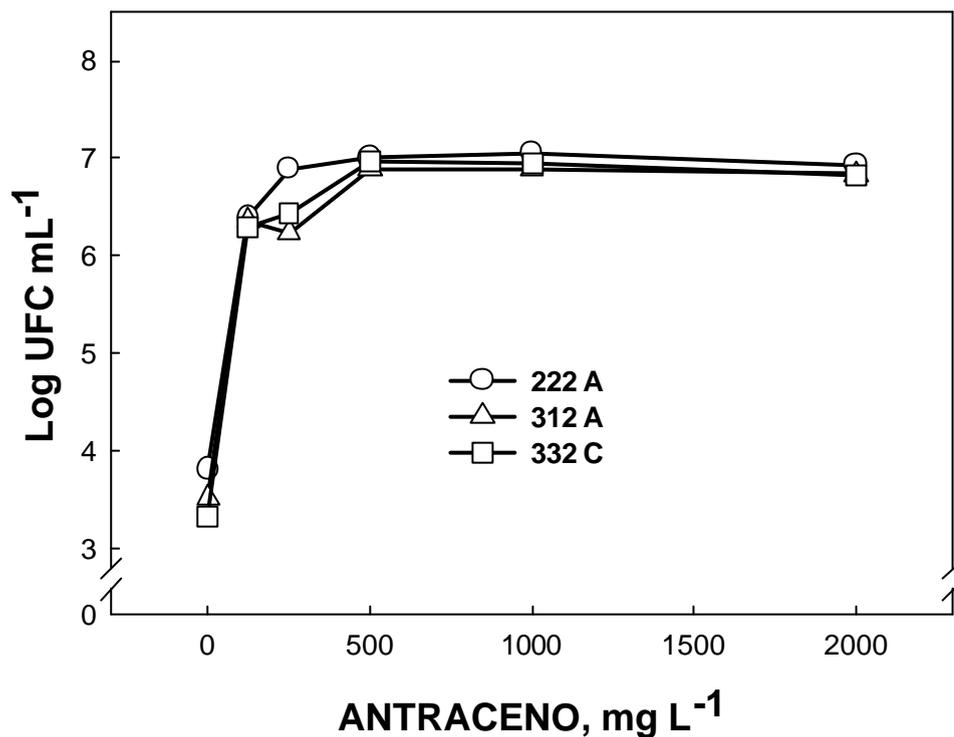


FIGURA 4. Efeito de concentrações de antraceno no número de células de três isolados crescendo em meio mineral a pH 7,0 e a 30°C, após 24 horas de incubação.

#### 4.2.4 Degradação do antraceno pelos isolados

Após a avaliação dos principais fatores que afetam o número e o crescimento dos isolados em presença de antraceno, foi observado que os mesmos apresentaram o melhor desempenho quando crescendo em temperaturas próximas a 30°C, pH 7,0 e em concentrações de antraceno próximas a 250 mg L<sup>-1</sup>. De posse dessas informações, os isolados foram incubados em um novo ensaio por 48 dias com o objetivo de avaliar o potencial máximo dos isolados em degradar o

antraceno, atendendo as condições ótimas de crescimento determinadas anteriormente.

Nas condições do experimento, os resultados apresentados pela análise cromatográfica mostraram que os isolados foram capazes de degradar o antraceno, em diferentes intensidades (Figura 5). Em média, a degradação de antraceno pelos isolados foi de 50,2%. O isolado 312 A apresentou a máxima porcentagem de degradação (71,7%), representando um acréscimo de 42,8% de degradação em relação média da degradação dos demais isolados. Os isolados 312 A e 332 C apresentaram 56,5 e 24,4% de degradação de antraceno, respectivamente.

Para avaliar se os isolados apresentavam algum mecanismo para o aumento da disponibilidade do antraceno à degradação, foi feito novamente à detecção de biossurfactantes através do acompanhamento da redução da medida da tensão superficial do meio. Na primeira tentativa de detecção (item 4.1.1) não foi observado a presença de surfactantes produzidos pelos isolados, devido, provavelmente, ao curto período de incubação (4 dias). Com o aumento do período para 48 dias, foi detectada uma redução significativa da tensão superficial, indicando que parte da degradação pode ser atribuída ao aumento da disponibilidade do antraceno, devido a produção de biossurfactantes.

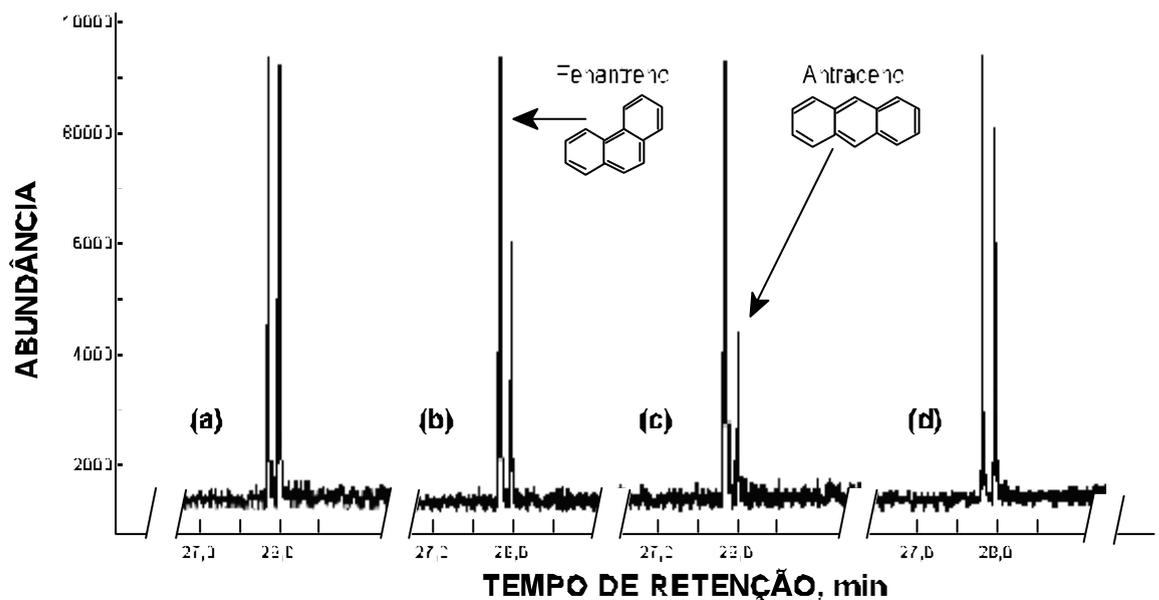


FIGURA 5. Degradação do antraceno pelos isolados 222 A (b), 312 A (c) e 332 C (d) em relação à concentração inicial (a).

O meio mineral Tanner utilizado durante os ensaios de crescimento dos isolados apresentou valor próximo ao encontrado para a água destilada (69,2 dinas  $\text{cm}^{-1}$ ) e outros compostos para calibrar o tensiômetro. O meio contendo o isolado 222 A foi responsável pela maior redução da tensão superficial (33,2 dinas  $\text{cm}^{-1}$ ), seguido dos demais isolados, cuja redução média foi de apenas 10,9 dinas  $\text{cm}^{-1}$ . Neste caso, a degradação do antraceno apresentada pelo isolado 222A pode ter sido influenciada, significativamente, pela capacidade deste em reduzir a tensão superficial do meio aquoso. O isolado 312 A, que apresentou a maior taxa de degradação (71,7%), teve a tensão superficial reduzida para 58,3 dinas  $\text{cm}^{-1}$ , demonstrando que seu aparato enzimático é suficiente para a degradação do antraceno, sem a necessidade inicial de diminuir a tensão superficial do meio.

Um microrganismo eficiente em produzir biossurfactantes deve reduzir a tensão superficial para valores próximos a 30,0 - 35,0 dinas  $\text{cm}^{-1}$  (Desai and Banat, 1997). Apesar do isolado 222 A ter sido enquadrado como um bom produtor de surfactante, existem ainda bactérias que produzem surfactinas (biossurfactante composto de lipo-peptídeos produzido por *Bacillus subtilis*) capazes de reduzir a tensão superficial de soluções aquosas para até 27 dinas  $\text{cm}^{-1}$ . Para aumentar o rendimento da produção de biossurfactantes, tem sido proposto a adição de sais de ferro ou de manganês (Wei & Chu, 1998).

