

CELIA MARCELA CAMACHO MONTEALEGRE

**DIVERSIDADE MICROBIANA E BIODEGRADAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO EM SOLOS DA ILHA DA TRINDADE
SUBMETIDOS À BIOESTIMULAÇÃO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS- BRASIL
2014**

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

C172d
2014
Camacho Montealegre, Celia Marcela, 1987-
Diversidade microbiana e biodegradação de
hidrocarbonetos de petróleo em solos da Ilha da Trindade
submetidos à bioestimulação / Celia Marcela Camacho
Montealegre. – Viçosa, MG, 2014.
vi,41f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Solos - Descontaminação. 2. Biorremediação.
3. Microrganismos do solo. 4. Ilha da Trindade - Brasil.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia
Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 363.728

CELIA MARCELA CAMACHO MONTEALEGRE

**DIVERSIDADE MICROBIANA E BIODEGRADAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS DE PETRÓLEO EM SOLOS DA ILHA DA
TRINDADE SUBMETIDOS À BIOESTIMULAÇÃO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.


APROVADA: 17 de julho de 2014



Prof. Maurício Dutra Costa
(Coorientador)



Dr. Péricles Leonardo Fernandes



Prof. Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Universidad Del Tolima – Colômbia, por oferecer-me educação de qualidade e iniciar minha formação como pesquisadora.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Marcos Rogério Tótola, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa e pelo incentivo e apoio na realização do meu trabalho.

Aos professores e servidores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos e pela ajuda na realização do meu trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, pela amizade e pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos colegas da pós-graduação em Microbiologia Agrícola, pelos momentos compartilhados durante a realização do mestrado.

A todas as pessoas envolvidas com o PROTRINDADE.

Aos amigos Laura e Sergio, por serem meus irmãos no Brasil, pelo apoio nos momentos difíceis e naqueles em que a saudade de casa batia forte.

Ao meu namorado Raphael, por fazer parte de minha vida e pela felicidade dos momentos compartilhados. A seus pais e irmãs, por terem me acolhido na sua família.

À minha família, por acreditar nos meus sonhos, por apoiar-me em todos os momentos e por serem meu motor e meu melhor exemplo de vida.

BIOGRAFIA

CELIA MARCELA CAMACHO MONTEALEGRE, filha de Juan Evangelista Camacho Perdomo e Carmen Eugenia Montealegre Mahecha, nasceu em Armenia, Quindio, Colômbia no dia 13 de julho de 1987.

Em dezembro de 2010, diplomou-se em Biologia pela Universidad Del Tolima - Colômbia.

Durante o ano de 2011, trabalhou como docente de Ciências Naturais e Educação Ambiental no ensino básico.

Em Julho de 2012 iniciou o programa de Pós-graduação, em nível de Mestrado, em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, na área de Biotecnologia e Microbiologia Ambiental.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA.....	2
1.1 Diversidade microbiana em solos.....	2
1.2 Petróleo.....	3
1.3 Contaminação de solos por petróleo.....	4
1.4 Remediação de solos contaminados por petróleo.....	5
1.4.1 Biorremediação.....	5
1.4.1.1 Atenuação natural.....	7
1.4.1.2 Bioaugmentação.....	9
1.4.1.3 Bioestimulação.....	10
1.5 REFERÊNCIAS.....	11
CAPÍTULO 2: DIVERSIDADE MICROBIANA DE SOLOS DA ILHA DA TRINDADE E SEU POTENCIAL PARA BIORREMEDIAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO.....	18
2.1 INTRODUÇÃO.....	18
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.2.1 Descrição do Local de Estudo e Obtenção das Amostras.....	19
2.2.2 Experimento de Biorremediação.....	20
2.2.3 Análise molecular da diversidade microbiana.....	21
2.2.3.1 Extração de DNA.....	21
2.2.3.2 PCR-multiplex.....	21
2.2.3.3 T-RFLP.....	22
2.2.3.4 Análise dos dados de T-RFLP.....	22
2.2.4 Isolamento e identificação de micro-organismos com potencial para utilização em processos de biorremediação de contaminação por petróleo.....	23
2.2.4.1 Isolamento.....	23
2.2.4.2 Identificação dos isolados bacterianos.....	23
2.2.5 Análises estatísticas.....	23
2.3 RESULTADOS.....	24
2.3.1 Caracterização físico-química dos solos.....	24
2.3.2 Experimento de biorremediação.....	25
2.3.3 Estrutura e Diversidade das Comunidades Microbianas.....	26
2.3.4 Análises de Agrupamento.....	31
2.3.5 Obtenção e identificação de isolados com potencial para degradar petróleo.....	33
2.4 DISCUSSÃO.....	34
2.5 REFERÊNCIAS.....	37
CONCLUSÕES GERAIS.....	41

RESUMO

MONTEALEGRE, Celia Marcela Camacho. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho, 2014. **Diversidade microbiana e biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo em solos da ilha da trindade submetidos à bioestimulação.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientadores: Maurício Dutra Costa e Cynthia Canêdo da Silva.

Esse estudo analisou a diversidade microbiana de solos rizosféricos de duas espécies vegetais, *Bulbostylis nesiotis* (Hemsl.) C.B.Clarke e *Cyperus atlanticus* (Hemsl.), em dois tipos de solo (um franco-arenoso e um argiloso), provenientes de dois pontos de coleta da Ilha da Trindade - Brasil, durante um experimento de biorremediação em microcosmos. O experimento consistiu num fatorial com dois níveis (Presença/Ausência), dois fatores (Petróleo e Fertilização com NPK) e três repetições, num delineamento inteiramente casualizado (DIC). O petróleo, após tratamento para remoção dos hidrocarbonetos mais voláteis, foi adicionado aos microcosmos em concentração de 25.000 mg dm⁻³. A fertilização consistiu na aplicação dos nutrientes NPK em concentrações finais de N, P e K de 80, 160 e 80 mg dm⁻³, respectivamente. Os microcosmos foram incubados a 24 °C em condições aeróbias por 60 dias, mantendo-se a umidade a 60% da capacidade de retenção de água. As análises de diversidade mostraram que o domínio *Bacteria* é o mais diverso, tanto nos solos prístinos quanto nos solos contaminados com petróleo, em relação ao domínio *Archaea* e ao reino *Fungi*. A maior percentagem de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) (75%) foi observada no solo argiloso da região radicular da espécie *B. nesiotis*. A biodegradação de HTP no solo argiloso foi significativamente maior do que no arenoso. Não houve efeito da adição de fertilizantes sobre a biodegradação de HTP. Foram obtidos, a partir dos solos contaminados, 27 isolados bacterianos com potencial uso em processos de biorremediação de petróleo.

ABSTRACT

MONTEALEGRE, Celia Marcela Camacho. M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Microbial Diversity and biodegradation of petroleum hydrocarbons in soils of the Trindade Island undergoing biostimulation.** Advisor: Marcos Rogério Tótola. Co-advisors: Maurício Dutra Costa and Cynthia Canêdo da Silva.

This study examined the microbial diversity in rhizospheric soils of two species (*Bulbostylis nesiotis* and *Cyperus atlanticus*) in two soil types (one sandy loam and one clayey) from two collection sites at Trindade Island - Brazil, for a bioremediation experiment in microcosms. The experiment consisted of a factorial with two levels (presence/absence), two factors (Oil and Fertilization with NPK) and three replications in a completely randomized design (CRD). The oil, after treatment for removal of the more volatile hydrocarbons, was added to the microcosms at a concentration of 25,000 mg dm⁻³. Fertilization consisted of the application of NPK nutrients at final concentrations of N, P and K of 80, 160 and 80 mg dm⁻³, respectively. The microcosms were incubated at 24 °C under aerobic conditions for 60 days, keeping the humidity to 60% of water holding capacity. The diversity analysis showed that the domain *Bacteria* is the most diverse, both in pristine and in oil-contaminated soils as compared to the domain *Archaea* and the kingdom *Fungi*. The highest percentage of degradation of total petroleum hydrocarbon (TPH) (75%) was observed in the clayey soil of the root region of the specie *B. nesiotis*. TPH biodegradation in clayey soil was significantly greater than in sandy soil. There was no effect of fertilizer on biodegradation of TPH. Twenty-seven bacterial isolates with potential use in bioremediation of petroleum-contaminated soils were obtained.

INTRODUÇÃO GERAL

Com o aumento das atividades de exploração de petróleo nas últimas décadas, as preocupações relacionadas ao risco de contaminação de solos e águas por hidrocarbonetos, decorrente de derramamentos acidentais e vazamentos, vêm crescendo. Dentre os processos utilizados para se restaurarem ambientes contaminados com compostos orgânicos, incluindo os hidrocarbonetos de petróleo, a biorremediação tem ganhado destaque por ser um processo de baixo custo operacional e de pouco impacto ambiental, comparativamente aos processos físicos ou químicos. A biorremediação é um processo biotecnológico que utiliza a capacidade de alguns microrganismos de metabolizar os contaminantes, transformando-os em substâncias inócuas como CO₂ e água. A biorremediação ocorre naturalmente e pode ser acelerada pela estimulação de microrganismos autóctones (bioestimulação) ou pela inoculação de microrganismos eficientes na degradação dos contaminantes (bioaumentação).

Esse trabalho visa contribuir para o aprofundamento dos estudos de biorremediação de hidrocarbonetos de petróleo em ambientes ainda não estudados, além de aportar ao estudo da ecologia microbiana dos solos tropicais.

No capítulo 1 é apresentada uma revisão bibliográfica sobre os métodos para o estudo da diversidade microbiana em solos, assim como dos efeitos da contaminação por petróleo nos ecossistemas terrestres e algumas técnicas utilizadas para sua descontaminação.

No capítulo 2 - “Diversidade microbiana de solos da Ilha da Trindade e seu potencial para biorremediação de contaminação por petróleo” -, são estudadas as comunidades microbianas de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* nos solos da Ilha da Trindade durante um experimento de biorremediação. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da contaminação por hidrocarbonetos de petróleo sobre as comunidades microbianas autóctones e analisar a capacidade desses microrganismos para degradar os hidrocarbonetos contaminantes.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Diversidade microbiana em solos

A microbiota autóctone dos solos engloba seres procariotos (Arqueas e Bactérias) e eucariotos (Fungos, Microalgas e Protozoários). A atividade biológica é mais intensa na camada superficial do solo, até cerca de 20 cm de profundidade, pois nessa camada encontra-se maior acúmulo de nutrientes, que resulta da deposição de materiais vegetais e animais (Moreira e Siqueira, 2006).

Os microrganismos têm papel de destaque no processo de formação do solo e nos processos subsequentes que garantem o funcionamento desse componente dos ecossistemas terrestres (Tótola e Chaer, 2002). Em solos já formados, os microrganismos participam ativamente na decomposição de matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes e de energia, decomposição de compostos xenobióticos e no controle biológico de pragas e doenças (Tótola e Chaer, 2002; Madigan *et al.*, 2004).

