

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**



**PERFIL DA COMUNIDADE BACTERIANA EM SOLOS: OS EFEITOS DA  
CONTAMINAÇÃO COM DIESEL E BIOESTIMULAÇÃO DA MICROBIOTA  
COM UREIA EM SISTEMAS DE MESOCOSMOS**

**DIANA ALVES MATOS**

**ILHÉUS-BAHIA-BRASIL  
Fevereiro de 2019**

**DIANA ALVESMATOS**

**PERFIL DA COMUNIDADE BACTERIANA EM SOLOS: OS EFEITOS DA  
CONTAMINAÇÃO COM DIESEL E BIOESTIMULAÇÃO DA MICROBIOTA  
COM UREIA EM SISTEMAS DE MESOCOSMOS**

Tese apresentada à Universidade Estadual  
de Santa Cruz, como parte das exigências para  
obtenção do título de doutor em Genética e  
Biologia Molecular.

**Área de Concentração:** Genética e Biologia  
Molecular

**ILHÉUS-BAHIA-BRASIL**  
**Fevereiro de 2019**

M433

Matos, Diana Alves.

Perfil da comunidade bacteriana em solos: os efeitos da contaminação com diesel e bioestimulação da microbiota com ureia em sistemas de mesocosmos / Diana Alves Matos. – Ilhéus, BA: UESC, 2019.

52f. : il.

Orientador: Rachel Passos Rezende

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Inclui referências.

1. Ureia como fertilizantes. 2. Biodegradação. 3. Diesel. 4. Cromatografia a gás. 5. Bactérias gram-negativas. 6. Sequenciamento genético. I. Título.

CDD 631.841

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente a Deus, e aos meus guias protetores por sempre iluminarem o meu caminho.

Aos meus pais Hélio e Ana Lúcia e meu irmão Diego, por todo apoio, amor, paciência e pelas orações

À Prof.<sup>a</sup> Rachel Rezende, pela oportunidade, confiança, pela amizade e pelo carinho desde minha chegada à UESC.

Aos Profs. João Dias, Eduardo Gross, Ivon Lobo, Carlos Priminho, Carla Romano e Charles Greer pelas contribuições e auxílio durante este período.

Aos colegas e amigos, Carol, Mooana, Stephanie, Eric, Adriana Barros, Herbert, Moara, Alberto, Duca, Fabiana, Juliano, Valter, Horlei, Adriana Silva, Marianna, Gerson, Dona Jô, Geovane.

À UESC, pelos recursos disponibilizados para a realização deste trabalho.

Ao National Research Council Canadá, pela realização de parte da pesquisa.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, em especial a Fabrícia e a Mara, que nos dar suporte e esclarecem dúvidas em todo o processo do curso.

Aos Laboratórios: Biotecnologia Microbiana, Biologia Molecular, Monitoramento Ambiental, Imunologia, BIOMA

À CAPES, pelo financiamento concedido.

## ÍNDICE

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| EXTRATO.....                                                       | 1  |
| ABSTRACT.....                                                      | 2  |
| 1.INTRODUÇÃO.....                                                  | 3  |
| 2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                      | 5  |
| 2.1 Petróleo e a contaminação do meio ambiente.....                | 5  |
| 2.2 Biorremediação.....                                            | 9  |
| 2.3 Degradação microbiana de hidrocarbonetos.....                  | 16 |
| 2.4 Genes que atuam na degradação de hidrocarbonetos.....          | 18 |
| 3. HIPÓTESES.....                                                  | 22 |
| 4. OBJETIVOS.....                                                  | 23 |
| 4.1 OBJETIVO GERAL.....                                            | 23 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                     | 23 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS.....                                         | 24 |
| 5.1 Área de estudo e coleta de amostras.....                       | 24 |
| 5.2 Desenho experimental dos mesocosmos.....                       | 24 |
| 5.3 Extração de DNA do solo.....                                   | 25 |
| 5.4 Amplificação e sequenciamento do gene bacteriano 16S rRNA..... | 25 |
| 5.5 Análise dos dados da sequência do gene 16S rRNA.....           | 25 |
| 5.6 Análise cromatográfica da degradação do diesel.....            | 26 |
| 5.7 Análises estatísticas.....                                     | 26 |
| 6. RESULTADOS.....                                                 | 28 |
| 6.1 Características físico-químicas do solo.....                   | 28 |
| 6.2 Sequenciamento do rRNA 16S.....                                | 28 |
| 6.3 Degradação do diesel.....                                      | 32 |
| 7. DISCUSSÃO.....                                                  | 38 |
| 8. CONCLUSÃO.....                                                  | 43 |
| 9. REFERÊNCIAS.....                                                | 44 |

## EXTRATO

MATOS,D.A, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Fevereiro de 2019. **Perfil da comunidade bacteriana em solos: Os efeitos da contaminação com diesel e bioestimulação da microbiota com ureia em sistemas de mesocosmos.** Orientadora: Rachel Passos Rezende. Co-orientador Carlos Priminho Pirovani.

Os hidrocarbonetos de petróleo exibem alta toxicidade gerando uma grande preocupação acerca de sua eliminação. As técnicas de biorremediação vêm sendo utilizadas e aprimoradas a fim de reduzir a quantidade de resíduos dispostos no ambiente. Um dos tipos de biorremediação de solos leva em conta a adição de nutrientes (bioestimulação). O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil da comunidade bacteriana após contaminação de diesel em solo adicionados de concentrações crescentes de fertilizante nitrogenado. Para acesso à comunidade microbiana o NGS do gene rRNA 16S foi realizado. O acompanhamento da degradação dos hidrocarbonetos presentes no diesel foi verificada através de Cromatografia Gasosa (GC) utilizando padrões para alcanos de cadeia média e mix de hidrocarbonetos policíclico aromáticos. O fertilizante utilizado foi a ureia em cinco concentrações (0,25%, 0,5%, 1%, 2% e 4%).O solo utilizado foi um solo proveniente da Mata Atlântica e rico em matéria orgânica. Os controles foram preparados com solo e ureia, solo e diesel e solo sem contaminantes. Os resultados mostraram que o aumento da concentração de fertilizante reduz a riqueza de espécies. Nas menores concentrações, observa-se a de predominância de Proteobactéria. Nas maiores concentrações, domínio do filo Firmicutes com a predominância da família Bacillaceae e redução da degradação. O efeito do fertilizante parece ser independente da presença de diesel. Contudo, os compostos alifáticos de cadeia longa e aromáticos parecem aumentar sua relcacitrância quando a concentração inicial do fertilizantes é de 4%. Em análise de coordenada principal (PCoA) é mostrado um distanciamento de grupos microbianos quando foi utilizado concentração maior do fertilizante. A degradação dos compostos do diesel diminuem em função do aumento da concentração do fertilizante, havendo mudança importante no perfil da comunidade. Espécies da família Bacillaceae são reconhecidos como essenciais para o ciclo do nitrogênio o que pode ter relação com seu aumento em função da concentração de ureia. É importante ressaltar que a atenuação natural de hidrocarbonetos em solo ricos em matéria orgânica continua sendo fator essencial nas questões de preservação ambiental.

**Palavras-chave:** ureia, biodegradação, diesel, cromatografia gasosa, proteobactéria, NGS.

## ABSTRACT

MATOS, D.A, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. February 2019. **Profile of the bacterial community in soils: The effects of contamination with diesel and biostimulation of the microbiota with urea in mesocosmos systems.** Advisor: Rachel Passos Rezende. Co-adviser Carlos Priminho Pirovani.

Petroleum hydrocarbons exhibit high toxicity leading to great concern about their elimination. Bioremediation techniques have been used and improved in order to reduce the amount of waste disposed in the environment. One of the types of soil bioremediation takes into account the addition of nutrients (biostimulation). The objective of this work was to evaluate the bacterial community profile after contamination of diesel in soil added with increasing concentrations of nitrogen fertilizer. For access to the microbial community the NGS of the 16S rRNA gene was performed. The monitoring of the degradation of the hydrocarbons present in the diesel was verified through Gas Chromatography (GC) using standards for medium chain alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. The fertilizer used was urea in five concentrations (0.25%, 0.5%, 1%, 2% and 4%). The soil used was a soil from the Atlantic Forest rich in organic matter. The controls were prepared with soil and urea, soil and diesel and soil without contaminants. The results showed that increasing fertilizer concentration reduces species richness. At the lowest concentrations, the predominance of Proteobacterium is observed. In the highest concentrations, dominance of the Firmicutes phylum with the predominance of the family Bacillaceae and reduction of the degradation. The effect of the fertilizer seems to be independent of the presence of diesel. However, long-chain and aromatic aliphatic compounds appear to increase their reliance when the initial concentration of the fertilizer is 4%. In the main coordinate analysis (PCoA) a distance of microbial groups is shown when a higher fertilizer concentration was used. The degradation of the diesel compounds decreases due to the increase in fertilizer concentration, with a significant change in the community profile. Species of the Bacillaceae family are recognized as essential for the nitrogen cycle which may be related to their increase as a function of urea concentration. It is important to emphasize that the natural attenuation of hydrocarbons in soil rich in organic matter continues to be an essential factor in environmental preservation issues.

**Key words:** urea, biodegradation, diesel, gas chromatography, proteobacteria, NGS

## 1. INTRODUÇÃO

O petróleo ainda é a matriz energética mais utilizada no mundo. É um combustível fóssil, não renovável, composto basicamente por hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e em pequenas quantidades por oxigênio, nitrogênio e enxofre. Devido a grande exploração e utilização do petróleo e seus derivados, a contaminação do meio ambiente por esses compostos se tornou algo corriqueiro e é dada pouca importância pelas autoridades ambientais brasileiras.

A contaminação do solo pelo petróleo e seus derivados, como o diesel, é um grave problema mundial. A produção, refino e transporte do petróleo, assim como a estruturação de uma cadeia logística para a sua comercialização, fez com que houvesse um grande número de acidentes envolvendo derrames e consequentemente a poluição do solo e água subterrânea. Os HPAs são foco de grande atenção decorrente de sua alta toxicidade e recalcitrância, podendo persistir por longos períodos no meio ambiente. Tendo em vista que esse tipo de contaminação é um problema global, começou a surgir uma preocupação acerca da destruição desses contaminantes e a recuperação de ambientes contaminados.

A biorremediação é um processo ecologicamente favorável que visa a recuperação total ou parcial de ambientes contaminados usando como ferramentas de descontaminação plantas, micro-organismos ou enzimas provenientes destes. Nas últimas décadas, muitos avanços foram alcançados nas técnicas de biorremediação, sendo seu objetivo superar fatores que limitam e retardam as taxas de biodegradação. Geralmente, esses fatores limitantes são de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, baixa oxigenação, pH e em alguns casos micro-organismos capazes de degradar esses compostos. Isso pode ser corrigido ou amenizado através do processo de bioestimulação, onde nutrientes e aeração são adicionados ao sistema a ser tratado e a bioaugmentação, onde um mix de micro-organismos previamente selecionados é adicionado ao sistema que está sendo remediado.

A ureia é um fertilizante comumente usado no Brasil e no mundo e como é uma fonte de nitrogênio de baixo custo pode ser usado como elemento nos processos de

bioestimulação em ambientes contaminados. É usado em muitos tipos de plantações, assim como em sistemas agroflorestais.

Dentre os sistemas agroflorestais que podem ser fertilizados com ureia, a mata do tipo Cabruca é um sistema agroflorestal que consiste no plantio de cacau sombreado pela mata nativa que neste caso é a Mata Atlântica. É um sistema onde há uma grande ciclagem de nutrientes e com isso uma grande atividade microbiana que sustenta a plantação de cacau. A Mata Atlântica é considerada um dos maiores *hotspots* de biodiversidade do mundo e uma das suas áreas mais ricas encontra-se na região sul da Bahia. Como tem uma das maiores riquezas de fauna e flora do planeta, esta mata é rica em matéria orgânica. Além disso, em um ambiente rico em matéria orgânica, lignina etc abriga micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos.

Existem micro-organismos que são evolutivamente capacitados para quebrar hidrocarbonetos, gerando intermediários metabólicos que irão participar de vias centrais através da oxidação destes substratos. A inserção de um ou dois grupos hidroxila na estrutura do hidrocarboneto parece ser o primeiro passo durante a degradação aeróbia desse composto. As principais enzimas neste processo são as oxigenases, as dioxigenases e mono-oxigenases. As dioxigenases catalisam a adição de dois grupos hidroxila e as mono-oxigenases catalisam a introdução de um átomo de oxigênio no hidrocarboneto. Essas classes de enzimas são as mais estudadas dentre as enzimas microbianas que fazem parte das vias de degradação de hidrocarbonetos. Assim como seus genes correspondentes *nah* e *alkB*, que podem ser encontrados em micro-organismos não relacionados filogeneticamente indicando uma grande taxa de transferência horizontal.

Visto que os micro-organismos exibem grande potencial nos processos de biorremediação, muitos trabalhos estão sendo realizados a fim de identifica-los e aos genes responsáveis pela degradação desses compostos, assim como estudos que visam melhorar a eficiência na degradação desses contaminantes. No intuito de responder questões acerca de biodegradação e com modificação ou não do perfil microbiano em solos fertilizados, objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil da comunidade bacteriana após contaminação de diesel em solo adicionados de concentrações crescentes de fertilizante nitrogenado. Supõe-se que exista forte relação de aumento de recalcitrância nos compostos com aumento da concentração de ureia, mudando a comunidade microbiana.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Petróleo e contaminação do meio ambiente.**

O petróleo é uma mistura complexa de compostos orgânicos, na maior parte alcanos e hidrocarbonetos aromáticos, com pequenas quantidades de compostos como oxigênio, nitrogênio e enxofre (FETTER, 1993). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem uma classe de produtos químicos orgânicos perigosos consistindo de três ou mais anéis de benzeno fundidos e estão dispostos em várias configurações estruturais. São moléculas altamente recalcitrantes que podem persistir no ambiente devido à sua hidrofobicidade e baixa solubilidade em água (CERNIGLIA, 1992; BAMFORTH & SINGLETON, 2005).

O óleo diesel é um combustível derivado do petróleo de composição complexa, constituído basicamente por hidrocarbonetos parafínicos, olefínicos e aromáticos e, em menor quantidade por enxofre, nitrogênio, metais, oxigênio, etc. O óleo diesel é formulado por meio da mistura de diversas correntes como gasóleos, nafta pesada, diesel leve e diesel pesado, provenientes das diversas etapas de processamento do petróleo bruto (FERREIRA et al, 2008).

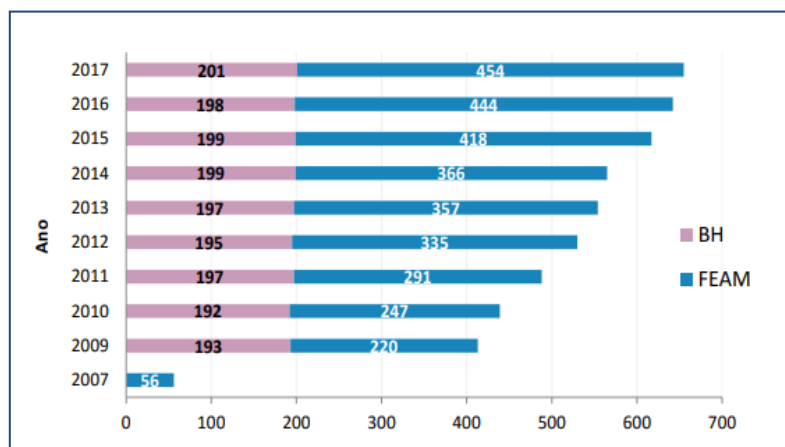
Na década de 70 o Brasil vivia uma crescente industrialização e desenvolvimento econômico. Este período exigiu uma estruturação logística e de comercialização de petróleo e seus derivados, que vai desde a descoberta de novos campos à construção de polos petroquímicos e aumento da rede de distribuição. A estruturação da cadeia produtiva do petróleo gerou também contaminação de solos e águas subterrâneas (MARIANO, 2006).

A produção, refino, transporte e uso de petróleo contribuem altamente para a poluição do meio ambiente. A contaminação do solo e águas subterrâneas por hidrocarbonetos de petróleo é um problema ambiental grave e generalizado. As causas são geralmente a corrosão de tanques de armazenamento e problemas de vedação que podem causar vazamentos em tanques de armazenamento e tubulações. (CHIEN et al, 2011).

A contaminação do solo com hidrocarbonetos de petróleo causa um declínio significativo na sua qualidade impossibilitando seu uso para agricultura, sendo assim, esses solos tornam-se inutilizáveis (GOJGIC-CVIJOVIC et al, 2011). Mais de 90% desta poluição por óleo está diretamente relacionada a acidentes devido a falhas e atividades humanas, incluindo a eliminação deliberada de lixo (ZHU et al, 2001; MEGHARAJ et al, 2011).

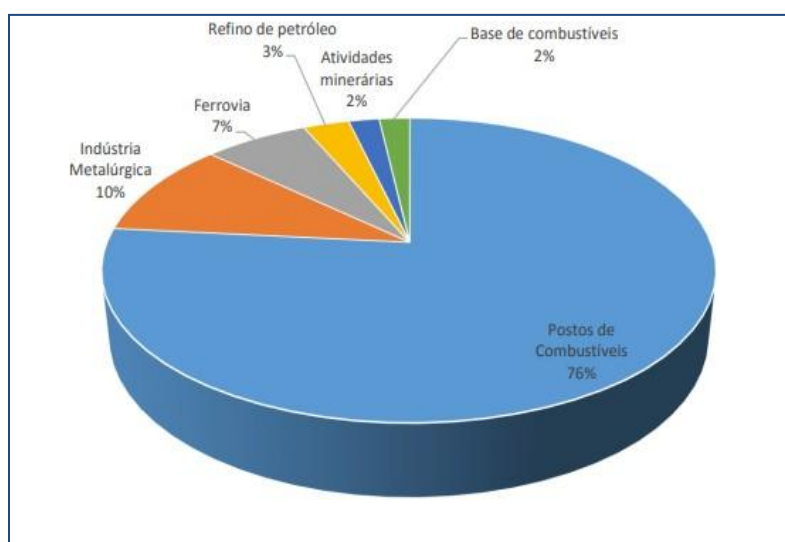
Dentre as classes de hidrocarbonetos presentes no petróleo, os HPAs demonstraram propriedades altamente tóxicas, entretanto, preocupações com a saúde humana sobre os HPAs se concentram nos metabólitos intermediários formados em sua transformação metabólica por organismos aquáticos e terrestres. Estes compostos intermediários podem ser agentes mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos, como epóxidos di-idrodiol. Estes metabolitos que se ligam e perturbam o DNA e o RNA são a base para a formação de tumores (WILD, 1995).