### **4.3 Efeito do ferro *in vitro***

#### **4.3.1 Efeito de fontes de ferro**

O efeito de fontes de ferro na contagem dos isolados bacterianos, crescendo em meio com 250 mg  $\text{L}^{-1}$  antraceno, foi avaliado utilizando-se fontes solúveis e insolúveis e os três isolados selecionados anteriormente, em comparação a contagem dos isolados na ausência de ferro (Tabela 2). Independente das fontes de ferro, o isolado 222 A apresentou a maior contagem na presença de ferro e antraceno do que os demais isolados. Este isolado apresentou, anteriormente, a segunda maior taxa de degradação de antraceno (item 4.2.4) na ausência de ferro entre os isolados. Entre as fontes de ferro, as solúveis apresentaram maior efeito sobre a contagem dos isolados, com destaque para as fontes  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  e  $\text{FeSO}_4$ . Entretanto, tem sido relatado que a fonte de ferro contendo sulfato acidificou o meio

de cultivo para pH inferior a 5,0 após 140 horas de incubação (Wei & Chu, 1998). Neste caso, é preferível a fonte com nitrato para evitar que a acidificação possa inibir a atividade dos isolados, pois apresentam o seu pH ótimo de crescimento em torno da neutralidade.

Entre as fontes solúveis, a maior contagem ocorreu quando foi adicionado  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  no meio onde cresceu o isolado 222 A. Esta fonte também foi responsável pela maior contagem do isolado 312 A. Estes mesmos isolados apresentaram uma menor contagem do que o controle sem ferro quando foi adicionado óxido de ferro no meio com antraceno (Tabela 2). A menor contagem observada no meio contendo  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  pode ser atribuída a baixa solubilidade desta forma de ferro, a qual possui alta cristalinidade e uma baixa taxa de dissolução.

TABELA 2. Efeito de fontes de ferro no número de células de três isolados, crescendo em meio mineral contendo 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno, a pH 7,0 e a 30°C.

Fontes de ferro	Isolados		
	222 A	312 A	332 C
	----- Log UFC mL <sup>-1</sup> -----		
Ferro reduzido ( $\text{Fe}^0$ )	6,72 a	5,78 bc	5,92 ab
Nitrato de ferro [ $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ ]	7,34 a	6,67 a	6,46 ab
Óxido de ferro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )	5,38 c	5,17 c	5,63 ab
Sulfato de ferro ( $\text{FeSO}_4$ )	6,78 a	6,93 a	6,60 a
Ferro EDTA	6,74 a	7,02 a	6,53 ab
Cloreto de ferro ( $\text{FeCl}_3$ )	6,58 ab	6,50 a	6,44 ab
Sem ferro	5,50 bc	5,28 c	5,52 b
DMS 5%	1,12	0,85	1,06

Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem significativamente entre fontes de ferro ( $p < 0,05$ );

Glasauer et al. (2001) demonstraram que o ferro, na forma de óxidos e hidróxidos, é absorvido na parede celular, inicialmente por atração reversível do tipo forças de Van der Waals, para posterior interação irreversível através de ligações químicas. Esta interação ocorre em função da superfície da parede das células

microbianas possuírem cargas negativas e os óxidos e hidróxidos possuírem carga positiva (pH neutro a alcalino). Além disso, a interação entre estes minerais e a parede celular é de difícil reversão, visto que moléculas orgânicas formam ligações covalentes e iônicas com os óxidos e hidróxidos. Estas interações interferiram, provavelmente, na absorção de outros elementos necessários ao crescimento da célula, justificando o menor crescimento que o controle.

Além do efeito da baixa solubilidade do óxido de ferro e do efeito indireto na absorção de outros nutrientes, tem sido relatado que a fonte de ferro insolúvel utilizada no presente trabalho (hematita -  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) aumenta a genotoxicidade do HAP benzo(a)pireno no trato respiratório de mamíferos (Garry et al., 2003). De acordo com estes autores, o aumento das propriedades carcinogênicas do benzo(a)pireno no pulmão pela presença de hematita, se deve ao aumento dos metabólitos cancerígenos do benzopireno e das espécies ativas do oxigênio, ambos gerados pelo citocromo P450 1A1. Os estudos epidemiológicos têm demonstrado o potencial etiológico da co-exposição de óxidos de ferro e HAP pelo excesso de mortes de mineiradores por câncer no pulmão (Garçon et al., 2001). É possível que os isolados, principalmente, o 222 A e o 312 A tenham sido inibidos não somente pela insolubilidade da fonte de ferro mas por algum efeito tóxico resultante da interação antraceno-óxido de ferro.

#### **4.3.2. Efeito da concentração de ferro**

Apesar de não existirem diferenças marcantes entre as fontes solúveis de ferro na contagem dos isolados crescendo em meio com antraceno, foi utilizado o  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  para avaliar o efeito da concentração de ferro sobre o crescimento dos isolados (Figura 6). As concentrações de ferro avaliadas variaram desde a ausência até 1 mM de ferro. Entretanto, a partir da adição de 0,5 mM, o ferro inibiu, significativamente, a contagem dos isolados, não permitindo o crescimento dos mesmos nas concentrações mais elevadas. Este efeito ocorreu, provavelmente, em função da elevada solubilidade do  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  que associado a alta concentração adicionada ao meio causou toxidez às células, uma vez que os melhores crescimentos foram obtidos em concentrações cerca de 10 a 20 vezes menores que as concentrações que causaram o efeito inibitório.

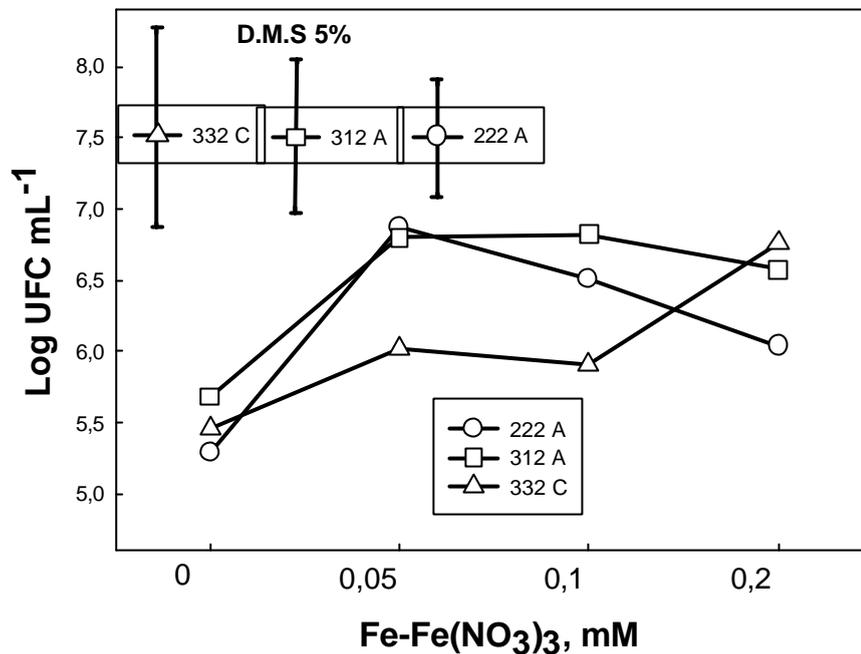


FIGURA 6. Efeito de concentrações de ferro [Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] no número de células de três isolados, crescendo em meio mineral contendo 250 mg L<sup>-1</sup> de antraceno, a pH 7,0 e a 30°C.

A adição de ferro em diferentes concentrações afetou a contagem dos isolados no meio contendo antraceno. Por outro lado, a ausência de ferro resultou na menor contagem entre os isolados. Os isolados 222 A e 312 A apresentaram uma maior contagem em concentrações entre 0,05 e 0,1 mM ao passo que o isolado 332 apresentou a maior contagem na maior concentração de ferro adicionada que não implicou em inibição (0,2 mM). Relatos sobre o efeito da concentração do ferro na degradação de antraceno ou de HAP não foram encontrados na literatura, apesar do ferro fazer parte das enzimas envolvidas na degradação de HAP, como co-fator e/ou grupo prostético.

#### 4.3.3. Efeito do ferro em diferentes hidrocarbonetos

A concentração de 0,1 mM de Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> foi utilizada para avaliar o efeito do ferro na contagem dos isolados crescendo em meio mineral com diferentes hidrocarbonetos. Foram utilizados três HAP (antraceno, fenantreno e pireno), dois

combustíveis (gasolina e óleo diesel) e quatro componentes de combustíveis (tolueno, xileno, benzeno, etilbenzeno).

A análise estatística mostrou que houve diferenças significativas para a contagem dos isolados crescendo nas diferentes fontes de hidrocarbonetos, na presença e ausência do ferro (Anexo 04). Independente de fontes de hidrocarbonetos, a adição de 0,1 mM de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  estimulou o aumento da contagem de todos os isolados (Tabela 3). Como destaque, o isolado 332 C apresentou, em média, a maior e a menor contagem de colônias em presença e ausência de ferro, respectivamente, entre os isolados. A adição de ferro no meio contendo os HAP antraceno, pireno e fenantreno estimulou o aumento do número de colônias, principalmente, dos isolados 222 A e 332 C.