No estudo da composição das comunidades microbianas em solos, são utilizados métodos dependentes de cultivo e métodos independentes de cultivo (Alonso-Gutierrez *et al.*, 2009; Fabiani *et al.*, 2009). Estudos de abundância microbiana são muitas vezes baseados em métodos dependentes de cultivo. No entanto, as células cultiváveis representam menos de 1% de toda a comunidade microbiana num ambiente (Amann *et al.*, 1995; Rappé e Giovannoni, 2003) e numerosas bactérias entram num estado viável mas não-cultivável em resposta a fatores de estresse ambiental (McDougald *et al.*, 2009). Em razão dessa pequena proporção de microrganismos cultiváveis presentes nas comunidades microbianas do solo, análises independentes de cultivo baseadas em métodos moleculares são cada vez mais utilizadas em microbiologia ambiental e ecologia microbiana (Tótola e Chaer, 2002; Zhang *et al.*, 2012).

Embora as técnicas moleculares apresentem algumas desvantagens para estudos da biodiversidade em solos, tais como eficiência variável na extração e lise do DNA e amplificação diferencial dos genes-alvo, ainda são mais fidedignas e representativas do que as técnicas baseadas em cultivos *in vitro* (Wolk *et al.*, 2001; Kirk *et al.*, 2004).

Métodos independentes de cultivo têm permitido identificar espécies microbianas envolvidas na degradação de hidrocarbonetos de petróleo (Kasai *et al.*, 2002; Yakimov *et al.*, 2005; McKew *et al.*, 2007). Porém, ainda não existe suficiente informação sobre as mudanças que ocorrem na diversidade microbiana depois de um evento de contaminação por petróleo e sua relação com as taxas de biodegradação de hidrocarbonetos. Dessa maneira, vários autores indicam a necessidade de se incluírem análises da diversidade das comunidades microbianas antes e durante a degradação de hidrocarbonetos de petróleo (Head *et al.*, 2006; Dell'Anno *et al.*, 2012).

1.2 Petróleo

O petróleo é uma mistura complexa que contém vários compostos, sendo que os hidrocarbonetos representam a fração majoritária. É também encontrada uma pequena fração de moléculas contendo nitrogênio, enxofre e oxigênio, além de compostos organometálicos. A sua composição química e as suas propriedades físicas variam de um campo petrolífero para outro (Speight, 2007).

A composição do petróleo pode ser definida pelo teor de hidrocarbonetos saturados, que incluem alcanos de cadeia simples e ramificada (compostos parafínicos) e cicloalcanos (compostos naftênicos); hidrocarbonetos aromáticos, incluindo moléculas aromáticas puras, cicloalcano-aromáticos (compostos nafteno-aromáticos) e, em alguns casos, compostos cíclicos de enxofre; resinas e asfaltenos, que correspondem aos compostos policíclicos, com alto peso molecular, os quais possuem, além de carbono e hidrogênio, átomos de nitrogênio, enxofre e oxigênio (Zílio e Pinto, 2002).

1.3 Contaminação de solos por petróleo

Nos últimos 10 anos, o aumento médio anual da produção de petróleo no Brasil foi de 5,3%, o que levou o país a se tornar o 12º maior produtor de óleo do mundo em 2010 (ANP, 2011). Como consequência desse aumento constante na produção de petróleo, também aumenta o risco de ocorrerem derramamentos acidentais, ocasionando a contaminação de solos e águas.

A contaminação dos solos com níveis elevados de hidrocarbonetos resulta em um aumento do teor de carbono orgânico do solo, o qual, dependendo da composição e concentração, pode ser utilizado para crescimento microbiano ou pode ser tóxico para os micro-organismos (Watts *et al.*, 2000).

Em solos contaminados por petróleo e seus derivados, alguns contaminantes destacam-se frente aos demais. É conhecido que hidrocarbonetos aromáticos são geralmente mais tóxicos do que hidrocarbonetos alifáticos (Watts *et al.*, 2000). Várias classes de compostos são alvo de atenção em solos contaminados por petróleo, como os BTEX (benzeno, etil-benzeno, tolueno e xilenos), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), os compostos orgânicos voláteis totais (COV) e os hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP). BTEX, HPAs e HTP são considerados prioritários principalmente pela toxicidade, mobilidade e persistência no meio ambiente, já os COV totais, são importantes por representarem o total de emissões gasosas, como perdas por volatilização provenientes do derramamento (Andradre *et al.*, 2010).

Os BTEX são definidos como hidrocarbonetos monoaromáticos, cujas estruturas moleculares possuem, como característica principal, a presença do anel benzênico. Esses compostos constituem grande problema em nível mundial por serem tóxicos para a maioria dos organismos, incluindo os seres humanos, nos quais atuam como depressores do sistema nervoso central e apresentam toxicidade crônica mais significativa do que os hidrocarbonetos alifáticos (também presentes no petróleo e derivados), mesmo em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ (Watts *et al.*, 2000).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) compreendem uma família de compostos que possuem dois ou mais anéis aromáticos condensados. A presença de HPAs em solos contaminados pode representar riscos para os organismos a eles expostos, em razão de sua elevada toxicidade. Doses elevadas de HPAs inibem e, eventualmente, impedem o crescimento das plantas. Os HPAs podem penetrar através das membranas celulares, diminuindo a eficiência na utilização de água e nutrientes e inibindo a atividade fotossintética e o transporte de elétrons (Jacques *et al.*, 2007; Cristale *et al.*, 2008).

Em razão dos danos ambientais causados pelos hidrocarbonetos de petróleo, faz-se necessária a remoção dessa classe de compostos sempre que ocorre contaminação de água e solos, o que tem incentivado a realização de pesquisas relacionadas com a remediação de sítios contaminados.

1.4 Remediação de solos contaminados por petróleo

Solos contaminados com petróleo ou seus derivados podem ser restaurados com a utilização de três tipos de processos: físicos, químicos e biológicos. O método físico mais comum é a escavação e incineração do solo. Esses processos, no entanto, apresentam alto custo, e a incineração é uma fonte potencial de poluição atmosférica (Andradre *et al.*, 2010). Métodos químicos incluem a injeção direta de oxidantes químicos no solo contaminado (Riser-Roberts, 1998). Entretanto, esses compostos podem alterar a composição química natural do ambiente, causando desequilíbrios. A biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo é um processo de tratamento com melhor relação custo-benefício se comparado com técnicas físico-químicas, pois essas são mais caras e de difícil implementação (Baptista *et al.*, 2005).

1.4.1 Biorremediação

A biorremediação pode ser definida como o uso de organismos vivos para remover poluentes ambientais presentes no solo, águas e gases. Esses compostos são metabolizados sob condições aeróbias ou anaeróbias, por meio de processos bioquímicos realizados, em grande parte, pelos microrganismos. Essa atividade decompositora resulta na degradação ou mineralização dos contaminantes ou, ainda, na conversão dos mesmos em outras moléculas, algumas das quais menos tóxicas (Seklemova, 2001).

A biorremediação de solos contaminados pode ser limitada por muitos fatores, dentre os quais se destacam (Skladany e Metting, 1993):

- Características físico-químicas do contaminante: altas taxas de degradação são geralmente conseguidas quando o contaminante possui baixa massa molecular.
- Concentração e biodisponibilidade do contaminante: concentrações elevadas podem ser tóxicas e concentrações baixas podem estar abaixo do limiar crítico a partir do qual a degradação ocorre.
- Propriedades dos constituintes do solo, pH, temperatura, umidade e concentração de oxigênio e de nutrientes minerais.
- Presença de micro-organismos com capacidade de degradar o contaminante.

Gutnick e Rosenberg (1977) postularam três características essenciais para a utilização de hidrocarbonetos pelos microrganismos:

- Um sistema eficiente de absorção de hidrocarbonetos, com sítios especiais de ligação e/ou produção de substâncias emulsificantes para o transporte do hidrocarboneto ao interior da célula;
- Enzimas oxigenases específicas;
- Especificidade induzida – resposta positiva do organismo ao hidrocarboneto.

As diferentes vias que os microrganismos têm desenvolvido para solucionar esses três problemas provavelmente contribuem para o fato de mais de 200 espécies terem sido descritas com capacidade de utilização de hidrocarbonetos. Essas espécies de microrganismos estão distribuídas nos três domínios: *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (com destaque para o Reino *Fungi*) (Kataoka, 2001; Tapilatu *et al.*, 2010).

Recentemente, vários estudos têm demonstrado que membros do domínio *Archaea* apresentam capacidade de mineralizar hidrocarbonetos de petróleo em condições aeróbicas e anaeróbicas (Anderson e Lovley, 2000; Chang *et al.*, 2006; Tapilatu *et al.*, 2010; Stauffert *et al.*, 2014).

A habilidade dos fungos em utilizar hidrocarbonetos ocorre principalmente em duas ordens: Mucorales e Moniliales. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* possuem muitas espécies que assimilam hidrocarbonetos. Contudo, essa característica é uma propriedade individual da espécie e não necessariamente uma característica particular do gênero (Riser-Roberts, 1992). Algumas espécies de fungos envolvidos na degradação de hidrocarbonetos são *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium* (Steffenet *et al.*, 2002; Zanget *et al.*, 2007; Lotfinasabasi *et al.*, 2012).

As bactérias são o grupo de microrganismos mais empregado em estratégias de biorremediação devido a sua ampla diversidade fisiológica e porque são o grupo mais abundante entre as populações microbianas do solo (Pichtel, 2007). Dentre as bactérias que degradam hidrocarbonetos, algumas espécies bem conhecidas são: *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Flavobacterium* sp., *Klebsiella cepacia*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella phenylpiruvica*, *Nocardia* sp., *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp., *Proteus mirabilis*, *Vibrio* sp., *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp., *Vibrio fisheri* e *Xanthomonas maltophilia* (Dean-Ross *et al.* 2002; Cybulski *et al.*, 2003; Ruberto *et al.*, 2005; Pucci *et al.*, 2010; Rodrigues, 2014).

1.4.1.1 Atenuação natural

O termo “atenuação natural” tem sido empregado para descrever a remediação passiva de ambientes contaminados que envolve a ocorrência de diversos processos naturais, como a biodegradação, a volatilização, a dispersão, a diluição e a adsorção. Dentre estes, somente a biodegradação destrói os contaminantes. Os demais processos citados envolvem, basicamente, a transferência dos contaminantes de um local para outro ou a retenção do contaminante, no caso do processo de sorção (Andradre *et al.*, 2010).

A principal vantagem da atenuação natural é que, mesmo sem o acréscimo de nutrientes ou a adequação de qualquer condição ambiental, a redução do contaminante pode acontecer de maneira eficiente e contínua. Isso ocorre, principalmente, em decorrência do processo de adaptação natural da microbiota nativa existente no sítio impactado. Nesse caso, esses microrganismos passam a utilizar em seu metabolismo os compostos orgânicos poluentes como fontes de carbono e energia, promovendo, então, a redução das concentrações dessas substâncias ao longo do tempo (Robb e Moyer, 2001).

A utilização da atenuação natural como opção principal de remediação requer algumas ressalvas, haja vista que as condições do meio, inclusive o tipo e a concentração dos contaminantes, podem não contribuir para a redução de substâncias tóxicas e recalcitrantes e, conseqüentemente, aumentam-se os riscos de contaminação de pessoas e animais. Por esse motivo, o emprego da atenuação natural é permitido e até recomendado, desde que sejam respeitados os resultados obtidos em estudos preliminares sobre a avaliação de risco da exposição da população, elaborada dentro de um cenário real para o uso presente e futuro da área. Normalmente, processos de atenuação natural costumam durar de meses a anos. Por isso, o tempo requerido para a descontaminação e a porcentagem de degradação dos contaminantes podem ser imprevisíveis. É justamente por essa consideração que, na maioria dos casos, é necessário que esse processo de tratamento seja monitorado rigorosa e periodicamente. Esse processo, denominado de “atenuação natural monitorada” (ANM), é um dos

mais utilizados nos EUA para a redução do impacto ambiental causado por contaminações de solos com compostos orgânicos (Andradre *et al.*, 2010).