Nos Estados Unidos foram relatados aproximadamente 275 mil casos de contaminação por petróleo e derivados na última década entre acidentes em terra e marinhos. (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2018), no Canadá os relatos de contaminação estão por volta de 17 mil (TREASURY BOARD OF CANADA SECRETARIAT, 2018). Já no Brasil, no estado de Minas Gerais, no ano de 2017 foram registradas 655 áreas contaminadas e reabilitadas, sendo 201 (31% do total) em gerenciamento na Prefeitura de Belo Horizonte (Figura 1). O maior número de áreas contaminadas cadastradas dividida por empreendimentos no estado de Minas Gerais, corresponde aos Postos de Combustíveis, comércio varejista de combustíveis e revendedores de gasolina, álcool e diesel (Figura 2) (FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE – FEAM, 2017).



(Fonte: FEAM 2017)

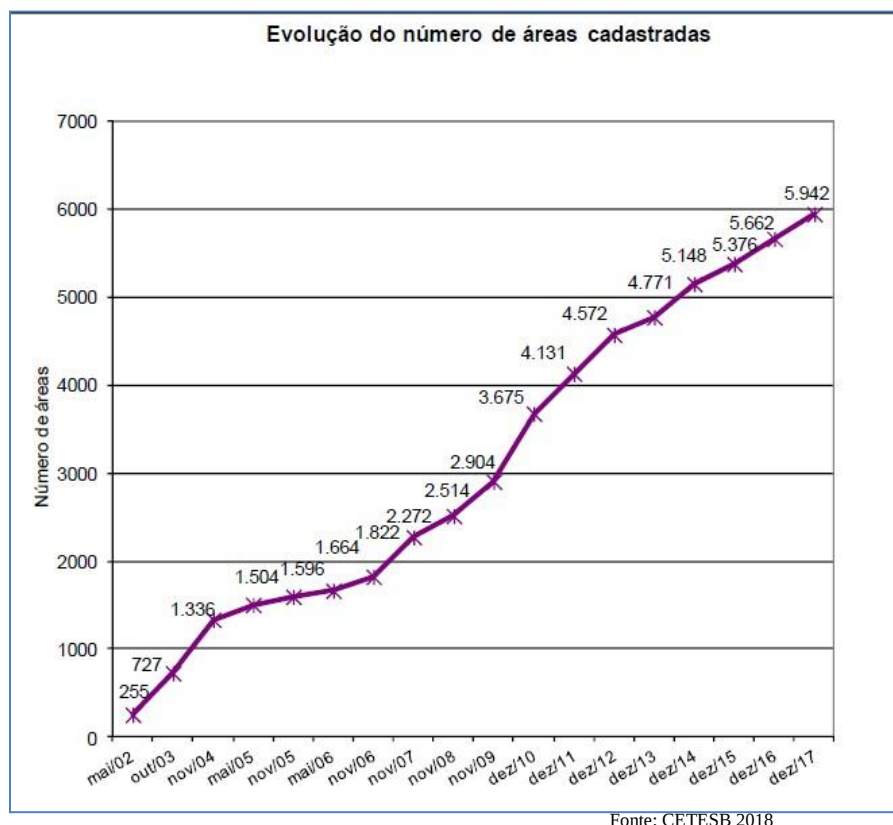
**Figura 1:** Aumento do número de áreas contaminadas e reabilitadas no período de 2007 a 2017. As áreas foram gerenciadas pela prefeitura de Belo Horizonte (lilás) e FEAM (azul).



Fonte: FEAM 2017

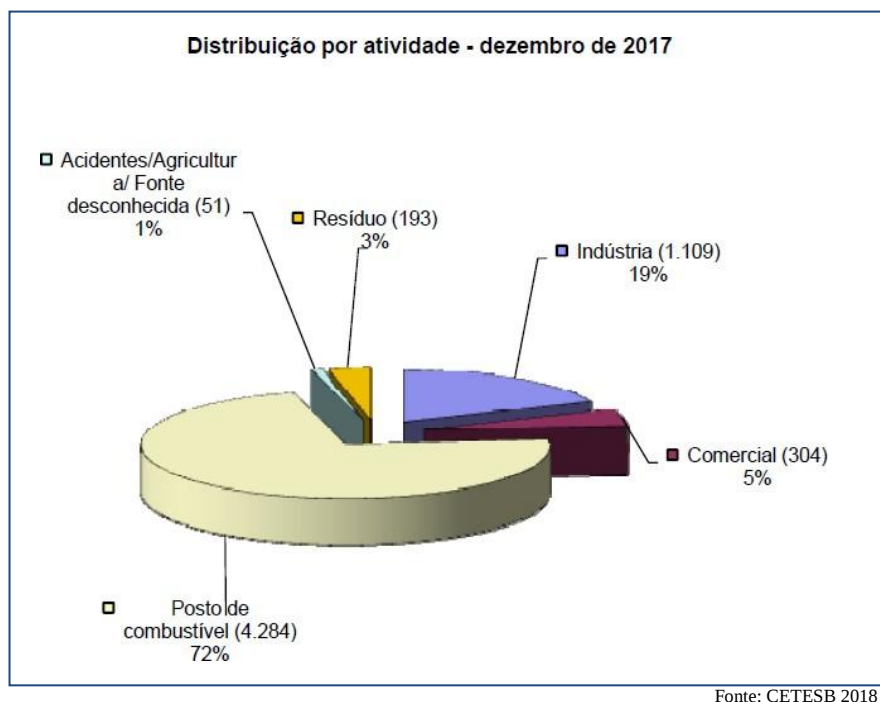
**Figura 2:** Percentual de áreas contaminadas e reabilitadas agrupadas por atividade econômica.

No estado de São Paulo, em maio de 2002, a CETESB divulgou pela primeira vez a lista de áreas contaminadas, registrando a ocorrência de 255 áreas contaminadas. Após a última atualização, ocorrida em dezembro de 2017, foram totalizados 5.942 registros no Cadastro de Áreas Contaminadas e Reabilitadas no Estado de São Paulo (Figura 3). (CETESB 2018).



**Figura 3:** Evolução do número de áreas contaminadas cadastradas e reabilitadas pela CETESB no período de 2002 a 2017.

Os postos de combustíveis destacaram-se na relação de dezembro de 2017, com 4.284 registros (72%) (Figura 4). Evidenciando que os principais grupos de contaminantes encontrados nas áreas afetadas se devem ao grande número de áreas utilizadas pela atividade de revenda de combustíveis, como também de áreas industriais, destacando-se: solventes aromáticos (basicamente representados pelo benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos), combustíveis automotivos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), metais, Hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) e solventes halogenados. (CETESB, 2018). Não foram encontrados relatórios sobre acidentes de contaminação no estado da Bahia.



**Figura 4:** Locais onde ocorreu contaminação agrupado por tipo de atividade no ano de 2017.

## 2.2 Biorremediação

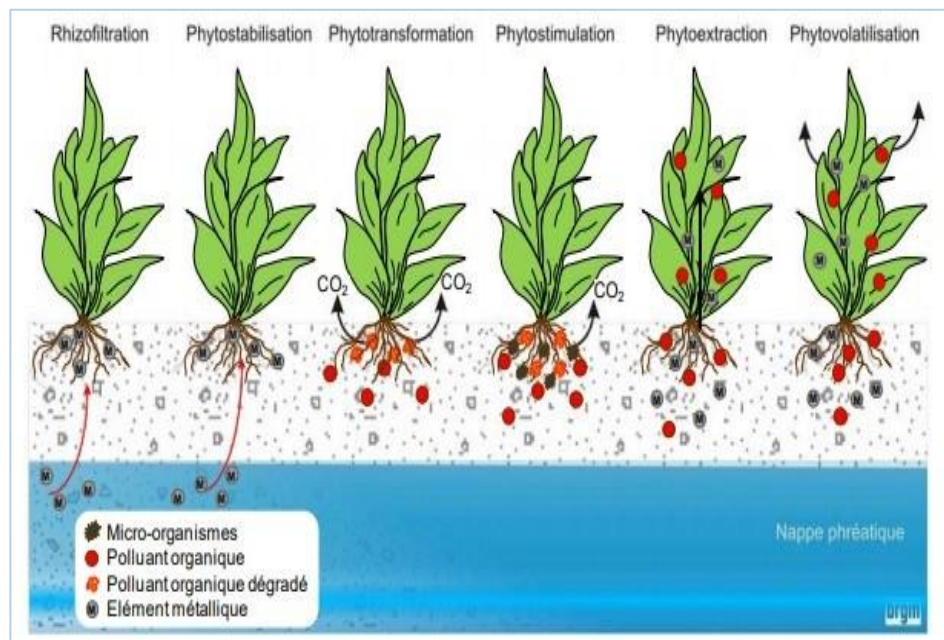
Nas últimas duas décadas, ocorreram avanços nas técnicas de biorremediação que priorizam restaurar o ambiente contaminado de maneira eficaz, utilizando uma abordagem ecológica e de baixo custo (AZUBUIKE et al, 2016). A Biorremediação é definida como um processo que utiliza micro-organismos, plantas ou suas enzimas para tratar os sítios poluídos a fim de recuperar sua condição original (GLAZER & NIKAIDO, 1995). O objetivo da biorremediação é superar os fatores que limitam ou que retardam as taxas de biodegradação, fatores como falta de nutrientes, oxigenação, pH, micro-organismos com capacidade de degradação, etc.

Existem várias formas de biorremediação, dentro das mesmas há tratamentos *in situ* e *ex situ*. Nas aplicações *in situ*, a poluição é tratada no local. Por outro lado, as tecnologias *ex situ* envolvem o transporte do solo contaminado para um lugar onde um sistema de tratamento adequado pode ser implementado (FUENTES et al, 2014). Dentre as técnicas de biorremediação estão micorremediação, fitorremediação, *lardfaming*,

*biosparging*, *bioventing*, compostagem, *slurry-phase*, *Treatment-bed*, biopilhas e atenuação natural (JORGENSEN et al, 2000, BAHADURE et al, 2013).

A micorremediação é um processo que envolve o uso de fungos na remediação parcial ou total de contaminantes, como hidrocarbonetos e metais pesados, em águas superficiais e subterrâneas contaminadas, águas residuais, solo, sedimentos e lamas (SINGH & GAUBA, 2014; ABU-ELSAOUD et al, 2017).

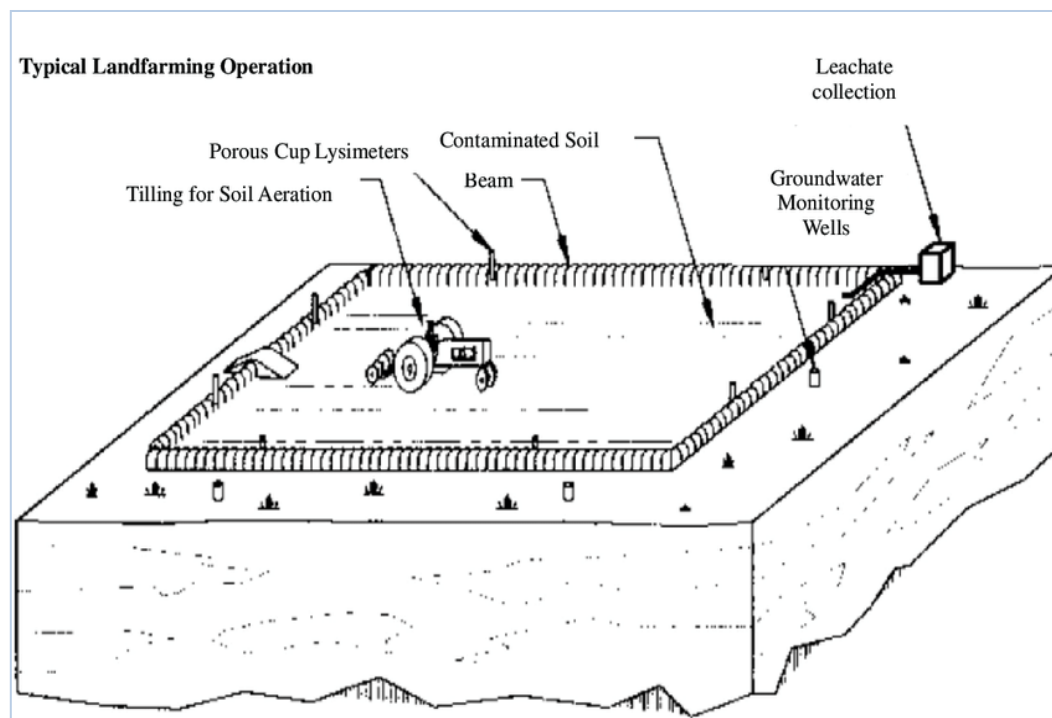
A fitorremediação é definida como o uso de plantas para remediação ambiental, onde envolve a remoção de orgânicos e metais dos solos e água através da atividade conjunta de micro-organismos e plantas (Figura 5) (RASKIN et al, 1994).



Fonte: : BRGM e Angélique San Miguel

**Figura 5:** Esquema ilustrativo do processo de fitorremediação

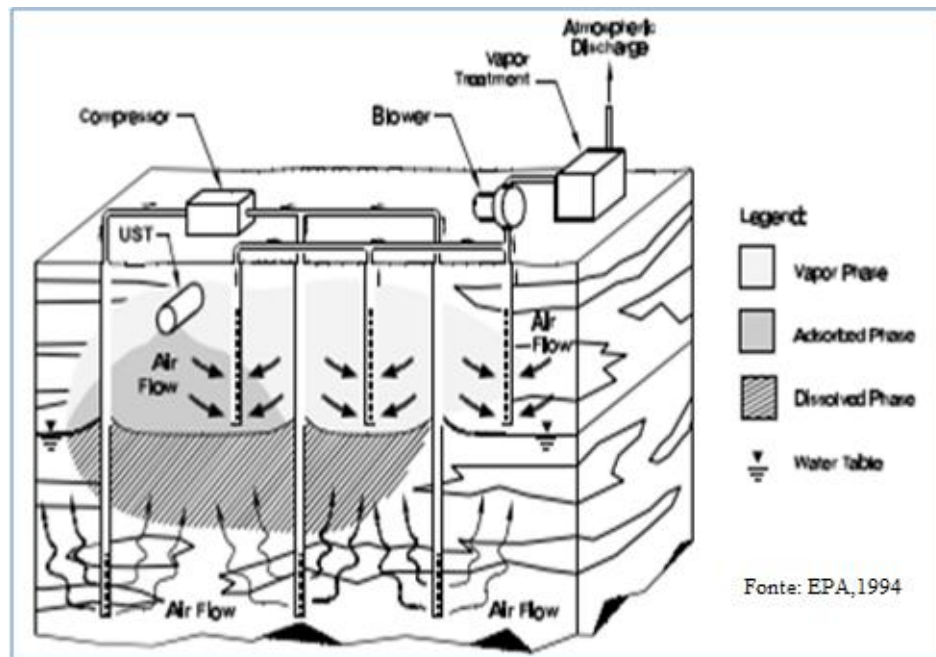
*Landfarming* é um tratamento *ex situ* que faz uso de micro-organismos nativos para a biodegradação. O resíduo oleoso é distribuído sobre uma grande área de superfície plana acima de uma camada impermeável, dividido em células contendo solo, geralmente com tratamentos diferentes para que os resíduos oleosos sejam colocados para biodegradação (Figura 6). Nos sistemas de *landfarming*, o solo é periodicamente arado e com adição de nutrientes para estimular o metabolismo microbiano aeróbio (AUSMA et al., 2003; REZENDE et al, 2012).



Fonte: FRTR, 2000

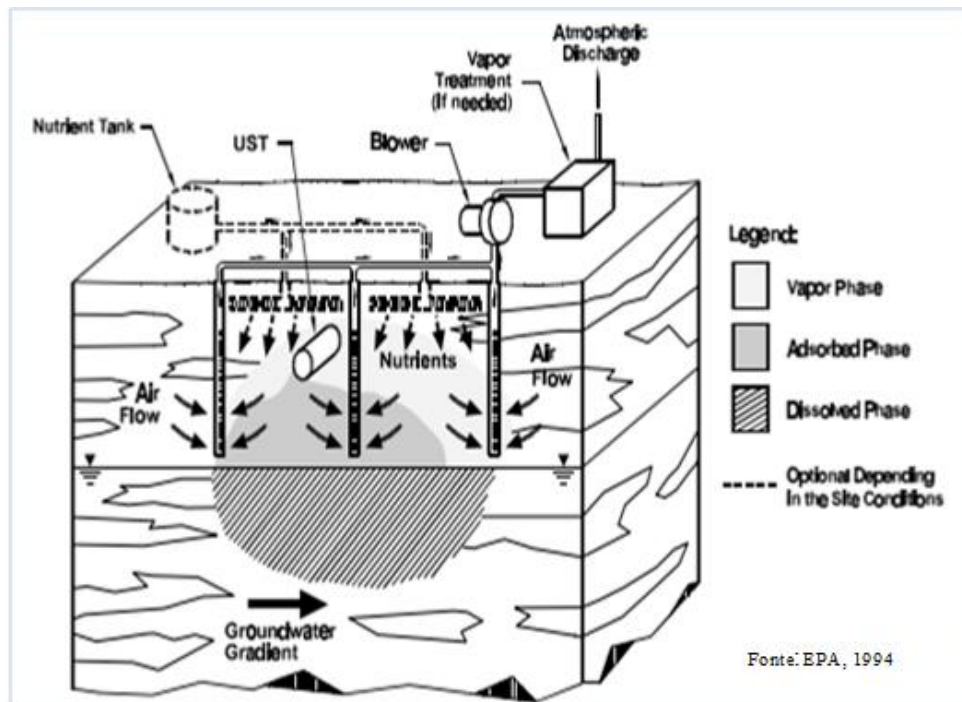
**Figura 6:** Esquema básico de uma típica operação de *landfarming*

Na *biosparging*, ar (ou oxigênio) e nutrientes (se necessário) são injetados na zona saturada para aumentar a atividade biológica dos micro-organismos nativos (Figura 7). O *biosparging* pode ser usado para diminuir as concentrações de componentes do petróleo dissolvidos em águas subterrâneas, adsorvidos ao solo abaixo do lençol freático e dentro da franja capilar (EPA, 1994).