O número de bactérias crescendo no meio com óleo diesel e gasolina aumentou com a adição de ferro e em algumas situações apresentou número semelhante ao dos HAP. O crescimento dos isolados pode ter ocorrido pela utilização como fonte de carbono, a fração leve e alifática presente nestes compostos. Nos demais substratos (tolueno, xileno, benzeno, etilbenzeno) ocorreu a total inibição do crescimento dos isolados (dados não apresentados), com a toxidez e morte das células microbianas. Este comportamento era esperado uma vez que a maioria destes componentes de combustíveis são solventes, com acentuada ação biocida. Apesar do óleo diesel e gasolina serem uma mistura dos compostos em que não houve crescimento dos isolados, a quantidade adicionada ao meio quando na forma de óleo diesel e gasolina, é muito inferior ao que foi adicionado separadamente, reforçando o efeito de toxidez.

De modo geral, os isolados que cresceram em presença de HAP apresentaram maior número em relação aos que cresceram em presença de óleo diesel e gasolina, principalmente, em presença de ferro. A maioria dos genes que codificam as enzimas responsáveis pela degradação de compostos aromáticos se encontram em DNA extracromossomal (plasmídeos) e na maioria são induzidas pelo substrato. Deste modo, é possível que o longo período de crescimento em meio contendo antraceno como única fonte de carbono e energia selecionou somente os microrganismos mais aptos a indução destas enzimas.

TABELA 3. Efeito da adição de 250 mg L<sup>-1</sup> de diferentes hidrocarbonetos no número de células de três isolados crescendo na presença e na ausência de 0,1 mM de ferro [Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] a pH 7,0 e a 30°C.

Hidrocarboneto	ISOLADOS					
	222 A		312 A		332 C	
	Sem Fe	Com Fe	Sem Fe	Com Fe	Sem Fe	Com Fe
	----- Log UFC mL <sup>-1</sup> -----					
Antraceno	5,72 bA	7,75 aA	5,23 bAB	6,57 aAB	5,40 bAB	7,14 aA
Pireno	5,92 bA	6,86 aB	5,48 bAB	6,67 aAB	5,44 bAB	7,07 aA
Fenantreno	5,78 bA	6,45 aB	4,80 bB	7,18 aA	5,00 bBC	7,04 aA
Gasolina	5,80 bA	6,32 aB	5,70 bA	6,20 aB	4,69 bC	6,96 aA
Diesel	6,14 bA	6,36 aB	5,57 bAB	6,83 aAB	5,91 bA	6,73 aA
dms 5%	0,52		0,48		0,41	
DMS 5%	0,87		0,80		0,69	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, não diferem significativamente entre adição ou não de ferro (dms 5%; p<0,05); médias seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem significativamente entre hidrocarbonetos (DMS 5%; p<0,05).

#### 4.3.4 Efeito do ferro na degradação do antraceno

Os isolados selecionados degradaram em torno de 50% do antraceno adicionado ao meio mineral após 48 dias de incubação (item 4.2.4). Para avaliar o efeito do ferro no estímulo a degradação do antraceno, foi adicionado 0,1 mM de ferro [Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] no meio. Nas condições do experimento, os resultados apresentados pela análise cromatográfica mostraram que os isolados foram capazes de degradar o antraceno em presença do ferro, em diferentes intensidades (Figura 7).

Em média, a degradação de antraceno na presença de ferro foi de 63,0%, comparado a degradação de antraceno na ausência do ferro (50,2%) (Tabela 4). Entre os isolados, o 332 C apresentou o maior estímulo a degradação de antraceno quando foi adicionado ferro em relação a não adição (83%). Apesar de ter aumentado apenas 28% da degradação do antraceno quando em presença de ferro, o isolado 222 A apresentou a mais alta porcentagem de degradação (72,4%) de antraceno verificada em todos os tratamentos, como resultado do

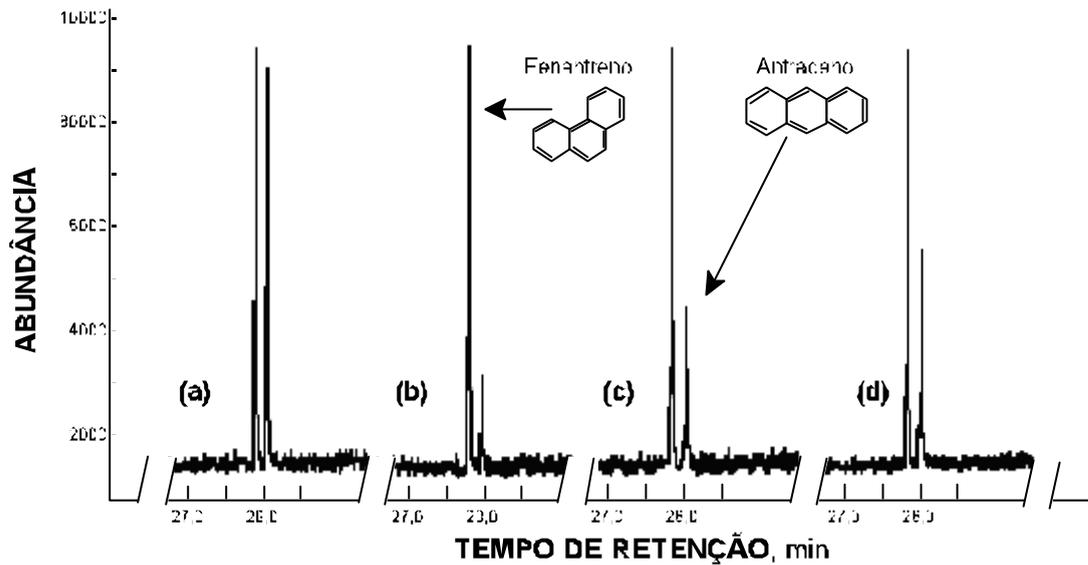


FIGURA 7. Degradação do antraceno em presença de 0,1 mM de  $[\text{Fe}(\text{NO}_3)_3]$  pelos isolados 222 A (b), 312 A (c) e 332 C (d) em relação à concentração inicial (a).

estímulo proporcionado pelo ferro. O isolado 312 A não foi estimulado pelo ferro na degradação do antraceno.

A detecção de biosurfactantes foi observada apenas no isolado 222 C e esta foi estimulada pela adição de ferro. Nos demais isolados não foi detectado em quantidades consideráveis para caracterizá-los como produtores de surfactantes. A análise das variáveis degradação do antraceno, detecção de biosurfactante e adição de ferro mostrou uma relação distinta entre os isolados. O isolado 222 A teve a sua degradação estimulada pelo ferro e diminuiu a tensão superficial, ao passo que o isolado 332 C, que também foi estimulado por ferro, não reduziu a tensão superficial. Já o isolado 312 A não foi estimulado pelo ferro nem produziu surfactantes.

O estímulo do ferro à produção de surfactantes detectado no isolado 222 A foi recentemente descrito por Wei et al. (2003). Estes autores verificaram que a suplementação de ferro conduziu a uma superprodução de surfactina e aumentou

a biomassa do *Bacillus subtilis* (ATCC 21332) que a produziu.

TABELA 4. Porcentagem de degradação do antraceno e detecção de biossurfactantes pelos isolados 222 A, 312 A e 332C, na presença e na ausência de 0,1 mM de ferro [Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] após 48 dias de incubação a pH 7,0 e a 30°C.

Tratamento	Isolados	Concentração <sup>(1)</sup>	Degradação <sup>(2)</sup>	Tensão superficial <sup>(3)</sup>
		— mg L <sup>-1</sup> ---	---- % ----	---- dinas cm <sup>-1</sup> ----
Sem ferro	222 A	96,4	56,5	36
	312 A	62,8	71,7	58,3
	332 C	167,6	24,4	58,6
Com ferro	222 A	57	72,4	26,2
	312 A	57,6	72	58,4
	332 C	114,2	44,6	58

<sup>(1)</sup> Concentração de antraceno no meio determinada por cromatografia gasosa;

<sup>(2)</sup> Porcentagem de degradação em relação a quantidade inicial de antraceno no meio sem (221,6 mg L<sup>-1</sup>) e com ferro (206,2 mg L<sup>-1</sup>);

<sup>(3)</sup> Detecção de biossurfactantes utilizando como referência a água destilada (69,2 dinas cm<sup>-1</sup>).

Foi observado que para aumentar o crescimento do *B. subtilis* era necessário um excesso de ferro, muito além das quantidades necessárias para qualquer microrganismo. O excesso de ferro foi justificado pelo fato de que o sistema de transporte deste elemento não era eficiente, devido a presença de agentes quelantes que o tornavam indisponível. Neste caso, o excesso de ferro tinha por objetivo saturar os quelantes e disponibilizar o ferro para o crescimento da bactéria e para o estoque nas ferritinas (Harrison & Arosio, 1996).

No presente trabalho, o isolado 222 A apresentou uma relação direta de dependência do ferro para estimular a produção de surfactantes e este, por conseguinte, aumentou a disponibilidade do antraceno à degradação. A adição de ferro diminuiu a tensão superficial do meio para 26,2 dina cm<sup>-1</sup>, sendo este valor um dos menores já reportados para biossurfactantes, somente comparado a surfactina produzida por *B. subtilis*.