1.4.1.2 Bioaugmentação

A Bioaugmentação é uma estratégia de biorremediação que envolve a introdução de microrganismos que possuem a capacidade metabólica de degradar os contaminantes no sítio impactado (Vogel e Walter, 2001).

O sucesso da bioaugmentação, assim como de qualquer outra estratégia de biorremediação, depende das condições ambientais do local contaminado. Isso é relevante quando se trata de bioaugmentação, uma vez que os micro-organismos que serão introduzidos no ambiente devem ter a capacidade de se adaptar de forma rápida às condições do meio. As metodologias comumente utilizadas para a aplicação da estratégia de bioaugmentação são: adição de linhagens puras pré-adaptadas; adição de consórcios microbianos pré-adaptados; introdução de bactérias modificadas geneticamente com um conjunto de genes relevantes para a biodegradação, e que por conjugação podem ser transmitidos para micro-organismos autóctones (El Fantroussi e Agathos, 2005).

Do ponto de vista ecológico, existem barreiras para o sucesso da bioaugmentação. Alguns fatores, como a relação dos microrganismos inoculados com novos fatores bióticos e abióticos, irão interferir na sobrevivência e atividade metabólica do inóculo. Dentre os fatores bióticos, a predação por protozoários e competição com micro-organismos autóctones por nutrientes e aceptores de elétrons são elementos adversos para a bioaugmentação (Pezeshki *et al.*, 2000).

Uma das estratégias para superar essas barreiras é o uso de microrganismos da própria área contaminada. Um novo conceito em bioaugmentação, conhecido como “bioaugmentação autóctone” (ABA), foi proposto por Ueno *et al.* (2007) e é definido como a tecnologia de bioaugmentação que usa exclusivamente microrganismos nativos do lugar (solo, areia, água) para sua descontaminação. Dessa forma, cepas isoladas ou culturas enriquecidas, que foram obtidas antes ou depois da contaminação do local alvo, são administradas aos locais que venham a ser

contaminados (Nikolopoulou *et al.*, 2013). Aparentemente, microrganismos autóctones previamente selecionados possuem maior probabilidade de sobreviver e propagar-se no ambiente após a reintrodução, quando comparados a microrganismos isolados de outros locais (Orcutt *et al.*, 2010).

1.4.1.3 Bioestimulação

A bioestimulação consiste na introdução de nutrientes minerais e da adequação de fatores como o potencial redox, temperatura, umidade e pH em ambientes contaminados, com o objetivo de aumentar as populações e a atividade dos micro-organismos autóctones ou daqueles introduzidos no solo a partir da bioaugmentação (Chambers *et al.*, 1991).

Medidas das propriedades físicas e químicas de amostras do local podem revelar as limitações físico-químicas para a atividade microbiológica, a qual pode então ser modelada para indicar os fatores críticos limitantes (Ramaswami e Luthy, 1997).

Em alguns ambientes, a biorremediação é limitada por fatores ambientais como a disponibilidade de nitrogênio, fósforo e potássio, os quais são elementos necessários para o crescimento microbiano (Thavasi *et al.*, 2011). Nesses ambientes, a adição desses nutrientes na forma de fertilizantes é considerada uma forma eficaz para se estimular o crescimento e a atividade microbianos e assim estimular o catabolismo dos contaminantes (Atlas e Hazen, 2011).

Para se determinar a melhor estratégia a ser utilizada na biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, é necessária a realização de estudos sobre as condições bióticas e abióticas do local, especialmente em ambientes ainda pouco estudados. É importante também a exploração de novos microrganismos provenientes desses ambientes, que possam ser usados em processos de bioaugmentação.

1.5 REFERÊNCIAS

Alonso-Gutierrez J, Figueras A, Albaiges J, Jimenez N, Vinas M, Solanas AM, *et al.* 2009. Bacterial communities from shoreline environments (Costa da Morte, Northwestern Spain) affected by the Prestige oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:3407–3418.

Amann R, Ludwig W, Schleifer KH. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1):143–169.

Anderson RT e Lovley DR. 2000. Hexadecano decay by methanogenesis. *Nature*, 404: 722-723.

Andrade JA, Augusto F, Jardim ICSF. 2010. Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo e Seus Derivados. *Eclética química*. 35:3, 17-43.

ANP (Agência Nacional do petróleo, gás natural e biocombustíveis). 2011. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/?pg=57890>

Atlas RM e Hazen TC. 2011. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. history. *Environmental Science and Technology*. 45:6709–6715.

Baptista SJ, Cammarota MC, Freire DC. 2005. Production of CO₂ in Crude Oil Bioremediation in Clay Soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48: 249-255.

Chambers DC, Willis J, Giti-Pour S, Zieleniewski LJ, Rickabaugh JF, Mecca MI, Pasin B, Sims CR, Sorensen LD, Sims LJ, Mclean EJ, Mahmood R, Dupont RR, Wagner K. 1991. *In-situ Treatment of Hazardous Waste Contaminated Soils*. New Jersey, U.S.A: Noyes Data Corporation, pp. 7-10.

Chang W, Um Y e Holoman TRH. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation coupled to methanogenesis. *Biotechnology Letters*, 28: 425-430.

Cristale J, Silva FS, Marchi MRR. 2008. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. *Eletica Química*, 33 (4): 69-78.

Cybalski Z, Dzurla E, Kaczorek E, Olszanowski A, 2003. The influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by *Pseudomonadacea* and *Bacillacea* strains. *Spill Science and Technology Bulletin*, 8: 503-507.

Dean-Ross D, Moody J, Cerniglia CE. 2002. Utilization of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria isolated from contaminated sediment. *FEMS Microbiology Ecology*, 41: 17.

Dell'Anno A, Beolchini F, Rocchetti L, Luna GM, Danovaro R. 2012. High bacterial biodiversity increases degradation performance of hydrocarbons during bioremediation of contaminated harbor marine sediments. *Environmental Pollution*, 167: 85-92.

El Fantroussi S, Agathos SN. 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology*. 8: 268–75.

Fabiani A, Gamalero E, Castaldini M, Coss GP, Musso C, Pagliai M, *et al.* 2009. Microbiological polyphasic approach for soil health evaluation in an Italian polluted site. *Science of the Total Environment*, 407:4954–64.

Gutnick DC, Rosenberg E. 1977. Oil tankers and pollution: a microbiological approach. *Annual Review of Microbiology*, v.31, p.379-396.

Head IM, Jones DM, Röling WFM. 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 173-182.

Jacques RJS, Bento FM, Antonioli ZI, Camargo FA. 2007. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, 37 (4): p.1192-1201.

Kasai Y, Kishira H, Harayama S. 2002. Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in a marine environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5625-5633.

Kataoka APAG. 2001. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de "landfarming". (Tese Doutorado) Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, Brasil.

Kirk LJ, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomas JN, Lee H, *et al.* 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58:169–88.

Lotfinasabasl S, Gunale VR, Rajurkar NS. 2012. Assessment of petroleum hydrocarbon degradation from soil and tarball by Fungi. *Bioscience Discovery*, 3(2): 186-192.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2004. *Microbiologia de Brock*. São Paulo, Brasil: Prentice Hall. 624 p.

McDougald D, Rice SA, Kjelleberg S. 2009. New perspectives on the viable but nonculturable response. *Biologia*, 54: 617–23.

McKew BA, Coulon F, Osborn AM, Timmis KN, McGenity TJ. 2007. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environmental Microbiology*, 9: 165-176.

Moreira FMS e Siqueira JO. 2006. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras, Brasil: Editora UFLA. 729p.

Nikolopoulou M, Pasadakis N e Kalogerakis N. 2013. Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. *Marine pollution bulletin*, 72: 165-173.

Orcutt BN, Joye SB, Kleindienst S, Knittel K, Ramette A, Reitz A, Samarkin V, Treude T, Boetius A. 2010. Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57:2008–2021.

Pezeshki SR, Hester MW, Lin Q, Nyman JA. 2000. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environmental Pollution*, 108:129–139.

Pichtel J. 2007. *Fundamentals of site remediation: for metal and hydrocarbon-contaminated soils*. Lanham, U.S.A.: Government Institutes, 437p.

Pucci G, Acuña A, Tonin N, Tiedemann M, Pucci O. 2010. Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa de Caleta Córdova, Argentina. *Revista peruana de biología*, 17(2): 237 – 244.

Ramaswami A e Luthy R. 1997. Measuring and modeling physicochemical limitations to bioavailability and biodegradation. In Hurst CJ, Knudsen GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV. (eds.). *Manual of environmental microbiology*. Washington D.C., U.S.A.: ASM Press, pp. 721-729.

Rappé M e Giovannoni SJ. 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Reviews Microbiology*, 57:369–394.

Riser-Roberts E. 1992. *Bioremediation of Petroleum Contaminated Sites*. Boca Ratón, U.S.A.: CRC Press.

Riser-Roberts E. 1998. Remediation of Petroleum Contaminated Soils: Biological, Physical, and Chemical Processes. Boca Ratón, U.S.A.: CRC Press.

Robb J e Moyer E. 2001. Natural attenuation of benzene and MTBE at four midwestern retail gasoline marketing outlets. Contaminated Soil, Sediment and Water, Spring: 67-71.

Rodrigues EM. 2014. Prospecção de bactérias degradadoras de petróleo e avaliação de potenciais estratégias de biorremediação para a degradação de hidrocarbonetos na Ilha da trindade. (Dissertação Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil.

Ruberto L, Vazquez S, Lobaldo A, *et al.* 2005. Psychrotolerant hydrocarbon-degrading *Rhodococcus* strains isolated from polluted Antarctic soils. Antarctic Soils, 17: 47-56.

Seklemova E, Pavlova A, Kovacheva K. 2001. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. Biodegradation, 12(5): 311-6.

Skladany G.J e Metting Jr FB. 2006. Bioremediation of contaminated soil. p. 483–513. In: Metting Jr, FB (ed.) Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural and Environmental Management. New York, U.S.A.: Marcel Dekker, Inc.

Speight JG. 2007. The Chemistry and Technology of Petroleum. New York. U.S.A.: CRC Press..

Stauffert M, Duran R, Gassie C e Cravo-Laureau C. 2014. Response of archaeal communities to oil spill in bioturbated mudflat sediments. Microbial Ecology, 67(1):108-119.

Steffen KT, Hatakka A, Hofrichter M. 2002. Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi. *Applied Microbiology Biotechnology*, 60:212–217.

Tapilatu YH, Grossi V, Acquaviva M, Militon C, Bertrand JC, Cuny P. 2010. Isolation of hydrocarbon-degrading extremely halophilic archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France). *Extremophiles*, 14: 225-231.