**Figura 7:** Esquema básico do sistema de *Biosparging* usando extração de solo a vapor

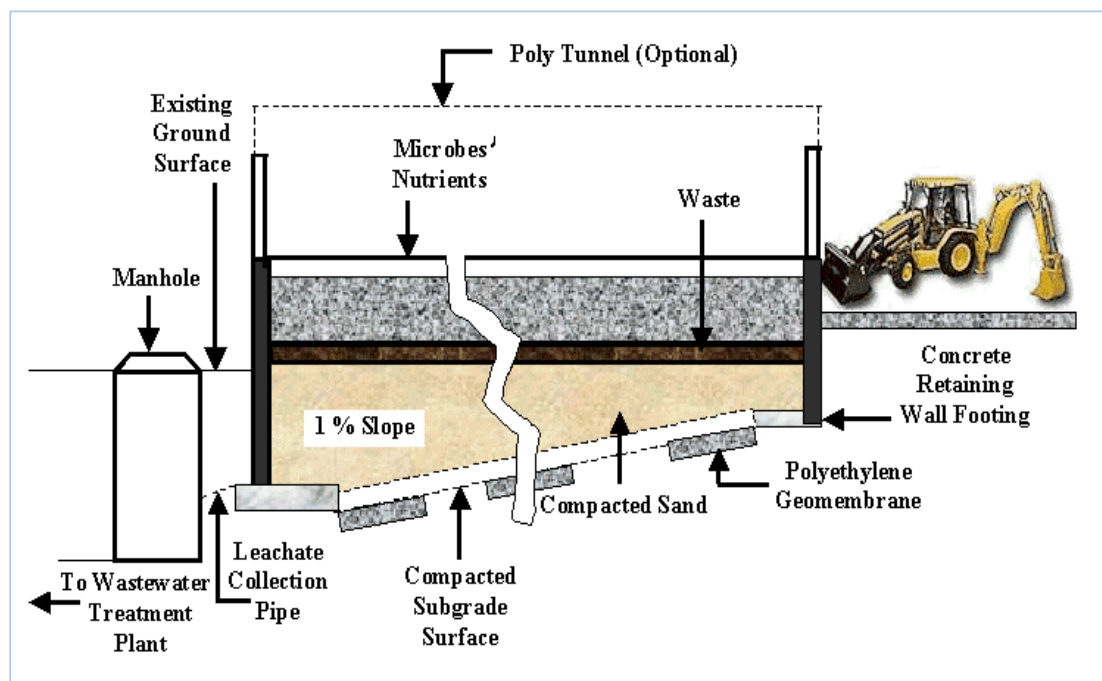
*Bioventing* é uma técnica de remediação *in-situ* que usa micro-organismos nativos para degradar constituintes orgânicos adsorvidos a solos na zona insaturada (Figura 8). Na tecnologia de *bioventing*, a atividade das bactérias autóctones é reforçada pela indução de fluxo de ar (ou oxigênio) para a zona não saturada (usando poços de extração ou injeção) e, se necessário, adicionando nutrientes (EPA, 1994). Estas duas técnicas diferem apenas na região onde é aplicado o fluxo de ar, *biosparging* na zona insaturada e *bioventing* na zona saturada.



**Figura 8:** Esquema básico do sistema de *Bioventing* usando extração de solo a vapor

Compostagem pode ser definida como a decomposição biológica de matéria orgânica ao nível de húmus relativamente estável, adequado para solos. Este processo é realizado por microrganismos termofílicos sob condições aeróbicas ou parcialmente aeróbicas (GOLUEKE et al, 1954).

Tecnologias de biorremediação *ex situ* incluem remediação *slurry-phase* (Figura 9), em que uma fase de água é adicionada para melhorar a mistura física; remediação *Treatment-bed*, onde apenas os nutrientes são adicionados e o material que está sendo tratado é agitado mecanicamente por um dispositivo de mistura durante intervalos; e a tecnologia de biopilha que refere-se ao empilhamento do material a ser biotratado por adição de nutrientes e aeração em pilhas, estas podem ser suplementadas com um agente de volume, geralmente com palha, serragem, cascas ou lascas de madeira ou algum outro material orgânico (JORGENSEN et al, 2000).



Fonte: [learnbioremediation.weebly.com/slurry-phase-bio-reactor](http://learnbioremediation.weebly.com/slurry-phase-bio-reactor)

**Figura 9:** Esquema básico do sistema de biorremediação *ex-situ* *slurry-phase*.

A atenuação natural é geralmente definida como uma série de processos físicos e biológicos, que, sem a intervenção humana deliberada, reduzem a concentração, a toxicidade ou a mobilidade de contaminantes químicos. Esses processos ocorrem independentemente de outras medidas ativas de limpeza estarem ou não em vigor (CENTER FOR PUBLIC ENVIRONMENTAL OVERSIGHT, 1998)

As técnicas de biorremediação citadas podem fazer uso de processos como bioaumentação e bioestimulação (exceto a atenuação natural) que servem para superar fatores que limitam a biorremediação. Estas técnicas fazem parte do processo de biorremediação conjuntamente ou não. A biorremediação melhorada geralmente é realizada via bioaumentação ou bioestimulação ou ambas, dependendo das condições do solo e da estrutura da comunidade microbiana (LIN et al, 2010).

A bioaumentação é um processo onde há a introdução (inoculação) de um mix de micro-organismos específicos para melhorar a biodegradação do composto alvo (KAO et al 2008; MARIANO et al, 2009). A bioaumentação pode aumentar as taxas de remoção de poluentes aumentando a população bacteriana (THOMASSIN-LACROIX et

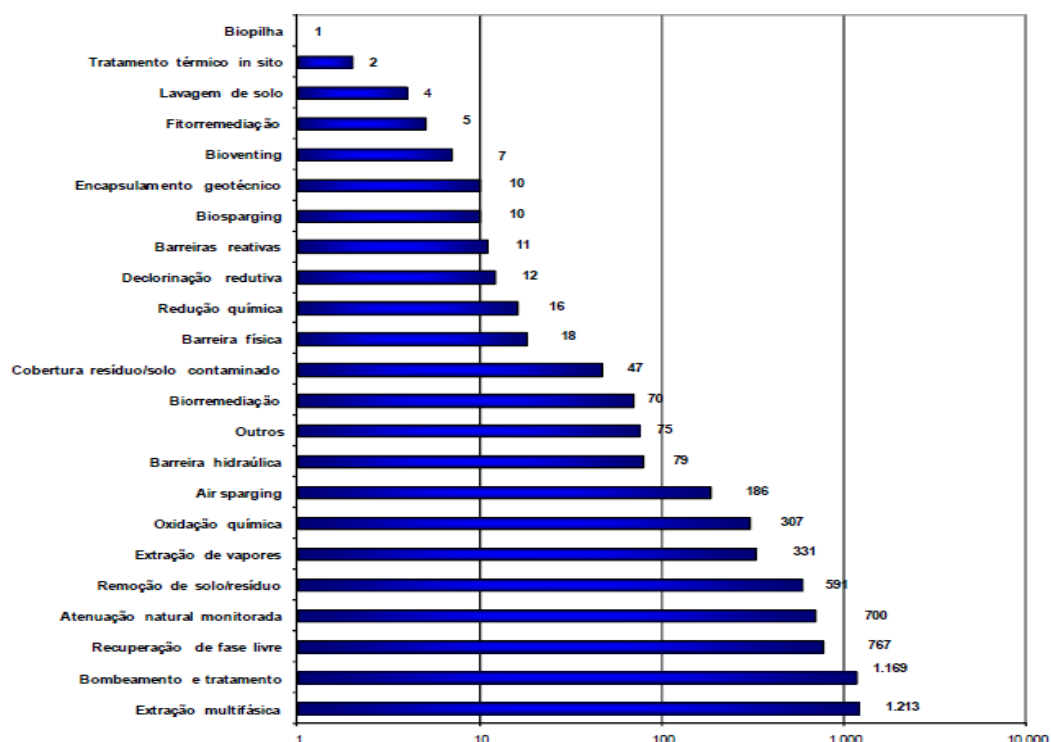
al 2002).

A bioestimulação pode envolver uma adição de aceptores de elétrons ou doadores de elétrons para estimular populações microbianas que ocorrem naturalmente. Na bioestimulação, o solo é modificado com nutrientes que contêm principalmente fontes de nitrogênio e fósforo, fatores de otimização, como oxigenação, temperatura, pH e possível adição de biossurfactantes (THOMASSIN-LACROIX et al, 2002 MULLIGAN, 2005; WHANG et al, 2008; LIN et al, 2010).

O nitrogênio é um dos principais nutrientes para a sobrevivência de todos os organismos vivos, sendo ele um componente necessário de muitas biomoléculas, como proteínas, DNA e clorofila. Embora o nitrogênio seja muito abundante na atmosfera como gás  $N_2$ , é inacessível nesta forma para a maioria dos organismos, tornando um recurso escasso e muitas vezes limitando a produtividade primária em muitos ecossistemas (HOWARTH, 2008). Apenas quando o gás  $N_2$  é convertido em amônia ( $NH_3$ ) que se torna disponível para os produtores primários, como planta, dessa forma é necessário que o nitrogênio passe por transformações como fixação, nitrificação, desnitrificação, metabolismo anammox (oxidação anaeróbia da amônia), e amonificação; estas transformações nos seus diversos estados de oxidação são dependentes das atividades de um conjunto diversificado de micro-organismos, tais como bactérias, arqueas e fungos (BERNHARD, 2010).

A ureia é um composto nitrogenado ( $CO [NH_2]_2$ ) que na sua quebra gera duas moléculas de amônia, que por sua vez é a forma em que o nitrogênio encontra-se disponível para os produtores primários. Devido a esse ato e sua facilidade de uso e transporte, a ureia é a forma química mais dominante de fertilizante nitrogenado usado no *Corn Belt* dos Estados Unidos e em todo o mundo (FAO, 2017).

O ciclo do nitrogênio é principalmente impulsionado pela comunidade microbiana do solo, assim, melhor compreensão das respostas da comunidade microbiana à adição de ureia têm implicações generalizadas (STALEY et al, 2018). No Brasil, no Estado de São Paulo as técnicas de biorremediação são utilizadas em 793 áreas das 5.492 áreas contaminadas registradas no ano de 2018, dentre essas técnicas a mais usada foi a atenuação natural (Figura 10) (CETESB 2018). Este levantamento mostra que ainda são poucos os processos de biorremediação utilizados no Brasil.

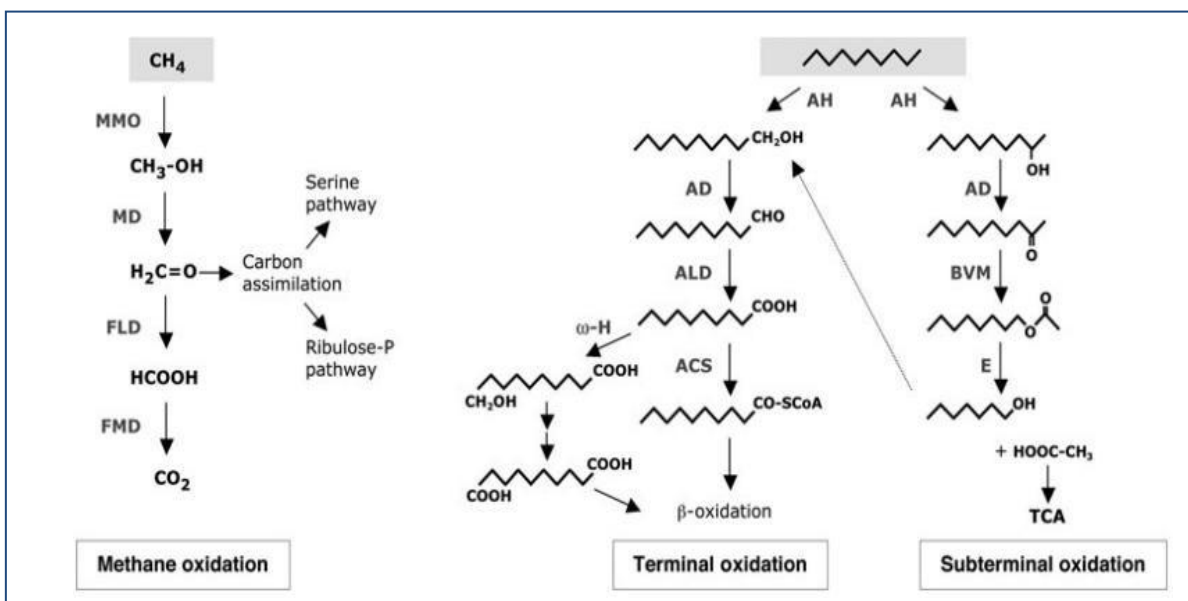


( Fonte: CETESB 2018)

**Figura 10:** Técnicas de remediação utilizadas no Estado de São Paulo em 2018.

### 2.3 Degradação microbiana de hidrocarbonetos

Os micro-organismos possuem mecanismos evolutivos para ativar hidrocarbonetos gerando intermediários metabólicos, que encaminham para vias metabólicas centrais por oxidação destes substratos (FUENTES et al, 2014). A adição de um ou dois grupos hidroxila na estrutura do hidrocarboneto parece ser o primeiro passo universal durante o catabolismo aeróbio (Figura 11). As enzimas-chave nas vias de degradação dos hidrocarbonetos são as oxigenases. Essas catalisam a adição de oxigênio molecular para o substrato (ROJO, 2009). As dioxygenases catalisam a adição de dois grupos hidroxila, em contrapartida as mono-oxigenases catalisam a introdução de um átomo de oxigênio no hidrocarboneto. Durante a degradação anaeróbia, a ativação é conseguida acoplando CO<sub>2</sub> ou fumarato aos hidrocarbonetos, o sulfato e nitrato são utilizados como receptores finais de elétrons (SO, et al, 2003; CALLAGHAN et al, 2012).



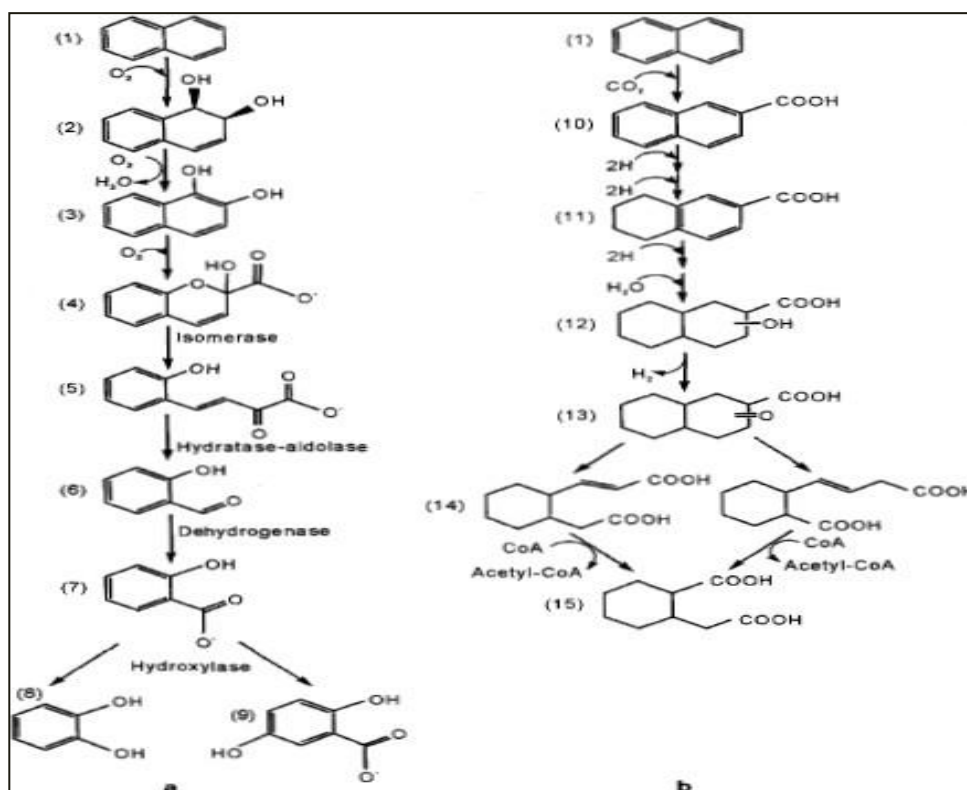
(Rojo et al, 2009)

**Figura 11:** Via metabólica de degradação aeróbica de alcanos. Via aeróbica para a degradação de metano (esquerda) e de n-alcanos maiores por oxidação terminal e subterminal (direita). A ativação inicial da molécula de alcano requer O<sub>2</sub> como reagente. MMO, metano monooxygenase; MD, metanol desidrogenase, FLD, formaldeído desidrogenase; FMD, formiato desidrogenase. AH, alcano hidroxilase; AD, álcool desidrogenase; ALD, aldeído desidrogenase; ACS, acil-CoA sintetase; w-H, w-hidroxilase; BVM, Baeyer-Villiger monooxygenase; E, esterase; TCA, ciclo dos ácidos tricarboxílicos

Uma vasta gama de bactérias não relacionadas filogeneticamente e fungos podem usar n-alcanos como única fonte de carbono e energia (KLOOS et al, 2006). Dentre elas estão as bactérias *Acinetobacter venetianus* (THRONE-HOLST et al, 2006), *Pseudomonas oleovorans* (van BEILEN et al, 1994), *Rhodococcus* sp. strain 1BN (ANDREONI et al, 2000), *Alcaligenes xylosoxidans* DSM 6388, , *Brevundimonas diminuta* DSM 1635, *Burkholderia cepacia* DSM 50181, *Flavobacterium devorans* DSM 30198, *Gordona rubropertinctus* SBUG 248, *Nocardia asteroides* SBUG (VOMBERG, & KLINNER, 2000), além dos fungos filamentosos *Pestalotiopsis* sp. NG007, *Trametes versicolor* U97, *Pleurotus ostreatus* PL1, *Cerena* sp. F0607, e *Polyporus* sp. S133 (YANTO & TACHIBANA, 2014). Degradação bacteriana de n-alcanos é possível sob condições aeróbicas e anaeróbicas (WIDDEL & RABUS, 2001). A degradação anaeróbica de alcanos ocorre em taxas mais baixas em comparação com o catabolismo microbiano aeróbio (WENTZEL et al, 2007).

Os diferentes micro-organismos podem usar diversos caminhos diferentes para a degradação de HPAs. Na sua grande maioria, os micro-organismos relatados, fazem

uso da via de degradação aeróbica. O primeiro passo da catálise por uma dioxigenase, o oxigênio reage com dois átomos de carbono adjacentes do HPA resultando na formação de cis-di-hidrodiol que então sofre re-aromatização por desidrogenases para formar intermediários di-hidroxilados. Estes, por sua vez, sofrem clivagem do anel para formar intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (Figura 12) (SAMANTA et al, 2002; ZHANG et al, 2006).