O estímulo do ferro à degradação do antraceno pelo isolado 332 C não foi dependente da produção de surfactantes. Neste caso, o isolado pode ter utilizado outro mecanismo para disponibilizar o antraceno, como o aumento do fluxo de dissolução do antraceno (sistema de absorção de alta afinidade pelo substrato) ou

reduzido a distância entre a célula e o substrato por meio de estruturas de adesão na superfície das células (Harms, 1996). O ferro provavelmente estimulou a degradação devido as suas várias funções na célula e nas enzimas responsáveis pela degradação de HAP em geral, conforme demonstrado no item 2.4.1.

Devido a inexistência de resultados sobre o efeito do ferro na degradação de antraceno na literatura, utilizou-se o tolueno como modelo para inferir sobre o provável envolvimento do ferro na degradação deste hidrocarboneto. Dinkla et al. (2001) verificaram que o ferro limitou a degradação de tolueno por estirpes de *Pseudomonas*, contendo o plasmídeo TOL (pWWO) que codifica dois operons catabólicos (operons orto e meta) responsáveis pela degradação do tolueno. Foi observado que a atividade da enzima tolueno monoxigenase da via orto decresceu com a limitação de ferro, bem como a atividade de três enzimas presentes na via meta. O decréscimo da atividade da monoxigenase foi atribuído a ausência de ferro para se ligar a enzima, o que poderia ter resultado na instabilização ou inativação da apoenzima. A atividade das enzimas da via meta foram dependentes da presença de ferro, devido, provavelmente, a dependência deste elemento para a regulação da expressão dos genes do operon meta.

O isolado 312 A apresentou a mesma porcentagem de degradação, independente da presença ou não de ferro, bem como não apresentou produção significativa de surfactantes (Tabela 3). Este isolado pode ter se utilizado de outro mecanismo para a solubilização do antraceno que não a redução da tensão superficial, da mesma forma que o isolado 332 C, ou apresenta mecanismos e aparato enzimático específicos mais eficientes em degradar formas mais insolúveis de antraceno.

Para justificar a ausência do estímulo do ferro na degradação do antraceno pelo isolado 312 A é possível inferir que este isolado apresente algum mecanismo para a retirada do elemento do ambiente e o armazena, para posterior uso. Para a aquisição do ferro, os microrganismos podem utilizar mecanismos e reações de alta afinidade como a ligação celular direta ao ferro, a utilização de proteínas que se ligam ao ferro e o uso de sideróforos que complexam o ferro solúvel (Brickman & Armstrong, 1994).

Entre as proteínas utilizadas para a captura do ferro, destaca-se a

transferrina, a lactoferrina e a hemoglobina (Bonnah & Schryvers, 1998). Já os sideróforos permitem a retirada do ferro do ambiente e o transporta através da membrana, utilizando duas proteínas, que facilita a entrada do ferro na membrana (permease) e outra que fornece energia para o transporte (hidrolase). Após a passagem do ferro pela membrana para o citoplasma, o  $\text{Fe}^{3+}$  é reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  por sideróforos redutores, com menor afinidade, sendo então regenerados e extruídos para fora da célula para complexar o ferro novamente (Wolz et al., 1994). O balanço interno do ferro na célula é mantido pela entrada e saída do elemento de proteínas de armazenamento de ferro, como a ferritina. Esta proteína solúvel pode se ligar com mais de 4.500 átomos de ferro, formando um complexo não tóxico a célula (Crichton, 1991).

Deste modo, é possível que a ausência de resposta da adição de ferro à degradação do antraceno pelo isolado 312 A esteja associada a maior capacidade deste isolado em resistir a deficiência de ferro do que os demais, em função das várias possibilidades de aquisição e de armazenamento, já descritas na literatura, mas não verificadas no presente trabalho. Para a verificação desta hipótese seria necessário o esgotamento do ferro das células por um período maior do que o realizado no experimento (24 horas).

#### **4.4 Efeito do ferro no solo**

Para avaliar o efeito do ferro e do estímulo proporcionado pelos isolados e pela adição de fertilizantes sobre a degradação do antraceno, foi conduzido um experimento adicionando-se no solo, diferentes concentrações de ferro. Foi planejado originalmente, a avaliação da produção de  $\text{CO}_2$  e a análise cromatográfica da degradação do antraceno no solo, entre os tratamentos. Entretanto, serão apresentados apenas os dados de produção de  $\text{CO}_2$  e da cinética desta produção, devido a restrições metodológicas da análise cromatográfica, associada aos prazos para a defesa do trabalho.

O experimento foi organizado em quatro tratamentos submetidos a três concentrações de ferro. Os tratamentos constaram de um controle, da adição de antraceno (biorremediação passiva), da adição de antraceno e do consórcio dos isolados selecionados (bioaugmentação) e da adição de antraceno, isolados e de

fertilizantes (NPK) (bioestimulação). Os resultados da produção acumulativa de CO<sub>2</sub> durante os 64 dias de avaliação e os resultados finais da produção de CO<sub>2</sub> e da cinética de degradação ( $C_0$ -CO<sub>2</sub> = carbono potencialmente mineralizável; k = taxa de degradação; t ½ = meia vida da reação de degradação) serão apresentados a seguir, discutindo-se em separado o efeito do ferro na biorremediação passiva, na bioaugmentação e na bioestimulação do antraceno. Os resultados referentes a produção final de CO<sub>2</sub> e os parâmetros cinéticos encontram-se na Tabela 5.

#### **4.4.1 Efeito do ferro na degradação do antraceno (biorremediação passiva)**

A produção de CO<sub>2</sub> pelo antraceno, na ausência de ferro, foi superior ao da testemunha até os 54 dias de incubação (Figura 8). Ao final dos 64 dias, a testemunha apresentou um pequeno aumento de 3% em relação ao tratamento com antraceno, mas com um potencial máximo de mineralização de 57% a mais que o tratamento com antraceno (Tabela 5). Por outro lado, a taxa de degradação do antraceno, na ausência do ferro foi de 4,1%, comparada a de 1,5% da testemunha. A meia vida da degradação do antraceno foi 3 vezes menor do que a da testemunha.

A adição do ferro (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) diminuiu a produção de CO<sub>2</sub>, tanto pelo antraceno como pela testemunha (Figura 8). Entre as concentrações de 5 e 10% de ferro não houve diferenças representativas na produção de CO<sub>2</sub>. A adição de 5% de ferro diminuiu em 33 % a produção de CO<sub>2</sub> pelo antraceno e em 40% a da testemunha (Tabela 5) ao final dos 64 dias de incubação. A adição de 5 e 10% de ferro diminuiu o potencial de mineralização tanto do antraceno como da testemunha, ao passo que as taxas e a meia vida da degradação do antraceno não foram afetadas pela adição de doses crescentes de ferro.

Kastner et al., (1999) quantificaram a degradação do antraceno pela microbiota nativa do solo, após 35 dias de incubação, através da liberação de CO<sub>2</sub>. Estes autores observaram que a biota autóctona foi responsável pela degradação de 3,9% do antraceno adicionado (100 mg kg<sup>-1</sup>). Esta degradação é inferior aos 12,6% verificada no experimento, após 33 dias de incubação no solo Itapuã,

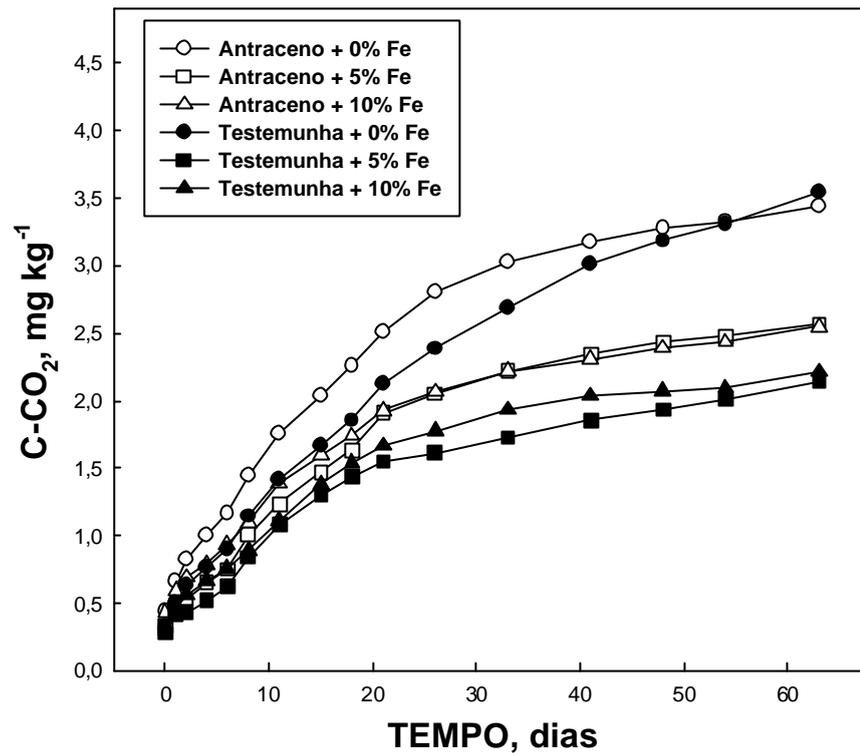


FIGURA 8. Produção acumulativa de CO<sub>2</sub> do solo contaminado com antraceno (biorremediação passiva), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro, durante 64 dias.

contendo 250 mg kg<sup>-1</sup> de antraceno.

