

## **SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Influência do níquel na biorremediação de solo tropical multicontaminado com hidrocarbonetos de petróleo e na estrutura da comunidade microbiana**

## **PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA**

**Luiz Inácio Lula da Silva**

**José Alencar Gomes da Silva**

Vice-Presidente

## **MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

**Sérgio Machado Rezende**

Ministro da Ciência e Tecnologia

**Luiz Antonio Rodrigues Elias**

Secretário-Executivo

**José Edil Benedito**

Subsecretário de Coordenação das Unidades de Pesquisa

## **CETEM – CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL**

**José Farias de Oliveira**

Diretor

**Carlos César Peiter**

Coordenador de Apoio Tecnológico à Micro e Pequena Empresa

**Arnaldo Alcover Neto**

Coordenador de Análises Minerais

**Silvia Cristina Alves França**

Coordenadora de Processos Minerais

**Cosme Antônio de Moraes Regly**

Coordenador de Administração

**Ronaldo Luiz Correa dos Santos**

Coordenador de Processos Metalúrgicos e Ambientais

**Andréa Camardella de Lima Rizzo**

Coordenadora de Planejamento, Acompanhamento e Avaliação

# **SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL**

ISSN 0103-7374

ISBN 978-85-61121-70-9

**STA-59**

## **Influência do níquel na biorremediação de solo tropical multicontaminado com hidrocarbonetos de petróleo e na estrutura da comunidade microbiana**

**Natália Franco**

Mestre em Ciências

**Rodrigo Gouvêa Taketani**

Doutor em Ciências

**Selma Gomes Ferreira Leite**

Doutora em Ciências

**Andrea Camardella de Lima Rizzo**

Doutora em Ciências

**Siu Mui Tsai**

Doutora em Ciências

**Cláudia Duarte da Cunha**

Doutora em Ciências

**CETEM/MCT**

2010

## **SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Luis Gonzaga Santos Sobral**

Editor

**Andréa Camardella de Lima Rizzo**

Subeditora

### **CONSELHO EDITORIAL**

Marisa Bezerra de M. Monte (CETEM), Paulo Sergio M. Soares (CETEM), Saulo Rodrigues P. Filho (CETEM), Silvia Gonçalves Egler (CETEM), Vicente Paulo de Souza (CETEM), Antonio Carlos Augusto da Costa (UERJ), Fátima Maria Zanon Zotin (UERJ), Jorge Rubio (UFRGS), José Ribeiro Aires (CENPES), Luis Enrique Sánches (EPUSP), Virginia Sampaio Ciminelli (UFMG).

A Série Tecnologia Ambiental divulga trabalhos relacionados ao setor minerometalúrgico, nas áreas de tratamento e recuperação ambiental, que tenham sido desenvolvidos, ao menos em parte, no CETEM.

O conteúdo desse trabalho é de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

**Thatyana Pimentel Rodrigo de Freitas**

Coordenação Editorial

**Vera Lúcia Espírito Santo Souza**

Programação Visual

**Andrezza Milheiro da Silva**

Revisão

---

Influência do níquel na biorremediação de solo tropical multicontaminado com hidrocarbonetos de petróleo e na estrutura da comunidade microbiana / Natália Franco et al. — Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010.

77p.:il. (Série Tecnologia Ambiental, 59)

1. Biorremediação. 2. Solo contaminado por petróleo. 3. Hidrocarbonetos de petróleo I. Centro de Tecnologia Mineral. II. Franco, Natália. III. Taketani, Rodrigo Gouveia. IV. Leite, Selma Gomes F. V. Rizzo, Andrea C. Lima. VI. Tsai, Sin Mui. VII. Cunha, Cláudia Duarte. VIII. Série.

CDD – 661.81

---

# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>9</b>
<b>1   INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
1.1   Contaminação ambiental por hidrocarbonetos de petróleo	11
1.2   Os metais	13
1.3   Multicontaminações: compostos orgânicos e metais pesados	15
1.4   A biorremediação e a ecologia microbiana	19
1.5   Biorreatores	21
<b>2   OBJETIVO</b>	<b>23</b>
<b>3   METODOLOGIA</b>	<b>24</b>
3.1   Solo	24
3.2   Óleo	25
3.3   Ensaios em microcosmos	26
3.4   Ensaio em biorreator	29
3.5   Análises da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo	30
3.6   Análises microbiológicas	31
3.7   Tratamento estatístico dos dados	34
<b>4   RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>35</b>
4.1   Ensaios em microcosmos	35
4.2   Ensaio em biorreator	60

4.3   Considerações gerais	63
5   CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

## RESUMO

A atividade industrial petroquímica é responsável por grandes despejos de poluentes orgânicos e inorgânicos no ambiente. Dentre os elementos inorgânicos, podemos destacar o vanádio, arsênio, níquel, dentre outros que possuem característica de persistência no ambiente, causando, assim, o acúmulo desses elementos. Há muitos estudos que mostram o efeito negativo de alguns desses elementos na degradação dos hidrocarbonetos, afetando, diretamente, os processos de biorremediação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do níquel na biorremediação do óleo cru em solo multicontaminado e estudar as alterações na estrutura da comunidade microbiana. Para tal, foram realizados ensaios em microcosmos verificando a influência da concentração do metal, da concentração do óleo e do teor de umidade na remoção dos hidrocarbonetos totais de petróleo por um período de 67 dias. Foi utilizado o planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) (*Design Expert - Stat Easy®*) como ferramenta para análise estatística dos resultados das influências. O parâmetro resposta foi o percentual de remoção dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP), quantificados por espectrometria no infravermelho (Infracal®). Para o monitoramento das comunidades microbianas do solo foi realizada contagem de bactérias heterotróficas totais, bactérias degradadoras de óleo cru e a técnica de PCR-DGGE utilizando diferentes marcadores moleculares. Posteriormente, fez-se uma ampliação dos experimentos para a escala semi-piloto em um reator com capacidade de 8 kg de solo, no qual foi simulado um processo de biorremediação de óleo cru (5% p/p) na presença de níquel (260 mg/kg). Os resultados obtidos de remoção de HTP indicam um atraso significativo na degradação do óleo na presença desse metal, nos primeiros 15 dias de tratamento. A umidade foi o fator de maior influência positiva nos experimentos por todo o período analisado. Ao final do tratamento (67 dias), o óleo passou a ser o parâmetro de maior

influência negativa, demonstrando uma adaptabilidade da comunidade microbiana à presença do níquel. Em relação às contagens, seus perfis foram diretamente influenciados pela umidade. As análises dos geis de DGGE indicaram que todos os tratamentos se diferenciaram entre si, exceto os tratamentos contendo óleo (5% p/p) com Ni (130 mg/kg) e óleo (5% p/p) com Ni (260 mg/kg). Quando comparamos os marcadores moleculares entre si, a maior parte demonstrou um comportamento distinto. Apenas o marcador para  $\gamma$ -proteobactéria em relação à Actinobacteria e à Bacteria demonstrou similaridade significativa. Pode-se concluir, portanto, que o níquel promoveu uma alteração direta nos perfis da comunidade e um comportamento distinto entre os diferentes marcadores usados. O grupo das  $\gamma$ -proteobactérias, provavelmente, teve uma maior relação com as alterações, inclusive por possuir grupos importantes que participam desses processos, como o das *Pseudomonas*. No entanto, a capacidade de adaptação dos micro-organismos, assim como sua diversidade, foi capaz de superar a influência negativa inicial da presença do metal e promover um percentual de remoção final (próximo a 30%) bastante similar nos diferentes sistemas que continham um valor de umidade máximo. Com relação ao biorreator, as taxas de remoção finais foram similares às obtidas em microcosmos, porém, no biorreator, o valor de 30% de remoção foi atingido em apenas 7 dias, refletindo a eficiência de operação atribuída ao mesmo.

### **Palavras-chave**

Biorremediação, multicontaminação, níquel, hidrocarbonetos, DGGE, biorreator.



## **ABSTRACT**

The petrochemical industrial activity is responsible for huge discharges of organic and inorganic pollutants in the environment. Among the inorganic elements, vanadium, arsenic, nickel, among others, have a characteristic of persistence in the environment, causing, thus, their accumulation. There are many studies showing the negative effect of some of those elements in the hydrocarbons' degradation, affecting, directly, the bioremediation process. The study aimed at evaluating the influence of nickel on the bioremediation of crude oil in soil multicontaminated and the changes in microbial community structure during the process. Therefore, tests were accomplished in microcosms monitoring the influence of metal concentration, oil concentration and moisture content in the removal of total petroleum hydrocarbons for a period of 67 days. Full factorial design ( $2^3$ ) was used (Design Expert - Easy Stat®) as a tool for statistical investigation of the influence of those parameters. The response parameter was the total petroleum hydrocarbons (TPH) removal percentage, quantified by infrared spectroscopy (Infracal®). For monitoring the soil microbial communities, the counting of total heterotrophic bacteria, crude oil degrading bacteria and PCR-DGGE using different molecular markers were performed. It was also made a scale up using a pilot bioreactor with capacity for 8 kg of crude oil bearing soil (5% w/w) and nickel (260 mg/kg). The results of TPH removal showed a significant delay in the degradation of oil in the presence of metal in the first 15 days of treatment. The humidity was the factor of highest positive influence in the experiments throughout the analyzed period. At the end of the treatment (67 days), oil had become the most negative parameter influence, showing an adaptability of the microbial community to the presence of nickel. Regarding the microorganisms counting operation, their profiles were directly influenced by moisture. The DGGE gels analyses showed that all treatments differed

from one another, except oil treatments (5% w/w) with Ni (130 mg/kg) and with Ni (260 mg/kg). When comparing the molecular markers between them, most showed a distinct behavior, and only the marker for  $\gamma$ -proteobacteria compared to Bacteria and Actinobacteria showed significant similarity. It can be concluded, therefore, that the nickel promoted a direct change in profiles of the community and a distinct behavior between the different markers used. The group of  $\gamma$ -proteobacteria probably had a higher correlation with the changes, as it contains the major groups involved in these processes, such as *Pseudomonas*. However, the adaptability of microorganisms, as well as their diversity, was able to overcome the negative influence of the initial presence of that metal and promoted a final degradation percentage (close to 30%) very similar in different systems that had a maximum humidity value. With respect to the bioreactor, the final oil removal rates were similar to those obtained in microcosm, but 30% was achieved in just 7 days, reflecting an operation efficiency attributed to the bioreactor.

### **Keywords**

Bioremediation, multicontamination, nickel, hydrocarbons, DGGE, bioreactor.

## 1 | INTRODUÇÃO

### 1.1 | Contaminação ambiental por hidrocarbonetos de petróleo

As práticas industriais dos últimos 200 anos provocaram grandes distúrbios na maioria dos ecossistemas. Como resultado desses distúrbios podemos citar a diminuição da diversidade, a extinção de muitas espécies sensíveis e a seleção de espécies cosmopolitas adaptadas ao ambiente sobre determinado estresse (KOZDRÓJ & VAN ELSAS, 2001).

O processamento do petróleo pode oferecer riscos de acidentes e consequentes contaminações. Os impactos ambientais e de saúde pública gerados podem ocorrer desde a etapa de exploração, passando pela geração de resíduos (sólidos e líquidos) e emissões atmosféricas durante o processo de refino, até os eventuais vazamentos acidentais ocorridos em terra ou em mar (CORRÊA, 2003; RIZZO, 2008). O trabalho de Knox & Gilman (1997), que verificou os efeitos de tais resíduos, relata um aumento da incidência de câncer nos ossos, cérebro e pulmões, além de leucemias em indivíduos residentes próximos às indústrias petroquímicas, induzido pelas mesmas.

Todo esse impacto gerado pela contaminação dos recursos naturais promove uma alteração no meio ambiente, principalmente na atividade microbiana presente, que tenta restabelecer um novo equilíbrio.

A participação dos micro-organismos nos processos de biodegradação dos hidrocarbonetos foi estabelecida como sendo uma função do ecossistema (nicho ecológico) e das condições locais do ambiente (ALEXANDER, 1994). A microbiota hetero-

trófica da maioria dos ambientes inclui a população degradadora de hidrocarbonetos que ocorre naturalmente. Essa característica inerente proporciona um grande potencial de metabolizar os hidrocarbonetos. Assim sendo, a adição de petróleo e seus derivados ao solo, de forma acidental ou não, enriquece, seletivamente, a comunidade capaz de utilizar esse substrato (HILL, 1984). Por outro lado, a percolação do petróleo através do solo reduz a aeração e modifica o balanço C:N para as comunidades microbianas presentes, alterando a diversidade e o número de micro-organismos no ecossistema (ALEXANDER, 1994).

A primeira exposição da comunidade microbiana aos hidrocarbonetos, seja por derrame acidental de óleo, disposição de resíduos oleosos ou por fenômenos naturais, é importante para a determinação do tempo do processo de eliminação do hidrocarboneto no ambiente. Esse fenômeno, que resulta em um aumento do potencial da comunidade oxidante dos hidrocarbonetos, é chamado de adaptação (ATLAS, 1991). Os três mecanismos inter-relacionados os quais levam à adaptação são: (a) indução de enzimas específicas; (b) mudanças genéticas que resultam em novas capacidades metabólicas; (c) enriquecimento seletivo de micro-organismos capazes de transformar o composto em questão. Com relação ao enriquecimento seletivo, o número de micro-organismos que utilizam hidrocarbonetos, assim como a sua proporção na comunidade heterotrófica, aumenta com a exposição ao petróleo e seus derivados, geralmente, refletindo o grau de contaminação do ecossistema (KORDA *et al.*, 1997).