Thavasi R, Jayalakshmi S, Banat IM. 2011. Effect of biosurfactant and fertilizer on biodegradation of crude oil by marine isolates of *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioresource Technology*, 102:772–8.

Tótola M. R. e Chaer G. M. 2002. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. Tópicos em ciência do solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 2, 195-276 p.

Ueno A, Ito Y, Yumoto I, Okuyama H. 2007. Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 1739-1745.

Vogel TM e Walter MV. 2001. Bioaugmentation. In: Hurst CJ, Crawford RL, Garland JL, Lipson DA, Mills AI (eds). *Manual of environmental microbiology*. Washington D.C., U.S.A.: American society for microbiology, 952-959 p.

Watts RJ, Haller DR, Jones AP, Teel AL. 2000. A foundation for the risk-based treatment of gasoline-contaminated soils using modified Fenton's reactions. *Journal of Hazardous Materials*, 76: 73–89.

Wolk D, Mitchell S, Patel R. 2001. Principles of molecular microbiology testing methods. *Infectious Diseases Clinics of North America*, 15(4): 1157-1204.

Yakimov MM, Denaro R, Genovese M, Cappello S, D'Auria G, Chernikova TN, Timmis KN, Golyshin PN, Giuliano L. 2005. Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environmental Microbiology*, 7: 1426-1441.

Zang S, Li P, Yu X, Shi K, Zhang H, Chen J. 2007. Degradation of metabolites of benzo[a]pyrene by coupling *Penicillium chrysogenum* with KMnO_4 . *Journal of Environmental Sciences*, 19: 238–243.

Zhang DC, Mörtelmaier C, Margesin R. 2012. Characterization of the bacterial archaeal diversity in hydrocarbon-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 421–422: 184–196.

Zílio EL e Pinto UB. 2002. Identification and distribution of the main groups of components present in brazilian crude oils. *Boletim Técnico da PETROBRAS*, 45:21–25.

CAPÍTULO 2

**DIVERSIDADE MICROBIANA DE SOLOS DA ILHA DA TRINDADE
E SEU POTENCIAL PARA BIORREMEDIAÇÃO DE
CONTAMINAÇÃO POR PETRÓLEO**

2.1 INTRODUÇÃO

A ilha oceânica da Trindade, com superfície aproximada de 10 km², situa-se no oceano Atlântico sul no paralelo da cidade de Vitória, Estado do Espírito Santo - Brasil, afastada aproximadamente 1.140 km da linha costeira. Vários estudos têm reportado a presença de espécies de fauna e flora endêmicas e ressaltado a importância dessa ilha para a reprodução e alimentação de diversos organismos marinhos e terrestres, como as aves migratórias e as tartarugas marinhas (Almeida, 2000; Martins e Alves, 2007; Clemente *et al.*, 2009).

Essa ilha, de extraordinária importância ecológica, está localizada numa região de grande interesse econômico, constituída pela reserva sub-oceânica de petróleo do Pré-Sal. Atualmente, nessa região são produzidos diariamente 500 mil barris de petróleo, mas para 2018 estima-se que 52% da produção total de óleo do Brasil virão do pré-sal (Petrobras, 2014). Durante a exploração, o transporte, o refino e as operações de armazenamento do petróleo e/ou de seus derivados, podem ocorrer derramamentos acidentais, ocasionando a contaminação de solos e águas (Aislabie *et al.*, 2006; Marín *et al.*, 2006).

Hidrocarbonetos provenientes do petróleo acidentalmente liberados no ambiente causam distúrbios ambientais em toda a biota local e adjacências, além de alto prejuízo para a economia do local atingido (De La Huz *et al.*, 2005). Os efeitos são sentidos imediatamente e também em longo prazo. Em ambientes costeiros, os problemas do contato do óleo com a biota são facilmente visualizados, causando diminuição na capacidade respiratória e fotossintética dos organismos, ocasionando mortandades em massa (Laffon *et al.*, 2006).

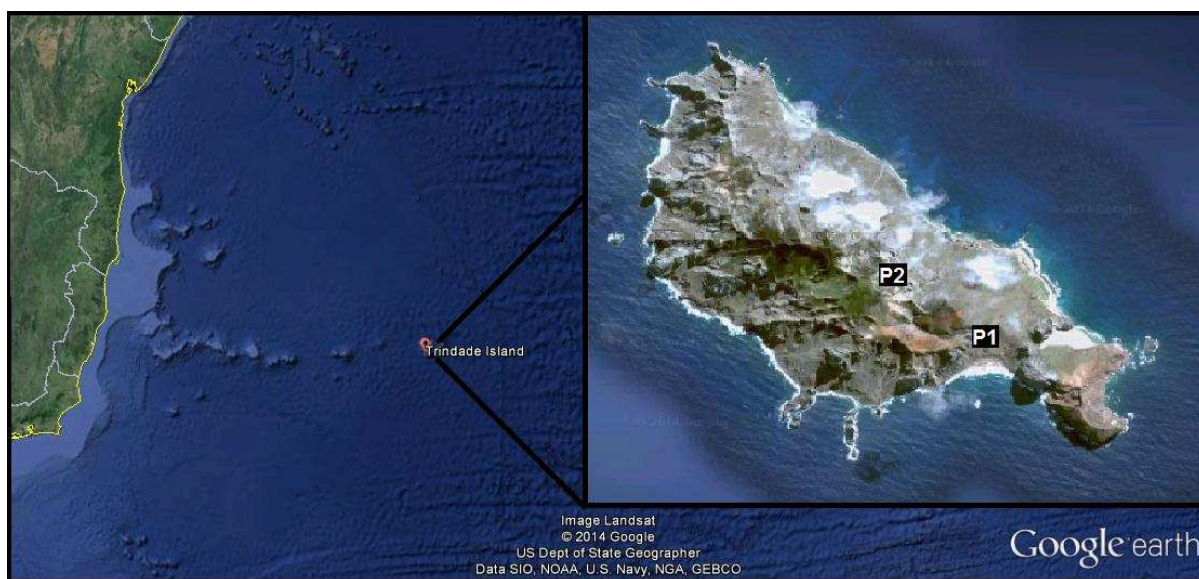
O presente trabalho teve como finalidade analisar a diversidade microbiana de solos da Ilha da Trindade, onde não existem registros de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, e estudar o impacto de uma possível contaminação por hidrocarbonetos de petróleo nas comunidades microbianas autóctones desses solos, avaliando a capacidade de biodegradação dos contaminantes por esses microrganismos.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Descrição do Local de Estudo e Obtenção das Amostras

Amostras de solo foram coletadas a uma profundidade de 0 a 20 cm em dois pontos, Praia do Príncipe e Pico do Desejado (Figura 1). Em cada um desses pontos foi realizada a coleta em triplicata de duas amostras, uma constituída de solo da região radicular da espécie *Bulbostylis nesiotis* (Hemsl.) C.B. Clarke e outra de solo da região radicular da espécie *Cyperus atlanticus*, Hemsl., ambas pertencentes à família *Cyperaceae*.

Figura 1. Mapa da Ilha da Trindade mostrando os pontos de coleta dos solos. P1: Ponto1 - Praia do Príncipe; P2: Ponto 2 - Pico do Desejado



Fonte: Google earth, 2014.

As amostras foram armazenadas a 4°C até a chegada à Universidade Federal de Viçosa, onde foram caracterizadas quanto a aspectos físicos e químicos e utilizadas em ensaios de biorremediação

2.2.2 Experimento de Biorremediação

O experimento de biorremediação foi conduzido em microcosmos contendo 100 cm³ de cada solo. O experimento consistiu num fatorial com dois níveis (Presença/Ausência), dois fatores (Petróleo, NPK) e três repetições, num delineamento inteiramente casualizado (DIC) (Tabela 1).

A contaminação consistiu da adição de petróleo aquecido gradualmente até 210 °C para eliminação dos hidrocarbonetos mais voláteis, em concentração de 25.000 mg dm⁻³. A fertilização foi feita adicionando-se (NH₄)₂SO₄, Na₂HPO₄ e KCl em concentrações finais de N, P e K de 80, 160 e 80 mg dm⁻³, respectivamente.

Imediatamente após a adição dos nutrientes e da contaminação com petróleo, os microcosmos foram incubados em incubadora DBO a 24 °C em condições aeróbias por 60 dias, mantendo-se a umidade a 60% da capacidade de retenção de água. Ao final do experimento, foi realizada a quantificação de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) utilizando-se o kit RemediAid® (CHEMetrics).

Tabela 1: Tratamentos do experimento de biorremediação.

Fatores	Petróleo*	NPK*
T1	0	0
T2	1	0
T3	0	1
T4	1	1

* 1: presença, 0: ausência.

2.2.3 Análise molecular da diversidade microbiana

2.2.3.1 Extração de DNA. A extração de DNA dos solos foi realizada ao final do experimento de biorremediação, empregando-se o kit PowerLyzer® (MoBio), de acordo com as instruções do fabricante.

2.2.3.2 PCR–multiplex. A PCR (50 µL) foi realizada com um conjunto de três pares de oligonucleotídeos iniciadores, um par para cada um dos três grupos microbianos estudados (Tabela 2). A mistura de reação continha 1,0 µL dos primers 63F e 1087R NED a 10µM; 2,0 µL dos primers ITS1F FAM, ITS4, Ar3F e Ar927R HEX a 10µM; 0,2mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato; 2,5 U de Taq Polimerase e 2µL de DNA molde. As amplificações foram realizadas em termociclador (Bio-Rad, C1000™), conforme o seguinte programa: 5 min. a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 seg. a 95 °C, 30 seg. a 55 °C e 1 min. a 72 °C, com extensão final de 10 min. a 72 °C. Os produtos da amplificação foram verificados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,2 % em tampão TAE 1X.

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR-*multiplex*

Iniciador	Marcação	Sequência de 5' para 3'	Gene alvo	Grupo	Referência
63f	-	AGGCCTAACACATGCAAGTC	16S rRNA	<i>Bacteria</i>	Marchesi <i>et al.</i> , 1998
1087r	NED	[NED]- CTCGTTGCGGGACTTACCCC	16S rRNA	<i>Bacteria</i>	Hauben <i>et al.</i> , 1997 Gardes e Bruns, 1993
ITS1f	6-FAM	[6-FAM]- CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	ITS (18S rRNA)	<i>Fungi</i>	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4r	-	TCCTCCGCTTATTGATATGC	ITS (18S rRNA)	<i>Fungi</i>	Giovannoni <i>et al.</i> , 1988
Ar3f	-	TTCCGGTTGATCCTGCCGGA	16S rRNA	<i>Archaea</i>	Jurgens <i>et al.</i> , 1997
Ar927r	HEX	[HEX]- CCCGCCAATTCCTTTAAGTTTC	16S rRNA	<i>Archaea</i>	

2.2.3.3 T-RFLP. Os produtos amplificados foram purificados com o kit *IllustraGFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare®) e em seguida eluídos em 25 µL de tampão de eluição. Prosseguiu-se com a digestão enzimática de cada produto amplificado em uma reação (30 µL) contendo todo o produto amplificado, 10 U de enzima de restrição *MspI*, 0,3 µL de albumina de soro bovino acetilada (*BSA*) e 3 µL do respectivo tampão em concentração final de 1X (Culman, 2006).