A biorremediação passiva ou intrínseca é a biorremediação natural de um ambiente contaminado pela sua população de microrganismos autóctonos. Neste caso, o contaminante pode ser utilizado como fonte de carbono e energia para o seu crescimento. A eficiência de utilização do carbono e, conseqüentemente da biorremediação, está relacionado a capacidade metabólica da microbiota em degradar o substrato adicionado, e as condições ambientais adequadas para sustentar o crescimento (Skipper, 1999).

O solo utilizado no presente trabalho não obedece a nenhum desses critérios, pois se trata de um solo pobre em fertilidade e que nunca recebeu adições de uma fonte de carbono como o antraceno. Nessas condições, a população não está adaptada e não apresenta a resposta metabólica necessária para o desdobramento deste substrato. Nas condições experimentais do trabalho, foi

verificado o efeito da biorremediação passiva até os 54 dias de incubação, sendo esta diminuída com a adição de ferro.

TABELA 5. Produção acumulativa de C-CO<sub>2</sub>, carbono potencialmente mineralizável (C<sub>o</sub>-CO<sub>2</sub>), taxa de degradação (k) e meia vida da reação de degradação (t<sub>1/2</sub>) por diferentes tratamentos (biorremediação passiva, bioaugmentação e bioestimulação) em relação ao controle, em presença diferentes concentrações de ferro, ao final de 64 dias de incubação.

Tratamentos	Ferro (%)		
	0	5	10
	----- C-CO <sub>2</sub> (mg kg <sup>-1</sup> ) -----		
Testemunha (controle)	3,55	2,13	2,21
Antraceno	3,44	2,57	2,54
Antraceno + Inoculação	3,67	3,89	2,38
Antraceno + Inoculação + NPK	4,22	4,13	3,90
	----- C <sub>o</sub> -CO <sub>2</sub> (mg kg <sup>-1</sup> ) -----		
Testemunha (controle)	37,7	16	15,8
Antraceno	23,9	19,7	17,2
Antraceno + Inoculação	30,7	29,8	16,5
Antraceno + Inoculação + NPK	34,1	30,8	27,6
	----- k -----		
Testemunha (controle)	0,015	0,032	0,039
Antraceno	0,041	0,032	0,045
Antraceno + Inoculação	0,024	0,029	0,042
Antraceno + Inoculação + NPK	0,025	0,031	0,036
	----- t <sub>1/2</sub> (dias) -----		
Testemunha (controle)	80,4	30,4	27,7
Antraceno	26,8	36	23,3
Antraceno + Inoculação	47,7	39	25,3
Antraceno + Inoculação + NPK	45,9	36,6	30,6

O ferro pode ter inibido a população de microrganismos autóctones, tanto pelo excesso, como pela incapacidade do solo em adsorver ou eliminar este excesso. No experimento *in vitro* foi observado que a concentração de 0,1 mM não foi prejudicial ao crescimento dos isolados em antraceno. No entanto, no

experimento com solo, a concentração de 5% é equivalente a 30 mM, ou seja, 300 vezes mais concentrada que a do meio mineral. Como se tratava de um solo arenoso, ácido e de baixo conteúdo de matéria orgânica e de óxidos de ferro (0,6%), pode ter ocorrido o excesso de ferro, em níveis tóxicos para a microbiota nativa do solo.

#### 4.4.2 Efeito do ferro e da bioaumentação na degradação do antraceno

A bioaumentação do solo com os isolados selecionados aumentou a liberação do CO<sub>2</sub> do antraceno, quando comparado a liberação do tratamento testemunha, tanto na ausência como na presença de 5% de ferro (Figura 9).

A presença dos isolados no solo com antraceno proporcionou um aumento de 7% na produção de CO<sub>2</sub>, quando comparado com o tratamento

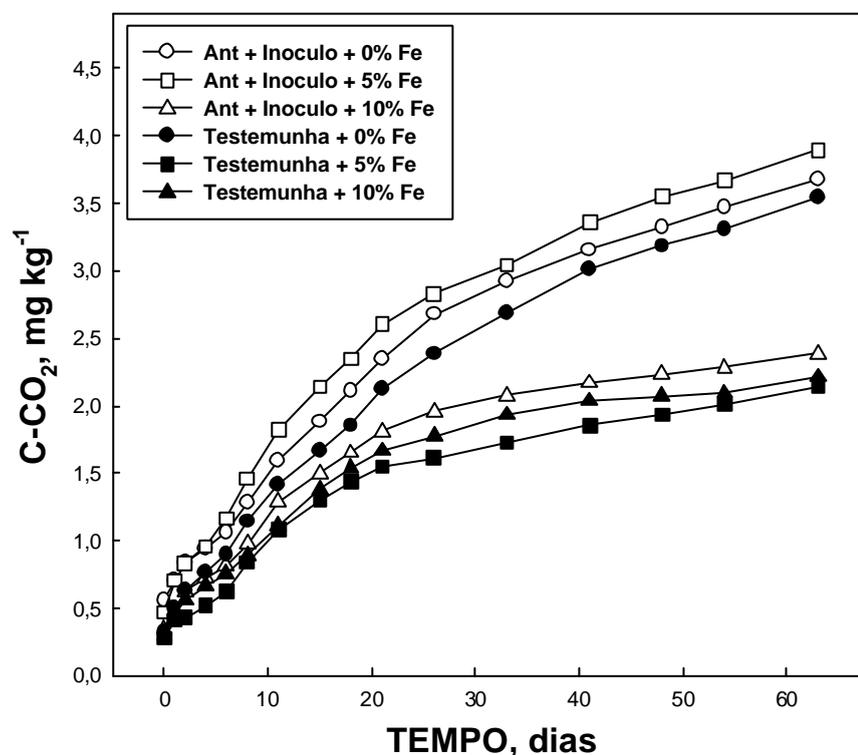


FIGURA 9. Produção acumulativa de CO<sub>2</sub> do solo contaminado com antraceno, inoculado pelos isolados selecionados (bioaumentação), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro, durante 64 dias.

somente com antraceno (Tabela 5). A adição dos isolados aumentou o carbono potencialmente mineralizável, mas por outro lado diminuiu a taxa de degradação e, conseqüentemente, aumentou a meia vida de degradação em relação ao tratamento com antraceno. Kastner et al. (1998), avaliando o impacto de protocolos de inoculação, salinidade e pH na degradação do antraceno, verificaram que a bioaugmentação com *Sphingomonas paucimobilis* BA2 foi responsável pela degradação de 31% do antraceno, após 98 dias de incubação.

A adição de 5% de ferro resultou em maior estímulo a liberação de C-CO<sub>2</sub> pelos isolados em presença de antraceno do que a não adição de ferro (Figura 9). Além disso, quando comparado com a testemunha, a adição de 10% de ferro incrementou em 8% a liberação de CO<sub>2</sub> (Tabela 5). De modo geral, a adição de ferro, principalmente na concentração de 5%, aumentou a taxa de liberação do CO<sub>2</sub> e diminuiu o tempo da meia vida da reação. Em relação ao tratamento com antraceno, a bioaugmentação com os isolados estimulou a maior produção de CO<sub>2</sub> em presença de 5% de ferro.

Bioaugmentação pode ser definida com a inoculação de microrganismos em ambientes contaminados para aumentar ou facilitar a degradação do contaminante. O inoculante deve conter microrganismos selecionados, nativos ou melhorados geneticamente, com alto potencial para degradar o contaminante em questão (Skipper, 1999). Conforme observado no experimento *in vitro*, os microrganismos utilizados no experimento com solo foram selecionados pela maior taxa de crescimento em meio contendo antraceno e pela elevada porcentagem de degradação deste composto. No solo, a adição do consórcio dos três isolados selecionados aumentou a liberação de CO<sub>2</sub> nos tratamentos contendo 250 mg kg<sup>-1</sup> de antraceno, bem como estimulou esta liberação pela adição de 5% de ferro.