(Zhang et al, 2006)

**Figura 12:** Via metabólica de degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. a) Vias de degradação aeróbica e b) anaeróbica do naftaleno no solo: (1) naftaleno, (2) cis-1, 2-di-hidroxi-1,2-di-hidronaftaleno, (3) 1,2-di-hidroxinaftaleno, (4) 2-hidroxi-cromeno-2-carboxilato (HCCA), (5) trans-ehidrexibenzilidenopiruvato (tHBPA), (6) salicilaldeído, (7) salicilato, (8) catecol, (9) gentisato, (10) ácido 2-naftóico, (11) 5,6,7,8-tetra-hidro-2-naftóico, (12) ácido hidroxideca-hidro-2-naftóico, (13) ácido  $\beta$ -oxo-deca-hidro-2-naftóico (14)  $C_{11}H_{16}O_4$ -diácido e (15) ácido 2-carboxiciclo-hexilacético

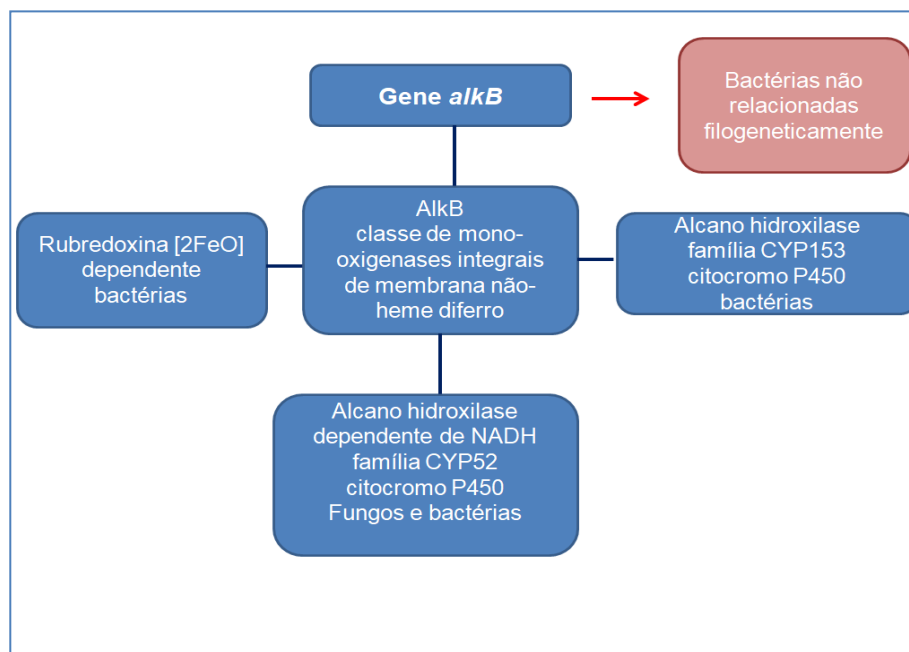
#### 2.4. Genes que atuam na degradação de hidrocarbonetos

Até o presente momento, a presença, abundância e diversidade de genes metabólicos de alcanos e HPA têm sido investigadas em uma variedade de ecossistemas terrestres e aquáticos contaminados por hidrocarbonetos (POWELL et al, 2010;.

PEREZ-DE- MORA et al,2011.; YANG et al, 2014). Dentre eles os genes mais estudados são o *alkB* responsável pela degradação de alcanos e *nah* responsável pela degradação de naftaleno.

O gene *alkB* codifica uma classe de mono-oxigenases integrais de membrana não-heme diferido do tipo AlkB, e essa tem sido proposta como uma das classes de enzimas não relacionadas filogeneticamente responsáveis pela transformação aeróbia de alcanos de cadeia média (C5-C16) e em alguns casos, até mesmo alcanos mais longos (VAN BEILEN et al, 2007). Estas enzimas catalisam a oxidação terminal ou subterminal de n-alcanos para álcoois primários ou secundários, que é o passo inicial na degradação aeróbia de n-alcanos (VAN BEILEN et al, 2003).

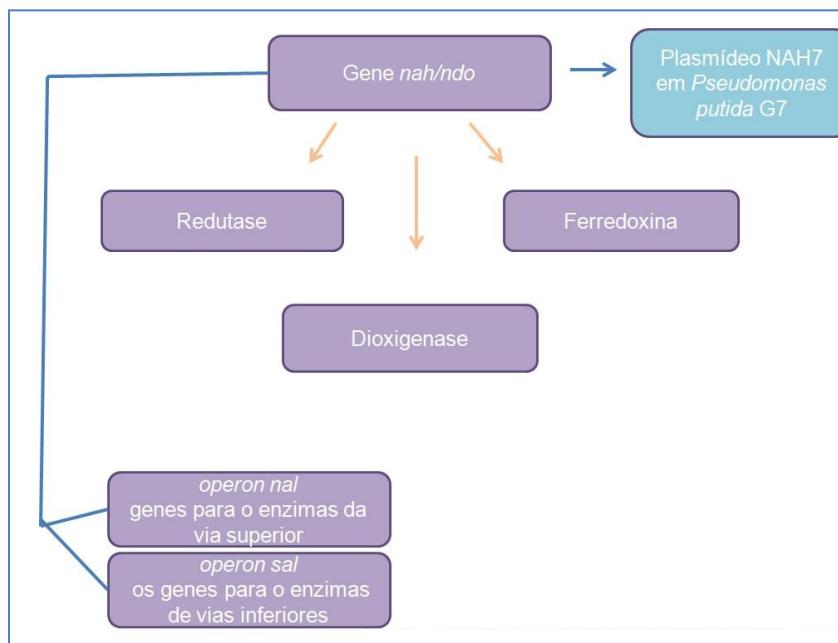
Três tipos de alcano mono-oxigenases são conhecidas; uma rubredoxina [2FeO] dependente, proteína que foi descrita para bactérias (SHANKLIN &WHITTLE, 2003); uma alcano hidroxilase que é alternativamente encontrada em bactérias, pertencente à família CYP153 das mono-oxigenases do citocromo P450 e uma alcano hidroxilase CYP52 dependente de NADH também pertencente ao citocromo P450 que é encontrada em fungos e bactérias (KLOOS et al, 2006) (Figura 13). A rubredoxina codificada pelo gene *alkB*, encontra-se numa variedade de bactérias não relacionadas filogeneticamente (SMITS et al, 1999). Mais de sessenta homólogos da proteína AlkB são conhecidos (ROJO, 2010). Eles foram encontrados tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas e mostram uma grande diversidade de sequências, mas exercem a mesma função (VAN BEILEN et al, 2003). Sendo esta uma das famílias de genes relacionada à degradação de alcanos mais estudada.



**Figura 13:** Fluxograma das enzimas codificadas pelo gene *alkB*

Dentre os genes que codificam enzimas que degradam HPAs, *nah* e homólogos como o *ndo* são os genes mais estudados e codificam as enzimas naftaleno dioxigenases que são responsáveis pela biodegradação de HPA de baixo peso molecular (dois a três anéis) WILSON et al, 1999; ZHOU et al, 2006).

O *cluster* do gene *nah* de *Pseudomonas spp.* é composto por três enzimas: uma redutase, ferredoxina e dioxigenase, sendo a dioxigenase constituída de uma subunidade maior  $\alpha$  e subunidades pequenas  $\beta$  (Figura 14) (PARALES & RESNICK, 2004). Os genes do catabolismo do naftaleno presentes no plasmídeo NAH7 em *Pseudomonas putida* G7 já foram bem caracterizados, nesse plasmídeo, os genes catabólicos do naftaleno (*nah*) são organizados em dois operons: o *operon nal* contendo os genes para as enzimas da via superior envolvidas na conversão do naftaleno a salicilato, e o *operon sal* contendo os genes para as enzimas de vias inferiores envolvidas na conversão de salicilato a piruvato e acetaldeído (SIMON et al, 1993). Além do naftaleno, um número de trabalhos sobre degradação de fenantreno por várias espécies bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas foram relatadas (PENG et al, 2008; SEO et al, 2009; MALLICK ET AL, 2011). Ghosa et al (2013) em seu trabalho, relatou a assimilação de acenafteno e acenaftileno pela cepa *Acinetobacter sp.* AGAT-W, isolada a partir de amostras de solo contaminado com resíduos urbanos, utilizando o acenafteno como única fonte de carbono e energia.



**Figura 14:** Fluxograma das enzimas codificadas pelo gene *nah*

Visto que os micro-organismos exibem grande potencial nos processos de biorremediação, muitos trabalhos estão sendo realizados a fim de identifica-los e aos genes responsáveis pela degradação desses compostos, assim como estudos que visam melhorar a eficiência na degradação desses contaminantes.

Tendo em vista a necessidade de avaliar condições que melhorem a capacidade de degradação de contaminantes derivados do petróleo em solo, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil da comunidade microbiana após contaminação de diesel em solo rico em matéria orgânica adicionados de concentrações crescentes de fertilizante nitrogenado.

Geralmente a bioestimulação com adição de fertilizante melhora as taxas de biodegradação, entretanto, cada caso deve ser avaliado em relação a extensão da área, concentração de contaminante, microbiota presente no local e o tipo de solo que foi contaminado.

### **3. HIPÓTESES**

-A degradação de hidrocarbonetos mediada por micro-organismos em solo com alta concentração de matéria orgânica pode ser influenciada com a adição de ureia.

-A ureia irá influenciar na estrutura da comunidade bacteriana e conseqüentemente no perfil de degradação de hidrocarbonetos presentes no diesel.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliação do perfil da comunidade bacteriana após contaminação com diesel em solo adicionados de concentrações crescentes de fertilizante nitrogenado.

### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Análise da influência da ureia na biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e hidrocarbonetos alifáticos presentes no diesel
- Análise do comportamento da comunidade bacteriana do solo frente às diferentes concentrações de ureia
- Avaliação da capacidade de recuperação do solo dentro das condições estabelecidas

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Área de estudo e coleta de amostras**

A área de estudo foi a Cabruca dentro da Mata Atlântica localizada dentro da área da Universidade Estadual de Santa Cruz nas coordenadas 14°47'44.2"S 39°10'21.2"W, sul da Bahia. O solo para a montagem dos mesocosmos foi coletado a uma profundidade entre 0 e 15 cm. Para cada tratamento dos mesocosmos foram coletados 8 kg de solo, sendo 7 kg para cada mesocosmo, 300 g para análises físico-químicas, 3 g para extração de DNA e 50 g para análise cromatográfica. As amostras para análise molecular e cromatográficas foram colocadas em recipientes estéreis de 15 mL e 50 mL, respectivamente e armazenadas a -80 ° C. O solo coletado foi enviado à Universidade Federal de Viçosa, Laboratório de Análise de Solo, Tecido Vegetal e Fertilizante para análise de características físico-químicas (tabela 1).

### **5.2 Desenho experimental dos mesocosmos**

Os mesocosmos foram montados utilizando caixas de polietileno pretas com dimensões de 54 cm x 42 cm na parte superior por 42 cm x 28 cm na base, as caixas possuem altura de 13 cm. Cada caixa foi preenchida com 7 kg de solo coletados e peneirados em malha de 2 mm. Foram utilizados cinco tratamentos e três controles; cinco concentrações de ureia (ureia ultrapura Invitrogen<sup>TM</sup>). As condições foram: tratamento 1- 0,25% de ureia (T1); tratamento 2 - 0,5% (T2); tratamento 3 - 1% (T3); tratamento 4 - 2% (T4); tratamento 5 - 4,0% (T5) (w/v). Os controles foram preparados nas seguintes condições: controle 1- solo com 1% de ureia (C1); controle 2- solo com 1% de diesel (C2); controle 3- solo sem adição de nutrientes ou contaminantes (C3) (SOUZA, 2013 adaptado). Cada mesocosmo foi contaminado com 1% de Diesel e misturados manualmente. O experimento foi realizado em triplicata e armazenado em estufa de casa de vegetação (localizada nas adjacências do Centro de Biotecnologia e Genética da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, BA) pelo prazo de 63 dias a 32°C de temperatura. Cada amostra foi revolvida diariamente (uma vez ao dia) para manter o solo aerado. As amostras foram coletadas no tempo 0 h, 1 dia, 3 dias, 5 dias, 7 dias, 10 dias e posteriormente a cada 7 dias (14 dias, 21 dias, 28 dias, 35 dias, 42 dias, 49 dias, 56 dias e 63 dias).

### 5.3 Extração de DNA do solo

O DNA metagenômico foi extraído utilizando o kit Power Soil DNA extraction (MoBio) de acordo com as instruções do fabricante. Foram extraídos DNA a partir de todas amostras de solo incluindo os controles (0 h, 1 dia, 3 dias, 5 dias, 7 dias, 10 dias,

14 dias, 21 dias, 28 dias, 35 dias, 42 dias, 49 dias, 56 dias e 63 dias). O DNA extraído foi armazenado em freezer -80°C e posteriormente liofilizado (Liofilizador LS300). O DNA extraído foi enviado ao National Research Council Canada onde foi quantificado, utilizando o método fluorimétrico de quantificação de DNA com a utilização do reagente PicoGreen®, em espectrofotômetro (Tecan Safire®, Switzerland) no comprimento de onda 260 nm, no software Magellan 6. As análises subsequentes a liofilização do DNA foram realizadas no Canadá através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da CAPES sob número de processo 88881.132673/2016-01.

### 5.4 Amplificação e sequenciamento do gene bacteriano 16S rRNA

As bibliotecas para sequenciamento foram preparadas de acordo com o guia “Preparação da Biblioteca de Sequenciamento Metagenômico 16S” da Illumina (Part # 15044223 Rev. B), com exceção do uso do Qiagen HotStar MasterMix para a primeira PCR (“PCR amplicon”). Os *primers* padrão específicos foram (sem a sequência do adaptador): 515F-Y GTG YCAGCMGCCGCGGTAA e 926R CCGYCAATTYMTTTRAGTTT (PARADA et al, 2016). A primeira PCR (“PCR de amplificação”) foi realizada por 25 ciclos com temperatura de anelamento de 55 ° C no termociclador Mastercycler®nexus (Eppendorf) O *pool* de amostras diluídas foram carregadas em equipamento Illumina MiSeq (Illumina inc., San Diego, CA,USA) e sequenciadas utilizando um Kit de Reagentes MiSeq de 600 ciclos v3.

### 5.5 Análise dos dados da sequência do gene 16S rRNA

As *reads* de sequenciamento foram agrupadas em 97% de identidade. Cada representante de cluster foi então classificado usando o classificador taxonômico RDP

classifier (WANG et al, 2007) em combinação com o banco de dados Greengenes training set. Uma tabela de OTU (unidade taxonômica operacional) foi obtida combinando a abundância de cada agrupamento com sua taxonomia resultante. Essa tabela OTU normalizada foi usada para análise *downstream* e para o cálculo de métricas de diversidade alfa e beta.

## **5.6 Análise cromatográfica da degradação do Diesel**

Amostras de solo com ureia nas concentrações estabelecidas e sem ureia foram removidas dos mesocosmos nos dias 0, 7, 14, 35 e 63 para análise de degradação. Primeiramente foi realizada a extração do óleo feita a partir de 10 g de solo com 10 ml de solvente acetona (Synth<sup>®</sup>) e hexano (Vetec<sup>®</sup>) preparado na solução mistura na proporção de 1:1. As suspensões resultantes foram sonicadas durante 30 min em banho-maria (Max Clean 1600, Unique). Após essa etapa foi adicionado 10 mL do solvente de extração e a mistura foi agitada em vórtex (Vortex Mixer, Vixar) por 1 minuto e novamente sonicadas por 30 minutos e vórtex por 1 minuto. A suspensão obtida foi armazenada em tubo de vidro ao qual foi adicionado 500 mg de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro (FMaia<sup>®</sup>) a fim de retirar a água presente nas amostras (COULON et al, 2010). As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo gasoso (Varian CP 3800) usando a coluna RTX – 5 (Restek, 30 m; 0,25 mm; 0,30µm film) usando hidrogênio como gás de arraste. Um microlitro de cada amostra foi injetado a 280°C. A temperatura da coluna começou em 35°C por 5 minutos, seguida de aquecimento de 5°C por minuto até 300°C e manteve por 20 minutos. Os padrões utilizados para identificação e quantificação dos picos correspondentes foram Polynuclear aromatic hydrocarbon mix (Sulpelco, USA) para hidrocarbonetos aromáticos e C7 – C40 alkanes standart (Sulpelco, USA) para alcanos de cadeia média. A porcentagem de degradação dos compostos foi calculada de acordo com a diferença entre as áreas dos picos das amostras dos tratamentos e as amostras do controle 2 ( 1% diesel), em que a área do pico do controle foi estabelecida em 100%.

## **5.7 Análises estatísticas**

Todas as análises estatísticas do sequenciamento do rRNA 16S foram realizadas no software R (The R fundação for Statistical Computing, Viena, Áustria).

Testes t pareados e não-pareados foram realizados usando a função `t.test`, correlações de ordem de classificação de Spearman ( $r_s$ ) usando a função `cor.test`, cálculo de dissimilaridade usando a função `vegdist` da biblioteca `vegan`, análise de coordenadas principais (PCoA) usando a função `cmdscale` e Permanova usando a função `adonis` da biblioteca `vegan`. O Método do Grupo de Pares Não Ponderados com Média Aritmética (UPGMA) foi realizado com base nas matrizes de distância Bray-Curtis e UniFrac usando a função `agnes` da biblioteca `vegan`. A significância estatística dos dados de degradação foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) e as médias foram então comparadas pelo teste de Tukey usando o software Prism Graphpad 8.0. As médias entre os tratamentos com  $P \leq 0,01$  foram consideradas significativamente diferentes.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Características físico-químicas do solo