A digestão foi realizada em termociclador a 37 °C por 3 h, seguido de um período de inativação da enzima por 15 minutos a 95 °C. Os produtos foram precipitados e posteriormente ressuspensos em placa de sequenciamento em MegaBace Loading Solution (Amersham Pharmacia Biotech®), juntamente com o marcador ET550-R (GE Healthcare). O *mix* na placa foi submetido à desnaturação a 95 °C por 5 min. e mantido no gelo até a corrida em seqüenciador *MegaBACE 1000 DNA Analysis System* (Molecular Dynamics/GE Healthcare®), utilizando o conjunto de filtros *Genotyping filter set 2*. As condições da corrida foram: tempo de injeção de 60 seg., tensão de injeção de 4 kV, tempo de corrida de 120 min. e tensão de corrida de 10 kV.

2.2.3.4 Análise dos dados de T-RFLP. A análise dos dados após a corrida no seqüenciador foi realizada com o programa *Gene Marker 2.4.1 Trial Version* (Soft Genetics, State College), após alteração do canal de cores para "*MegaBACEchannels*" e aplicação manual de matriz espectral gerada pela análise do sinal de cada corante fluorescente separadamente (Fluorescent Amidite Matrix Standard, Applied Biosystems®).

A análise de fragmentos terminais foi realizada considerando-se os fragmentos entre 50 e 550 pb. Todos os picos gerados foram conferidos manualmente e os que apresentaram intensidades menores que 40 unidades de fluorescência foram excluídos para minimizar os efeitos de ruído. A abundância relativa de cada pico foi calculada como a proporção de todas as alturas de pico na amostra antes das análises estatísticas.

Os índices ecológicos de diversidade de Shannon-Weaver, dominância de Simpson e riqueza de Margalef foram estimados a partir dos dados de abundância relativa de ribotipos e intensidades dos picos do

T-RFLP. Análises de agrupamento do perfil das comunidades dos três grupos microbianos foram realizadas utilizando-se como coeficiente de associação a distância euclidiana.

2.2.4 Isolamento e identificação de microrganismos com potencial para utilização em processos de biorremediação de contaminação por petróleo

2.2.4.1 Isolamento. Foram isoladas populações de *Bacteria* dos solos contaminados com petróleo durante o experimento de biorremediação. Amostras dos solos contaminados foram diluídas serialmente em solução tampão de pirofosfato de sódio (0,1%) e Tween 80 (0,05%), seguindo-se plaqueamento das diluições 10^{-6} a 10^{-8} pela técnica de espalhamento em superfície, utilizando-se meio Trypticase soy agar (TSA, DifcoTM), na concentração recomendada pelo fabricante e a 1/10 da concentração recomendada. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 24 °C por 48 h.

2.2.4.2 Identificação dos isolados bacterianos. A identificação dos isolados bacterianos foi feita por meio da análise do perfil de ácidos graxos, empregando-se o Microbial Identification System (MIDI) (Microbial ID Inc., Newark, Del). A obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi feita utilizando-se o Instant Fame Kit, de acordo com as recomendações do fabricante. A análise foi feita em um cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama 7890A (Agilent Technologies, Inc), utilizando-se o software Sherlock® Microbial Identification System, versão 6.2 e a biblioteca de referência ITSA 1.0.

2.2.5 Análises estatísticas. Os dados de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e a diferença entre pares específicos de médias foi avaliada usando-se o teste de Duncan a 5 % de probabilidade. Para os dados de diversidade, inicialmente os testes F e Shapiro-Wilks foram utilizados para testar a variância e normalidade dos dados, respectivamente. Os dados

considerados não-paramétricos foram então submetidos à análise com o teste de Wilcoxon a 5 % de probabilidade.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Caracterização físico-química dos solos.

A tabela 3 resume as propriedades físico-químicas dos solos estudados, antes de ser adicionado petróleo e/ou nutrientes inorgânicos. Os solos da Praia do Príncipe foram classificados como franco-arenosos, enquanto os solos do Pico do Desejado foram classificados como argilosos.

Os solos da Praia do Príncipe apresentaram valores de pH variando de neutro a moderadamente alcalino, enquanto os solos do Pico do Desejado apresentaram valores variando de ácido forte a ácido muito forte (U.S. Department of Agriculture, 1993).

Todos os solos analisados caracterizaram-se por apresentar altos teores de nutrientes, porém apresentam diferenças quanto ao conteúdo de matéria orgânica, sendo esse maior nos solos do Pico do Desejado do que nos solos da Praia do Príncipe

Tabela 3. Características físico-químicas dos solos utilizados no estudo

	S1B	S1C	S2B	S2C
Areia grossa (0.25-2 mm) (dag kg ⁻¹)	43	47	15	11
Areia fina (0.05-0.25mm) (dag kg ⁻¹)	14	15	4	6
Silte (0.002-0.05 mm) (dag kg ⁻¹)	26	24	35	31
Argila (<0.002 mm) (dag kg ⁻¹)	17	14	46	52
Classe textural	Franco-arenosa	Franco-arenosa	Argilosa	Argilosa
pH ⁽¹⁾	7,34	8,30	5,26	4,84
Matéria orgânica (dag kg ⁻¹) ⁽²⁾	1,29	0,78	15,50	13,56
N Total (dag kg ⁻¹) ⁽³⁾	0,320	0,648	0,158	0,368
P Remanescente (mg dm ⁻³) ⁽⁴⁾	18,4	22,0	10,4	15,9
P Disponível(mg dm ⁻³) ⁽⁵⁾	272,3	350,3	170,3	273,9
K Disponível(mg/dm ⁻³) ⁽⁶⁾	473	642	30	39

⁽¹⁾ pH em água - Relação 1:2,5; ⁽²⁾ Método Walkley-Black; ⁽³⁾ Método Kjeldahl; ⁽⁴⁾ Método utilizando CaCl₂; ^(5 e 6) Método Extrator Mehlich I.

S1B: Solo Praia do Príncipe sob vegetação de *B. nesiotis*; S1C: Solo Praia do Príncipe sob vegetação de *C. atlanticus*; S2B: Solo Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis*; S2C: Solo Pico do Desejado sob vegetação de *C. atlanticus*

2.3.2 Experimento de biorremediação

A concentração residual de HTP nos solos, ao final do período de incubação, variou entre 6.340 mg dm⁻³ no solo do Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis* e 8.400 mg dm⁻³ no solo da Praia do Príncipe sob vegetação de *C. atlanticus* (Tabela 3), correspondendo a 75% e 66% de remoção de HTP, respectivamente.

Tabela 3. HTP residual em solos da Ilha da Trindade contaminados com petróleo⁽¹⁾

Solo e Tratamento ⁽²⁾	Concentração média residual de HTP (mg dm ⁻³ solo)	% de degradação
S1B T2	8038	68
S1B T4	7856	69
S1C T2	8401	66
S1C T4	8143	67
S2B T2	6679	73
S2B T4	6340	75
S2C T2	7339	71
S2C T4	7017	72

⁽¹⁾Os microcosmos foram contaminados com petróleo (25.000 mg dm⁻³) e em seguida incubados por 60 dias em condições aeróbias, a 24 °C, mantendo-se a umidade a 60% da capacidade de retenção de água.

⁽²⁾S1B: Solo Praia do Príncipe - *B. nesiotis*; S1C: Solo Praia do Príncipe - *C. atlanticus*; S2B: Solo Pico do Desejado - *B. nesiotis*; S2C: Solo Pico do Desejado - *C. atlanticus* T2: sem NPK; T4: com NPK.

Não houve diferença significativa na degradação de HTP nos solos em resposta à aplicação dos nutrientes NPK ($p = 0,417$).

Foi observada diferença significativa na degradação de HTP entre os quatro solos estudados. O solo com maior percentagem de degradação de HTP foi o solo do Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis*, seguido do mesmo solo sob vegetação de *C. atlanticus*. Os solos da Praia do Príncipe (S1B e S1C) apresentaram as menores percentagens de degradação de HTP (Teste Duncan, $p = 0,05$).

2.3.3 Estrutura e Diversidade das Comunidades Microbianas

Houve diferença significativa do índice de diversidade de Shannon-Weaver e de Riqueza de Margalef (R) entre os três grupos taxonômicos estudados (Wilcoxon, $p < 0,05$). O domínio *Bacteria* foi o grupo mais diverso em todos os solos e tratamentos, seguido pelo reino *Fungi* e, por último, pelo domínio *Archaea* (Figura 2). *Bacteria* foi também o grupo com maior riqueza de espécies, quando comparado com *Archaea* e *Fungi* (Figura 3).

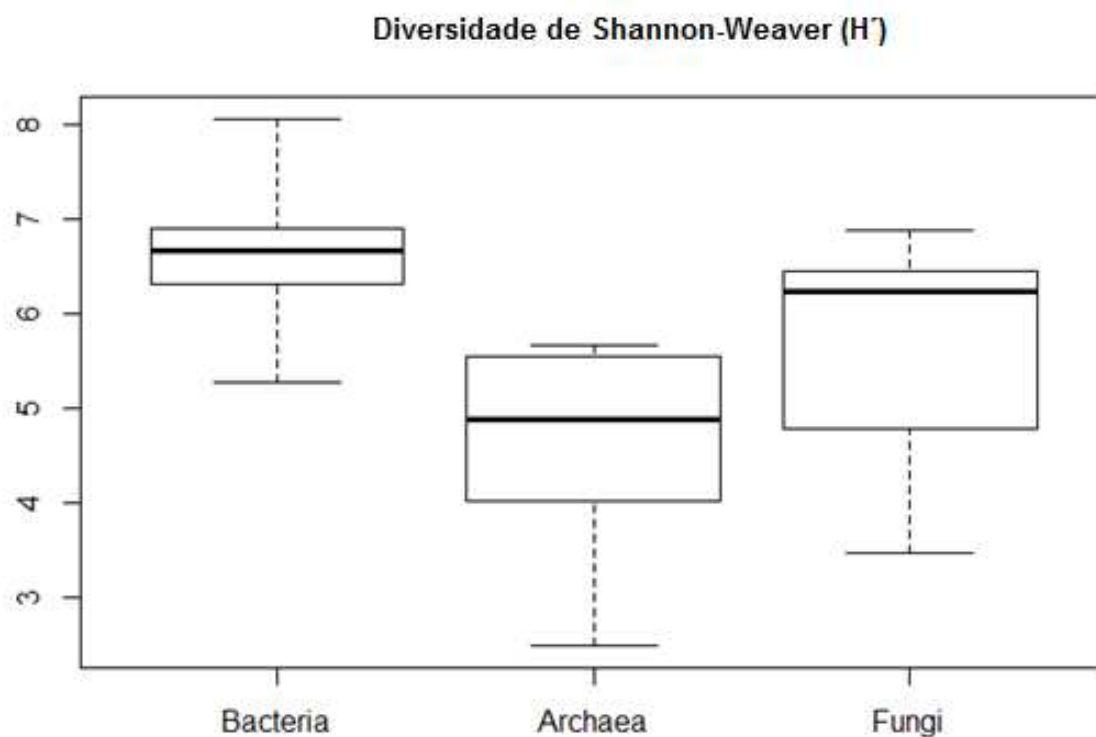


Figura 2. Valores médios do índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') para os três grandes grupos de microrganismos analisados no experimento de biorremediação, obtidos através dos dados de T-RFLP. As caixas indicam onde estão contidos 50 % dos dados; a linha escura dentro das caixas indica a mediana; as barras externas correspondem aos dados extremos, porém não discrepantes.