#### **4.4.3 Efeito do ferro, da bioaugmentação e da bioestimulação na degradação do antraceno**

O efeito combinado da bioaugmentação mais a bioestimulação com macronutrientes como o nitrogênio, fósforo e o potássio, foi responsável pela maior quantidade de CO<sub>2</sub> produzido em todo o experimento (Figura 10). Independente da presença ou não de ferro, a adição de microrganismos previamente selecionados

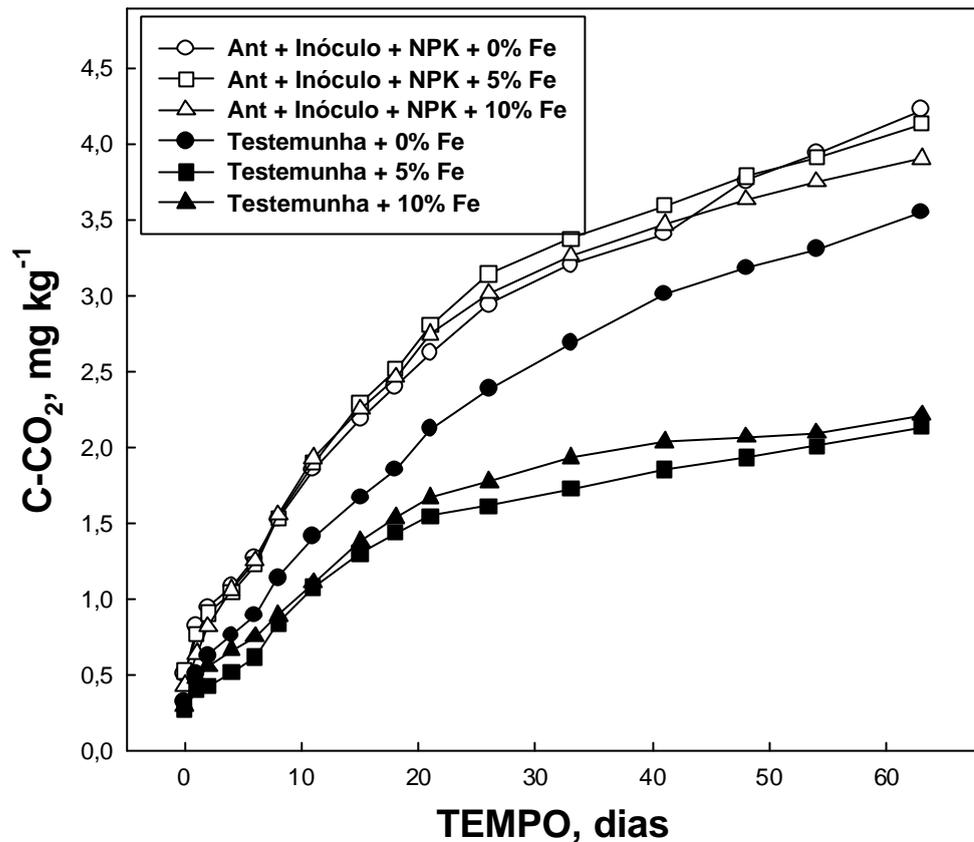


FIGURA 10. Produção acumulativa de  $\text{CO}_2$  do solo contaminado com antraceno, inoculado pelos isolados selecionados e pela adição de fertilizantes (bioestimulação), sob o efeito de diferentes concentrações de ferro, durante 64 dias.

e de nutrientes apresentou a maior liberação de  $\text{CO}_2$ , quando comparado aos demais tratamentos. A adição de NPK incrementou em 15, 23 e 19% a produção de  $\text{CO}_2$ , comparado aos tratamentos com bioaumentação, biorremediação passiva e o controle, respectivamente (Tabela 5).

Comparado a testemunha, o consórcio de isolados e NPK apresentou o efeito mais pronunciado da adição de ferro no solo contendo antraceno, em todo o experimento (Figura 10). A adição de ferro em diferentes concentrações, não acarretou em grandes diferenças na liberação de  $\text{CO}_2$  (Tabela 5). A concentração de 10% de ferro, que se mostrou limitante a biota degradadora nos demais tratamentos, aumentou em 63, 53 e 76% a liberação de  $\text{CO}_2$ , quando comparado aos tratamentos com bioaumentação, biorremediação passiva e o controle, respectivamente (Tabela 5).

O aumento das concentrações de ferro no solo aumentou a taxa de degradação e conseqüentemente, diminuiu o carbono potencialmente mineralizável e o tempo da meia vida da reação. O maior efeito relativo do ferro nas concentrações mais elevadas pode ser devido a adsorção deste pelo fósforo adicionado pela bioestimulação. Neste caso, a disponibilidade do ferro pode ter sido diminuída e o excesso de ferro, anteriormente relatado no item 4.4.1, pode não ter ocorrido.

A bioestimulação tem por objetivo adicionar nutrientes que geralmente são requeridos em grandes quantidades e limitam o crescimento da microbiota. Entre os nutrientes que mais tem sido utilizados na biorremediação de hidrocarbonetos, destacam-se o nitrogênio e o fósforo. A adição de nutrientes como N e P é uma prática padrão para o aumento da degradação de hidrocarbonetos. Através da adição destes nutrientes, as relações C/N e C/P do solo, onde foi adicionado esta fonte de carbono, se aproximam das relações C/N e C/P dos microrganismos envolvidos na degradação. No presente trabalho, a adição de nitrogênio, fósforo e potássio apresentaram a máxima liberação de CO<sub>2</sub> verificada no experimento. Com o efeito interativo do fósforo sobre a diminuição do excesso do ferro, o ferro também estimulou a degradação do antraceno quando comparado com a testemunha.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

a) Amostras de solo contaminadas com HAP apresentam microrganismos (bactérias) com potencial de degradação de antraceno;

b) Fontes solúveis de ferro em concentrações de até 0,2 mM, estimulam o crescimento dos isolados e a degradação do antraceno *in vitro* quando utilizado como única fonte de carbono e energia;

c) A adição de 0,1 mM de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  no meio de cultivo proporcionou até 72% de degradação do antraceno e esta degradação foi relacionada, em parte, ao efeito do ferro na diminuição da tensão superficial do meio;

e) O efeito do ferro no solo foi mais acentuado quando associado a bioaugmentação e a bioestimulação, sugerindo que este elemento pode ser utilizado para o desenvolvimento de estratégias de biorremediação dos HAP no ambiente.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- ACCIOLY, A.M.A.; SIQUEIRA, J.O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R.F. et al. (Ed.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa: SBCS, 2000. p. 299-352.
- AGARWAL, R. et al. Metabolism of benzo(a)pyrene by human melanocytes in culture. **Carcinogenesis**, Dallas, v.12, n.10, p.1963-1966. 1991.
- ALEF, K. Estimation of soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1995. 576p.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. Ithaca, NY: Academic Press, 1997. 302p.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.18, p.1951-1855, 1972.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology: fundamental and applications**. 4 ed. Menlo Park, CA: Academic Press, 1998. 694p.
- ATLAS, R.M.; CERNIGLIA, C.E. Biorremediation of petroleum pollutants. **Bioscience**, Oxford, v.45, p.332-338, 1995.
- BARKAY, T. et al. Enhancement of solubilization and biodegradation of polycyclic hydrocarbons by the bioemulsifier alkanol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.6, p.2697-2702, 1999.
- BASTIENS, L. et al. Isolation of adherent polycyclic aromatic Hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.5, 1834-1843, 2000.
- BEWLEY, R.J.F. Field implementation of in situ bioremediation: Key physicochemical and biological factors. In: STOTZKY, G.; BOLLAG, J.M. **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996. v.9, p. 473-542.
- BODEK, I.; LYMAN, W. J.; REEHL, W. F.; ROSENBLATT, D.H. **Environmental Inorganic Chemistry: Properties, Processes, and Estimation Methods**. New York, NY: Pergamon Press, 1988. 531p.

- BONNAH, R.; SCHRYVERS, A.B. Preparation and characterization of *Neisseria meningitidis* mutants deficient in production of the human lactoferrin-binding proteins LbpA and LbpB. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180, n.12, p.3080-3090, 1998.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, Chicago, v.74, p.63-67, 2000.
- BOSSERT, I.D. et al R. Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. **Bull Environmental Contaminant Toxicological**, Boca Raton, v.37, p.490-495, 1988.
- BOUCHEZ, M.D. et al. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations : inhibition phenomena and cometabolism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.43, p.156-164, 1995.
- BRICKMAN, T.J.; ARMSTRONG, S.K. Bordetella pertussis fur gene restores iron repressibility of siderophore and protein expression to deregulated *Bordetella bronchiseptica* mutants. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.177, n.1, p.268-270, 1995.
- COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS-CCE. **Proposta de directiva do parlamento europeu e do conselho relativa ao arsênio, ao cádmio, ao mercúrio, ao níquel, e aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos no ar e ambiente**. Bruxelas, 2003. 423p.
- CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Current Opinion Biotechnology**, New York, v.4, p.331-338, 1993.
- CERNIGLIA, C.E. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Advances in Applied Microbiology**, London, v.30, p.31-71, 1988.
- CHAKRADEO, P.P. et al. Effect of benzo(a)pireno and methyl(acetoxymethyl)nitrosamine on thymidine uptake and induction of aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human fetal oesophageal cells in culture. **Cellular Biology Internation**, Amsterdam, v.17, n.7, p.671-676, 1993.
- CHOUDHRY, G.R.; CHAPALAMADUGU, S. Biodegradation of halogenated organic compounds. **Microbiological Review**, Amsterdam, v.55, p.59-79, 1991.
- CLARKE, A.N. et al. Soil clean-up by surfactant washing. Laboratory results and mathematical modeling. **Environmental Science & Technology**, London, v.26, n.3, p.301-343, 1994.
- CRICHTON, R.R. **Inorganic biochemistry of iron metabolism**. New York, NY: Ellis Horwood, 1991. 356p.