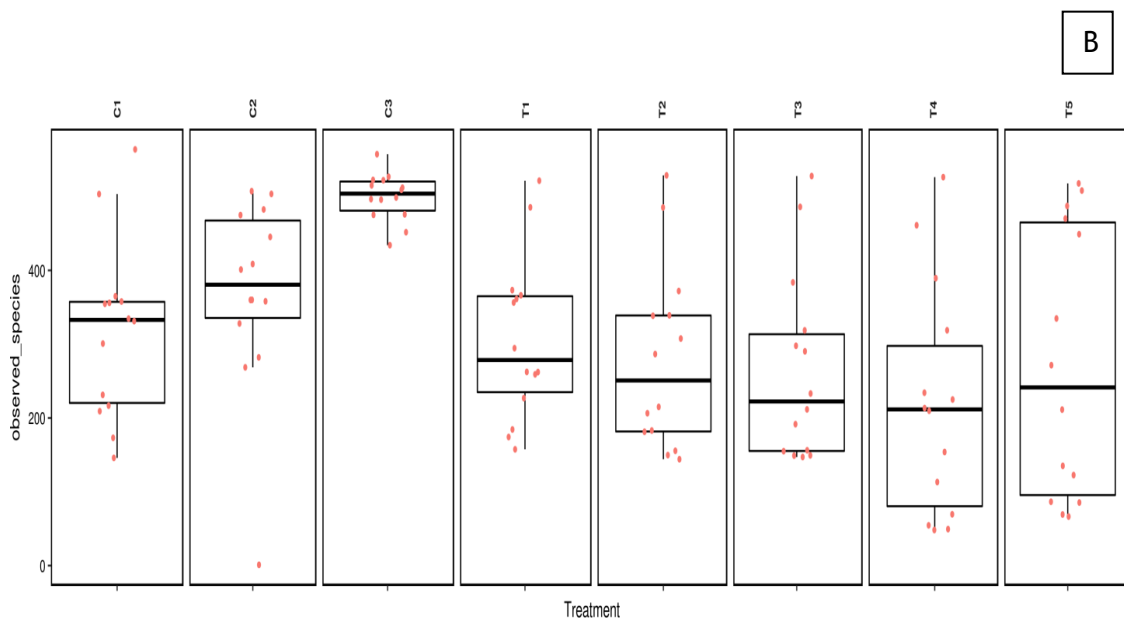
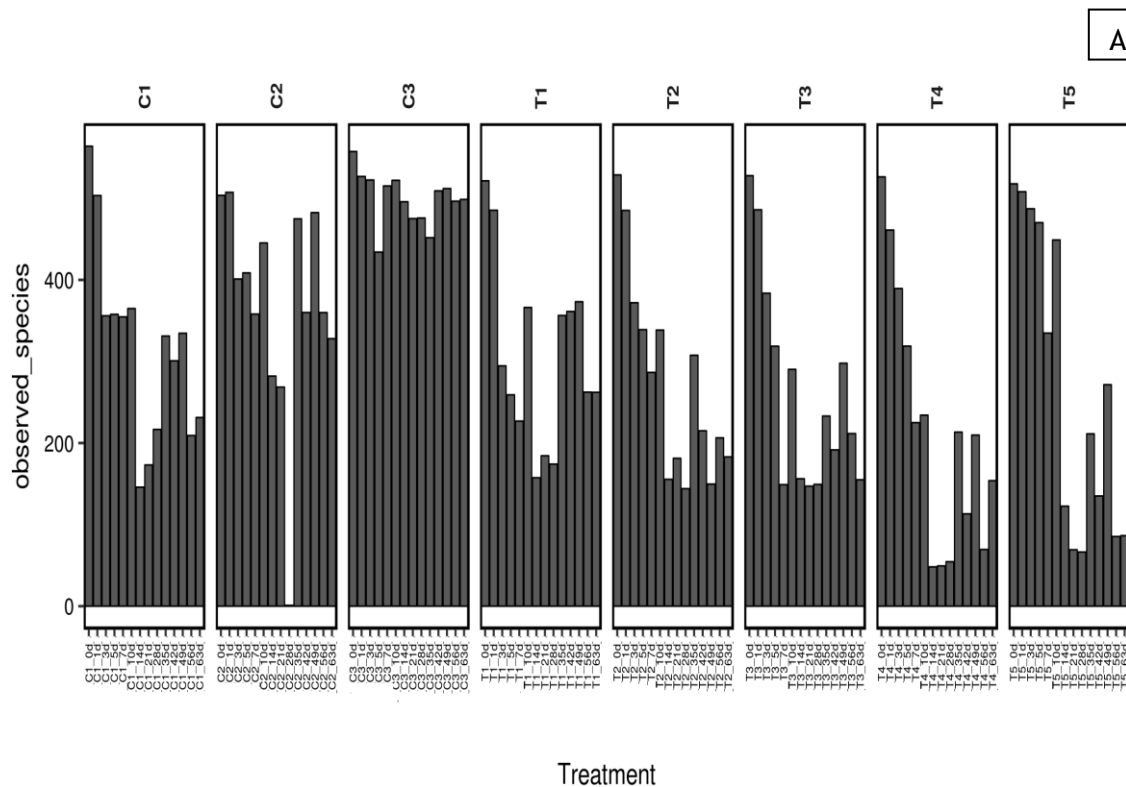
As análises de características físico-químicas do solo mostram que este solo é de caráter ácido, rico em matéria orgânica e possui elementos que sustentam o metabolismo microbiano como fósforo e alta humidade. Outras características podem ser observadas na tabela 1.

**Tabela 1:** Características físico-químicas do solo de Cabruca

| <b>pH</b><br><b>H<sub>2</sub>O</b>                               | <b>P</b><br><b>mg/dm<sup>3</sup></b>                  | <b>K</b><br><b>mg/dm<sup>3</sup></b> | <b>Ca<sup>2+</sup></b><br><b>Cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup></b> | <b>Mg<sup>2+</sup></b><br><b>Cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup></b> |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 5,47                                                             | 121,4                                                 | 74                                   | 13,58                                                            | 4,38                                                             |
| <b>Al<sup>3+</sup></b><br><b>Cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup></b> | <b>H+Al</b><br><b>Cmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup></b> | <b>N-Total</b><br><b>dag/kg</b>      | <b>Organic Matter</b><br><b>dag/kg</b>                           | <b>Humidity</b><br><b>%</b>                                      |
| 0,00                                                             | 3,5                                                   | 0,392                                | 107,7                                                            | 47,6                                                             |

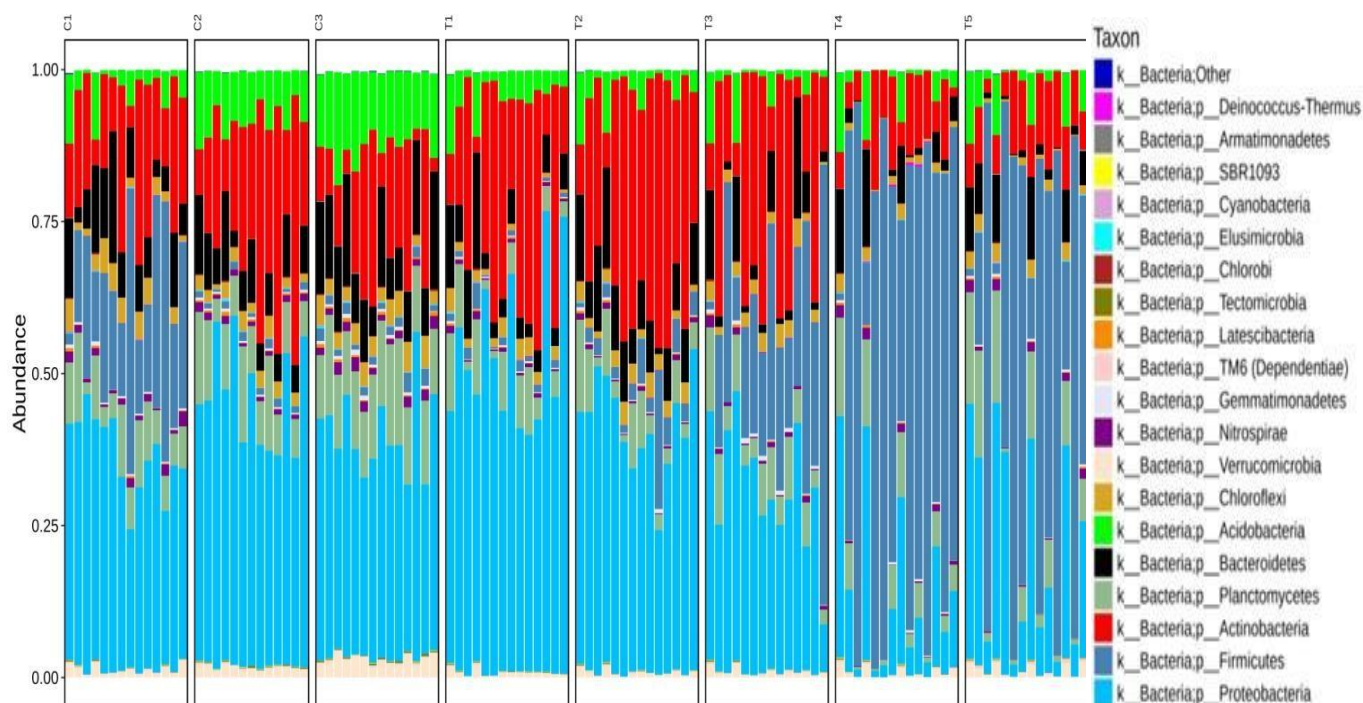
### 6.2 Sequenciamento do rRNA16S

A diversidade alfa calculada avaliada pelos dias de experimento (Figura 15 A) mostrou que no controle 3 (solo puro) o número de espécies observadas foi maior do que em qualquer outro tratamento ou controle. No controle 1 por análise total (Figura 15 B) houve uma redução das espécies observadas maior do que no controle 2 (1% diesel). Nos tratamentos 1, 2, 3 também houve redução, em níveis semelhantes. Os tratamentos 4 e 5 mostraram as maiores reduções no número de espécies (Figura 15 A).



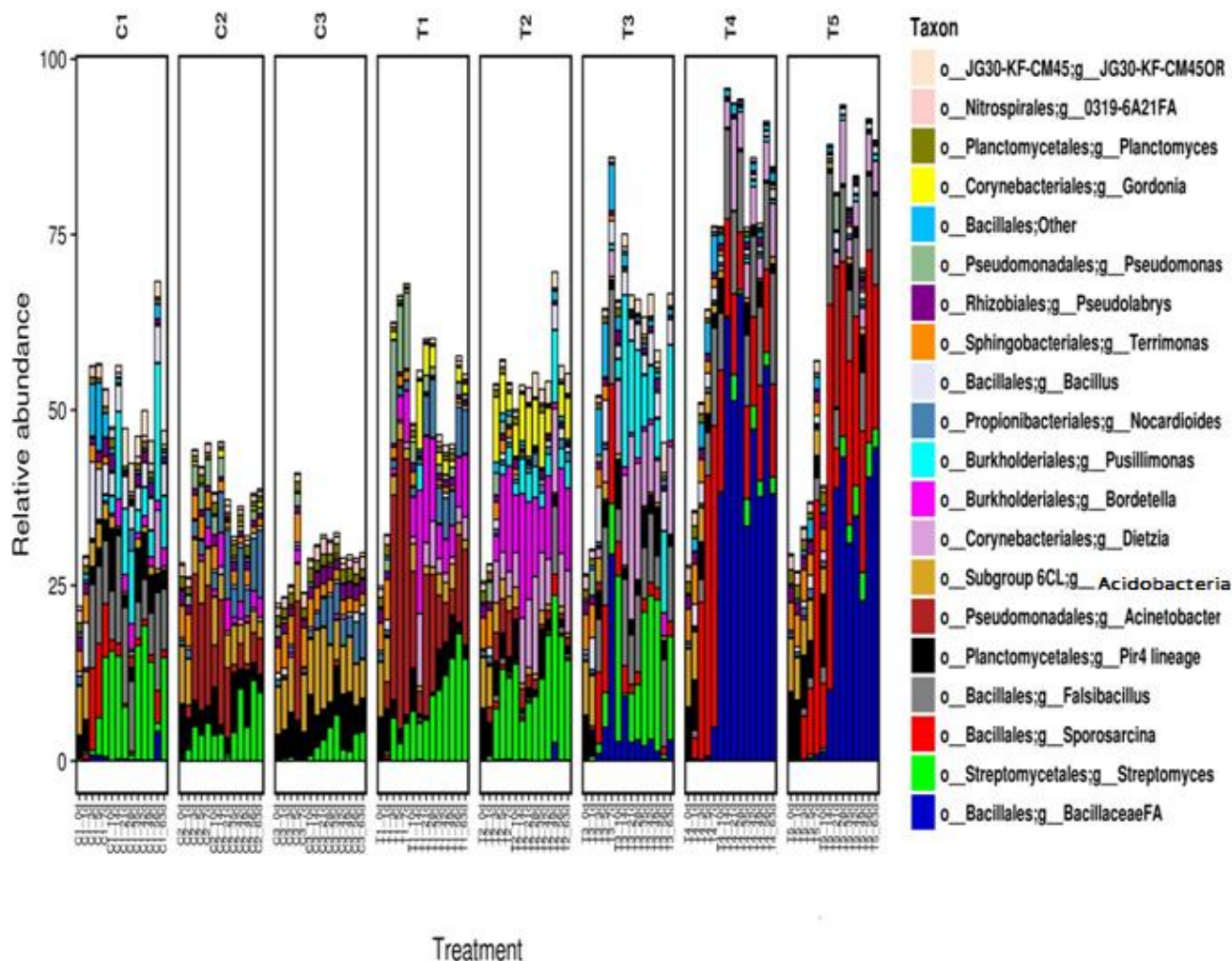
**Figura 15:** A: Gráficos Barplot de riqueza de espécies da diversidade alfa em função dos dias de coleta dos controle 1 (1% ureia) controle 2 (1% diesel), controle 3 (solo puro), tratamentos 1 (0,25% ureia, 1% diesel), 2 (0,5% ureia, 1% diesel), 3 (1% ureia, 1% diesel), 4 (2% ureia, 1% diesel) e 5 (4% ureia, 1% diesel). B: Gráfico Boxplot da análise de número total de espécies observadas para os controle 1 (1% ureia) controle 2 (1% diesel), controle 3 (solo puro), tratamentos 1 (0,25% ureia, 1% diesel), 2 (0,5% ureia, 1% diesel), 3 (1% ureia, 1% diesel), 4 (2% ureia, 1% diesel) e 5 (4% ureia, 1% diesel)

Através da figura 16 observa-se que o filo *Proteobacteria* foi mais abundante nos controles 2 e 3, seguido por *Actinobacteria* e *Acidobacteria*. No controle 1 o filo mais abundante foi *Proteobacteria*, seguido de *Firmicutes* e *Acidobacteria*. Já nos tratamentos 4 e 5 o filo mais predominante foi *Firmicutes*, seguido de *Proteobacteria*.



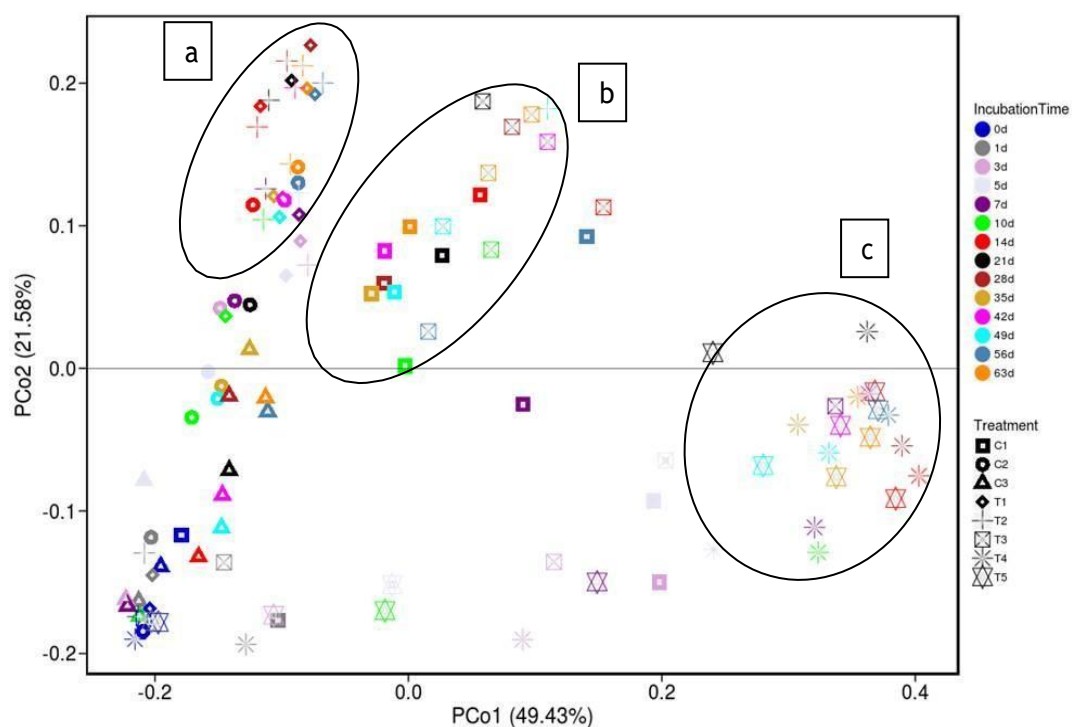
**Figura 16:** Abundância relativa dos filos bacterianos identificados através do gene 16S rRNA nos controle 1 (1% ureia), controle 2 (1% diesel), controle 3 (solo puro), tratamentos 1 (0,25% ureia, 1% diesel), 2 (0,5% ureia, 1% diesel), 3 (1% ureia, 1% diesel), 4 (2% ureia, 1% diesel) e 5 (4% ureia, 1% diesel).

Os grupos taxonômicos (gêneros e famílias) mais predominantes no controle 3 foram *Acidobacteria* e *Planctimicetales*. No controle 2 o grupo predominante foi *Acinetobacter*, seguido de *Streptomyces*. No controle 1 o gênero mais abundante foi *Pusillimonas*, seguido por *Streptomyces* e *Falsibacillus*. No tratamento 1 os gêneros mais abundantes foram *Acinetobacter*, *Bordetella* e *Dietzia*. No tratamento 2, *Streptomyces*, *Bordetella* e *Dietzia*. No tratamento 3 *Streptomyces*, *Dietzia*, *Pusillimonas*. Nos tratamentos 4 e 5 *Bacillacea*, *Sporocarcina* e *Falsibacillus* (Figura 17).



**Figura 17:** Abundância relativa dos gêneros e família bacterianos identificados através do gene 16S rRNA nos controle 1 (1% ureia), controle 2 (1% diesel), controle 3 (solo puro), tratamentos 1 (0,25% ureia, 1% diesel), 2 (0,5% ureia, 1% diesel), 3 (1% ureia, 1% diesel), 4 (2% ureia, 1% diesel) e 5 (4% ureia, 1% diesel).

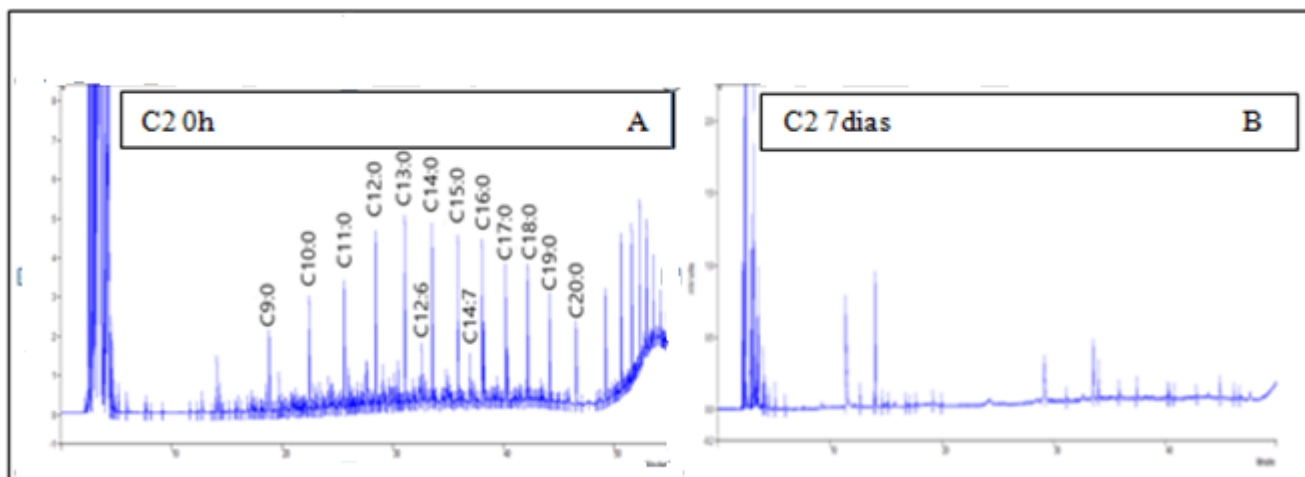
A análise de coordenada principal mostrou que a comunidade microbiana no tratamento 1 e 2 (Figura 18 a ), estão mais próximas entre si. Já o tratamento 3 está mais próximo do controle 1 (Figura 18 b). Os tratamentos 4 e 5 estão mais próximos entre si do que dos outros tratamentos e controles (Figura 18 c).