Não foi encontrada diferença significativa do índice de Dominância de Simpson (D) entre os três grupos (Figura 3).

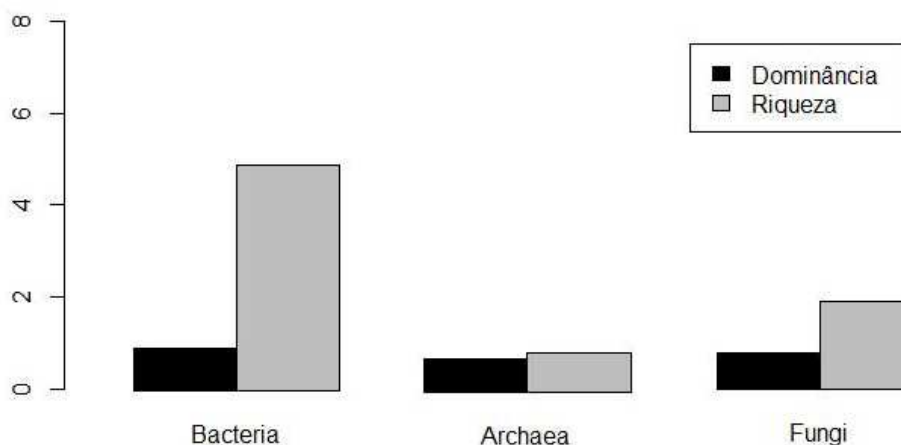


Figura 3. Índice de Dominância de Simpson (D) e de Riqueza de Margalef (R) para os três grandes grupos de microrganismos analisados no experimento de biorremediação, obtidos através dos dados de T-RFLP.

Foram encontradas diferenças significativas dos índices de Diversidade de Shannon-Weaver e de Riqueza de Margalef para os três grupos de microrganismos nos diferentes solos estudados (Wilcoxon, $p < 0,05$). Os maiores valores de diversidade e riqueza da comunidade de *Bacteria* e *Fungi* foram encontrados no Solo do Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis*, seguidos pelos encontrados no mesmo solo sob vegetação de *C. atlanticus*. A diversidade e riqueza de *Archaea* mostrou um padrão contrário ao de *Bacteria*, sendo os maiores valores encontrados nos solos da Praia do Príncipe. Não foram detectados representantes desse domínio no solo do Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis*, onde se obtiveram os maiores valores de Diversidade e Riqueza de *Bacteria* (Figura 4).

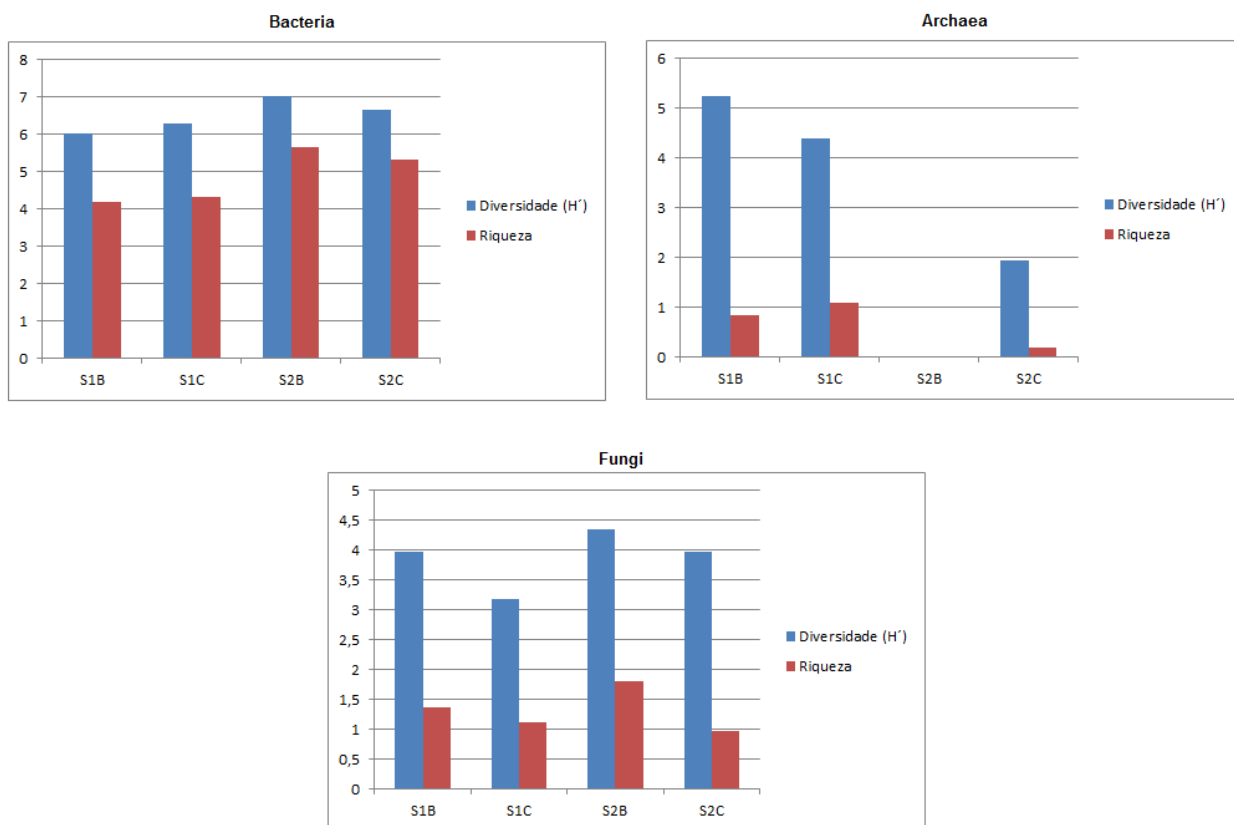


Figura 4. Índices de Diversidade de Shannon-Weaver (H') e de Riqueza de Margalef (R) da comunidade de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* nos solos estudados no experimento de biorremediação, obtidos através dos dados de T-RFLP. S1B: Solo Praia do Príncipe sob vegetação de *B. nesiotis*; S1C: Solo Praia do Príncipe sob vegetação de *C. atlanticus*; S2B: Solo do Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis*; S2C: Solo do Pico do Desejado sob vegetação de *C. atlanticus*.

Representantes do domínio *Bacteria* foram encontrados em todos os solos e tratamentos estudados. Já os representantes do domínio *Archaea* foram detectados em todos os tratamentos dos solos da Praia do Príncipe, mas não foram detectados em nenhum dos tratamentos do solo do Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis* e em dois dos tratamentos do solo dessa mesma área sob vegetação de *C. atlanticus* (S2CT3 e S2CT4). Representantes do reino *Fungi* não foram detectados nos tratamentos S1BT1, S1CT2, S1CT3, S2BT2 e S2CT4 (Figura 5).

Nos solos da Praia do Príncipe, a diversidade e riqueza de *Bacteria* sofreram redução significativa em resposta à contaminação com petróleo, no tratamento sem adição de nutrientes (S1T1 x S1T2). No tratamento que recebeu adição de NPK, a presença de óleo não afetou a diversidade (S1T3 x S1T4). Nas amostras não-contaminadas, a adição de nutrientes resultou em aumento da diversidade e redução da riqueza (tratamentos S1T1 x S1T3). Já nas amostras contaminadas, a aplicação de NPK resultou em aumento tanto da diversidade quanto da riqueza (tratamentos S1T2 x S1T4) (Figura 5).

Nos solos do Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis*, não houve efeito da contaminação com petróleo sobre a diversidade ou riqueza de *Bacteria* nos solos que não receberam aplicação de fertilizantes (S2BT1 x S2BT2, Figura 5). Já nos solos que receberam aplicação de NPK, a contaminação com petróleo resultou em aumento significativo tanto da diversidade quanto da riqueza desse grupo (S2BT3 x S2BT4, Figura 5). No mesmo tipo de solo, coletado sob vegetação de *C. atlanticus*, a aplicação de NPK resultou em aumento da diversidade e riqueza de *Bacteria* no tratamento sem contaminação com petróleo (S2CT1 x S2CT3) e na redução da riqueza (mas não da diversidade) na amostra contaminada (S2CT2 x S2CT4), em relação ao efeito da contaminação sobre as comunidades microbianas nesse solo, houve aumento dos índices de diversidade e riqueza em resposta à contaminação nos solos que não receberam aplicação de NPK (S2CT1 x S2CT2) e o contrário foi observado nas amostras fertilizadas (S2CT3 x S2CT4) (Figura 5).

A diversidade e riqueza de *Archaea* no solo da Praia do Príncipe sob vegetação de *B. nesiotis* diminuíram com a aplicação de nutrientes, com a adição de petróleo e com a aplicação de nutrientes junto com petróleo (S1BT1 x S1BT2, S1BT3 e S1BT4). No solo sob vegetação de *C. atlanticus*, houve aumento tanto da diversidade quanto da riqueza desse grupo quando foi adicionado petróleo nos solos sem fertilizante (S1CT1 x S1CT2), ocorrendo o oposto quando o petróleo foi adicionado aos solos fertilizados (S1CT3 x S1CT4) (Figura 5).

No solo do Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis* não foram encontrados representantes do domínio *Archaea* em nenhum dos tratamentos. Porém, no solo do Pico do desejado sob vegetação de *C. atlanticus* foram detectados representantes desse Domínio nos solos sem adição de nutrientes, nos quais a diversidade e riqueza desse grupo microbiano aumentaram com a aplicação de petróleo (S2CT1 x S2CT2) (Figura 5).

Não foram detectados representantes do reino *Fungi* no solo da Praia do Príncipe sob vegetação de *B. nesiotis* nos quais não foram adicionados nem nutrientes nem petróleo (S1BT1). Nesse solo, a diversidade e riqueza desse grupo foram maiores no tratamento em que foi adicionado NPK (S1BT3), havendo porém uma redução quando houve adição de petróleo (S1BT3 x S1BT2, S1BT4). No mesmo solo, sob vegetação de *C. atlanticus*, houve aumento da diversidade (mas não da riqueza) de fungos no solo quando adicionados em conjunto nutrientes e petróleo (S1CT1 x S1CT4), mas não foram encontrados representantes do reino *Fungi* nos solos com adição de nutrientes e petróleo separadamente (S1CT2 e S1CT3) (Figura 5).

No solo do Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis*, houve diminuição da diversidade (mas não da riqueza) de fungos quando foram adicionados nutrientes (S2BT1 x S2BT3). Porém, quando se adicionaram nutrientes juntamente com petróleo, houve diminuição tanto da riqueza quanto da diversidade desse grupo (S2BT1 x S2BT4). No tratamento com adição de petróleo sem nutrientes, não foram detectados representantes do reino *Fungi*. No mesmo solo, sob vegetação de *C. atlanticus*, houve diminuição da diversidade e riqueza de fungos quando nutrientes e petróleo foram adicionados separadamente (S2CT1 x S2CT2, S2CT3) e não houve detecção de representantes desse grupo quando nutrientes e petróleo foram adicionados em conjunto (S2CT4) (Figura 5).