## 1.2 | Os metais

Tem-se verificado, ao longo do desenvolvimento tecnológico mundial, uma contribuição crescente das fontes antrópicas de metais para o solo, o que resulta na poluição de extensas áreas e no avanço do impacto negativo destes sobre o meio ambiente (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). De acordo com Gadd & White (1993), a combustão do carvão mineral é a atividade que contribuiu com maior número de metais poluentes para o solo, sendo esta seguida pela deposição de lodo de esgoto e resíduos da indústria petrolífera e siderúrgica. A elevação na concentração de metais no solo interfere diretamente no ciclo desses elementos na natureza e também pode influenciar de modo negativo nos demais processos com interferência no ecossistema (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Os estudos das transformações inorgânicas dos metais tiveram início no final do século XIX, quando o pesquisador russo Serguei Winogradsky evidenciou o modo quimiolitotrófico da vida microbiana. Por este metabolismo, micro-organismos fixam  $\text{CO}_2$  através da energia de oxidação de compostos inorgânicos. A atividade quimiolitotrófica, além de ter grande importância geoquímica, tem aplicação na lixiviação ou solubilização de minerais através do processo conhecido como biolixiviação ou biometalurgia. A microbiota interfere, ativamente, nas transformações e ciclos de vários elementos no solo, influenciando o fluxo destes no ecossistema e podendo causar deficiência ou fitotoxidez de micronutrientes e até problemas ambientais.

Os metais encontram-se em formas diversas no solo, como: solúveis em água, retidos nos sítios de troca, adsorvidos ou complexados aos colóides orgânicos e inorgânicos. Esses ele-

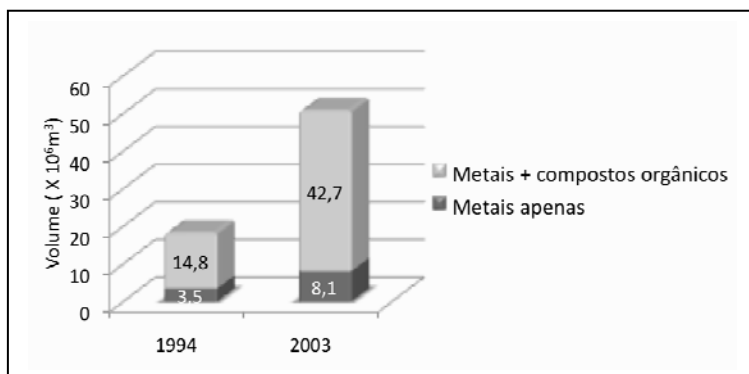
mentos, quando presentes em resíduos orgânicos vegetais, animais e outros como lodo de esgoto, por exemplo, são liberados mediante biodegradação, produzindo quelatos orgânicos e metais livres, os quais vão para a biomassa, entram nas diversas formas do estoque de metais do solo ou são absorvidos pelas plantas ou ainda lixiviados. Assim, como ocorre com outros elementos, os metais passam por uma biociclagem no solo através da absorção pelas plantas, biomassa microbiana e transformação em formas livres (iônica) ou de quelatos, que se equilibram com as demais formas encontradas no solo. Portanto, os elementos metálicos, além de sofrerem inúmeras transformações, estão também sujeitos à mineralização e à imobilização temporária na biomassa. Muito pouco se conhece sobre a capacidade da biomassa microbiana do solo em armazenar metais, especialmente daqueles metais sem função fisiológica conhecida, como o Cd e Hg (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Os tratamentos de locais contaminados com metais são difíceis de serem realizados, pois: (1) a contaminação normalmente é heterogênea, em escala macro (distribuição do metal no ambiente, tanto na sua dispersão vertical, quanto na horizontal) e/ou escala micro (formas químicas ou físicas da interação do metal com a matriz do solo); (2) o metal não pode ser degradado ou destruído e (3) as diferentes formas do metal e da matriz do solo contaminado interferem, diretamente, na avaliação de risco e no tratamento do solo contaminado. O conhecimento apenas da quantidade de metal que contaminou um determinado volume de solo não é suficiente para uma avaliação de risco e escolha de uma estratégia de tratamento. É preciso identificar as diferentes formas do metal, assim como as características do solo como o valor de pH, capacidade de

troca catiônica, granulometria, mineralogia e quantidade de matéria orgânica (DERMONT *et al.*, 2008).

### 1.3 | Multicontaminações: compostos orgânicos e metais pesados

Dermont e colaboradores (2008) abordaram a questão do tratamento de solos multicontaminados por metal e por compostos orgânicos, mostrando (Figura 1) um aumento de mais de 300% do volume desse tipo de material (sedimentos, solo e lodo) de 1994 a 2003 (USEPA, 1996; USEPA, 2004).



Fonte: adaptado de DERMONT, 2008.

**Figura 1.** Aumento do volume de material multicontaminado no período de 1994 a 2003. Estimativa da quantidade de material (solo, lodo e sedimento) em aproximadamente 1.000 locais prioritários considerados pela USEPA, nos Estados Unidos.

A importância da elucidação dos processos de multicontaminações vem, também, aumentando em consequência da necessidade de monitoramento e remediação dessas áreas. Em 2007, Nadal e colaboradores (2007) publicaram um trabalho de monitoramento de áreas com atividade industrial química, petro-

química, urbana e não poluída no ano de 2002 e 2005, sendo que a única área que apresentou aumento da concentração de todos os metais avaliados (arsênio, cádmio, cromo, chumbo e vanádio), foi a de atividade petroquímica.

Irha e colaboradores (2003) estudaram o efeito de metais pesados e hidrocarbonetos policíclicos armáticos (HPA) na estrutura de comunidade microbiana de diferentes tipos de solo usando a atividade desidrogenásica e concluíram que o efeito negativo dos poluentes na comunidade microbiana do solo variava em relação à quantidade de matéria orgânica encontrada em cada tipo. A matéria orgânica do solo é importante para reduzir a fração solúvel dos contaminantes e a biodisponibilidade dos mesmos, diminuindo o efeito de persistência dos poluentes orgânicos. Muitos outros trabalhos também obtiveram um efeito negativo, por testes enzimáticos (urease e desidrogenase), em solos multicontaminados com hidrocarbonetos e metais pesados (CHANDER & BROOKES, 1991; KELLY & TATE, 1998; KELLY, HAGGBLOM & TATE, 1999; AL-SALEH & OBUEKWE, 2005; SHEN *et al.*, 2005).

Com o objetivo de esclarecer a inibição da biodegradação de hidrocarbonetos monoaromáticos pela presença de metais pesados, Amor e colaboradores (2000) testaram vários metais pesados (zinco, níquel e cádmio) na inibição da biodegradação do tolueno em meio de cultura e concluíram que o níquel foi o metal com maior influência negativa, seguido pelo cádmio e por último o zinco.

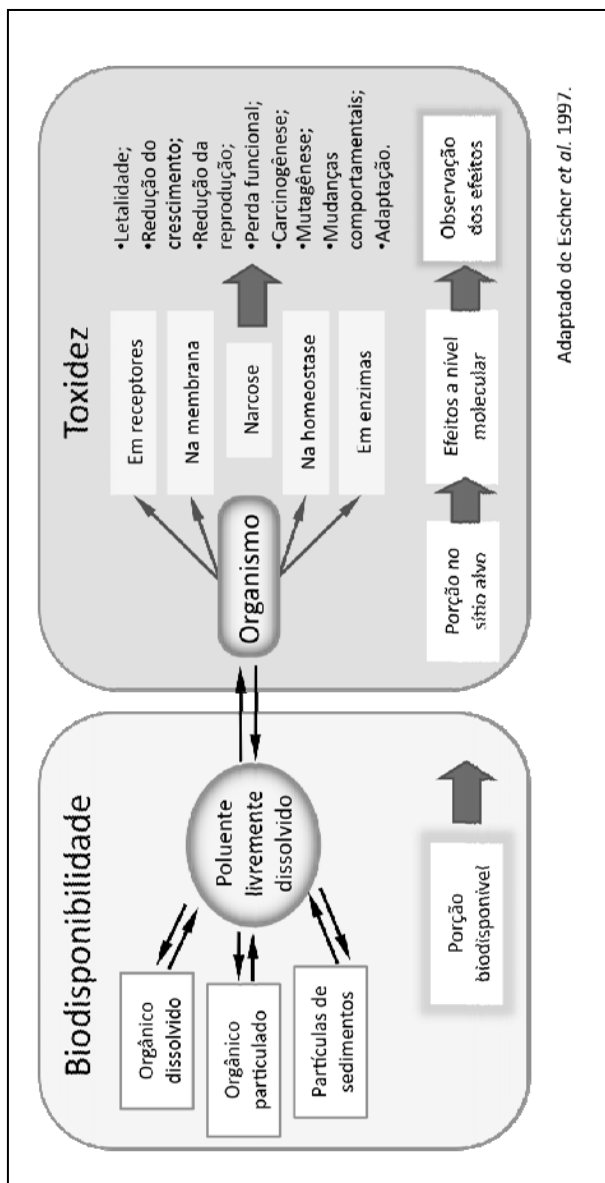
Dermont e colaboradores (2008) abordaram a questão da influência dos compostos orgânicos nos tratamentos de solos contaminados por metais. Nesse sentido, o poluente orgânico altera a mobilidade do metal no solo (GALVEZ-CLOUTIER &



DUBE, 2002) e acaba por prejudicar os tratamentos físico-químicos para retirada do metal. Em relação aos tratamentos, os compostos orgânicos voláteis afetam os processos de solidificação e/ou estabilização, já os compostos viscosos afetam as técnicas de lavagem do solo. Portanto, primeiramente os compostos orgânicos devem ser retirados para a posterior remoção do metal.

Para a remoção do óleo, o tratamento mais adequado é a biorremediação como discutido anteriormente, porém o impacto no solo pela contaminação por petróleo e metais pesados pode resultar em grandes perdas de sua qualidade (COYNE, 1999). A perda, em grande parte, é consequência da toxidez desses poluentes aos processos biológicos catalisados pelos microrganismos do solo (TESTA, 1997).

As fontes de informações sobre áreas multicontaminadas ainda são bastante escassas em termos específicos para cada metal, sendo que existe um fator complicador que é a alta influência do tipo de solo para cada caso. O esquema da Figura 2 mostra as interações entre o poluente e o organismo presente no ambiente, assim como os efeitos da toxidez do poluente. Nesse esquema é possível ver a complexidade dessas interações, assim como o número de variáveis, porém só é possível ter controle do processos de descontaminação se esclarecermos tais informações.



Fonte: Adaptado de Escher et al., 1997.

**Figura 2.** Esquema da interação do contaminante com o poluente.

## 1.4 | A biorremediação e a ecologia microbiana

Há registros de contaminação por petróleo desde 1754; porém, foi a partir da década de 60 que as atenções foram voltadas para esse problema, gerando o desenvolvimento de várias técnicas de tratamento. Essas técnicas baseiam-se em processos físicos (lavagem e extração por vapor), químicos (extração por solvente e processos oxidativos avançados – POAs, desalogenação química), térmicos (dessorção térmica, incineração) e biológicos (“*landfarming*”, biopilhas, biorreatores etc.) (URURAHY, 1998).

Há várias definições para o termo biorremediação, porém é importante ressaltarmos duas delas. A primeira, descrita pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), conceitua biorremediação como “o processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de micro-organismos para degradar substâncias toxicamente perigosas, transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas”. A segunda definição, feita pelo Escritório de Estudos Geológicos do Departamento do Interior do Governo Americano (USGS), leva em consideração o uso de plantas nos processos de biorremediação, considerando “o uso de agentes biológicos, tais como bactérias e plantas para remover ou neutralizar contaminantes, como poluentes do solo e da água” (MARTINS *et al.*, 2004 *apud* RIZZO, 2008).

A biorremediação do petróleo é mediada por micro-organismos capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de energia e carbono (RON, 2000). Esses micro-organismos são versáteis, sendo capazes de degradar vários tipos de hidrocarbonetos – alcanos lineares de cadeia curta e longa, inúmeros compostos aromáticos e policíclicos aromáticos (RON & ROSENBERG, 2002).

O aprimoramento da biorremediação como uma ferramenta útil na recuperação de solos contaminados tem sido, em grande parte, baseado no aumento do conhecimento da fisiologia, ecologia e bioquímica das populações hidrocarbonoclásticas presentes no solo e de como os contaminantes são metabolizados pelos micro-organismos.

A biorremediação explora a diversidade genética e a versatilidade metabólica dos micro-organismos para a transformação de contaminantes em produtos finais menos tóxicos, os quais são integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais (ALEXANDER, 1994).