- CROSA, J. H. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, n.3, p.319-336, 1997.
- DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61, n.1, p.47-64, 1997.
- DINKLA, I.J.T. et al. Effects of iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* Strains carrying the TOL(pWWO) plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.8, p.3406-3412, 2001.
- EDWARDS, D.A. et al. Experimental data and modeling for surfactant micelles, HOCs, and soil. **Journal Environmental Engineering**, Amsterdam, v.120, p.23-41, 1994.
- GARCIA-JUNCO, M.G. et al. Bioavailability of solid and non-aqueous phase liquid (NAPL)-dissolved phenanthrene to the biosurfactant-producing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* 19SJ. **Environmental Microbiology**, Paris, v.3, n.9, p.561-569, 2001.
- GARÇON, G. et al. Benzo[a]pyrene-coated onto Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles-induced lung tissue injury: role of free radicals. **Cancer Letter**, Baltimore, v.167, n.1, p.7-15, 2001.
- GARRY, S. et al. Hematite enhances benzo[a]pyrene genotoxicity in endotracheally treated rat, as determined by comet assay. **Mutation Research**, New York, v.538, p.19-29, 2003.
- GLASAUER, S. et al. Sorption of Fe (hydr)oxides to the surface of *Shewanella putrefaciens*: Cell-bound fine grained minerals are not always formed De Novo. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.12, p.5544-5550, 2001.
- GREEK, B.F. Sales of detergents growing despite recession. **Chemistry Engineering News**, San Diego, v. 69, p.25-52, 1991.
- HAIGLER, B.E.; GIBSON, D.T. Purification and properties of ferredoxin NAP, a component of Naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, n.3, p.465-468, 1990.
- HALL, M.; GROVER, P.L. Differential stereoselectivity in the metabolism of benzo(a)pyrene and anthracene by rabbit epidermal and hepatic microsomes. **Cancer Letter**, Baltimore, v.38, p.57-64, 1988.
- HARA, H. et al. Characterization of the 4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate aldolase gene and operon structure of the Protocatechuate 4,5-cleavage pathway genes in *Shingomonas paucimobilis* SKY-6. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.185, n.1, p.41-50, 2003.

- HARAYAMA, K. et al. Bacterial aromatic ring cleavage enzymes are classified into different gene families. **Journal Biological Chemistry**, San Diego, v.264, p.15328- 15333, 1999.
- HARMS, H. Bacterial growth on distant naphthalene diffusing through water, air, water-saturated and non-saturated porous media. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2286-2293, 1996.
- HARMS, H.; BOSNA, T.N.P. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.27-33, 1997.
- HARRISON, P.M.; AROSIO, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. **Biochimica Biophysica Acta**, Baltimore, v.3, n.2, p.161-203, 1996.
- HAWLEY, G.G. **The condensed chemical dictionary**. New York, NY: Van Nostrand Reinhold Company. 1993. 563p.
- HOLLIGER, C. et al. Contaminated environment in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.20, n.4, p.517-523, 1997.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. **Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds**. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of the chemical to man. Lyon, France: World Health Organization, v.3, n.p. 1973.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. **Polynuclear aromatic compounds: Part 1. Chemical, environmental and experimental data**. Lyons, France: World Health Organization, v.32, p.155-161, 1983.
- JONES, K.C. Organic contaminants in Welsh Soils: polynuclear aromatic hydrocarbons. **Environmental Science & Technology**, Washington, v.13, p.540-550, 1989.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace Elements in Soils and Plants**. Boca Raton, CRC Press, FL. 1992. 323p.
- KANALY, R.A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.182, n.8, p.2059-2067, 2000.
- KANALY, R.A. et al. Biodegradation of [<sup>14</sup>C] Benzo[a]pyrene added in crude oil to uncontaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.1, p.4511-4515, 1997.

- KARIM-LOTFABAD, S.; PICKARD, M.; GRAY, M.R. Reactions of polynuclear aromatic hydrocarbons on soil. **Environmental Science & Technology**, Washington, v.30, n.4, p.1145-1151, 1996.
- KARR, L.A; LYSYJ, T. Identification of toxicity sources in waste matter by correlation of chemical and toxicological parameters. **American Chemical Society**, Miami, v.1, p.17-21, 1985.
- KASTNER, M. et al. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.1, p.359-362, 1998.
- KASTNER, M. et al. Formation of bound residues during microbial degradation of [<sup>14</sup>C] anthracene in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.5, p.1834-1842, 1999.
- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, London, v.54, p.305-315, 1990.
- LIMA, C.B.S. et. al. Efluentes: a qualidade da água comprometida. In: MENEGAT, R.; et al. (Eds.) **Atlas ambiental de Porto Alegre**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, p.157-158, 1998a.
- LIMA, C.B.S. et. al. Mapa de potencial de poluição por efluentes. In: MENEGAT, R.; et al. (Eds.) **Atlas ambiental de Porto Alegre**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, p.161-162, 1998b.
- LINDSAY, W. L. **Chemical Equilibria in Soils**. In: JOHN WILEY AND SONS. New York, NY: Wiley-Interscience, 1979. 230p.
- MARS, A.E. et al. Microbial degradation of chloroaromatics: Use of the meta-cleavage pathway for mineralization of chlorobenzene. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.179, n.14, p.4530-4537, 1997.
- MASON, J.R.; COMMARCK, R. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. **Annual Review of Microbiology**, Washington, v.46, p.277-305, 1992.
- MASON, J.R. Oxygenase catalyzed hydroxylation of aromatic compounds: Simple chemistry by complex enzymes. **International Industrial Biotechnology**, London, v.8, p.19-24, 1988.
- MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Microbiologia ambiental. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. **Como isolar microrganismos degradadores de moléculas xenobióticas**. Jaguariúna: Embrapa, CNPMA., 1997. 440p.

- MIELNICZUK, C. **A população microbiana e a degradação de resíduo petroquímico no solo**. 1991. 134p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Porto Alegre, 1991. 134p.
- MISHRA, V. et al. Ezymes and operons mediating xenobiotic degraation in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v27, n.2, p.133-166, 2001.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 626 p.
- MOREL, F. M. M.; J. G. HERING. **Principles and Applications of Aquatic Chemistry**.New York, NY. 1993. 423p.
- PETERS, C.A.; KNIGHTES, C.D.; BROWN, D.G. Long term composition dynamics of PAH-containing NAPLs and implications for risk assessment. **Environmental Science & Technology**, Washington, v.33, n.24, p.4499-4507, 1999.
- PRADHAN, S.P. et al. Potencial of phytorremediation for treatment of PAHs in soil at MGP sites. **Journal of Soil Contamination**, Boca Raton, v.7, n.4, p.467-480, 1998.
- PRESCOTT, L.M. et al. **Microbiology**. Dubuque, IA: Ed. WCB, 1997. 883p.
- RICHARD, J.Y.; VOGEL, T.M. Characterization of soil consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.44, p.93-100, 1999.
- SCHWERTMANN, U. Occurrence and formation of iron oxides in various pedoenvironments.In: J. W. STUCKE. ET AL. **Iron in Soils and Clay Minerals**. Boston: NATO ASI Series C127. D. Reidel Publ. Co., p.267-308, 1988.
- SHUTTLEWORTH, K.L.; CERNIGLIA, C.E. Practical methods fore the isolation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degrading microrganisms and biodegradation intermediates. In: HURST, J. et al. **Manual of Environmental Microbiology**. Washington, DC: Ed. ASM, 1996. 894p.
- SIMS, J.L. et al. Approach to bioremediation of contaminated soil. **Hazardous waste harzardous material**, London, v.7, p.117-149, 1990.
- SKIPPER, H.D. **Biorremediation of contaminated soils**. In: SYLVIA, D.M., FUHRMANN, J.J., HARTEL, P.G. (Ed.). Principles and applications of soil microbiology, New York, p.469-481, 1999.
- SONG, H.G. et d. **Hydrocarbon mineralization in soil: relative bacterial and fungal contribution**. New Brunswick: Rutgers University. n.p. 1985.