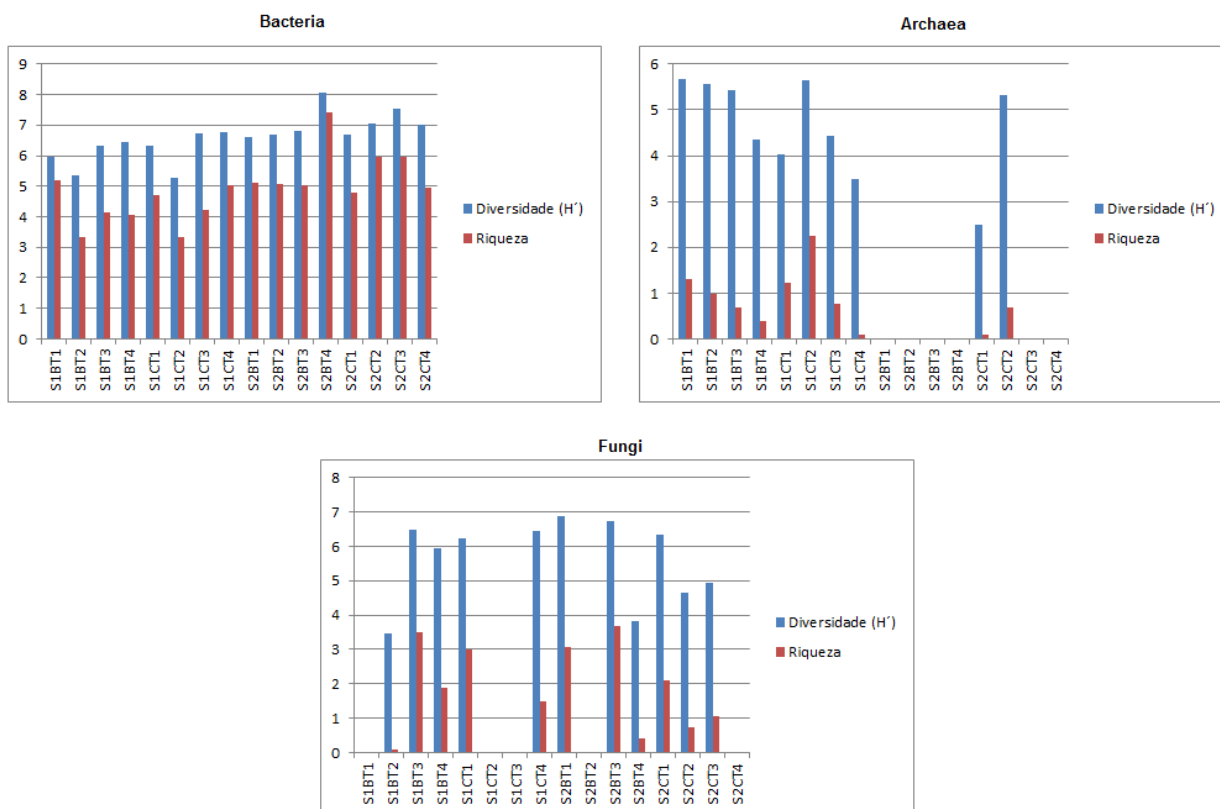


Figura 5. Diversidade de Shannon-Weaver (H') e Riqueza de Margalef (R) da comunidade de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi* nos solos e tratamentos estudados no experimento de biorremediação, obtidos através dos dados de T-RFLP. S1B: Solo Praia Príncipe sob vegetação de *B. nesiotis*; S1C: Solo Praia do Príncipe sob vegetação de *C. atlanticus*; S2B: Solo do Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis*; S2C: Solo do Pico do Desejado sob vegetação de *C. atlanticus*; T1: sem petróleo/sem NPK; T2: com petróleo/sem NPK; T3: sem petróleo/com NPK; T4: com petróleo/com NPK.

2.3.4 Análises de Agrupamento

A comunidade de *Bacteria* do solo do Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis*, contaminado com petróleo e fertilizado (S2BT4), é a que mais difere quando comparada com as comunidades dos outros solos e tratamentos; para *Archaea*, a comunidade do solo da Praia do Príncipe sob vegetação de *C. atlanticus*, contaminado com petróleo e não-fertilizado (S1CT2), é a que mais difere e, para *Fungi*, a comunidade que mais diferiu das demais é a encontrada no solo da Praia do Príncipe sob vegetação de *C. atlanticus*, não-contaminado e sem aplicação de NPK (S1CT1) (Figura 6).

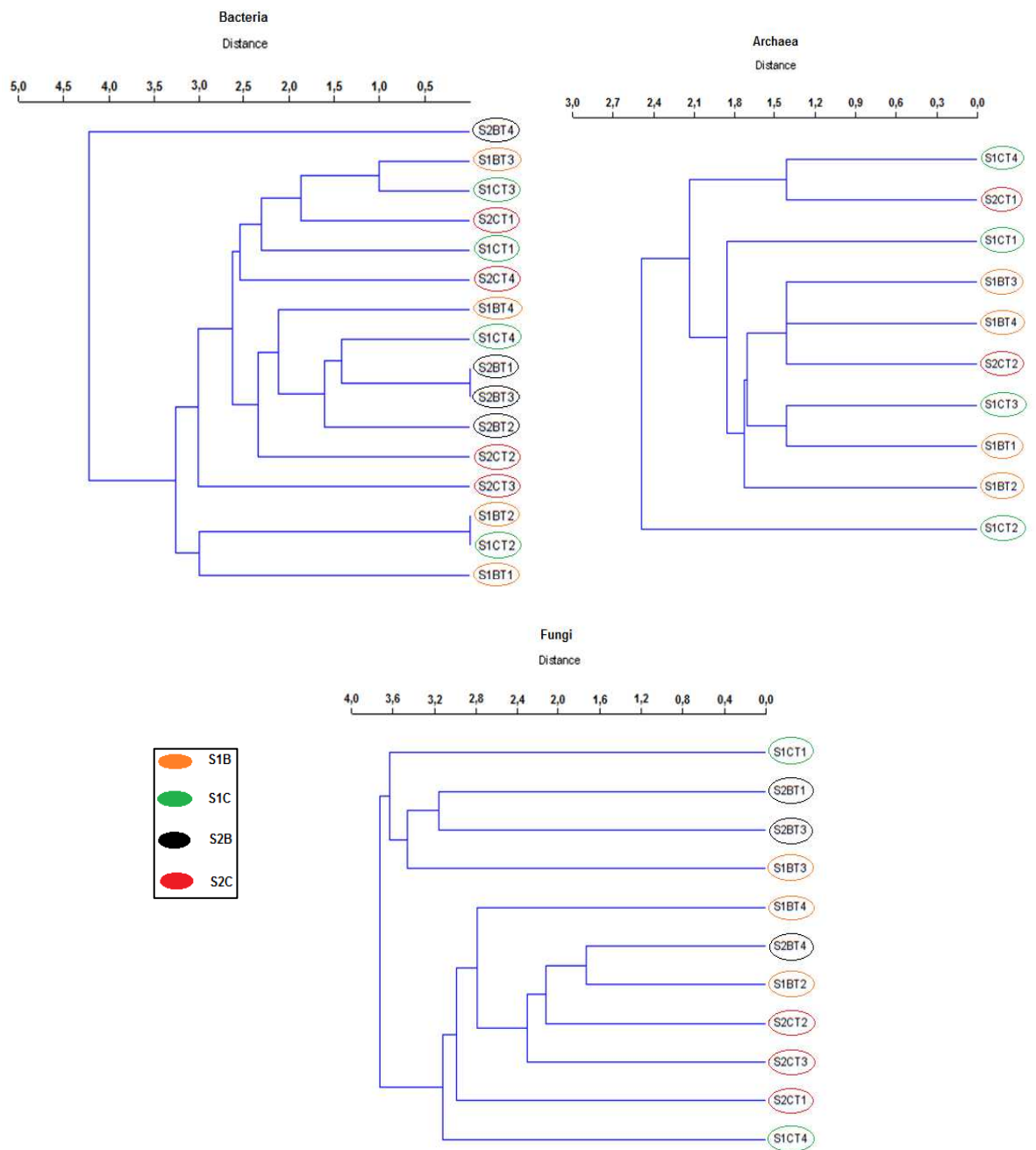


Figura 6. Análises de agrupamento do perfil das comunidades de *Bacteria*, *Archaea* e *Fungi*, utilizando-se a distância euclidiana como coeficiente de associação. S1B: Solo Praia do Príncipe sob vegetação de *B. nesiotis*; S1C: Solo Praia do Príncipe sob vegetação de *C. atlanticus*; S2B: Solo Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis*; S2C: Solo Pico do Desejado sob vegetação de *C. atlanticus*; T1: sem petróleo/sem NPK; T2: com petróleo/sem NPK; T3: sem petróleo/com NPK; T4: com petróleo/com NPK.

2.3.5 Obtenção e identificação de isolados com potencial para degradar petróleo

Foram obtidos 27 isolados a partir dos solos da Ilha da Trindade contaminados com petróleo durante o experimento de biorremediação. Os resultados da identificação dos mesmos pelo perfil de ácidos graxos estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Identificação dos isolados obtidos a partir de solos da Ilha de Trindade contaminados com petróleo durante o experimento de biorremediação.

Isolado	Identificação	Índice de similaridade (IS)*
TRN1	<i>Pseudomonas putida</i>	0.936
TRN2	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	0.590
TRN3	<i>Microbacterium terrae</i>	0.547
TRN4	<i>Microbacterium terrae</i>	0.470
TRN5	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	0.610
TRN6	<i>Micrococcus luteus</i>	0.471
TRN7	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	0.861
TRN8	<i>Moraxella osloensis</i>	0.519
TRN9	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	0.575
TRN10	<i>Micrococcus luteus</i>	0.853
TRN11	<i>Moraxella osloensis</i>	0.593
TRN12	<i>Kocuria rhizophila</i>	0.470
TRN13	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	0.432
TRN14	<i>Bacillus subtilis</i>	0.706
TRN15	<i>Bacillus subtilis</i>	0.744
TRN16	<i>Bacillus subtilis</i>	0.738
TRN17	<i>Bacillus subtilis</i>	0.759
TRN18	<i>Micrococcus luteus</i>	0.439
TRN19	<i>Kocuria varians</i>	0.392
TRN20	<i>Paenibacillus pabuli</i>	0.444
TRN21	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	0.517
TRN22	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	0.432
TRN23	<i>Bacillus subtilis</i>	0.743
TRN24	<i>Nocardia globerula</i>	0.656
TRN25	<i>Nocardia globerula</i>	0.656
TRN26	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	0.450
TRN27	<i>Bacillus subtilis</i>	0.717

*Índice de similaridade do perfil de ácidos graxos do isolado em relação ao perfil de ácidos graxos das cepas utilizadas na construção da biblioteca de referência ITSA 1.0.

2.4 DISCUSSÃO

As altas percentagens de degradação de HTP (acima de 66%) obtidas nesse trabalho com solos da Ilha de Trindade, mantidos em condições aeróbicas e temperatura de 24 °C por 60 dias, são coerentes com a origem rizosférica dos solos estudados, onde se demonstrou a presença de uma grande diversidade e riqueza microbianas. Nos solos rizosféricos, dada a presença de raízes e exsudatos, há uma elevada biomassa microbiana e uma maior atividade dos microrganismos do que nos solos com pouca ou nenhuma influência radicular, o que favorece a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo (Schwab *et al.*, 1995).