O conhecimento da diversidade bacteriana e os estudos de ecologia microbiana são essenciais para o entendimento do papel das comunidades microbianas nos diferentes processos que ocorrem no solo. Várias condições devem ser satisfeitas para que a biodegradação aconteça, entre elas: a) existência de organismos que possuam as enzimas necessárias para que os processos ocorram; b) a presença deste organismo no ambiente que contenha as substâncias a serem biodegradadas. Apesar de muitos micro-organismos estarem presentes em muitos ambientes, sítios específicos podem não conter o organismo que possui as enzimas necessárias; c) a substância deve estar acessível ao organismo que contém estas enzimas. Muitas vezes, a persistência se deve ao fato do micro-organismo não ter acesso ao composto que ele tem capacidade de metabolizar (VAN ELSAS & SMALLA, 1997).

Durante muitos anos, a metodologia empregada no estudo desses micro-organismos era baseada em técnicas de cultivo e isolamento (HEAD *et al.*, 1998). Dessa forma, apenas uma pequena parcela desses organismos era estudada. Um exemplo é

o domínio Bactéria que são descritas de 3 a 4 mil espécies que compõem apenas 10% do total de espécies estimadas (COLEMAN *et al.*, 1994). A esse respeito, o progresso das metodologias aplicadas é determinante para o estudo da diversidade e de novas funções ecológicas contidas nesses ecossistemas (KOZDRÓJ & VAN ELSAS, 2001).

A utilização de métodos moleculares, através da análise por indicadores moleculares (por exemplo, DNA, RNA e fosfolípidios) extraídos diretamente do solo, é eficiente para superar as limitações das técnicas convencionais de cultivo (VAN ELSAS *et al.*, 1998).

Portanto, tais técnicas permitem um conhecimento mais aprofundado dos grupos microbianos presentes, após a seleção imposta por condições extremas, como a presença de substâncias poluentes e de suas formas distintas de tratamento. Do ponto de vista técnico, esses métodos são viáveis porque são rápidos e sensíveis para identificar e monitorar a população microbiana presente e atuante no processo de biorremediação (CUNHA 2004; WATANABE & HAMAMURA, 2003).

## 1.5 | Biorreatores

A maior parte dos processos de biorremediação se depara com problemas como a heterogeneidade do contaminante no solo, assim como a incorporação homogênea de aditivos e oxigênio. A utilização de biorreatores é capaz de sanar tais limitações, favorecendo, principalmente, o tratamento de solos argilosos que possuem uma maior dificuldade de percolação intrínseca.

Dentre as vantagens associadas a essa tecnologia estão o controle maior das condições do tratamento (pH, temperatura, teor de umidade, etc.), assim como das emissões de gases e efluentes gerados no processo. Outro fator muito importante é a homogeneização controlada (agitação contínua ou descontínua) possibilitando, também, o controle da degradação do óleo no solo de forma mais representativa. A característica de ser um sistema fechado oferece maior segurança física e ambiental. E por fim, o tempo de tratamento para a descontaminação do solo, em geral, é menor comparado a outros métodos biológicos. O tempo de tratamento de biorremediação está diretamente relacionado ao custo, onde este se situa entre U\$30,00 e U\$85,00 por tonelada de solo tratado (ALEF & NANNIERI, 1995; RIZZO, 2008).

## 2 | OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do níquel na degradação do óleo cru durante o processo de biorremediação de um solo multicontaminado, assim como avaliar seus efeitos nos perfis das comunidades microbianas dominantes deste solo sob os diferentes parâmetros estudados.

Objetivos específicos:

1. Avaliar, em microcosmos, as influências dos parâmetros (óleo, metal e umidade), utilizando uma análise fatorial completa;
2. Avaliar os perfis das comunidades microbianas dominantes do solo nos diferentes tratamentos em microcosmos, utilizando uma técnica de “*fingerprinting*” (DGGE);
3. Aplicar a condição do processo, definida como mais apropriada em microcosmo, em biorreator semipiloto, para verificar a eficiência da ampliação de escala.

### 3 | METODOLOGIA

#### 3.1 | Solo

O solo utilizado nos experimentos foi coletado na região Nordeste do Brasil, próximo a uma área de exploração de petróleo. Esse solo (aproximadamente 235 kg), após secagem, foi submetido à desagregação em um britador de mandíbulas e classificado em uma peneira de 4 malhas *Tyler* (4,699 mm), para separar folhas, galhos e raízes e, em seguida, foi feita a homogeneização cônica e quarteamento da amostra.

As características físico-químicas do solo estão apresentadas na Tabela 1. Através dos dados de fertilidade obtidos, foram realizados cálculos para certificar se haveria a necessidade da adição de nutrientes para manter uma relação de C:N:P de 100:10:0,39, conforme estudos realizados por Rizzo *et al.*, 2008. Com os teores apresentados, não foi necessário a incorporação de fonte de nitrogênio e fósforo ao solo.



**Tabela 1.** Características físico-químicas e de fertilidade do solo usado nos experimentos.

Propriedades Físico-Químicas							
pH				6,0			
Densidade Bulk (g/mL)				0,96			
Densidade de Partícula (g/mL)				1,86			
Porosidade (%)				48			
CRA (%)				42			
Fertilidade							
Na	Ca	Mg	K	H <sup>+</sup> Al	Al	S	T
-----Cmol/dm <sup>3</sup> -----							
0,066	24	7,7	0,02	9,2	0	31,79	40,99
V		m		n		C. org	
----- % -----							
78		0		0		6	
P			K			N	
----- mg/L -----						----- % -----	
10			8			1,4	

Fonte: adaptado de Telhado, 2009.

### 3.2 | Óleo

A fim de simular uma situação real de contaminação foi utilizado o óleo cru da mesma região onde o solo foi coletado. Na Tabela 2 encontram-se os percentuais das frações de compostos saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos do óleo cru utilizado.

**Tabela 2.** Percentual de saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos - SARA (%) do óleo cru.

SARA (%)	
Saturados	55,00
Aromáticos	20,46
Resinas + Asfaltenos	24,52

### 3.3 | Ensaios em microcosmos

Realizou-se uma análise fatorial completa (*Design Expert – Stat Easy®*) para verificar, estatisticamente, a influência da presença do níquel na degradação do óleo. Para tal, três fatores em dois níveis ( $2^3$ ) foram considerados. São eles:

a) concentração de óleo – foi usada a concentração mínima de 0,5% (p/p) de óleo cru, por ser este o valor de intervenção de acordo com a Lista Holandesa (CETESB, 2005), e 5% (p/p) de óleo cru, como concentração máxima por representar um nível de contaminação alto;

b) concentração de Níquel (Ni) – o metal escolhido para a análise da influência se destaca por ser um elemento constituinte do óleo utilizado, porém em baixa concentração, além de estar presente nos catalisadores de refino do petróleo, os quais acabam sendo incorporados aos resíduos oleosos em áreas de produção e refino. Seguindo a mesma razão do óleo, o nível mínimo do Ni usado foi de 130 mg/kg, já o ponto máximo foi de 260 mg/kg por ser o dobro da concentração de intervenção industrial, de acordo com a resolução nº 420 do CONAMA (2009). Como foi levada em consideração a alta toxidez no Ni,

não se usou uma concentração muito elevada em relação ao nível mínimo para podermos alcançar respostas mais próximas a realidade;

c) Umidade – o teor de umidade foi escolhido como um dos parâmetros de análise por ser um fator muito importante não só para a atividade biológica do solo, mas como um fator compactador do solo, que poderia prejudicar o revolvimento do mesmo no processo de biorremediação em biorreatores. Os níveis escolhidos foram baseados no trabalho de Rizzo 2008 que levou em consideração os melhores valores referentes à capacidade de retenção de água do solo (CRA) para um bom desempenho do biorreator. Portanto, fixaram-se os valores de 45 e 70% da CRA deste solo.

Não houve necessidade de ajuste das condições nutricionais , uma vez que os teores de nitrogênio e fósforo já eram suficientes para manter uma relação de C:N:P de 100:10:0,39 nos sistemas com alta concentração de óleo.

A Tabela 3 apresenta a relação dos experimentos com os parâmetros e níveis definidos, além da simbologia que será considerada ao longo deste trabalho. A análise temporal ocorreu durante 67 dias, tendo 4 pontos de coleta (7, 15, 36, 67 dias) totalizando 76 ensaios.

Como parâmetro resposta foi usado o percentual de remoção dos hidrocarbonetos totais de petróleo (HTPs) gerado nos ensaios.

Aerações forçadas com ar comprimido (20 L/min) foram feitas nos sistemas reacionais, além da reposição de água por diferença de peso e homogeneização com bastão de vidro de 3 em 3 dias, durante os 67 dias de experimento.

**Tabela 3.** Esquema dos tratamentos gerados pelo planejamento de dados com suas simbologias.

	Óleo (%p/p)	Níquel (mg/kg)	Umidade (% da CRA)	Simbologia
1	0,5	130	45	oleo-ni-agua
2	5	130	45	OLEO-ni-agua
3	0,5	260	45	oleo-NI-agua
4	5	260	45	OLEO-NI-agua
5	0,5	130	70	oleo-ni-AGUA
6	5	130	70	OLEO-ni-AGUA
7	0,5	260	70	oleo-NI-AGUA
8	5	260	70	OLEO-NI-AGUA
9	2,75	190	57,5	Ponto Central

Para confirmar que os resultados obtidos com os fatores estudados são referentes à atividade biológica do solo, foi realizado um sistema similar ao descrito acima, contendo o solo utilizado, autoclavado 5 vezes com adição periódica ( a cada semana) de uma solução biocida (azida de sódio 1%) para garantir a inatividade biológica desse solo.

Para a avaliação das alterações das comunidades microbianas do solo por biologia molecular, foram feitos alguns controles onde só foi colocado o solo com óleo na concentração de 5% e o solo com níquel na concentração de 260 mg/kg, além do ajuste da umidade que são as condições estabelecidas para a realização dos ensaios no biorretor de bancada. Os sistemas foram mantidos como anteriormente descritos, porém por apenas um período de 29 dias.

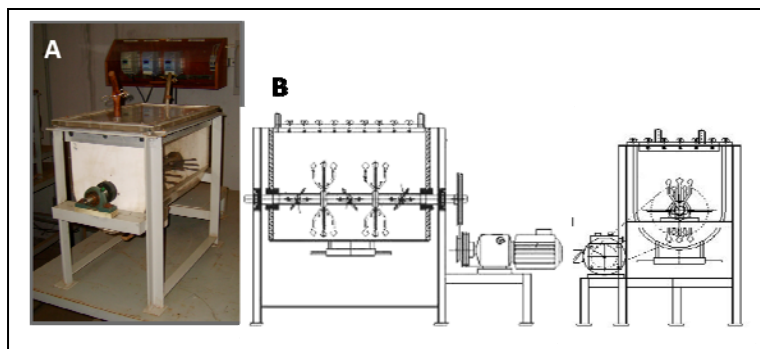
Todos os sistemas foram mantidos sob temperatura interna do laboratório (23-26°C), não sofrendo influência de grandes variações de temperatura e de luz solar direta, porém possíveis efeitos foram avaliados através dos controles abióticos.

### 3.4 | Ensaio em biorreator

Vários tipos de biorreatores podem ser usados no tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, entre eles os de fase semi-sólida e sólida, horizontais ou verticais, com tabor fixo ou rotativo, sendo o de fase sólida o mais indicado para tratamento de solo com alto teor de partículas finas (RIZZO *et al.*, 2010).

A Figura 3 mostra a configuração do biorreator utilizado nos experimentos. O projeto, a execução e os testes de eficiência foram realizados na tese de doutorado desenvolvida por Rizzo (2008), que testou e padronizou as melhores condições de aeração e agitação.

As condições usadas neste experimento foram de uma contaminação de 5% (p/p) de óleo, 260 mg/kg de Ni e 70% da CRA. A operação consistiu de agitação 2 vezes ao dia por 15 min a 4 rpm, sendo a aeração realizada por 1 hora a uma vazão de 20 L/min. O biorreator teve um período total de operação de 29 dias. Foram retiradas amostras a cada semana para quantificação dos HTPs residuais do solo, além da quantificação dos micro-organismos heterotróficos totais e degradadores.



**Figura 3.** Biorreator usado nos experimentos: (A) foto e (B) esquema do biorreator com visão frontal e lateral.

### **3.5 | Análises da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo**

As análises foram feitas através do Infracal (modelo HART-T da *Wilks Enterprise*), que é um equipamento portátil capaz de quantificar óleos e graxas totais / HTP por espectrofotometria de infravermelho.

A quantificação de HTP do solo foi feita após extração do óleo com solvente orgânico (n-hexano PA padrão HPLC), segundo metodologia descrita por Telhado (2009). Neste trabalho foi usado o mesmo solo e óleo submetidos a diferentes métodos de análises (Cromatografia gasosa, Óleos e graxas – método gravimétrico e infravermelho). Dentre essas análises, o infravermelho utilizando o Infracal se mostrou mais preciso que o método gravimétrico e bem próximo ao cromatográfico, indicando ser uma técnica rápida e barata, e melhor opção para análise.