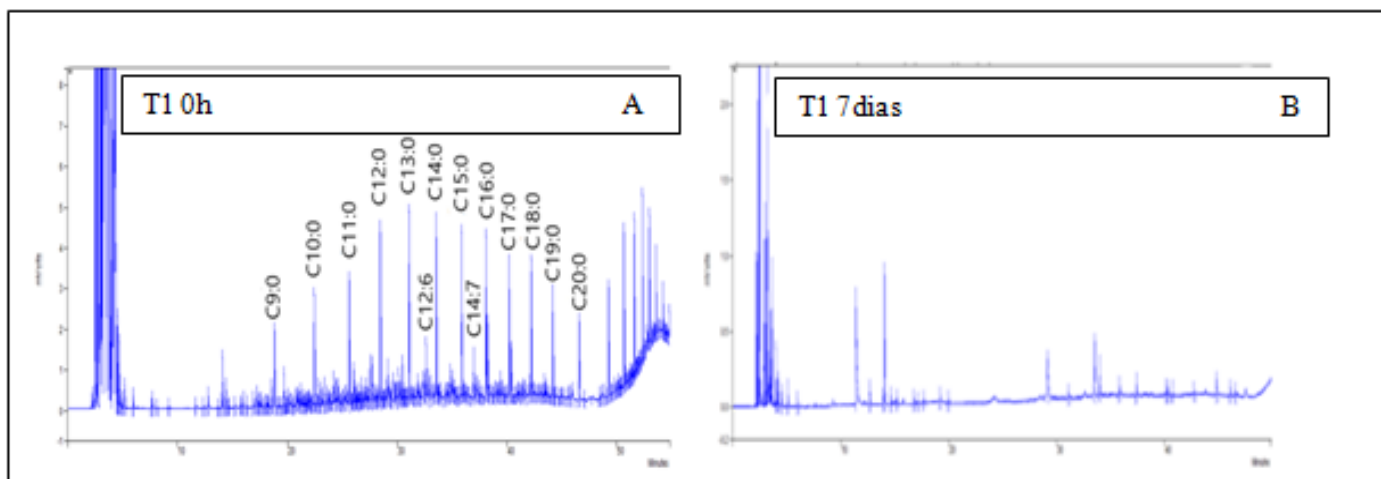
**Figura 18:** Coordenadas Principais calculadas através da distância de matrizes Bray-Curtis. Delimitado em “a” está o agrupamento de Tratamento 1 e Tratamento 2; b: Tratamento 3 e Controle 1; c: Tratamento 4 e tratamento 5.

### 6.3 Degradação do diesel por cromatografia gasosa

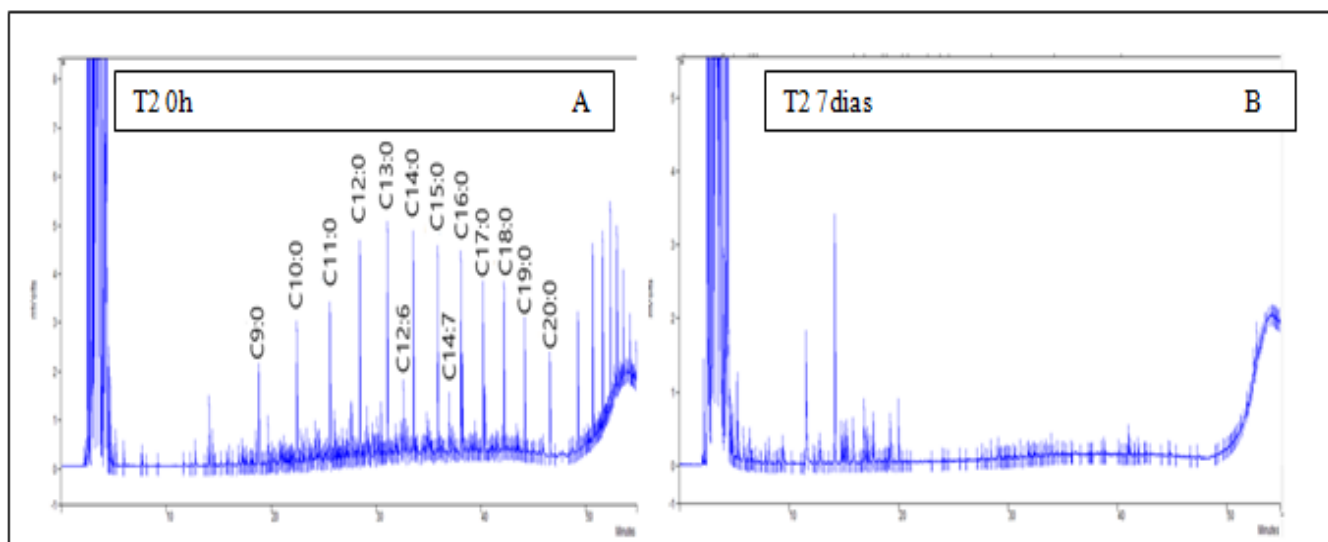
Os Controles 1 e 3 não mostraram nenhum traço de hidrocarbonetos. Todos os tratamentos e controle 2 apresentaram alto nível de degradação, próximo a 100%. Controle 2, tratamento 1, tratamento 2 e tratamento 3 mostraram 100% de degradação de compostos alcanos presentes em Diesel (C9 –C20) e compostos aromáticos policíclicos como acenafiteno e antraceno nos primeiros 7 dias de experimentos (Figuras 19, 20, 21, 22). O tratamento 4 apresentou redução de 44,6% destes compostos aos 7 dias, aos 14 dias 61,69% foram degradados, aos 35 dias de experimento 100% desses compostos foram degradados (Figura 23). O tratamento 5 mostrou redução da concentração para 54,53% aos 7 dias, 34,29% aos 14 dias, 29,20% aos 35 dias e 28% aos 63 dias (Figura 24). Foi o único tratamento que não degradou 100% destes compostos (Figura 25). Apenas os tratamentos 4 e 5 mostraram diferença significativa ( $p = 0.0003$  e  $p = 0.0004$ ) entre os níveis de degradação no mesmo período.



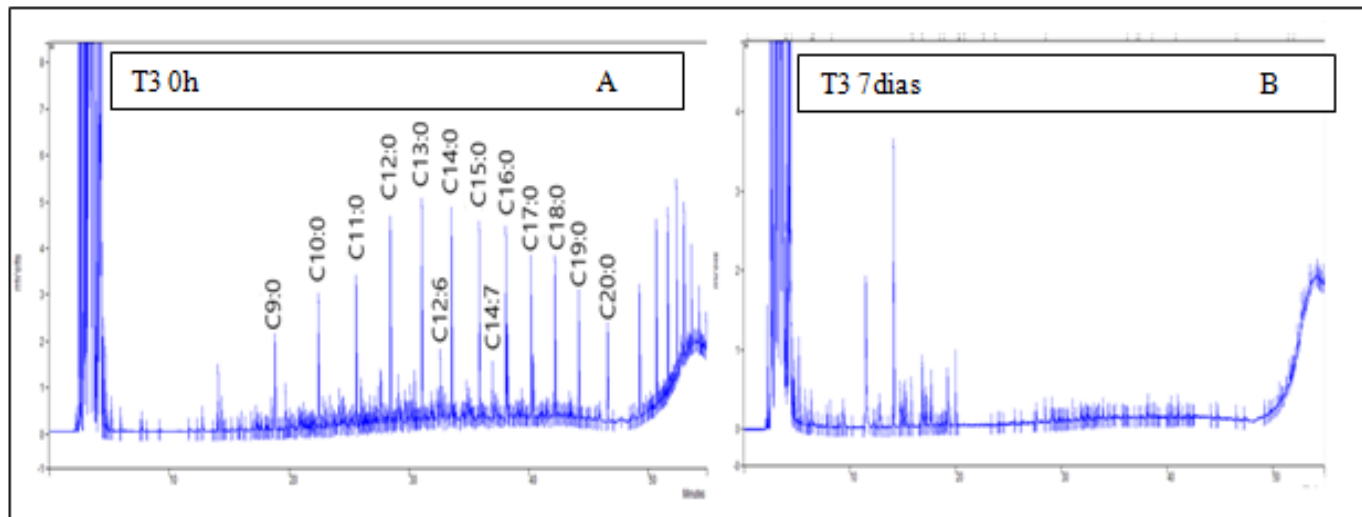
**Figura 19:** Cromatogramas da análise de degradação nos solos dos mesocosmos contaminados por diesel: A: controle 2 0 h, B: controle 2 7 dias . Os compostos representados pelos picos estão identificados de acordo com a quantidade de carbono nos alcanos e quantidade de carbonos e insaturações nos hidrocarbonetos aromáticos (C9:0 – nonano; C10:0 – decano; C11:0 – undecano; C12:0 – dodecano; C13:0 – tridecano; C14:0 – tetradecano; C15:0 – pentadecano; C16:0 – hexadecano; C17:0 – heptadecano; C18:0 – octadecano; C19:0 – nonadecano; C20:0 – eicosano; C12: 6 – acenaftileno; C14:7 – antraceno).



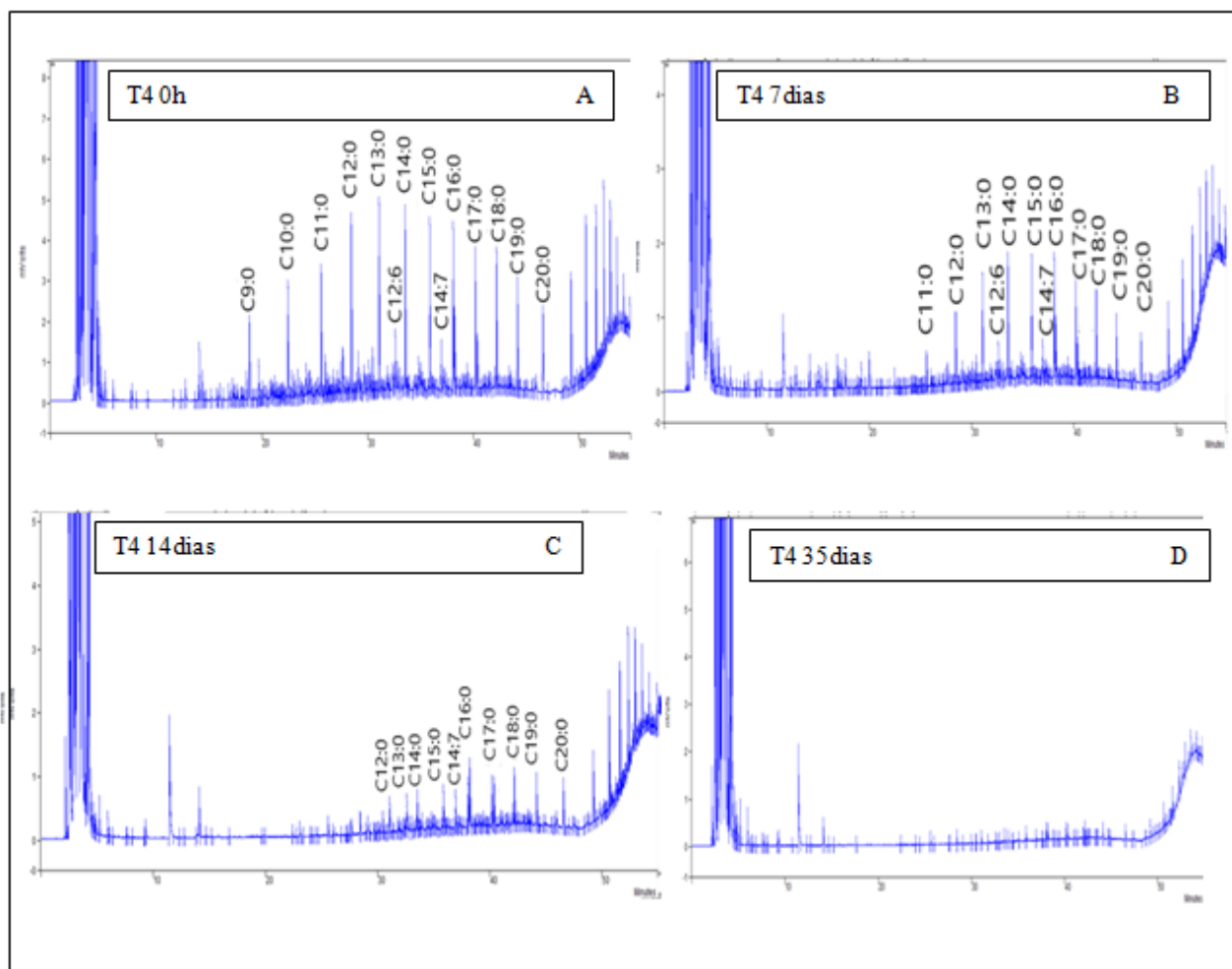
**Figura 20:** Cromatogramas da análise de degradação nos mesocosmos contaminados por diesel: A: Tratamento 1 0h, B Tratamento 1 7 dias. Os compostos representados pelos picos estão identificados de acordo com a quantidade de carbono nos alcanos e quantidade de carbonos e insaturações nos hidrocarbonetos aromáticos (C9:0 – nonano; C10:0 – decano; C11:0 – undecano; C12:0 – dodecano; C13:0 – tridecano; C14:0 – tetradecano; C15:0 – pentadecano; C16:0 – hexadecano; C17:0 – heptadecano; C18:0 – octadecano; C19:0 – nonadecano; C20:0 – eicosano; C12: 6 – acenaftileno; C14:7 – antraceno).



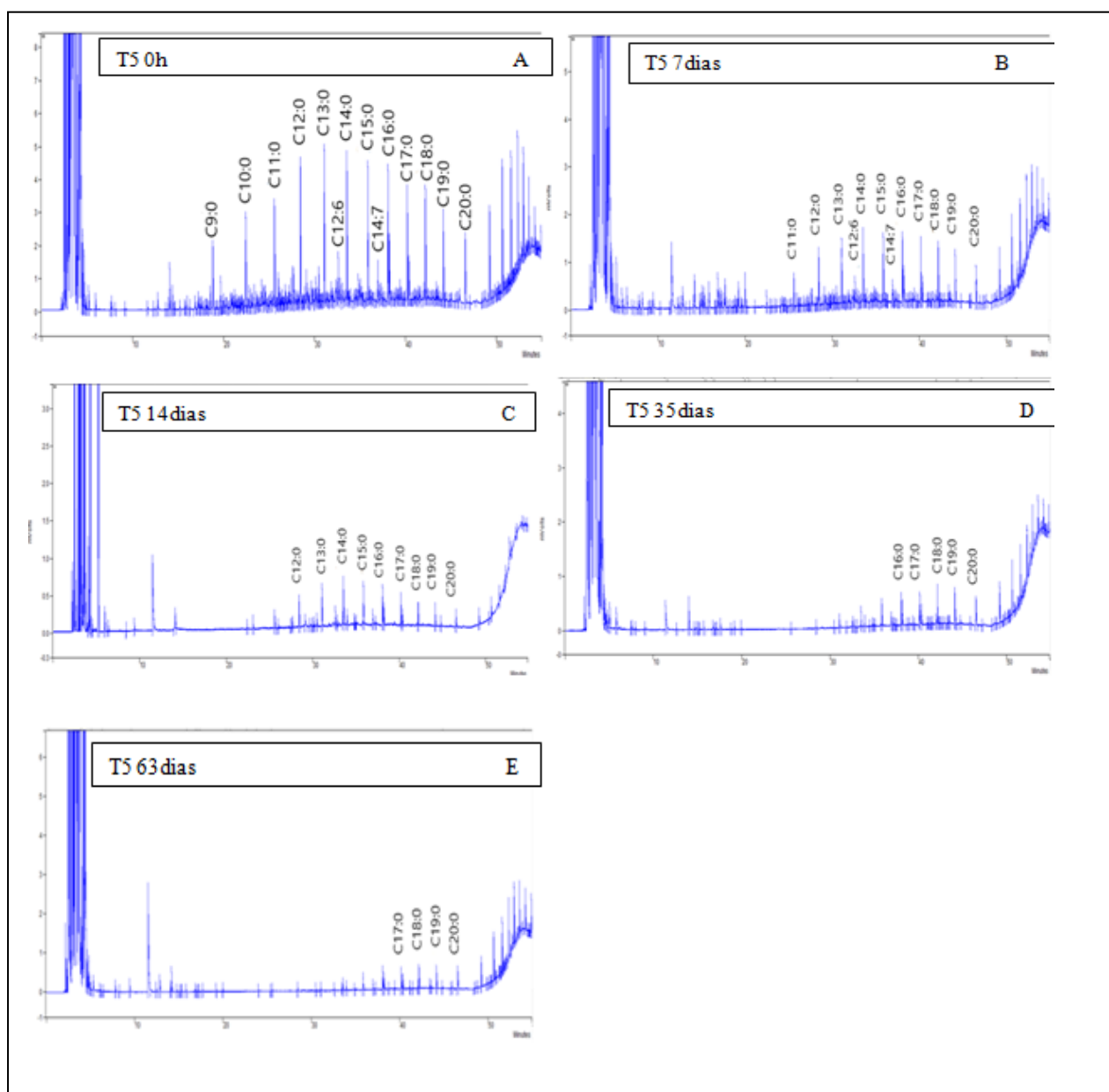
**Figura 21:** Cromatogramas da análise de degradação nos mesocosmos contaminados por diesel. A: Tratamento 2 0h, B: Tratamento 2 7 dias. Os compostos representados pelos picos estão identificados de acordo com a quantidade de carbono nos alcanos e quantidade de carbonos e insaturações nos hidrocarbonetos aromáticos (C9:0 – nonano; C10:0 – decano; C11:0 – undecano; C12:0 – dodecano; C13:0 – tridecano; C14:0 – tetradecano; C15:0 – pentadecano; C16:0 – hexadecano; C17:0 – heptadecano; C18:0 – octadecano; C19:0 – nonadecano; C20:0 – eicosano; C12: 6 – acenaftileno; C14:7 – antraceno).