- SORKHOH, N.A. et al. High temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwait desert. **Applied Microbiology & Biotechnology**, Amsterdam, v.39, p.123-126, 1993.
- STOJILJKOVIC, I. et al. HmbR outer membrane receptors of pathogenic *Neisseria* spp.: Iro-regulated, hemoglobin-binding proteins with a high level of primary structure conservation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, n.15, p.4670-4678, 1996.
- STRUTHERS, J.K. et al. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in biorremediation of contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.9, p.3368-3375, 1998.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES - USDHS. **Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons**. In: U.S.. ATSDR, Atlanta, GE, august 1995. 454p.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE - USDOC. **Imports for consumption and general imports**. TSUSA Commodity by country of origin. FT246/Annual Washington, D.C., 1985. 273p.
- WATKINSON, R.J. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Biodegradation**, London, v.1, p.79-92, 1990.
- WEI, Y.H.; CHU, I. M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.22, p.724-728, 1998.
- WEI, Y.H. et al. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam, v.96, n.2, p.174-178, 2003.
- WICK, L.Y. et al. Kinetics of mass transfer-limited bacterial growth on solid PAHs. **Environmental Science & Technology**, Washington, v.35, p.354-361, 2001.
- WOLZ, C. et al. Iron from transferrin by pyoverdinin and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, Washington, v.62, n.9, p.4021-4027, 1994.

## 7. APÊNDICES

### Apêndice 01: Meios minerais e ágar nutritivo

Meio mineral 1 (Richard & Vogel, 1999).

<b>Macronutrientes</b>			
Reagente	<b>g L<sup>-1</sup></b>	<b>Modificações</b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>
KCl	0,7		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	2,9
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,0		
<b>Solução de micronutrientes (1 mL.L<sup>-1</sup>)</b>			
Reagente	<b>g L<sup>-1</sup></b>		<b>g L<sup>-1</sup></b>
MgSO <sub>4</sub>	4,0	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	8,2
FeSO <sub>4</sub>	0,2	FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,36
MnCl <sub>2</sub>	0,2	MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0,31
CaCl <sub>2</sub>	0,2	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,26

Meio mineral 2 (Bastiaens et al.,2000).

<b>Solução de macronutrientes</b>			
Reagente	<b>g L<sup>-1</sup></b>	<b>Modificações</b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>
NaHPO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	8,8	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	7,6
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0		
NaCl	0,5		
NH <sub>4</sub> Cl	1,0		
MgSO <sub>4</sub>		MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1,23
<b>Solução de micronutrientes (2,5 mL L<sup>-1</sup>)</b>			
Reagente	<b>mg L<sup>-1</sup></b>		<b>mg L<sup>-1</sup></b>
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	36		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	31		
MnCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	23		
MnCl <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	30	MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	55,75
CuCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	10		
NiCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	20		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	30		
ZnCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	10		

Meio mineral Tanner (Shuttleworth & Cerniglia, 1996).

<b>Macronutrientes</b>			
Reagente	<b>g L<sup>-1</sup></b>	<b>Modificações</b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,04		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1		
NaCl	0,8		
NH <sub>4</sub> Cl	1,0		
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2		
KCl	0,1		
<b>Solução de micronutrientes (0,5 mL L<sup>-1</sup>)</b>			
Reagente	<b>g L<sup>-1</sup></b>		<b>g L<sup>-1</sup></b>
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,2		
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	1,0	MnCl <sub>2</sub> . 4H <sub>2</sub> O	0,85
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2	ZnCl <sub>2</sub>	0,10
CuCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,02	CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,03
NiCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,02		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0,02		
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	0,02		

Meio ágar nutritivo

Reagente	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0
Ágar	15,0

**Apêndice 02: Análise química do solo Itapuã**

---

Argila	7 %
pH	5,5
Índice SMP	6,8
P	3,5 mg dm <sup>-3</sup>
K	46 mg dm <sup>-3</sup>
M.O.	0,8%
Al	0,0 cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
Ca	9,5 cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
Mg	2,9 cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
Al+H	1,7 cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
CTC	14,3 cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
Ca/Mg	3,3
Ca/K	81
Mg/K	25
S	9,5 cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
Zn	3,8 cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
Cu	1,1 cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
B	0,6 cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
Mn	11 cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>

---

**Apêndice 03:** Quadros das análises de variância

Quadro da análise da variância do efeito de fontes de ferro no crescimento do isolado 222.

Quadro da análise da variância					
Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M	Valor F	Prob. > F
Fontes	6	6,26	1,04	13,11	0,00237
Residuo	7	0,55	0,07		
Total	13	6,81			

Quadro da análise da variância do efeito de fontes de ferro no crescimento do isolado 312.

Quadro da análise da variância					
Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M	Valor F	Prob. > F
Fontes	6	7,18	1,19	25,64	0,00053
Residuo	7	0,32	0,04		
Total	13	7,50			

Quadro da análise da variância do efeito de fontes de ferro no crescimento do isolado 332.

Quadro da análise da variância					
Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M	Valor F	Prob. > F
Fontes	6	2,50	0,41	5,790	0,01872
Residuo	7	0,50	0,07		
Total	13	3,00			

Quadro da análise da variância do efeito de concentrações de ferro no crescimento do isolado 222.

Quadro da análise da variância					
Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M	Valor F	Prob. > F
Concentrações	5	103,21	20,64	472,68	0,00004
Residuo	6	0,26	0,04		
Total	11	103,47			

Quadro da análise da variância do efeito de concentrações de ferro no crescimento do isolado 312.

Quadro da análise da variância					
Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M	Valor F	Prob. > F
Concentrações	5	111,46	22,29	299,25	0,00005
Residuo	6	0,44	0,07		
Total	11	111,91			

Quadro da análise da variância do efeito de concentrações de ferro no crescimento do isolado 332.

Quadro da análise da variância					
Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M	Valor F	Prob. > F
Concentrações	5	95,42	19,08	142,94	0,00010
Residuo	6	0,80	0,13		
Total	11	96,22			

Quadro da análise da variância do efeito de ferro e hidrocarbonetos no crescimento do isolado 222.

Quadro da análise da variância					
Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M	Valor F	Prob. > F
Ferro	1	2,11	2,11	33,81	0,00007
Hidrocarbonetos	8	355,66	44,45	710,26	0,00001
Ferro x hidroc.	8	3,63	0,45	7,25	0,00043
Residuo	18	1,12	0,06		
Total	35	362,54			

Quadro da análise da variância do efeito de ferro e hidrocarbonetos no crescimento do isolado 312.

Quadro da análise da variância					
Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M	Valor F	Prob. > F
Ferro	1	8,04	8,04	204,59	0,00001
Hidrocarbonetos	8	335,96	41,99	1067,99	0,00001
Ferro x hidroc.	8	7,63	0,95	24,27	0,00001
Residuo	18	0,70	0,03		
Total	35	352,35			

Quadro da análise da variância do efeito de ferro e hidrocarbonetos no crescimento do isolado 332.

Quadro da análise da variância					
Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M	Valor F	Prob. > F
Ferro	1	4,94	4,94	93,66	0,00007
Hidrocarbonetos	8	322,64	40,33	7640,33	0,00001
Ferro x hidroc.	8	5,77	0,72	13,67	0,00003
Residuo	18	0,97	0,052		
Total	35	334,30			

Quadro da análise da variância do efeito do antraceno na liberação do CO<sub>2</sub> do solo.

Quadro da análise da variância					
Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M	Valor F	Prob. > F
Ferro	2	333,13	166,56	9,71	0,01369
Antraceno	1	12,27	12,27	0,71	0,56613
Ferro x Antraceno	2	20,57	10,28	0,60	0,58185
Residuo	6	102,86	17,14		
Total	11	468,84			

Quadro da análise da variância do efeito da bioestimulação na liberação do CO<sub>2</sub> do solo.

Quadro da análise da variância					
Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M	Valor F	Prob. > F
Ferro	2	162,39	81,19	16,39	0,00443
NPK	1	372,56	372,56	75,24	0,00037
Ferro x Antraceno	2	97,03	48,51	9,79	0,01344
Residuo	6	29,70	4,95		
Total	11	661,70			

Quadro da análise da variância do efeito da bioaumentação na liberação do CO<sub>2</sub> do solo.

Quadro da análise da variância					
Causas da variação	G.L	S.Q	Q.M	Valor F	Prob. > F
Ferro	2	119,53	59,76	1,97	0,21
Inoculação	1	20,78	20,78	0,68	0,55
Ferro x Antraceno	2	297,40	148,70	4,92	0,05
Residuo	6	181,12	30,18		
Total	11	618,84			

## **8. VITA**

Eder da Costa dos Santos, filho de Oly Carvalho dos Santos e Ester da Costa dos Santos, nascido em 13 de maio de 1976 em Rio Grande-RS.

Estudou nas Escolas Marçal Pacheco e Agrotécnica Federal de São Vicente do Sul, onde completou o primeiro e segundo graus, respectivamente. Em 1997 ingressou na Universidade Federal de Santa Maria, onde foi graduado Engenheiro Agrônomo em março de 2002. Neste mesmo ano iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.