### 3.6 | Análises microbiológicas

Como a maior parte da degradação de poluentes orgânicos está sob responsabilidade direta da atividade microbiana do ambiente impactado e visto que o tempo de geração dos micro-organismos é alto, sua diversidade nos diferentes momentos e condições normalmente apontam alterações associadas às condições impostas. Levando tal aspecto em consideração, foram realizados métodos de análises microbiológicas com o objetivo de monitorar os bioprocessos que ocorrem durante a biorremediação. As análises usadas foram contagem de micro-organismos heterotróficos totais e degradadores e análise do perfil da comunidade microbiana por DGGE.

#### 3.6.1 | Contagem de heterotróficas totais

A quantificação de micro-organismos heterotróficos totais foi realizada conforme Trindade (2002).

#### 3.6.2 | Contagem de micro-organismos degradadores de óleo cru

A quantificação dos micro-organismos degradadores de óleo cru foi realizada empregando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP) descrita por Ururahy (1998) e Brown & Bradock (1990).

#### 3.6.3 | Análise por biologia molecular

##### **Extração do DNA da comunidade bacteriana total no solo**

O DNA total da comunidade presente no solo foi extraído a partir de amostra de solo utilizando o kit Powersoil™ DNA Kit

(MoBio Laboratories, USA) e seguindo as especificações do fabricante. O DNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose para avaliar a integridade do DNA e sua pureza através de espectrofotometria em NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

### **PCR-DGGE**

De modo a obter perfis da comunidade bacteriana total,  $\alpha$ -,  $\gamma$ -proteobacteria, actinobacteria (HEUER et al., 1997; GOMES et al., 2001; MUHLING et al., 2008) as amostras foram amplificadas por PCR, usando os iniciadores apresentados na Tabela 4. As reações foram realizadas em aparelho GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Todas as misturas de reação utilizadas (volume total de 50  $\mu$ l) continham tampão 1x Taq Platinum Buffer (Invitrogen), 200  $\mu$ M de cada deoxinucleosídeo trifosfato, 400 nM de cada iniciador, 0,05U Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen),  $\approx$ 20 ng de DNA molde. Com uma alíquota de 5  $\mu$ L dos amplicons foi feita uma corrida de eletroforese em gel de agarose para avaliar a especificidade e rendimento da reação. Como todas as reações resultaram em produtos de mesma intensidade no gel de agarose, 5  $\mu$ L de cada amplicon foi então usado em corrida de DGGE.

As análises de DGGE foram realizadas em aparato PhorU2 system (Ingeny International, Goes, The Netherlands) de acordo com instruções do fabricante. Foram utilizados gradientes de 45–60% de desnaturantes (uréia/formamida) (100% de desnaturantes corresponde a uma solução 8M de ureia e 40% (V/V) de formamida), temperatura do tampão de 60°C e corrida a 110V por 18 h. O gel foi posteriormente corado por coloração de prata (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).



**Tabela 4.** Iniciadores utilizados nas reações de PCR-DGGE, programas e variações no preparo das reações.

Iniciador	Alvo	Referência	Conjunto de iniciadores	Programa termociclador/ variações no preparo das reações
R1378	16S rRNA bacteriano	HEUER <i>et al.</i> , 1997	F203/R1378	94 °C 5 min; 30 ciclos: 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min; 72 °C 10 min 3,75 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,25 µL formamida
F203α	16S das α-proteobactérias	GOMES <i>et al.</i> 2001		
Gamma395f	16S das γ-proteobactérias	MÜHLING <i>et al.</i> , 2008	Gamma395f/R1378	96 °C 4 min; 30 ciclos: 96 °C 1 min, 54 °C 1 min, 74 °C 1 min; 74 °C 10 min 2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
F243	16S de actinobactérias	HEUER <i>et al.</i> , 1997	F243/R1378	94 °C 4 min; 30 ciclos: 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min; 72 °C 10 min 3,75 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,25 µL formamida
F984GC	16S rRNA bacteriano	HEUER <i>et al.</i> , 1997	F984GC/R1378**	94 °C 4 min; 30 ciclos: 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 2 min; 72 °C 10 min 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,25 µL formamida
gc.				

As imagens dos géis de DGGE foram digitalizadas em HP Scanjet G4050 e foram analisadas através do software Bionumerics (Applied Maths, Bélgica) para gerar perfis densitométricos.

O processamento de dados gerados a partir dos géis de DGGE foi realizado através da comparação dos perfis de bandas das diferentes amostras. Em Ecologia Microbiana, estudam-se, principalmente, diferenças espaciais e temporais de amostras ambientais, assim como entre diferentes condições abióticas.

Essas análises podem ser feitas através de construção de matrizes que possibilitam o estudo estatístico dos perfis (FRANCO, CUNHA & ROSADO 2006).

### 3.7 | Tratamento estatístico dos dados

Para realizar testes multivariados nos dados de contagens microbiológicas e DGGE utilizou-se o software Past (HAMMER *et al.*, 2001). As análises de coordenadas principais (PCoA) foram realizadas baseando-se em matrizes de similaridade construídas pelo método de Bray-Curtis, assim como para fazer análise de agrupamento, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA), com os valores das contagens microbiológicas em relação a cada tempo analisado. Análises de similaridade (ANOSIM) foram realizadas usando 999 permutações para avaliar a significância das diferenças nas comunidades (CLARKE, 1993).

## 4 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 | Ensaio em microcosmos

#### 4.1.1 | Remoção do óleo

As análises de quantificação, por espectrofotometria por infravermelho dos níveis de HTP dos diferentes sistemas de tratamento foram realizadas e convertidas em porcentagem de remoção com o objetivo de melhor expressar os resultados experimentais (Tabela 5).

Foram obtidos valores nulos de remoção para o controle abiótico para todos os tratamentos em todos os tempos analisados. Portanto, podemos considerar que todas as variações obtidas pelos sistemas são de origem biológica.

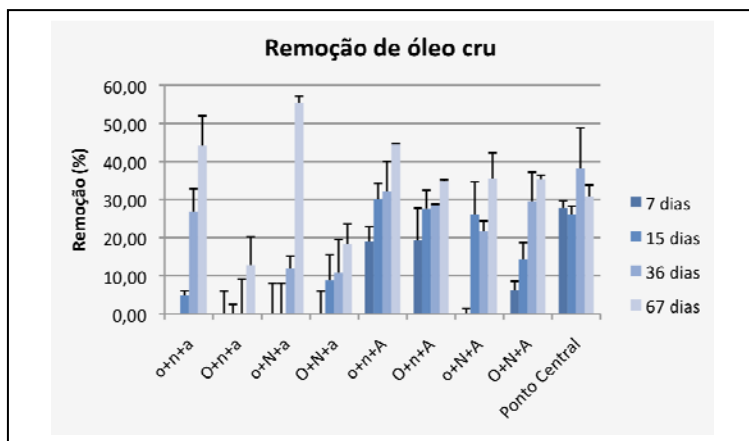
As variações no percentual de remoção para os diferentes tratamentos ao longo do tempo podem ser melhor visualizadas através do gráfico em barras (Figura 4). Foi possível verificar que nos experimentos com nível de umidade mínimo, valores percentuais de remoção significativos ocorreram apenas após o décimo quinto dia. Já nos frascos com umidade máxima, os valores de remoção atingiram até 30% neste mesmo tempo, mostrando que a água foi um fator de grande influência positiva nos sistemas, neste tempo.

Apesar de parecer óbvio o efeito positivo da umidade na atividade microbiana, é importante a definição de um ponto mínimo de umidade necessário para a obtenção de bons níveis de degradação e para um bom funcionamento dos biorreatores, cujo desempenho é prejudicado com o uso de solos muito úmidos.

**Tabela 5.** Valores de remoção do óleo cru nos sistemas gerados a partir da análise fatorial.

CONCENTRAÇÕES INICIAIS	Téorico		Real	
	0,5% = 5 mg/g 2,75% = 27,5 mg/g 5% = 50 mg/g		0,5% = 5,06 mg/g 2,75% = 28,46 mg/g 5% = 50,63 mg/g	
EXPERIMENTO	7 dias		15 dias	
	Óleo no solo (mg/g)	Remoção (%)	Óleo no solo (mg/g)	Remoção (%)
óleo - ni - água	5,87 ±0,00	0,00	4,82 ±0,07	4,76
ÓLEO - ni - água	55,91 ±3,03	0,00	52,34 ±1,21	0,00
óleo - NI - água	5,58 ±0,40	0,00	5,63 ±0,40	0,00
ÓLEO - NI - água	56,20 ±3,03	0,00	46,20 ±3,43	8,75
óleo - ni - ÁGUA	4,10 ±0,20	18,88	3,53 ±0,20	30,17
ÓLEO - ni - ÁGUA	40,77 ±4,24	19,47	36,63 ±2,42	27,65
óleo - NI - ÁGUA	5,06 ±0,07	0,00	4,06 ±0,44	25,94
ÓLEO - NI - ÁGUA	47,49 ±1,21	6,21	43,34 ±2,22	14,39
Ponto Central	22,27 ±3,03	27,87	20,41 ±1,30	25,86
EXPERIMENTO	36 dias		67 dias	
	Óleo no solo (mg/g)	Remoção (%)	Óleo no solo (mg/g)	Remoção (%)
óleo - ni - água	3,70 ±0,30	26,88	2,83 ±0,40	44,04
ÓLEO - ni - água	51,06 ±4,65	0,00	44,20 ±3,84	12,70
óleo - NI - água	4,46 ±0,17	11,82	2,26 ±0,09	55,33
ÓLEO - NI - água	45,20 ±4,44	10,72	41,34 ±2,63	18,34
óleo - ni - ÁGUA	3,44 ±0,40	32,05	2,80 ±0,00	44,66
ÓLEO - ni - ÁGUA	36,06 ±0,00	28,78	33,06 ±0,20	34,71
óleo - NI - ÁGUA	3,87 ±0,13	21,70	3,02 ±0,34	35,57
ÓLEO - NI - ÁGUA	35,63 ±3,84	29,63	32,77 ±0,61	35,27
Ponto Central	18,55 ±2,70	38,16	20,32 ±1,24	30,78

**Nota:** Pela simbologia, óleo = 0,5% p/p; ÓLEO = 5% p/p; ni = 130 mg/kg; NI = 260 mg/kg; água = 45% da CRA; ÁGUA = 70% da CRA



**Figura 4.** Gráfico da remoção percentual do óleo nos diferentes sistemas de tratamento ao longo de 67 dias, onde pela simbologia, o= 0,5% p/p; O= 5% p/p; n= 130 mg/kg; N= 260 mg/kg; a= 45% da CRA; A= 70% da CRA.

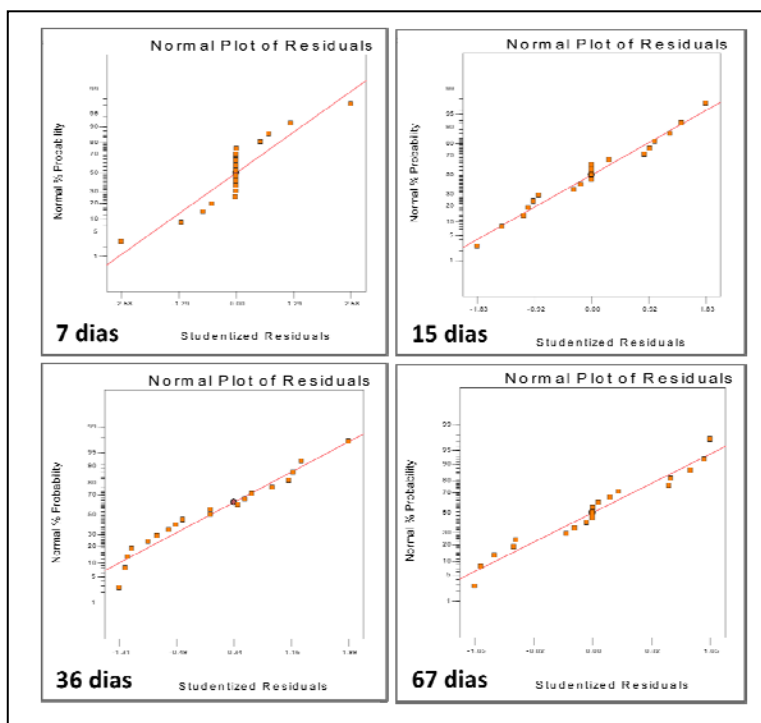
Os resultados obtidos com o ponto central mostram que o nível de umidade foi o suficiente para que o perfil de degradação fosse muito similar aos experimentos de alta umidade. Com isto obtivemos dois fatores favoráveis para o manejo da umidade nesse processo. O primeiro é que o tipo de solo permite o uso do teor de água de 70% da CRA sem que ocorra a sua compactação e conseqüente travamento do motor do biorreator. O outro aspecto é que, pelos resultados obtidos, a umidade requerida para uma remoção quase em seu nível máximo, através dos parâmetros estudados, encontra-se próxima ao valor de 58% da CRA (ponto central). Unidos estes dois fatos, oferecem uma ampla margem de trabalho, em relação ao teor de umidade a ser utilizado no biorreator.

#### 4.1.2 | Análise fatorial completa (AFC)

Conforme descrito na metodologia, os experimentos foram montados seguindo uma análise fatorial completa gerada pelo software *Design Expert (Stat Easy®)*, resultando em oito experimentos em duplicata mais três repetições do ponto central. Usando como variável resposta a porcentagem de remoção, foi possível obter uma análise para cada tempo estudado.