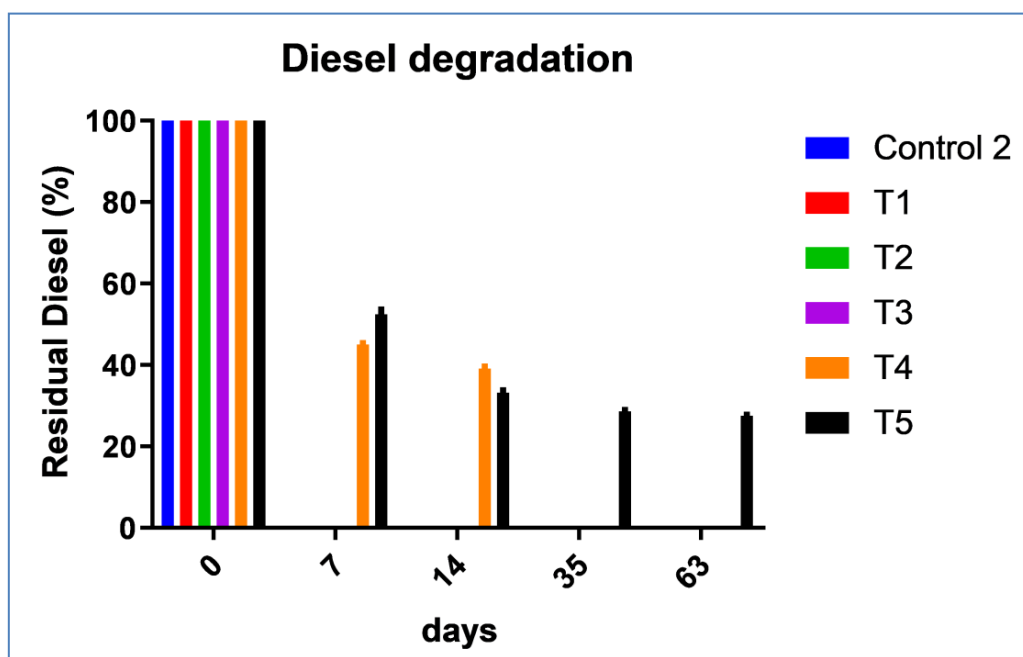
**Figura 22:** Cromatogramas da análise de degradação nos mesocosmos contaminados por diesel. A Tratamento 3 0 h, B Tratamento 3 7 dias. Os compostos representados pelos picos estão identificados de acordo com a quantidade de carbono nos alcanos e quantidade de carbonos e insaturações nos hidrocarbonetos aromáticos (C9:0 – nonano; C10:0 – decano; C11:0 – undecano; C12:0 – dodecano; C13:0 – tridecano; C14:0 – tetradecano; C15:0 – pentadecano; C16:0 – hexadecano; C17:0 – heptadecano; C18:0 – octadecano; C19:0 – nonadecano; C20:0 – eicosano; C12: 6 – acenaftileno; C14:7 – antraceno).



**Figura 23:** Cromatogramas da análise de degradação nos mesocosmos contaminados por diesel. C: Tratamento 4 14 dias, D: Tratamento 4 35 dias. Os compostos representados pelos picos estão identificados de acordo com a quantidade de carbono nos alcanos e quantidade de carbonos e insaturações nos hidrocarbonetos aromáticos (C9:0 – nonano; C10:0 – decano; C11:0 – undecano; C12:0 – dodecano; C13:0 – tridecano; C14:0 – tetradecano; C15:0 – pentadecano; C16:0 – hexadecano; C17:0 – heptadecano; C18:0 – octadecano; C19:0 – nonadecano; C20:0 – eicosano; C12: 6 – acenaftileno; C14:7 – antraceno).



**Figura 25:** Cromatogramas da análise de degradação nos mesocosmos contaminados por diesel. E: Tratamento 5 63 dias. Os compostos representados pelos picos estão identificados de acordo com a quantidade de carbono nos alcanos e quantidade de carbonos e insaturações nos hidrocarbonetos aromáticos (C9:0 – nonano; C10:0 – decano; C11:0 – undecano; C12:0 – dodecano; C13:0 – tridecano; C14:0 – tetradecano; C15:0 – pentadecano; C16:0 – hexadecano; C17:0 – heptadecano; C18:0 – octadecano; C19:0 – nonadecano; C20:0 – eicosano; C12: 6 – acenaftileno; C14:7 – antraceno).



**Figura 25:** Percentual de diesel residual presentes nos tratamentos 1 (0,25% ureia, 1% diesel), 2 (0,5% ureia, 1% diesel), 3 (1% ureia, 1% diesel), 4 (2% ureia, 1% diesel) e 5 (4% ureia, 1% diesel) e controle 2 (1% diesel, 1% diesel) no períodos 0h, 7, 14, 35 e 63 dias de experimento.

## 7. DISCUSSÃO

Compostos aromáticos oriundos do refino de borras oleosas e de seus derivados estão incluídos na lista dos principais poluentes de solo. Além disso, a queima destes combustíveis gera gases poluidores que contribuem para ocorrência de chuvas ácidas, efeito estufa dentre outros. Os micro-organismos de solos ricos em matéria orgânica são agentes efetivos na atenuação destes poluentes, produzindo uma série de reações enzimáticas.

Na biorremediação, o metabolismo microbiano pode ser estimulado com a adição de fertilizantes em processos de bioestimulação. Contudo, a degradação destes compostos pelos micro-organismos também leva a produção do principal gás do efeito estufa, o CO<sub>2</sub>.

O tipo de solo tem papel fundamental em como esse processo de remediação irá transcorrer, um solo pobre irá apresentar uma diversidade menor de micro-organismos se comparado a um solo rico em nutrientes e matéria orgânica. O solo utilizado para montagem dos mesocosmos foi classificado como médio arenoso ácido, com alta concentração de matéria orgânica e nitrogênio. Este solo não tem histórico de contaminação por hidrocarbonetos provenientes de vazamentos, visto que é proveniente de um sistema agroflorestal parcialmente preservado.

Nas condições experimentais, podemos afirmar que, como esperado, o solo não contaminado (Controle 3) mantém a riqueza da diversidade tanto em uma análise realizada por dia de experimento (Barplot Figura 10A) quanto na análise geral da riqueza (Boxplot Figura 10 B) até o fim do experimento. Ambas as análises demonstram alteração na riqueza em todos os outros tratamentos e controles, sobretudo quando observamos os dois tratamentos com maior concentração de ureia. Comparando o controle 2, contaminado apenas com diesel, com o controle 3 podemos inferir que o diesel exerce pressão seletiva sobre a riqueza da diversidade alfa. Nos tratamentos T4 e T5 observamos que tanto o diesel quanto a concentração do fertilizante exercem pressão sobre a riqueza da diversidade. O aumento da concentração de ureia parece exercer fortemente um impacto sobre a redução do número de grupos taxonômico. Staley e colaboradores (2018) também observaram o

mesmo efeito em relação a ureia.

Em relação a abundância relativa dos filos, levando-se em consideração a acidez no solo observa-se que no controle 3 (solo sem contaminação) e no controle 2 (solo

contaminado com 1% diesel) é notável a presença de *Acidobacterias*, contudo este grupo diminui visualmente no controle 1 e tratamentos com a adição do fertilizante que atua modificando o pH do solo. É importante destacar que os mesmos controles (2, 3) tem predominância de *Proteobacteria* que abriga tanto espécies nitrificantes quantos espécies degradadoras.

Na comunidade microbiana foi possível observar que a presença do diesel favorece a dominância de *Proteobacteria* (exceto em T4 e T5) e *Actinobactéria*. O mesmo foi observado por Sutton et al, 2013 e Jung et al, 2016. Contudo, essa dominância é drasticamente alterada nos resultados apresentados para tratamentos onde a concentração de ureia foi mais alta, mostrando grande influência na estrutura da comunidade.

As proporções nos filos nos tratamentos não foram similares no solo controle (controle 3). A adição da maior quantidade de ureia favoreceu o aumento da abundância de membros do filo *Firmicutes* que provavelmente são tolerantes ao estresse gerado pela alta concentração de ureia. Dados similares foram observados por O'Callaghan e colaboradores (2010) em relação a adição de ureia.

Aliados a esses achados, quando observamos os dados de abundancia relativa de gêneros, vemos que *Sporocarcina*, um *Firmicutes*, tem sua abundância aumentada nos tratamentos 4 e 5 . Sendo esse gênero reconhecidamente um produtor de urease (MAJID et al, 2016). Assim como a família *Bacillaceae* que é fundamental na ciclagem do nitrogênio (DING et al, 2004; VERBAENDERT et al,2011). Isso nos leva a crer que o aumento da abundância desse filo está intrinsecamente ligado ao aumento da fonte de nitrogênio. Para os outros grupos, ou a ureia foi tóxica e/ou favoreceu *Firmucutes* dominar a comunidade em detrimento dos outros grupos taxonômicos.

A despeito da concentração de ureia, os tratamentos 4 e 5 demonstram similaridade da comunidade microbiana diferindo muito aos controles e aos outros tratamentos (T1, T2, T3). Quando esses dados são comparados aos dados de degradação, observamos que os compostos são rapidamente degradados (7 dias) em

T1, T2, T3 e C2. Nos tratamentos 4 e 5 existe atenuação dos hidrocarbonetos ao longo do tempo, contudo os alcanos de cadeia longa como heptadecano (C17), octadecano (C18), nonadecano (C19) e eicosano (C20) tiveram sua degradação mais lenta e em menores taxas. Mesmo após 63 dias de experimento é observada a persistência de hidrocarbonetos de cadeia longa no Tratamento 5. Altos níveis de nutrientes podem provocar efeitos negativos na biodegradação de poluentes orgânicos, como observado por Carmichael e Pfaender, (1997), e Chaîneau e colaboradores, (2005). Nessas condições experimentais observamos uma relação inversa, pois quanto menor a concentração de ureia mais rápida a degradação.

A degradação lenta e em menor escala de T4 e T5 nos leva a 2 hipóteses: A primeira seria a dominância de *Firmicutes* com espécies tolerantes e degradadoras de ureia, porém com baixa capacidade de degradar alcanos de cadeia longa. A segunda hipótese seria sobre a toxicidade exercida pela ureia sobre os biodegradadores fazendo com que sua abundância seja reduzida e consequentemente a redução da degradação.

Vale ressaltar que, como o diesel em todos tratamentos estavam na mesma concentração, o que determinou a mudança no perfil de degradação foi o aumento da concentração de ureia.

Inicialmente (tempo 0 h) todas as unidades experimentais estavam agrupadas e com o passar dos dias ocorre uma diferenciação atribuídas pelos efeitos da adição de ureia. Os tratamentos com os maiores teor de ureia (T4 e T5) foram os grupos que mais divergiram. O controle 1 e tratamento 3 estão mais próximos entre si mesmo T3 contendo 1% de diesel. Isso nos leva a crer que o diesel não influencia representativa neste agrupamento devido ao controle 1 ter apenas ureia.

O gênero *Acinetobacter* parece estar relacionado com tratamentos com a presença do diesel e baixas concentrações de ureia. Nos tratamentos em que a concentração da ureia dobrou, sua abundância reduziu sensivelmente. Esse gênero é conhecido pela sua capacidade de degradar n-alcanos, muitos dos seus integrantes são capazes de degradar lignina, fenol e produzir biossurfactante (DI CELLO et al, 1997; FONDI et al, 2016; HO et al, 2017). Diante dessas habilidades é justificável a sua abundância em C2 e T1.

O gênero *Streptomyces* apresenta um comportamento similar. É possível perceber que dentre os gêneros mais abundantes nos tratamentos 1 e 2 os únicos gêneros diferentes entre eles foram *Acinetobacter* e *Bordetella*, que devem apresentar tolerâncias diferentes frente a ureia. Os gêneros *Streptomyces*, *Bordetella* e *Dietzia* já foram relatados como degradadores de hidrocarbonetos, sendo *Streptomyces* e *Bordetella* capazes de degradar compostos aromáticos como o naftaleno e o gênero *Dietzia*, alcanos de cadeia longa (BODTKER et al, 2008; WANG et al, 2011; BALACHADRAN et al, 2012; FERRADJI et al, 2014; LIANG et al, 2016; SOUSA et al, 2017).

Comparando-se o tratamento 3 com o controle 1 que tem a mesma concentração de ureia foi possível observar que a ureia favoreceu a dominância dos gêneros *Pusillimonas*, *Streptomyces* e *Falsibacillus*. Assim como o gênero *Streptomyces*, o gênero *Pusillimonas* têm representantes que degradam os alcanos que são constituintes do diesel (CAO et al, 2011; LI et al, 2013), entretanto foi possível observar que a presença de hidrocarbonetos não foi um fator determinante para o seu aumento de abundância, visto que o aumento desta é favorecido pela ureia, mesmo na ausência do diesel. É possível inferir também que mesmo que os grupos mais abundantes no tratamento 1 e 2 sejam diferentes do tratamento 3, a taxa de degradação é a mesma, indicando que a estrutura funcional da comunidade se comporta igual. Como diferentes espécies podem ter a mesma função nos ecossistemas, a redundância funcional prevê que a perda de espécies não necessariamente altera o funcionamento do ecossistema devido à sua substituição por outras espécies para a manutenção do processo (PHILIPPOT et al, 2013).

Nos tratamentos 4 e 5, onde houve uma redução na biodegradação, os grupos taxonômicos mais abundantes foram *Bacillacea*, seguida de *Sporosarcina* e *Falsibacillus*. Os gêneros citados, conhecidos por sua capacidade de degradação e presentes nos demais tratamentos, tiveram sua abundância reduzida.

O gênero *Falsibacillus* foi recentemente descrito e é atualmente compreendido por uma ou poucas espécies. A espécie que era anteriormente *Bacillus pallidus*, hoje se chama *Falsibacillus pallidus* (ZHOU et al, 2009). O que se tem relatado é que ela pode

degradar o composto nitrogenado nitrila (CAMERON et al 2005) e converter açúcares (POONPERM et al, 2008) etc., mas para esse gênero especificamente não há relatos sobre capacidade de degradar diesel. É possível que sua plasticidade metabólica permita que este gênero use hidrocarbonetos como fonte de carbono e tolere altas concentrações de ureia. *Sporosarcina*, como mencionado anteriormente, é um gênero microbiano produtor da enzima urease, enzima responsável por converter ureia em amônia (MAJID et al, 2016), o que justifica sua presença nos tratamentos com altas concentrações de ureia.

A família *Bacillaceae* é composta por 62 gêneros, dentre eles o gêneros *Bacillus*, *Geobacillus* e *Aeribacillus* já foram relatados com espécies que tem a capacidade de degradar hidrocarbonetos (SORKHOH et al, 1993; AL-SHARIDAH et al, 2000; FENG et al, 2007, ZHENG et al, 2011; MULEC et al, 2013; TOUROVA et al, 2016). Entretanto, mesmo apresentando gêneros com capacidade de degradação, para esse estudo quando esse grupo domina a comunidade a degradação diminui ou se torna mais lenta. O que levanta a seguinte hipótese: A atividade metabólica desse grupo poderia estar mais voltada para metabolizar a ureia na tentativa de balancear o equilíbrio do ciclo do nitrogênio, deixando o consumo de hidrocarbonetos de cadeia longa em segundo plano por ser mais custoso degradá-los, preferindo então, usar a matéria orgânica já existente como fonte de carbono.

Finalmente, como este tipo de solo é rico em nitrogênio e matéria orgânica, foi possível perceber que a adição de ureia não é necessária no processo de bioestimulação, visto que não houve diferença significativa entre controle 2 e os tratamentos com as menores concentrações de ureia. Além disso, nas altas concentrações de ureia, a estrutura da comunidade mudou completamente e teve como consequência a redução da degradação. Sendo assim, é razoável pensar que em solos ricos em matéria orgânica há uma diversidade de micro-organismos com capacidade de degradar esses compostos sem interferência humana, trazendo a atenuação natural como peça chave na recuperação de tais tipos de ambiente.

## 8. CONCLUSÃO

A partir dos resultados deste estudo foi possível observar que a ureia é um fator muito importante na estruturação na comunidade microbiana, sendo seu efeito mais expressivo do que o efeito do diesel. Para o solo estudado, solo de Cabruca, que é um solo rico em matéria orgânica e com grande diversidade de micro-organismos, não houve necessidade de adição de composto nitrogenado, visto que as taxas de degradação foram as mesmas dos tratamentos com baixa concentração de ureia, não havendo diferença significativa entre eles e a degradação foi retardada ou não concluída nas concentrações maiores. O solo em questão apresentou capacidade de se recuperar de uma possível contaminação. Outros estudos são necessários a fim de entender a relação de alguns desses grupos com a ureia e o comportamento em concentrações mais altas de diesel. Além disso, o isolamento e análise desses micro-organismos podem ser interessantes do ponto de vista biotecnológico. Vale ressaltar que a atenuação natural de hidrocarbonetos em solo ricos em matéria orgânica continua sendo fator essencial nas questões de restauração ambiental.

## 9. REFERÊNCIAS

- ABU-ELSAOUD, A M.,. NAFADY N. A, ABDEL-AZEEM, A. M. (2017). Arbuscular mycorrhizal strategy for zinc mycoremediation and diminished translocation to shoots and grains in wheat. **PLOS ONE**
- AL-SHARIDAH, A., RICHARDT, A., GOLECKIL, J. R., DIERSTEIN, R., TADROS, M. H. (2000). Isolation and characterization of two hydrocarbon-degrading *Bacillus subtilis* strains from oil contaminated soil of Kuwait. **Microbiological Research** 157, 155 – 164
- ANDREONI, V., BERNASCONI, S., COLOMBO, M., VAN BEILEN, J.B., CAVALCA, L., (2000). Detection of genes for alkane and naphthalene catabolism in *Rhodococcus* sp. strain 1BN. **Environ. Microbiol.** 2, 572–577.
- ATLAS, R. M. (1991). Microbial Hydrocarbon Degradation-Bioremediation Oil Spills. **J Chem Tech Biotech**, p. 149–156
- AZUBUIKE, C. C., CHIKERE, C.B., OKPOKWASILI, G.C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal Microbiology Biotechnology** 32:180
- BAHADURE, S., KALIA, R., CHAVAN, R. (2013). Comparative Study of Bioremediation of Hydrocarbon Fuels. **International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research**. Vol 4, nº 7, PP. 677-686
- BALACHANDRAN, C., DURAIPANDIYAN, V., BALAKRISHNA, K., IGNACIMUTHU, S. (2012). Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. **Bioresource Technology** 112 83–90
- BAMFORTH, S. M., SINGLETON, I. (2005). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal Chemical Technology Biotechnology** 80:723–736.
- BERNHARD, A. (2010) The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. **Nature Education Knowledge** 3(10):25
- BEWLEY, R.J.F., WEBB, G. (2001). In situ bioremediation of groundwater contaminated with phenols, BTEX and PAHs using nitrate as electron acceptor. **Land Contam. Reclam.** 9, 335–347.
- BØDTKER, G., HVIDSTEN, I. V., BARTH, T., TORSVIK, T. (2008). Hydrocarbon degradation by *Dietzia* sp. A14101 isolated from an oil reservoir model column.

CHAÎNEAU, C. H., ROUGEUX, G., YÉPRÉMIAN, C., OUDOT, J. (2005). Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. **Soil Biology & Biochemistry** 37 1490–1497

CALLAGHAN, A. V. (2012). Metabolomic investigations of anaerobic hydrocarbon-impacted environments. **Current Opinion in Biotechnology** 24:506–515.