Não foi encontrado efeito significativo da adição de nutrientes minerais sobre a degradação de HTP. O resultado é atribuído à alta fertilidade natural dos solos da Ilha da Trindade, onde os elementos N, P e K não são limitantes para a multiplicação e atividade microbianas.

A adição de nutrientes inorgânicos tem sido repetidamente relatada como uma estratégia eficaz para se estimular o crescimento microbiano na água do mar, em sedimentos e em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo (Kasai *et al.*, 2002; Head *et al.*, 2006; Nikolopoulou e Kalogerakis, 2008; Beolchini *et al.*, 2010; Rodriguez-Blanco *et al.*, 2010). No entanto, nos sedimentos marinhos contaminados com petróleo estudados por Roberg *et al.* (2007) e por Dell'Anno *et al.* (2012), não foi observado aumento significativo na abundância bacteriana ou na degradação de hidrocarbonetos em resposta à adição de nutrientes inorgânicos. No caso dos solos oriundos da Ilha da Trindade utilizados nesse trabalho, os resultados demonstram não haver benefício da adição de fertilizantes NPK em relação à atividade de biodegradação.

A maior percentagem de degradação de HTP observada no solo do Pico do Desejado em relação ao solo da Praia do Príncipe pode estar relacionada às características físico-químicas desses solos. O solo do Pico do Desejado caracteriza-se por apresentar maior teor de argila e de matéria orgânica do que o solo da Praia do Príncipe. Essas características podem influenciar a atividade das populações microbianas do solo e também os

possíveis efeitos da contaminação por hidrocarbonetos sobre elas. Altos teores de matéria orgânica e argila nos solos protegem os microrganismos contra o efeito dos hidrocarbonetos, levando a uma menor inibição das populações microbianas do solo (Labud *et al.*, 2007). A matéria orgânica e argila podem adsorver contaminantes, diminuindo a sua concentração inicial na fase aquosa e gasosa do solo. Nos solos arenosos, os contaminantes adicionados não são retidos pelos colóides orgânicos e inorgânicos do solo; conseqüentemente, compostos tóxicos exercem maior efeito de toxicidade sobre os microrganismos do solo (El-Tarabily, 2002). Esse efeito pode ser observado ao se compararem os dados de diversidade nos tratamentos sem (T1) e com adição de petróleo (T2) nos solos não fertilizados (Figura 5), que demonstram ter havido redução da diversidade em resposta à contaminação com petróleo somente nos solos da Praia do Príncipe, tanto sob vegetação de *B. nesiotis* quanto de *C. atlanticus*.

As análises de diversidade e riqueza de microrganismos demonstraram que os solos do Pico do Desejado apresentam originalmente maior diversidade e riqueza de bactérias e fungos do que os solos da Praia do Príncipe (Tratamento 1 na Figura 5), atributo que parece ter contribuído para com a maior atividade de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo nos solos do Pico do Desejado. Comunidades com baixa diversidade estão menos adaptadas para lidar com flutuações e estresse ambientais do que comunidades biologicamente estabelecidas com maior diversidade (Atlas e Bartha, 1998). Dell'Anno *et al.* (2012) demonstraram que a eficiência na biodegradação de hidrocarbonetos em sedimentos se relacionou significativa e positivamente com a riqueza de *Bacteria* em experimentos de biorremediação realizados em condições aeróbicas e anaeróbicas.

As diferenças de degradação de HTP entre o solo do Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis* e o sob vegetação de *C. atlanticus*, são coerentes com a ocorrência de seleção diferenciada de populações microbianas na rizosfera de diferentes espécies vegetais, como evidenciado nesse trabalho. As plantas excretam na rizosfera compostos orgânicos como aminoácidos, ácidos carboxílicos, carboidratos, derivados de ácidos nucléicos e enzimas, os quais promovem a seleção de certas populações microbianas na rizosfera (Rosa, 2006). A quantidade e a qualidade dos compostos

orgânicos liberados no solo pelas plantas dependem da espécie vegetal, ciclo de vida e estágio de crescimento.

No estudo realizado por Lambais *et al.* (2014) sobre a estrutura das comunidades bacterianas associadas à filosfera, dermosfera e rizosfera de sete espécies de árvores da Mata Atlântica no Brasil, foi demonstrado que cada uma das espécies de plantas seleciona comunidades bacterianas distintas, e que as estruturas das comunidades bacterianas estão significativamente relacionadas com o *taxa* das plantas, nos níveis de espécie, família e ordem.

Em conclusão, esse estudo demonstra que um fator relevante para a eficiência na degradação de hidrocarbonetos de petróleo nos solos é a diversidade das comunidades microbianas originalmente presentes. A seleção diferenciada de populações microbianas tanto pelas características físico-químicas dos solos quanto pela influência de espécies vegetais presentes neles, teve como consequência a obtenção de percentagens de degradação de hidrocarbonetos distintas nos solos da Ilha da Trindade estudados. Nesses solos, a adição de nutrientes para se estimular a biodegradação aparentemente faz-se desnecessária.

2.5 REFERÊNCIAS

Aislabie J, Saul DJ, Foght JM. 2006. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. *Extremophiles*, 10:171-179.

Almeida FFM. 2000. A Ilha de Trindade. In: Schobbenhaus C, Campos DA, Queiroz ET, Winge M, Berbert-Born M (eds). *Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil*. Disponível em: <http://www.unb.br/ig/sigep/sitio092/sitio092.htm>

Atlas RM e Bartha R. 1998. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Menlo Park, U.S.A.: Benjamin Cummings Publishing Co, 593p.

Beolchini F, Rocchetti L, Regoli F, Dell'Anno A. 2010. Bioremediation of marine sediments contaminated by hydrocarbons: experimental analysis and kinetic modeling. *Journal of Hazardous Materials*, 182: 403-407.

Clemente EP, Schaefer CEGR, Oliveira FS, Albuquerque Filho MR, Alves RV, Firme Sá MM, Melo VF, Corrêa GR. 2009. Toposequência de solos na Ilha da Trindade, Atlântico sul. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33: 1357-1371.

Culman SW, Duxbury JM, Lauren JG, Thies JE. 2006. Microbial community response to soil solarization in Nepal's rice-wheat cropping system. *Soil Biology and Biochemistry*, 38: 3359-3371.

De La Huz R, Lastra M, Junoy J, Castellanos C, Viéitez JM. 2005. Biological impacts of oil pollution and cleaning in the intertidal zone of exposed sandy beaches: Preliminary study of the "Prestige" oil spill. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 65:19-29.

Dell'Anno A, Beolchini F, Rocchetti L, Luna GM, Danovaro R. 2012. High bacterial biodiversity increases degradation performance of hydrocarbons

during bioremediation of contaminated harbor marine sediments. *Environmental Pollution*, 167: 85-92.

El-Tarabily K.A. 2002. Total microbial activity composition of a mangrove sediment are reduced by oil pollution at a site in the Arabian Gulf. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 176–182.

Gardes M e Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113-118.

Giovannoni SJ, DeLong FF, Olsen GJ, Pace NR. 1988. Phylogenetic group-specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells. *Journal of Bacteriology*, 170: 720-726.

Hauben L, Vauterin C, Swings J, Moore ERB. 1997. Comparison of 16S ribosomal DNA sequence of all *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 328-335.

Head IM, Jones DM, Röling WFM. 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 173-182.

Jurgens G, Lindstrom K, Saano A. 1997. Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil. *Appl. Applied and Environmental Microbiology*, 63: 803-805.

Kasai Y, Kishira H, Sasaki T, Syutsubo K, Watanabe K, Harayama S. 2002. Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil contaminated and nutrient supplemented sea water. *Environmental Microbiology*, 4: 141-147.

Labud V. et al. 2006. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, 66: 1863-1871.

Laffon B, Rábade T, Pásaro E, Méndez J. 2006. Monitoring of the impact of Prestige oil spill on *Mytilus galloprovincialis* from Galician coast. *Environment International*, 32:342–8.

Lambais MR, Lucheta AR, Crowley DE. 2014. Bacterial community assemblages associated with the phyllosphere, dermosphere, and rhizosphere of tree species of the atlantic forest are host taxon dependent. *Microbial Ecology*, 68(3):567-574.

Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG. 1998. Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (2): 795-799.

Marín JA, Moreno JL, Hernández T, García C. 2006. Bioremediation by composting of heavy oil refinery sludge in semiarid conditions. *Biodegradation*, 17: 251-261.

Martins Le Alves R. 2007. Regeneração Natural do Morro Vermelho, Ilha da Trindade. *Revista Brasileira de Biociências*, 5 (1): 39-41.

Nikolopoulou M e Kalogerakis N. 2008. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers combined with biosurfactants and molasses. *Marine Pollution Bulletin*, 56: 1855-1861.

Petrobras. 2014. Atuação no Pré-Sal. Disponível em: <http://www.petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/areas-de-atuacao/exploracao-e-producao-de-petroleo-e-gas/pre-sal/>

Roberg S, Stormo SK, Landfald B. 2007. Persistence and biodegradation of kerosene in high-artic intertidal sediment. *Marine Environmental Research*, 64: 417-428.

Rodriguez-Blanco A, Antoine V, Pelletier E, Delille D, Ghiglione JF. 2010. Effects of temperature and fertilization on total vs. active bacterial communities exposed to crude and diesel oil pollution in NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution*, 158: 663-673.

Rosa GS. 2006. Avaliação do potencial de espécies vegetais na fitorremediação de solos contaminados por petróleo. (Dissertação de Mestrado) Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil. 160p.

Schwab AP, Banks MK, Arunuchalam M. 1995. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in rhizosphere soil. In: *Bioremediation of Recalcitrant Organics*. Hinchey RE, Hoepfel RH, Anderson DB (Ed). Columbus, U.S.A.: Battelle Press. p.23-29.

U.S. Department of Agriculture. 1993. Soil survey manual, Cap. 3: 17. Disponível: http://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs142p2_050993.pdf

White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J. 1990. Analysis of phylogenetic relationship by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In: *PCR protocol: a guide to method and applications*. Innis MA, Gelfond DH, Sinsky JJ, White T. J. (ed.),. New York, U.S.A.: Academic Press.

CONCLUSÕES GERAIS

Os solos da Ilha de Trindade, sem registros de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo, apresentam microrganismos nativos com capacidade de metabolizar esse tipo de compostos orgânicos, auxiliando a remoção dos contaminantes.

Devido aos altos teores de nutrientes encontrados nos solos estudados, a fertilização com NPK não é um fator limitante ao processo de biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo. Porém, um fator relevante para a eficiência na degradação de hidrocarbonetos de petróleo nos solos estudados é a diversidade das comunidades microbianas originalmente presentes.

A seleção diferenciada de populações microbianas tanto pelas características físico-químicas dos solos quanto pela influência de espécies vegetais presentes neles, teve como consequência a obtenção de percentagens de degradação de hidrocarbonetos diferencial nos solos da Ilha da Trindade estudados. Sendo que a maior percentagem de degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo (75%) foi obtida no solo do Pico do Desejado sob vegetação de *B. nesiotis*.