Os gráficos da normal *versus* resíduos nos diferentes tempos estão apresentados na Figura 5. É possível verificar que a distribuição dos pontos (em laranja) em relação ao modelo gerado (linha rosa) configuram uma distribuição normal, portanto podemos levar em consideração os resultados gerados a partir de cálculo de probabilidade.

A relação com os resultados das significâncias dos modelos e das curvaturas para cada tempo estudado estão descritas na Tabela 6. Entretanto, no sétimo dia de tratamento, a análise do diagnóstico estatístico verificou que tanto o modelo quanto a curvatura eram significativos ( $p < 0.05$ ), o que permite a análise das influências geradas pelo modelo, porém sem avaliação dos valores intermediários nos diferentes níveis estudados. Para isso seria necessário utilizar uma análise por mistura de superfície.



**Figura 5.** Gráficos da normal *versus* resíduo das análises nos diferentes tempos.

**Tabela 6.** Relação da significância dos modelos e das curvaturas para todos os tempos estudados.

Tempo	Modelo	Curvatura
7 dias	S	S
15 dias	S	S
36 dias	S	S
67 dias	S	NS

S= valores significativos; NS= valores não significativos

No modelo apresentado na Tabela 7, o valor de R-quadrado foi 0,9171, mostrando um bom ajuste dos dados. Levando em consideração o cálculo de  $\text{Prob} > F$ , os parâmetros com a influência significativa foram o metal, a umidade e a interação entre estes (valores absolutos maiores que o desvio padrão). Neste tempo, a umidade foi o parâmetro de maior influência, sendo este positivo, enquanto o metal mostrou influência negativa. Já o óleo não apresentou influência significativa, mostrando que em 7 dias, independente da concentração, não houve mudança na porcentagem de remoção do mesmo.

Outro trabalho (AMOR KENNES & VEIGA, 2001) estudou a influência de metais pesados (zinco, níquel e cádmio) na biodegradação do tolueno e obteve como resultado que o níquel foi o metal com maior influência negativa, seguido do cádmio e por último o zinco.

A única interação significativa entre 2 parâmetros foi entre o metal e a umidade, podendo estar relacionado ao fato de que o metal na presença de umidade se encontra em uma forma mais disponível, aumentando assim sua toxidez aos micro-organismos degradadores.

**Tabela 7.** Modelo gerado, desvio padrão e o R-quadrado para o tempo de 7 dias.

Modelo – 7 dias		
Desvio Padrão	R-quadrado	R-quadrado ajustado
3,25	0,9171	0,8526

$$\text{Remoção do óleo (\%)} = +5,57 + 0,85 * \text{Óleo} - 4,01 * \text{Metal} + 5,57 * \text{Umidade} + 0,70 * \text{Óleo} * \text{Metal} + 0,85 * \text{Óleo} * \text{Umidade} - 4,01 * \text{Metal} * \text{Umidade} + 0,70 * \text{Óleo} * \text{Metal} * \text{Umidade}$$



Igualmente ao resultado obtido no tempo de 7 dias, foi possível obter um modelo e também uma curvatura significativa (Tabela 6). Para o modelo gerado para 15 dias também obteve-se um valor de R-quadrado em torno de 0,91 (Tabela 8). No entanto, levando em consideração a significância dos parâmetros no modelo, o único parâmetro com influência significativa foi a umidade, sendo bastante positiva.

Neste tempo de 15 dias, o metal já não apresentou influência negativa, assim como o óleo e a interação de dois e três fatores. Isto pode ter relação com as características do solo usado. No trabalho de Maliszewska-Kordybach & Smreczak (2003), que estudou a influência de metais pesados (zinco, chumbo e cádmio) e HPAs nas comunidades microbianas de diferentes culturas de plantas (trigo, aveia, milho, feijão, girassol e tomate), foi mostrado que o efeito dos dois tipos de contaminantes juntos sempre possuem um impacto inicial negativo, porém a capacidade de desenvolvimento das plantas e o grau de impacto nas comunidades microbianas está intimamente relacionado com as características do solo.

**Tabela 8.** Modelo gerado, desvio padrão e o R-quadrado para o tempo de 15 dias.

Modelo – 15 dias		
Desvio Padrão	R-quadrado	R-Quadrado ajustado
4,71	0,9079	08434

$$\text{Remoção do óleo (\%)} = +13,96 - 1,26 * \text{Óleo} - 1,69 * \text{Metal} + 10,58 * \text{Umidade} + 0,56 * \text{Óleo} * \text{Metal} - 2,26 * \text{Óleo} * \text{Umidade} - 2,69 * \text{Metal} * \text{Umidade} - 2,82 * \text{Óleo} * \text{Metal} * \text{Umidade}$$

Em 36 dias, podemos observar que o modelo e a curvatura foram significativos (Tabela 6), da mesma forma que nas análises anteriores. No entanto, o valor de R-quadrado obtido pelo modelo foi de 0,7832 (Tabela 9).

A umidade é um fator conhecidamente positivo aos processos de biodegradação de compostos orgânicos que geralmente envolve reações de hidrólise; além disso, quase todas as reações enzimáticas das células ocorrem em meio aquoso. Portanto, este parâmetro, quando oferecido de forma limitada, gera um atraso nas reações de biodegradação. No entanto, quando há a presença de metais em níveis tóxicos no ambiente, uma elevada oferta de umidade pode acarretar uma maior biodisponibilidade desses elementos e, conseqüentemente, aumento da toxicidade dos mesmos. Neste trabalho, em que encontramos os dois tipos de contaminantes juntos, a umidade teve uma influência positiva mostrando que as vantagens oferecidas à comunidade hidrocarbonoclástica é maior do que o aumento da biodisponibilidade do metal (DERMONT *et al.*, 2008).

**Tabela 9.** Modelo gerado, desvio padrão e o R-quadrado para o tempo de 36 dias.

Modelo – 36 dias		
Desvio Padrão	R-quadrado	R-quadrado
6,70	0,7832	0,6315

$$\begin{aligned} \text{Remoção do óleo (\%)} = & +20,55 - 2,56 \cdot \text{Óleo} - 2,08 \cdot \text{Metal} + 7,49 \cdot \text{Umidade} \\ & + 4,27 \cdot \text{Óleo} \cdot \text{Metal} + 3,73 \cdot \text{Óleo} \cdot \text{Umidade} - 0,29 \cdot \text{Metal} \cdot \text{Umidade} - \\ & 1,47 \cdot \text{Óleo} \cdot \text{Metal} \cdot \text{Umidade} \end{aligned}$$

Em 67 dias o modelo se apresentou de forma significativa, porém a curvatura foi não significativa (Tabela 6), o que nos

permite avaliar, além dos níveis estudados, toda a faixa de estudo, incluindo os valores intermediários.

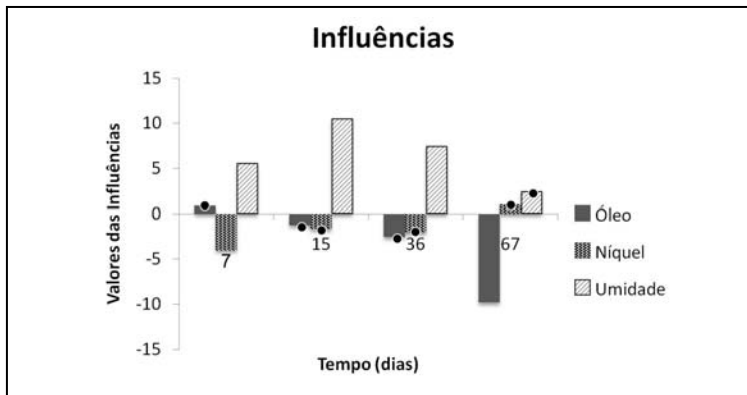
O modelo gerado em 67 dias (Tabela 10), mostrou um valor de R-quadrado de 0,9207, sendo o óleo o único parâmetro significativo com influência negativa. Já a interação do óleo com a umidade foi significativa e positiva. A influência negativa se deve, provavelmente, ao efeito tóxico do óleo cru sobre as comunidades microbianas do solo, principalmente com teor de água baixo, o que limita a atividade microbiana. Quanto maior a concentração do óleo, maior o impacto nestas comunidades, mesmo que esteja apenas relacionado à perda de abundância desses indivíduos.

**Tabela 10.** Modelo gerado, desvio padrão e o R-quadrado para o tempo de 67 dias.

Modelo – 67 dias		
Desvio Padrão	R-quadrado	R-quadrado
4,85	0,9207	0,8651
$\text{Remoção do óleo (\%)} = +35,08 - 9,82 \cdot \text{Óleo} + 1,05 \cdot \text{Metal} + 2,48 \cdot \text{Umidade} \\ + 0,50 \cdot \text{Óleo} \cdot \text{Metal} + 7,26 \cdot \text{Óleo} \cdot \text{Umidade} - 3,18 \cdot \text{Metal} \cdot \text{Umidade} \\ + 1,91 \cdot \text{Óleo} \cdot \text{Metal} \cdot \text{Umidade}$		

Após as análises individuais de cada tempo de coleta, foi possível unir os dados dos modelos e, levando em consideração os valores das influências, gerou-se um gráfico comparando os valores de influência de cada parâmetro em todos os tempos estudados (Figura 6). Foi possível verificar que a umidade mostrou influência positiva ao longo de todo o estudo e que o metal apresentou influência negativa no início do tratamento, confirmando uma adaptação rápida dos micro-organismos presentes. Já o óleo apresentou uma influência significativa e negativa mais tardia (67 dias). Isso pode ser devido à

composição do óleo cru, que é uma mistura complexa de substâncias e que muitas vezes seus produtos de degradação geram compostos ainda mais tóxicos, forçando a comunidade degradadora a se adaptar e se modificar constantemente a essa gama de substâncias (MAILA & CLOETE, 2005).



**Figura 6.** Gráfico com os valores das influências dos parâmetros avaliados em relação aos tempos de coleta. As esferas pretas marcam valores de influência não significativos.

#### 4.1.3 | Análises microbiológicas

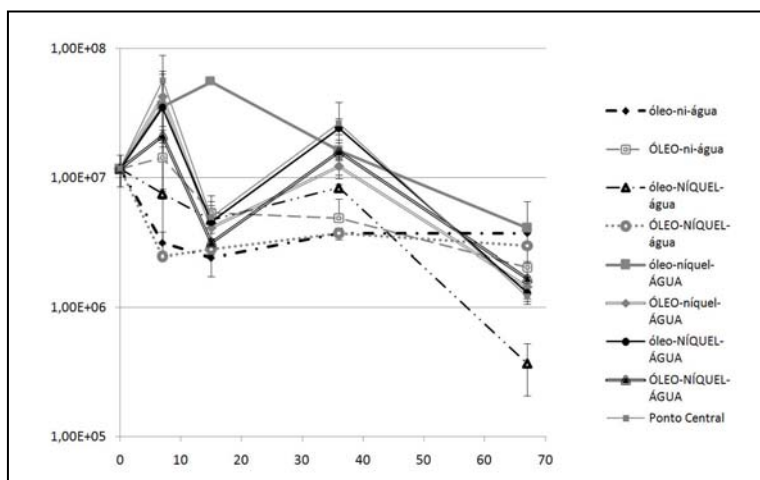
Através das análises microbiológicas foi possível quantificar os micro-organismos heterotróficos totais e degradadores de óleo cru cultiváveis e estudar as alterações nos perfis das comunidades bacterianas dominantes do solo independentes de cultivo.

#### Contagem de heterotróficas totais

Os valores de contagem dos micro-organismos heterotróficos totais estão apresentados na Figura 7. É possível verificar valores com ordens de grandeza muito parecidas entre si,

sendo assim, difícil de visualizar diferenças significativas entre os experimentos.

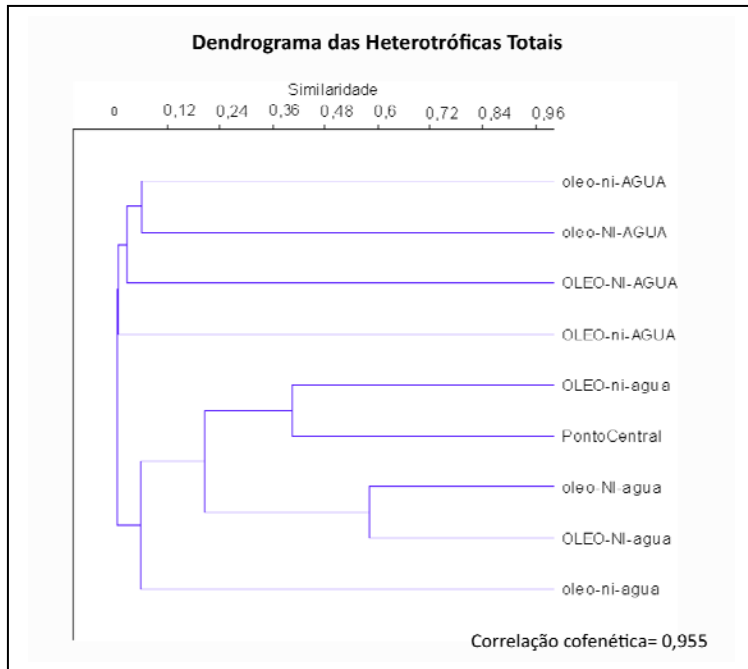
Em 15 dias, o tratamento que apresentou maior contagem em relação aos demais foi o que continha quantidade mínima dos poluentes e teor máximo de água, possivelmente devido à maior velocidade de adaptação desses micro-organismos sob menores concentrações de contaminantes e alto teor de umidade.