CAMERON, R. A., SAYED, M., COWAN, D. A. (2005). Molecular analysis of the nitrile catabolism operon of the thermophile *Bacillus pallidus* RAPc8B. **Biochimica et Biophysica Acta** 1725 35 – 46

CAO, B., MA, T., REN, Y., REN, Y., LI, G., LI, P., GUO, X. DING, P., FENG, L. (2011). Complete Genome Sequence of *Pusillimonas* sp. T7-7, a Cold-Tolerant Diesel Oil-Degrading Bacterium Isolated from the Bohai Sea in China. **Journal Of Bacteriology**, P. 4021–4022

CARMICHAEL L. M., PFAENDER F. K., (1997). The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. **Biodegradation**. 8(1):1-13.

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

CHIEN, H. Y.; KAO, C. M.; SURAMPALLI, R. Y.; HUANG, W. Y., HOU, F. (2011). Development of a Four-Phase Remedial Scheme to Clean Up Petroleum-Hydrocarbon Contaminated Soils. **Journal of Environmental Engineering**, Vol. 137, No. 7,

**COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB** 2018.  
Texto explicativo Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no estado de São Paulo

COULON, F., AL AWADI, M., COWIE, W., MARDLIN, D., POLLARD, S., CUNNINGHAM, C., RISDON, G., ARTHUR, P., SEMPLE, K. T., PATON, G. I. (2010). When is a soil remediated? Comparison of biopiled and windrowed soils contaminated with bunker-fuel in a full-scale Trial. **Environmental Pollution**. 158(10):3032-40

DI CELLO, E., PEPI, M., BALDI, F., FANI, R. (1997). Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, *Acinetobacter venetianus*. **Research Microbiol.**, 148, 237-249

DING, Y., WANG, J., LIU, Y., & CHEN, S. (2005). Isolation and identification of nitrogen-fixing bacilli from plant rhizospheres in Beijing region. **Journal of Applied Microbiology**, 99(5), 1271–1281. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02738.x

**ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY** - (<https://www.epa.gov/pesticide-incidents/how-report-spills-and-environmental-violations>) acessado em 03/01/2019

FAO (2017). FAOSTAT. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RF>  
FERNANDEZ, A. L., SHEAFFER, C. C., WYSE, D. L., STALEY, C., GOULD, T. J., AND SADOWSKY

FENG, L., WANG, W., CHENG, J., REN, Y., ZHAO, G., GAO, C., TANG, Y., LIU, X., HAN, W., PENG, X., LIU, R., WANG, L. (2007). Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. **PNAS** vol 104 no 13

FERRADJI, F. Z., MNIF, S., BADIS, A., REBBANI, S., FODIL, D., EDDOUAOUA, K., SAYADI, S. (2014). Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). **International Biodeterioration & Biodegradation** 86 300 - 308

FERREIRA, S. L., SANTOS, A. M., SOUZA, G. R., POLITO, W. L., MÓDOLO, D. L. (2008). Análise por cromatografia gasosa de btex nas emissões de motor de combustão interna alimentado com diesel e mistura diesel-biodiesel (B10). **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 3, 539-545, 2008

FETTER, C. W. **Contaminant Hydrogeology**. New York: Macmillan, 1993.

FONDI, M., MAIDA, I., PERRIN, E., ORLANDINI, V., LA TORRE, L., BOSI, E., NEGRONI, A., ZANAROLI, G., FAVA, F., DECOROSI, F., GIOVANNETTI, L., VITTI, C., DIJKSHOORN, L., FANI, R. (2016). Genomic and phenotypic characterization of the species *Acinetobacter venetianus*. **Nature Scientific Reports** 6:21985 |

FUENTES, S., MÉNDEZ, V., AGUILA, P., & SEEGER, M. (2014). Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98(11), 4781–94.

**FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE – FEAM** 2018. Inventário de áreas contaminadas de Minas Gerais 2017.

GLAZER, A. N. NIKAIDO, H. **Microbial biotechnology : fundamentals of applied microbiology**. Published in 1995 in New York (N.Y.) by Freeman

GHOSAL, D., DUTTA, A., CHAKRABORTY, J., BASU, S., DUTTA, T. K. (2013). Characterization of the metabolic pathway involved in assimilation of acenaphthene in *Acinetobacter* sp. Strain AGAT-W. **Res. Microbiol.** 164, 155– 163.

GHOSAL, D., DUTTA, G. S., T. K., AHN, Y. (2016). Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. **Frontiers in Microbiology** Volume 7 | Article 1369

GOJGIC-CVIJOVIC, G. D., MILIC, J. S., SOLEVIC, T. M., BESKOSKI V. P., ILIC, M. V., DJOKIC, L. S., NARANCIC, T. M., VRVIC, M. M. (2011). Biodegradation of

petroleum sludge and petroleum polluted soil by a bacterial consortium: a laboratory study. **Biodegradation** 23:1–14

GOLUEKE, C. G., MCGAUHEY, P. H., . GOTAS, H. (1954). Public-health and economic aspects of composting. **Bull World Health Organ.** 1954; 10(2): 307–314.

HO, M.T., WESELOWSKI, B., YUANA, Z.C. (2017). Complete Genome Sequence of *Acinetobacter calcoaceticus* CA16, Bacterium Capable of Degrading Diesel and Lignin. **Genome Announcements** Vol 5

How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites A Guide For Corrective Action Plan Reviewers. Chapter VIII Biosparging. **Environmental Protection Agency**, USA, 1994).

How To Evaluate Alternative Cleanup Technologies For Underground Storage Tank Sites A Guide For Corrective Action Plan Reviewers. Chapter III Bioventing. **Environmental Protection Agency**, USA, 1994).

HOWARTH, R. W. (2008). Coastal nitrogen pollution: A review of sources and trends globally and regionally. **Harmful Algae** 8 14–20.

JORGENSEN, K.S., PUUSTINEN, J., SUORTTI, A.-M. (2000). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. **Environmental Pollution** 107 245–254.

JUNG, J., PHILIPPOT, L., PARK, W. (2016). Metagenomic and functional analyses of the consequences of reduction of bacterial diversity on soil functions and bioremediation in diesel-contaminated microcosms. **Nature Scientific Reports** 6:23012.

KAO, C.M., CHEN, C.Y., CHEN, S.C., CHIEN, H.Y., CHEN, Y.L. (2008) Application of in situ biosparging to remediate a petroleum hydrocarbon spill site: field and microbial evaluation. **Chemosphere** 70:1492–1499

KLOOS, K., MUNCH, J. C., & SCHLOTTER, M. (2006). A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (alkB) in soils based on PCR-hybridization. **Journal of Microbiological Methods**, 66(3), 486–96.

LI, P., WANG, L., FENG, L. (2013) Characterization of a novel Rieske-type alkane monooxygenase system in *Pseudomonas* sp. Strain T7-7. **Journal of Bacteriology** p. 1892–1901 v.195

LIN, T., PAN, P. AND CHENG, S. (2010) Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. **Journal of hazardous materials** 176(1– 3), pp. 27–34

LIANG,Y., ZHAO, H., DENG, Y., ZHOU, J., LI, G., SUN, B. (2016). Long term oil contamination alters the molecular ecological networksof soil microbial functional genes. **Frontiers in Microbiology** v. 7 article 60

MAJID, S. A., GRAW, M. F., NGUYEN, H., HAY, A. G. (2016). Draft Whole-Genome Sequence of Urease-Producing *Sporosarcina koreensis*. **Genome Announcements** Vol. 4 Issue 2

MALLICK,S.,CHAKRABORTY,J., DUTTA,T.K.(2011).Role of oxygenases inguiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular- weight polycyclic aromatic hydrocarbons:a review. **Crit.Rev.Microbiol.** 37, 64–90.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. Rio Claro(SP), 164f,. Tese – (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) Curso de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista. 2006

MARIANO, A. P., ANGELIS, D. F., PIRÔLLO, M. P. S. , CONTIERO, J. , BONOTTO, D. M. (2009). Investigation about the Efficiency of the Bioaugmentation Technique when Applied to Diesel Oil Contaminated Soils. **Brazilian Archives Of Biology And Technology** Vol.52, n. 5: pp. 1297-1312

MEGHARAJ, M., RAMAKRISHNAN, B., VENKATESWARLU, K., SETHUNATHAN, N., NAIDU, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International* 37 1362–1375

MULEC, I. M., STEFANIC, P., ELSAS, J. D. v. ( 2013). Ecology of Bacillaceae. General overview of the Bacillaceae and Clostridia. **The Bacterial Spore: From Molecules to Systems**. Edited by P. Eichenberger and A. Driks

MULLIGAN, C. N. (2005). “Environmental applications for biosurfactants.” **Environmental Pollution**, 133(2), 183–198.

O’CALLAGHAN, M., GERARD, E. M., CARTER, P. E., LARDNER, R., SARATHCHANDRA, U., BURCH, G., ... BELL, N. (2010). Effect of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on microbial communities in a pasture soil amended with bovine urine. **Soil Biology and Biochemistry**, 42(9), 1425–1436.

PARADA, A. E., NEEDHAM, D. M., & FUHRMAN, J. A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. **Environmental Microbiology**, 18(5), 1403–1414.

PARALES R, RESNICK SM. (2004). Aromatic hydrocarbon dioxygenases, p175–196. In Singh A, Ward OP (ed), *Soil biology*, vol 2. **Biodegradation and bioremediation**. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany

PARDIECK, D.L., BOUWER, E.J., STONE, A.T.(1992). Hydrogen-peroxide use to increase oxidant capacity for in situ bioremediation of contaminated soils and aquifers—areview. **J. Contam.Hydrol.** 9, 221–242

PENG,R.H.,XIONG,A.S.,XUE,Y.,FU,X.Y.,GAO,F.,ZHAO,W.,etal.(2008). Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiol.Rev.** 32, 927–955.

PEREZ-DE-MORA A, ENGEL. M., SCHLOTTER, M. (2011) Abundance and diversity of n-alkane-degrading bacteria in a forest soil co-contaminated with hydrocarbons and metals: a molecular study on alkB homologous genes. **Microbial Ecology** 62:959–972

PHILIPPOT, L., SPOR, A., HE'NAULT, C., BRU, D., BIZOUARD, F., JONES, C M., SARR, A., MARON, P (2013). Loss in microbial diversity affects nitrogen cycling in soil. **The ISME Journal** 7, 1609–1619.

POOMPERM, W., TAKATA. G., IZUMORI, K., (2008). Polyol conversion specificity of *Bacillus pallidus*. **Bioscience, Biotchenology, Biochemistry** 72(1), 231- 235

POWELL SM, BOWMAN JP, FERGUSON SH, SNAPE I (2010) The importance of soil characteristics to the structure of alkane-degrading bacterial communities on sub-Antarctic Macquarie Island. **Soil Biology Biochemical** 42:2012–2021

RASKIN, L. , KUMAR, P.B.A.N , DUSHENKOV, S. , SALT, D. E (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. **Current Opinion in Biotechnology** Volume 5, Issue 3, June 1994, Pages 285-290

REZENDE, R. P., MACIEL, B. M., DIAS, J.C.T., SOUZA, F.O. (2012). Microbial Outlook for the Bioremediation of Crude Oil Contaminated Environments. **Introduction to enhanced oil recovery (EOR) processes and bioremediation of oil contaminated sites**. Edited by Laura Romero-Zerón

ROJO, F (2009) Degradation of alkanes by bacteria. **Environmental Microbiology** 11:2477–2490.

ROJO f. (2010). Enzymes for Aerobic Degradation of Alkanes. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, K. N. Timmis (ed.).

SAMANTA, S. K., SINGH, V. & JAIN, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. **Trends in Biotechnology**. 20(6): 243-248.

SEO, J.S.,KEUM,Y.S.,LI,Q.X.(2009).Bacterial degradation of aromatic compounds. Int. **J.EnvIRON.RES.PublicHealth** 6, 278–309.

SHANKLIN, J., WHITTLE, E., (2003). Evidence linking the *Pseudomonas oleovorans* alkane  $\omega$ -hydroxylase, an integral membrane diiron enzyme, and the fatty acid desaturase family. **FEBS Letter**. 545, 188–192.

SIMON, M. J., OSSLUND, T. D., SAUNDERS, R., ENSLEY, B. D., SUGGS, S., HARCOURT, A., ZYLSTRA, G. J. (1993). Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB 9816-4. **Gene**, 127(1), 31–37. doi:10.1016/0378-1119(93)90613-8

SINGH, A., GAUBA, P. Mycoremediation: A Treatment for Heavy Metal Pollution of Soil. **J Civ Eng Environ Technol**. 2014; 1: 59±61

SMITS, T.H., RÖTHLISBERGER, M., WITHOLT, B., VAN BEILEN, J.B., (1999). Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains. **Environmental Microbiology**. 1,307–317.

SO, C.M., PHELPS, C.D., Young, L.Y. (2003) Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3. **Applied Environmental Microbiology** 69:3892–3900

SORKHOH, N. A., . IBRAHIM A. S, GHANNOUM, M. A., RADWAN, S. S. (1993). High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwaiti desert. **Applied Microbiology and Biotechnology** (39) 123 – 126

SOUSA, S. T. P., CABRAL, L., LACERDA, G.V. J., OLIVEIRA, V. M. (2017). Diversity of aromatic hydroxylating dioxygenase genes in mangrove microbiome and their biogeographic patterns across global sites. **Microbiology Open** 6:e490.

SOUZA, S.S. **Efeito da ureia na degradação microbiana de hidrocarbonetos alifáticos e policíclicos aromáticos em biopilhas utilizando solo de Mata Atlântica**. Ilhéus (BA).63f. Dissertação – (Mestrado em Biotecnologia e Biologia de Micro-organismos). Curso de Pós-graduação em Biotecnologia e Biologia de Micro-organismos, Universidade Estadual de Santa Cruz, 2013.

SUTTON, N. B., MAPHOSA, F., MORILLO, J. A., AL-SOUD, W. A., LANGENHOFF, A. A. M., GROTEHUIS, T., RIJNAARTS, H. H. M., SMIDT, H. (2013). Impact of Long- Term Diesel Contamination on Soil Microbial Community Structure. **Applied and Environmental Microbiology** 79:619–630.

THOMASSIN-LACROIX, E. J. M., ERIKSSON, M., REIMER, K. J., MOHN, W. W. (2002). “Biostimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil.” **Applied Microbiology Biotechnology**, 59(4-5), 551–556.

THRONE-HOLST, M., S. MARKUSSEN, A. WINNBERG, T. E. ELLINGSEN, H. K. KOTLAR, AND S. B. ZOTCHEV. (2006). Utilization of n-alkanes by a newly isolated strain of *Acinetobacter venetianus*: the role of two AlkB-type alkane hydroxylases. **Applied Microbiology Biotechnology** 72:353–360.

TOUROVA, T. P., SOKOLOVA, D. SH., SEMENOVA, E. M., SHUMKOVA, E. S., POLTARAUS, A. B., KORSHUNOVA, A. V., BABICH, T. L., NAZINA, T. N. (2016). Detection of n-Alkane Biodegradation Genes *alkB* and *ladA* in Thermophilic

Hydrocarbon-Oxidizing Bacteria of the Genera *Aeribacillus* and *Geobacillus*. **Microbiology**, Vol. 85, No. 6, pp. 693–707.

**TREASURE BOARD OF CANADA** (<http://www.tbs-sct.gc.ca/fcsi-rscf/cm-eng.aspx?clear=1>). Acessado em 03/01/2019

VAN BEILEN, J.B., WUBBOLTS, M.G. AND WITHOLT, B. (1994) Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. **Biodegradation** 5, 161±174

VAN BEILEN JB, LI Z, DUETZ WA, SMITS THM, WITHOLT B (2003) Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Science Technology* 58, 427–440

VAN BEILEN J.B, FUNHOFF E.G (2007) Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. **Applied Microbiology Biotechnology** 74: 13–21.

VERBAENDERT, I., BOON, N., DE VOS, P., & HEYLEN, K. (2011). Denitrification is a common feature among members of the genus *Bacillus*. **Systematic and Applied Microbiology**, 34(5), 385–391.

VOMBERG, A., & KLINNER, U. (2000). Distribution of *alkB* genes within n-alkane-degrading bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 89(2), 339–348.

WANG, Q, G. M. GARRITY, J. M. TIEDJE, AND J. R. COLE. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Appl Environ Microbiol.** 73(16):5261-7. .

WANG, X.B., CHI, C.Q., NIE,Y., TANG, Y.Q., TAN,Y., WUB, G., WUA, X.L. (2011). Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. **Bioresource Thecnology** 102 7555 – 7761

WENTZEL, A., ELLINGSEN, T.E., KOTLAR, H.K., ZOTCHEV, S.B., THRONE-HOLST, M. (2007) Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. **Applied Microbiology Biotechnology** 76:1209–1221

WHANG, L. M., LIU, P. W. G., MA, C. C., CHENG, S. S. (2008). Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal Hazardous Materials**, 151(1), 155–163

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

WILD, S.R., JONES,K.C., (1995). Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment:a preliminary source inventory and budget, **Environmental Pollution**. 88 (1) 91–108.

WILSON, M.S., BAKERMANS, C., MADSEN, E.L. (1999) .In situ, real-time catabolic gene expression:extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. **Applied Environmental Microbiology**. 65: 80 – 87

- YANG, Y., WANG, J., LIAO, J., XIE, S., & HUANG, Y. (2014) Distribution of Naphthalene Dioxygenase Genes in Crude Oil-Contaminated Soils **Microbiology Ecology** (2014) 68:785–793.
- YANTO, D.H.Y., TACHIBANA, S., (2014). Potential of fungal co-culturing for accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbons in soil. **J. Hazard. Mater** 278, 454 e 463.
- ZHANG X. X., CHENG S.P., ZHU, C.-J., SUN, S.L. (2006) Microbial PAH-Degradation in Soil: Degradation Pathways and Contributing Factors. **Pedosphere** 16(5): 555-565, 2006
- ZHENG, C., HE, J., WANG,Y., WANG, M., HUANG, Z. (2011). Hydrocarbon degradation and bioemulsifier production by thermophilic *Geobacillus pallidus* strains **Bioresource Technology** 102 9155–9161
- ZHOU, H.W., GUO C.L., WONG, Y.S., TAM, N.F.Y. (2006) Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. **FEMS Microbiology Letters** 262:148–157
- ZHOU, Y., XU, J., XU, L., TINDALL, B.J. (2009). *Geobacillus pallidus* to replace the homonym *Bacillus pallidus* Zhou et al. 2008. **Int J Syst Evol Microbiol.** 59(Pt 12):3176-80
- ZHU X, VENOSA, A.D., SUIDAN, M.T., LEE, K. (2001) Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands. Cincinnati, OH: US **Environmental Protection Agency**; (<http://www.epa.gov/oilspill/pdfs/bioremed.pdf>.)