Nota: Onde pela simbologia óleo = 0,5% p/p; ÓLEO = 5%p/p; ni = 130mg/kg; NI = 260mg/kg; água = 45% da CRA; ÁGUA = 70% da CRA.

**Figura 7.** Gráfico da contagem de heretrófitos totais (UFCs/g de solo) dos experimentos em relação aos tempos de coleta.

O resultado gerado pela construção do dendrograma (Figura 8) mostrou melhor a separação dos dois grandes grupos pelo teor de umidade. A correlação cofenética, que neste caso foi de 0,955, significa que a análise de grupamento apresenta uma correlação com os dados originais representativa.



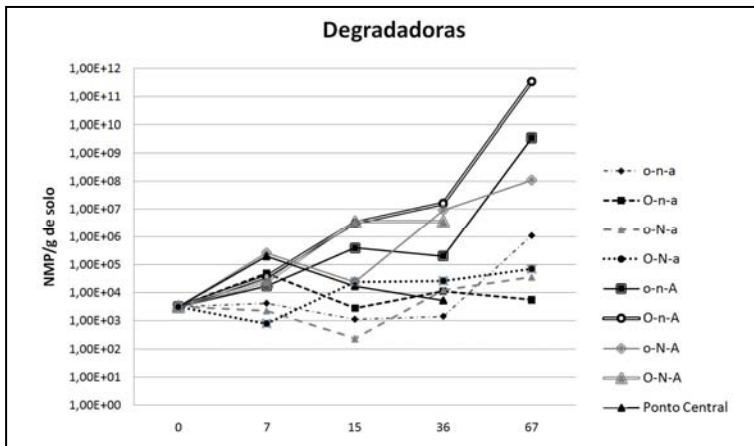
Nota: pela simbologia, óleo = 0,5% p/p; ÓLEO = 5% p/p; ni = 130 mg/kg; NI = 260 mg/kg; água = 45% da CRA; ÁGUA = 70% da CRA

**Figura 8.** Dendrograma gerado a partir da matriz com os valores obtidos nas contagens das heterotróficas totais para cada tempo de coleta.

### Contagem de micro-organismos degradadores de óleo cru

Os valores de contagem de bactérias degradadoras nos diferentes tempos estão apresentados na Figura 9. Esta análise teve como objetivo avaliar o perfil dos micro-organismos hidrocarbonoclasticos capazes de usar o óleo como fonte de carbono nos diferentes tratamentos. Como igualmente visto para os micro-organismos heterotróficos totais, a umidade foi o fator que mais diferenciou os tratamentos. Para o tratamento con-

tendo o ponto central, especificamente, após o sétimo dia, houve uma semelhança com os perfis dos tratamentos com menor umidade.

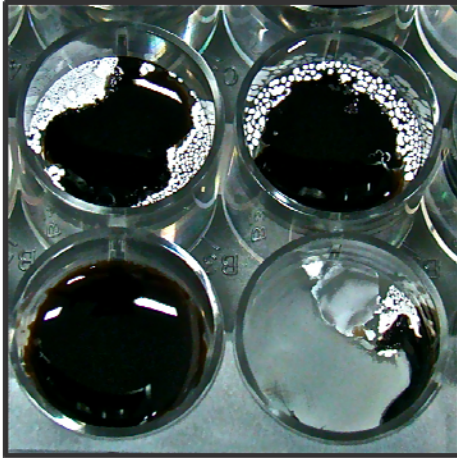


Nota: pela simbologia, óleo= 0,5% p/p; ÓLEO= 5% p/p; ni= 130 mg/kg; NI= 260 mg/kg; água= 45% da CRA; ÁGUA= 70% da CRA.

**Figura 9.** Gráfico com a contagem de bactérias degradadoras de óleo cru (NMP/g de solo) dos tratamentos em relação aos tempos de coleta.

Para alguns tratamentos, principalmente nos tempos finais, as contagens não foram possíveis de serem realizadas, pois havia a presença de micro-organismos (Actinobacterias) que interferiam na avaliação da técnica de NMP (Figura 10). No trabalho realizado por Telhado (2009), utilizando este mesmo solo e óleo, foi observada, também, a presença dessas Actinobacterias nas contagens de degradadores, sendo estas identificadas por sequenciamento do gene que codifica o rRNA 16S como 9 diferentes Actinobacterias, sendo de 2 gêneros diferentes (*Amycolatopsis* e *Arthrobacter*) e 1 classificado como actinobacteria não cultivada, mostrando sua prevalência e alta capacidade de adaptação ao meio. Portanto, para que os resultados

não fossem superestimados, não foi realizada a contagem nestes tempos.

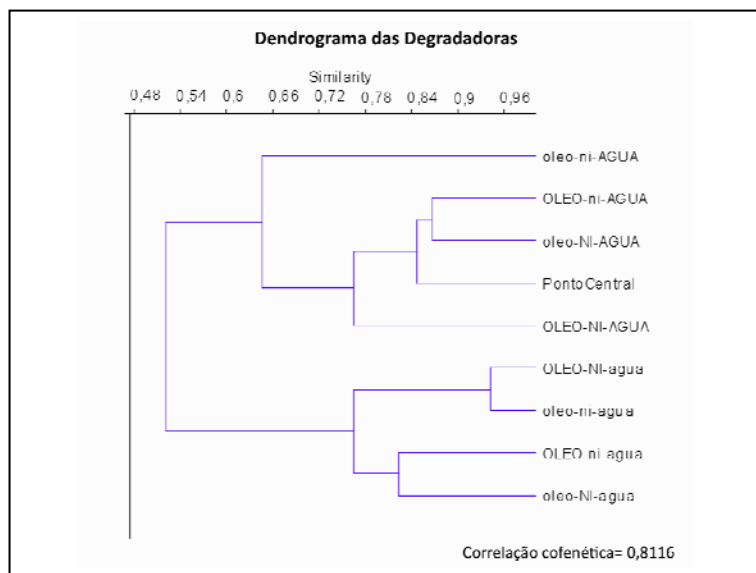


**Figura 10.** Fotografia da ocorrência de Actinobacterias predominantes em 4 poços das placas de contagem por NMP dos degradadores de óleo cru. Presença de colônias brancas e foscas) o qual impossibilitou a contagem de alguns pontos de coleta.

O resultado gerado pela construção do dendrograma (Figura 11) mostrou mais uma vez a separação em dois grandes grupos pelo teor de umidade, assim como ocorrido com as heterotróficas totais. A correlação cofenética, que neste caso foi de 0,8116, significa que a análise de grupamento também apresenta uma correlação com os dados originais representativa.

Usando esses métodos como monitoramento da atividade biológica, os resultados foram pouco discriminatórios em relação aos diferentes tratamentos, tendo apenas a umidade como um fator de influência direta e principal.





Nota: pela simbologia, óleo= 0,5% p/p; ÓLEO= 5% p/p; ni= 130 mg/kg; Ni= 260 mg/kg; água= 45% da CRA; ÁGUA= 70% da CRA.

**Figura 11.** Dendrograma gerado a partir da matriz com os valores achados nas quantificações de degradadoras por NMP/g de solo para cada tempo de coleta.

## Métodos moleculares

### a) Extração de DNA

Com o objetivo de avaliar e identificar o possível efeito do níquel na estrutura de comunidade bacteriana do solo em questão, foram escolhidos alguns dos tratamentos para serem submetidos às análises moleculares. Foram estudados diferentes níveis de óleo, níquel e umidade para avaliar o processo de biorremediação. Para fazer uma avaliação molecular da influência do níquel foram escolhidos os tratamentos com seus diferentes níveis, sendo o óleo fixado na concentração máxima

de 5% (p/p) e a umidade em seu nível máximo, para o aproveitamento da sua influência positiva no processo.

Paralelamente, foram realizados ensaios-controles, um deles contendo apenas óleo (5% p/p) e o outro apenas níquel (260 mg/kg), ambos com o nível máximo de umidade, para que fossem observadas as alterações isoladamente. A Tabela 11 mostra o conjunto de amostras usadas nas análises moleculares, assim como suas codificações para facilitar a avaliação dos resultados obtidos. Todas essas amostras foram analisadas em três tempos de coleta (7, 15 e 30 dias) e realizadas em triplicata.

As amostras obtidas através da extração de DNA geraram bandas visíveis e únicas no gel de agarose. Já a análise de quantificação através do *Nanodrop*® ND-1000 UV-VIS (Thermo Scientific) mostrou baixo teor de impurezas para todas as amostras, isto é, a relação de absorbância de 260 nm/280 nm atingiu valores próximos a 1,8, o que significa um baixo teor de proteínas presentes.

**Tabela 11.** Codificação das amostras usadas para as análises moleculares.

Codificação	Óleo	Níquel
ÓLEO - ni	5%	130mg/kg
ÓLEO - NI	5%	260mg/kg
ÓLEO	5%	-
NI	-	260mg/kg
Todas as amostras continham 75% da CRA do solo		

## b) PCR-DGGE

Os perfis de bandas gerados usando os iniciadores para gene que codifica o rDNA 16S se mostram muito parecidos entre si, além de apresentarem muitos ribotipos em cada amostra. Por-

tanto, não foi possível visualizar diferenças claras entre os diferentes tratamentos.

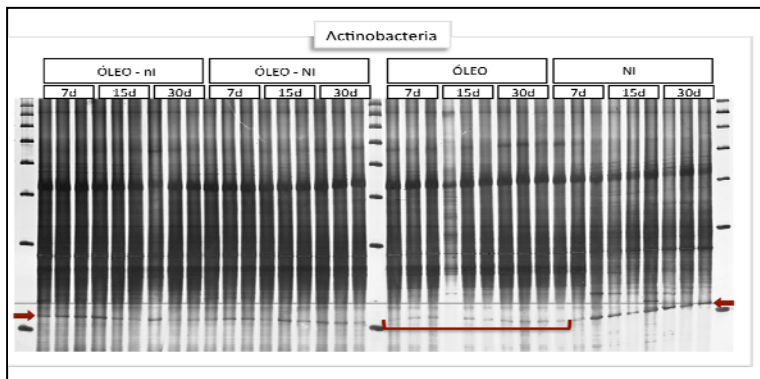
O gel gerado pelo uso dos iniciadores que codificam o gene rDNA 16S de Actinobacteria apresentou as mesmas características observadas para o Domínio Bactéria, porém, foi possível verificar o comportamento peculiar de uma banda nas diferentes amostras, indicada pela seta na Figura 12. A intensidade desta banda é maior nos tratamentos contendo níquel em relação ao tratamento contendo somente óleo. Tal aspecto pode estar relacionado com a possível capacidade de adaptação desse ribotipo à presença do metal.

O comportamento dos perfis de bandas gerados para o gel de  $\alpha$ -proteobacteria foi bem parecido com o obtido para o domínio Bactéria. Apesar de ter uma riqueza de ribotipos, também não foi possível visualizar diferenças entre os distintos tratamentos.

Os perfis obtidos para o grupo das  $\gamma$ -proteobacterias (Figura 13) também se mostraram ricos em ribotipos, porém com diferenças visíveis entre os tratamentos. O sistema contendo apenas níquel se mostrou diferente dos demais e, comparado ao sistema contendo óleo (5%) e níquel (260 mg/kg), apresentou diferenças principalmente no que diz respeito à intensidade das bandas (marcação em linha contínua).

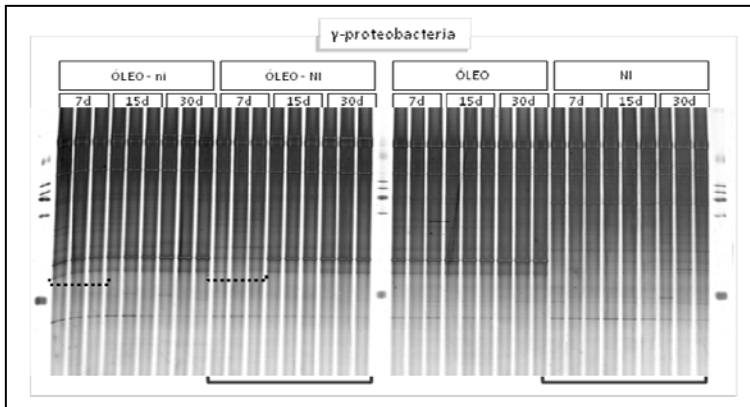
A diferença de intensidade das bandas entre as amostras com diferentes concentrações de níquel (130 mg/kg e 260 mg/kg) na presença de óleo (5%p/p), no tempo de 7 dias, estão marcadas com linha tracejada. Essa alteração foi a que mais se relacionou com os resultados obtidos de remoção do óleo cru. A diminuição da intensidade das bandas nos tratamentos com o nível máximo de níquel nesse período em relação ao nível

mínimo pode estar relacionada ao atraso ocorrido na degradação do óleo.



Nota: Os valores seguidos da letra d (de dias) são referentes aos tempos de coleta. As setas em vermelho apontam a linha de bandas que foram influenciadas, em sua intensidade, pela presença do níquel.

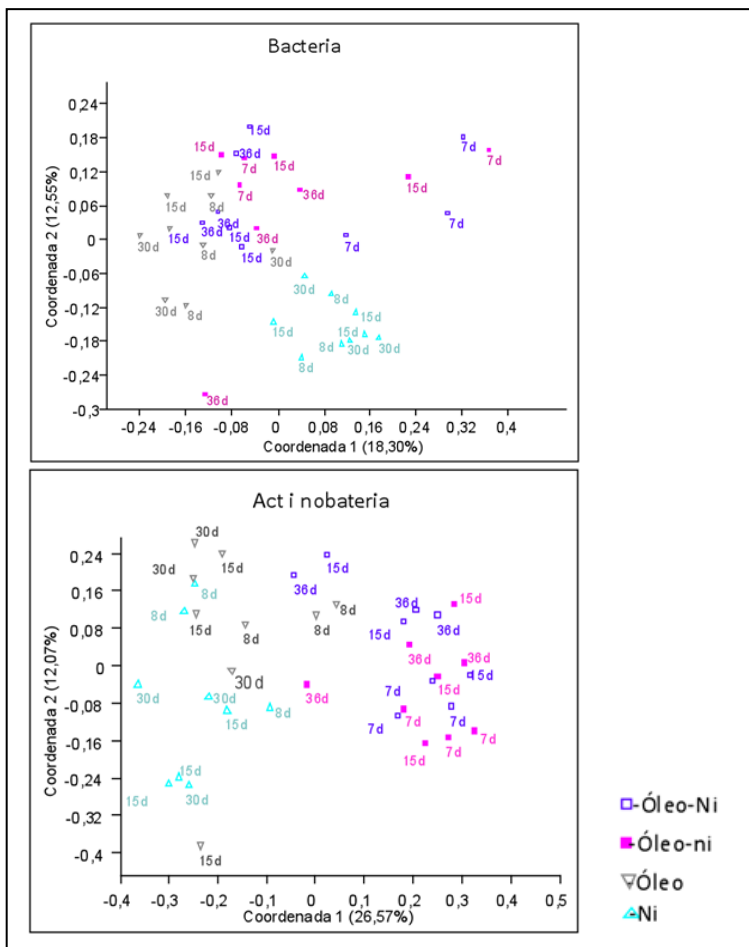
**Figura 12.** Imagem do gel de DGGE para o 16S do filo Actinobacteria. ÓLEO = 5% de óleo; NI = 260 mg/kg; ni = 130 mg/kg.



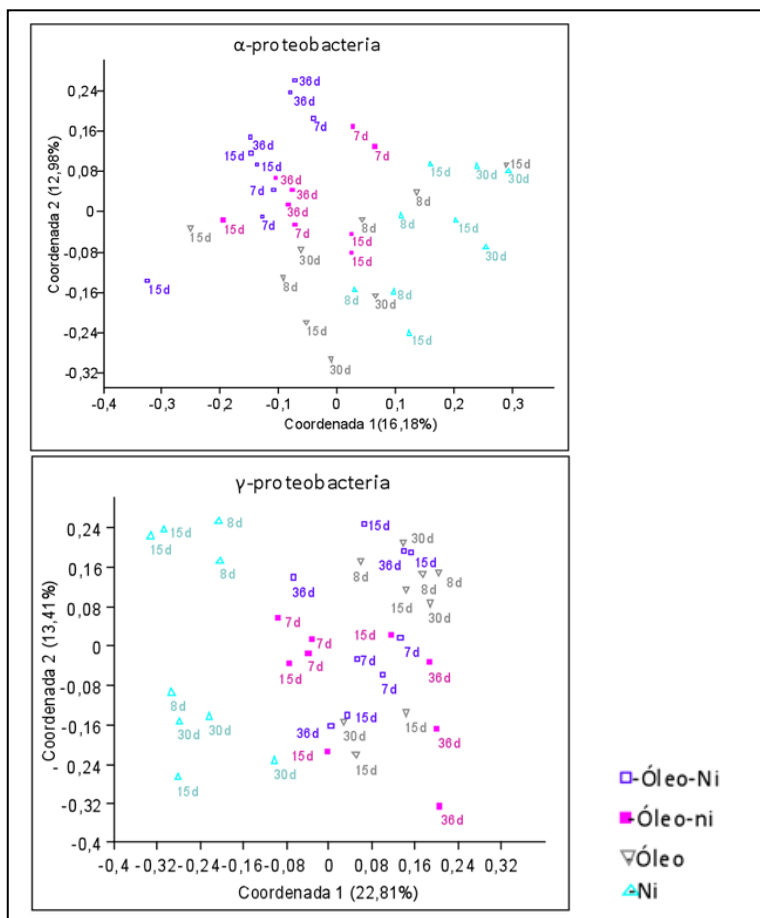
Nota: Os valores seguidos da letra d (de dias) são referentes aos tempos de coleta. As indicações em vermelho mostram as diferenças nos grupos de bandas dos tratamentos com baixo e alto teor de Ni. Em verde, as diferenças entre os tratamentos com 260 mg/kg de Ni na presença e na ausência de óleo (5% p/p).

**Figura 13.** Imagem do gel de DGGE para o 16S da classe  $\gamma$ -proteobacteria. ÓLEO = 5% de óleo; NI = 260 mg/kg; ni = 130 mg/kg.

Para uma análise mais robusta dos perfis gerados foi feito para cada marcador, por matriz de similaridade (coeficiente de Bray-Curtis), um gráfico de PCoA mostrado na Figura 14. Esses gráficos mostram a dispersão espacial das amostras e cada cor refere-se a cada tratamento (ÓLEO-ni, ÓLEO-NI, ÓLEO e NI). A observação mais clara para todos os marcadores avaliados foi a separação do tratamento NI (concentração de níquel alta) do restante das amostras, portanto quando havia a presença do óleo nas amostras, estas se alteravam para um perfil mais similar entre si, o que demonstra que o óleo foi o parâmetro de maior influência na estrutura da comunidade bacteriana neste estudo.



**Figura 14.** Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de DGGE obtidos dos experimentos em microcosmos. PCoA obtido a partir de matriz de similaridade calculada pelo método de *Bray-Curtis*.



**Figura 14 (continuação).** Análise de coordenadas principais (PCoA) dos perfis de DGGE obtidos dos experimentos em microcosmos. PCoA obtido a partir de matriz de similaridade calculada pelo método de *Bray-Curtis*.

Os gráficos representam as comunidades bacteriana total, de actinobacterias,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -proteobacterias conforme indicado acima dos gráficos. Os tratamentos estão separados por cores e formas conforme indicado na legenda. Valores próximos aos pontos representam o tempo de tratamento.

No trabalho de Evans e colaboradores (2004), usando a mesma técnica de DGGE, foi possível visualizar alterações nas comunidades microbianas provocadas pelo contaminante orgânico (óleo cru) e também pela adição de nutrientes (compostos inorgânicos como fósforo, potássio, cálcio e magnésio) para a aplicação da técnica do bioestímulo.

Analisando as amostras com os dois diferentes níveis de multi-contaminação com níquel em relação a amostras apenas contaminadas com óleo, foi possível verificar a similaridade entre elas, demonstrando que apenas a presença do níquel no solo contaminado por óleo, independentemente de sua concentração, é capaz de gerar a alteração.

As  $\gamma$ -proteobacterias se mostraram mais sensíveis às alterações provocadas pelos contaminantes, o que foi possível observar através da comparação entre os tratamentos Óleo-ni e Óleo-Ni no tempo de 7 dias. Estes se destacaram na parte central do gráfico em relação às outras amostras e entre si. Estes resultados se relacionam com os obtidos com a degradação do óleo nesse período, que mostra um atraso pelo alto teor de níquel no sistema.

Popp e colaboradores (2006) encontraram uma grande participação das  $\gamma$ -proteobactérias na biodegradação de hidrocarbonetos durante processo de biorremediação, descrevendo que nessa classe se encontram vários grupos de micro-organismos



degradadores, entre eles *Pseudomonas* e *Arthrobacter*, sendo então de grande destaque nos estudos de biorremediação.

O trabalho realizado por Gomes e colaboradores (2008) avaliou a estrutura da comunidade microbiana de sedimentos de mangue eutrofizado, com diferentes níveis de contaminação por hidrocarbonetos, em diferentes locais da Baía de Guanabara. A análise da estrutura da comunidade bacteriana total não foi capaz de discriminar as amostras com diferentes níveis de contaminação. Porém, usando marcadores moleculares para Actinobacteria e Proteobactéria, houve aumento da resolução dessas alterações calculadas por teste de permutação, mostrando a significância das diferenças entre os diferentes locais estudados.

Eles justificaram esse fato usando o cálculo do índice de *Shannon* que revelou uma alta diversidade microbiana, o que diminuiria a parcela de micro-organismos afetados pelos contaminantes e que a alteração obtida pode ter ocorrido por perda de abundância. É importante ressaltar que o grupo das *Pseudomonas* foi o que mais se associou com as contaminações por hidrocarbonetos.

A alta diversidade microbiana no ambiente está associada a múltiplas funções, o que acarreta em uma maior estabilidade do ambiente na presença de contaminantes (HOOPER *et al.*, 2005), essa estabilidade pode ser observada nos experimentos deste trabalho pela baixa diferenciação dos grupos na análises de PCoA, mesmo essas diferenças sendo significativas.

As análises de similaridades feitas pelo teste ANOSIM utilizam o método *Bray-curtis*, que se baseia em uma matriz de similaridade para comparar as diferentes condições de tratamento testadas. Na Tabela 12 estão apresentados os valores de R que diferenciam os tratamentos. Portanto, quanto menor o valor de R, mais parecidos

são os tratamentos. Os valores entre parênteses referem-se ao valor de  $p$  que, quando menor que 0,05, conferem significância estatística na diferenciação dos tratamentos.

**Tabela 12.** Análises de similaridade (ANOSIM) dos perfis de DGGE entre os diferentes tratamentos.

<b>Bacteria</b>			
	Óleo-ni	Óleo-Ni	Ni
Óleo-ni	0		
Óleo-Ni	0,1101* (0,0476)**	0	
Ni	0,4571 (<0,00001)	0,4628 (0,0001)	0
Óleo	0,2932 (0,0002)	0,1638 (0,0087)	0,7356 (<0,0001)
<b>Actinobacteria</b>			
	Óleo-ni	Óleo-Ni	Ni
Óleo-ni	0		
Óleo-Ni	<b>0,0823 (0,1438)</b>	0	
Ni	0,8114 (<0,00001)	0,7922 (<0,00001)	0
Óleo	0,583 (<0,00001)	0,4472 (0,0005)	0,2545 (0,0044)
<b><math>\alpha</math>-proteobacteria</b>			
	Óleo-ni	Óleo-Ni	Ni
Óleo-ni	0		
Óleo-Ni	0,2191 (0,0055)	0	
Ni	0,4247 (0,0001)	0,7178 (<0,0001)	0
Óleo	0,2179 (0,0026)	0,41840 (0,00001)	0,3416 (0,001)
<b><math>\gamma</math>-proteobacteria</b>			
	Óleo-ni	Óleo-Ni	Ni
Óleo-ni	0		
Óleo-Ni	0,2383 (0,0100)	0	
Ni	0,6187 (<0,00001)	0,7771 (<0,00001)	0
Óleo	0,3573 (<0,00001)	0,3824 (0,0004)	0,9057 (<0,00001)

Valores em negrito indicam correlações não significativas entre as matrizes (>0,05).

\*- Valores representam os valores de R observados.

\*\* - Valores entre parênteses representam os valores de  $p$  observados.

Em relação aos resultados obtidos, apenas a relação entre os tratamentos Óleo-Ni e Óleo-ni de Actinobacteria obtiveram diferenças não significativas, sendo, portanto, consideradas iguais. Por outro lado, o tratamento Ni se destacou em todos os marcadores moleculares por ser o que obteve os maiores valores de R, e portanto o que mais se diferenciou do restante.

Levando tais resultados em consideração, é possível concluir que o óleo foi o fator de maior influência na alteração das comunidades bacterianas avaliadas.

Para a avaliação da similaridade entre os diferentes marcadores moleculares utilizou-se o teste de Mantel (Tabela 13). Este utiliza a matriz de *Bray-curtis*, porém o valor de R dado reflete o grau de similaridade (quanto maior o valor de R, maior a similaridade). Os valores entre parênteses mostram o valor de *p*, sendo que apenas os valores em negrito foram significativos.

Conforme o teste de Mantel, o comportamento das  $\gamma$ -proteobactérias foi significativamente parecido com o comportamento das Actinobactérias e das bactérias.

**Tabela 13.** Teste de Mantel para os diferentes marcadores utilizados no DGGE.

	<b>Actinobacteria</b>	<b><math>\alpha</math>-proteobacteria</b>	<b>Bactéria</b>
Actinobacteria			
$\alpha$ -proteobacteria	0,107* (0,119)**		
Bactéria	-0,289 (0,515)	-0,095 (0,830)	
$\gamma$ -proteobacteria	<b>0,183 (0,021)</b>	0,084 (0,176)	<b>0,266 (0,014)</b>

Valores em negrito indicam correlações significativas entre as matrizes.

#- Matrizes de similaridade obtidas por Bray-Curtis.

\*- Valores representam os valores de R observados.

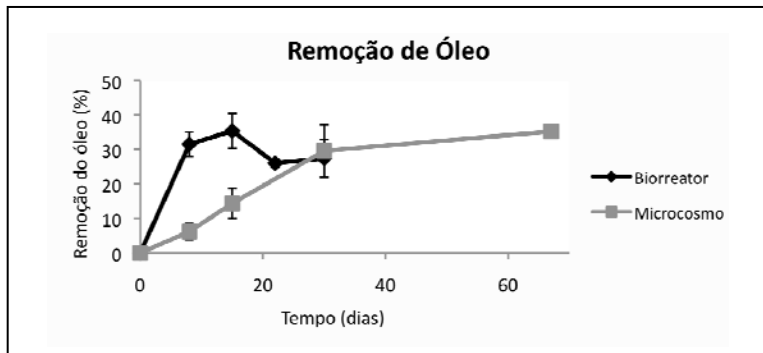
\*\* - Valores entre parênteses representam os valores de *p* observados.

## 4.2 | Ensaio em biorreator

Para a avaliação em escala ampliada do processo de biodegradação do óleo cru na presença de níquel, foi selecionada a condição com os níveis altos estudados (5% óleo e 260 mg/kg do metal) e o melhor teor de umidade obtido na etapa anterior (70% da CRA).

### 4.2.1 | Remoção do óleo

A Figura 15 apresenta o gráfico do percentual de remoção de óleo entre as duas diferentes escalas testadas (microcosmos e biorreator de bancada), sendo importante ressaltar que os microcosmos foram mantidos com um controle maior da temperatura, em torno de 25°C, e o biorreator foi mantido em temperatura ambiente em torno de 40°C (período do verão).



**Figura 15.** Gráfico com as porcentagens de degradação obtidas.

Foi possível observar a eficiência da ampliação de escala, onde há um aumento da remoção de óleo nos 20 primeiros dias, mostrando uma aceleração inicial no processo de biodegradação. As diferentes temperaturas utilizadas também podem ter uma relação direta com as diferenças de remoção observadas

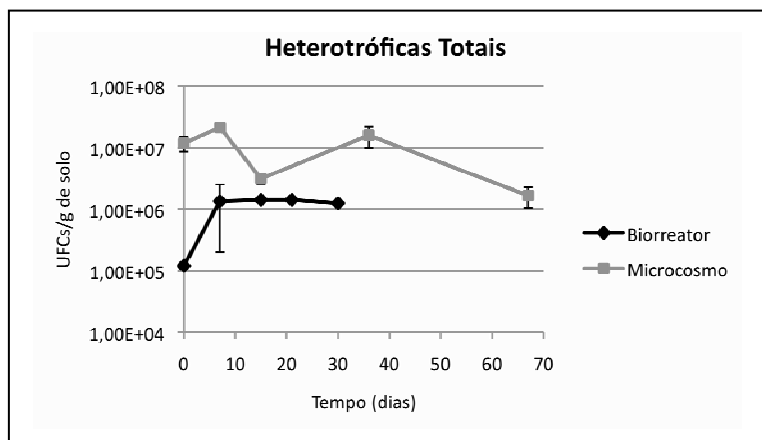
entre o ensaio em microcosmo e no biorreator. Ao final de 30 dias, o percentual de remoção foi muito próximo nos dois sistemas (em torno de 35% de remoção do óleo cru), sugerindo que a ampliação de escala se mostrou eficiente na biodegradação do óleo cru.

No trabalho desenvolvido por Rizzo e colaboradores (2010), que utilizou os mesmos biorreatores deste trabalho, observou-se, de forma clara, o efeito negativo do aumento da umidade pela formação de aglomerados do solo que, por sua vez, tinha característica argilosa. Isto agravava o problema, e o nível máximo de umidade utilizado neste caso foi de 60% da CRA. Já no presente estudo, o valor máximo de umidade que não interferia operacionalmente no biorreator foi de 70% da CRA. Isso pode ter relação com o aumento da eficiência de remoção.

#### 4.2.2 | Análises microbiológicas

##### **Contagem de heterotróficas totais**

Com relação às contagens de micro-organismos, houve, no biorreator, um aumento inicial do número de bactérias heterotróficas totais (de  $1,21 \times 10^5$  para  $1,35 \times 10^6$  UFC/g de solo) que depois se manteve estável, em contraste com os valores obtidos no microcosmo, que oscilou entre  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^7$  UFC/g de solo (Figura 16).

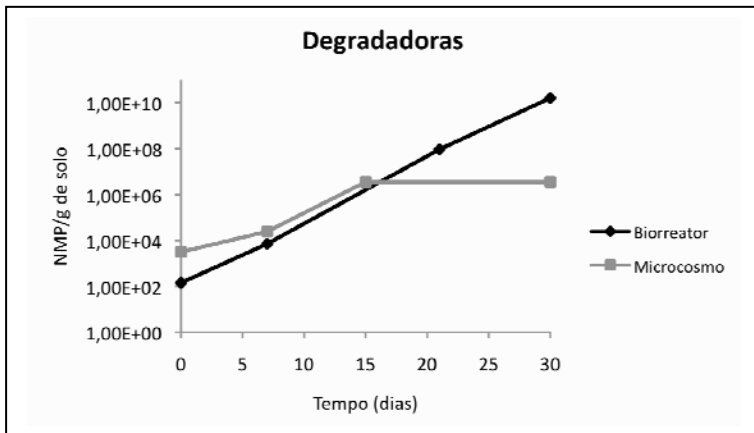


**Figura 16.** Gráfico com as contagens de heterotróficas totais obtidas no biorreator e nos microcosmos.

### Contagem de micro-organismos degradadores de óleo cru

Os micro-organismos degradadores de óleo cru tiveram um comportamento semelhante até os 15 primeiros dias de ensaio e, com a continuidade do ensaio, o microcosmo se manteve estável e o biorreator continuou aumentando a densidade populacional dos referidos micro-organismos (Figura 17).

Os resultados de contagens de micro-organismos heterotróficos totais obtidos para o biorreator não refletiram os eventos de degradação ocorridos, mostrando a não eficácia eventual das técnicas dependentes de cultivo que avaliam uma parcela muito pequena dos micro-organismos do solo.



**Figura 17.** Gráfico comparando as contagens de degradadoras de óleo cru obtidas no biorreator em comparação às obtidas nos microcosmos.

### 4.3 | Considerações gerais

No trabalho de Rizzo e colaboradores (2010), que usou o mesmo biorreator com mesmo tipo de solo, concentração de óleo e regime de operação, foram alcançados níveis de degradação de óleo cru de, aproximadamente, 20 e 35% na melhor condição testada (incluindo bioestímulo com ureia e adição de material estruturante) para o ensaio em microcosmo e biorreator, respectivamente. Neste trabalho também observamos uma melhora no processo de biorremediação, porém essa melhora ocorreu em um aumento da velocidade de remoção do óleo.

No estudo de Alisi e colaboradores (2009) foi desenvolvida uma técnica de bioaumento utilizando micro-organismos hidrocarbonoclasticos selecionados pela resistência a metais pesados (chumbo, zinco, cobre, níquel, cobalto, cromo e cádmio), e obteve-se uma eficiência de remoção de 100% para vários

compostos orgânicos presentes no diesel (C12 a C20 e fenantreno). Muito dessa capacidade de resistência está associada a estruturas celulares que anulam a toxidez do metal, seja por imobilização na superfície da célula ou no meio extracelular através da síntese de moléculas como os polissacarídeos, por exemplo (WANG *et al.*, 2009).

A compreensão da interação dos contaminantes com o ambiente é imprescindível para uma boa avaliação risco. Quanto maior o número de contaminantes envolvidos, maior a complexidade dessas interações e mais difícil se torna a construção da avaliação de risco, assim como a aplicação de um tratamento de descontaminação.

O petróleo, por si só, já é formado por um grupo muito grande de substâncias que, em sua maior parte, são tóxicas e recalcitrantes no ambiente. O principal tipo são as substâncias orgânicas, porém as substâncias inorgânicas também estão presentes, sendo que os metais pesados são os que oferecem maior risco ao meio ambiente. Esses metais não são degradados nem destruídos e vão se acumulando e ampliando o seu efeito deletério aos processos biológicos do ambiente.

No caso de multicontaminação por petróleo e metais, as formas físico-químicas do metal são diretamente afetadas, o que acarreta na necessidade de remoção, primeiramente, dos compostos orgânicos para posterior tratamento de remoção do metal.

Ainda há necessidade do desenvolvimento de estudos não só para o maior entendimento das interações dos contaminantes com o ambiente, mas também o desenvolvimento de estratégias que minimizem esses efeitos tóxicos à atividade biológica que é necessária em sua integral complexidade para a manutenção do equilíbrio biológico no solo.



## 5 | CONCLUSÃO

Unindo todas as informações geradas neste trabalho, foi possível concluir que:

- A umidade foi o fator de maior significância nos primeiros 30 dias de tratamento, onde ocorrem os maiores valores de remoção de óleo;
- O níquel provocou um atraso na degradação dos hidrocarbonetos nos ensaios em microcosmos, nos primeiros 7 dias de tratamento;
- As características do solo utilizado, assim como sua diversidade microbiana, foram capazes de favorecer uma rápida adaptabilidade dos micro-organismos à presença do níquel, atingindo em 30 dias de tratamentos, valores de remoção similares entre as diferentes concentrações do metal testadas;
- As contagens microbiológicas, por métodos dependentes de cultivo, não foram capazes de discriminar os tratamentos tendo os contaminantes usados como parâmetro;
- As análises microbiológicas independentes de cultivo foram capazes de discriminar os tratamentos usados.
- A sobreposição dos tratamentos na análise de PCoA teve relação com a influência do óleo na estrutura da comunidade microbiana;
- Foram obtidos níveis de remoção de óleo de aproximadamente 30%, tanto em microcosmo em 15 dias, quanto em biorreator em 7 dias, levando em consi-

deração uma multicontaminação de 5% p/p de óleo cru acrescido de 260 mg/kg de níquel;

- O estudo em microcosmo foi representativo para posterior ampliação de escala, gerando valores de remoção similares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEF, K. & NANNIPIERI, P. 1995. (Eds.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. San Diego: Academic. 101-102.
- ALEXANDER, M. 1994. *Biodegradation and bioremediation*. (San Diego, Academic Press Inc.).
- ALISI, C., MUSELLA, R., TASSO, F., UBALDI, C., MANZO, S., CREMISINI, C. & SPROCATI, A. R. 2009. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of the Total Environment*. 407: 3024–3032.
- AL-SALEH, E. & OBUEKWE, C. 2005. Inhibition of hydrocarbon bioremediation by lead in a crude oil-contaminated soil. U.S. Patent 1. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56:1-7.
- AMOR, L.; KENNES, C. & VEIGA, M.C. 2001. Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals. *Bioresource Technology*, 78: 181-185.
- ATLAS, R. M. 1991. Microbial hydrocarbon degradation - bioremediation of oil-spills. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 52:149-156.
- BROWN, E; BRADOCK, J. 1990. Sheen Screen, a most probable number method for enumeration of oil degrading microorganism. *Applied Environmental Microbiology* 56: 3865-3896.
- CETESB. Manual de gerenciamento de águas contaminadas, seção 6530. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas\\_contaminadas/anexos/download/6530.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/anexos/download/6530.pdf)> Acesso em 29 de jun.2010.
- CHANDER, K. & BROOKES, P.C. 1991. Is the hydrogenase assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper-contaminated soils?. *Soil Biology and Biochemistry* 23, 909–915.

- CLARKE, K.R. 1993. Nonparametric Multivariate Analyses of Changes in Community Structure. *Australian Journal of Ecology* 18: 117-143.
- COLEMAN, D.C., DIGHTON, J., RITZ, K. & GILLER, K.E. 1994. Perspectives on the compositional and functional analysis of soil communities. In: RITZ, K., DIGHTON, J., GILLER, K.E. (Eds), *Beyond the biomass*. Wiley-Sayce, New York, 261-271.
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 420, de 28 de dezembro de 2009.
- CORRÊA, O.L.S. 2003. *Petróleo: noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia*. Rio de Janeiro: Ed. Interciência.
- COYNE, M.S. 1999. *Soil microbiology – exploratory approach*. London: Delman.
- CUNHA, C.D. 2004. *Avaliação de diferentes tecnologias de biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente*. 176p. Tese (Doutorado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil).
- DERMONT, G., BERGERON, M., MERCIER, G. & RICHER-LAFLÈCHE, M. 2008. Metal-contaminated soils: remediation practices and treatment technologies. *Practice periodical of hazardous, toxic, and radioactive waste management*, v.12, p.188-209.
- EVANS, F.F., SELDIN, L., SEBASTIAN, G.V., KJELLEBERG, S., HOLMSTRON, C. & ROSANDO, A.S. 2004. Influence of petroleum contamination and bioestimulation treatment on the diversity of *Pseudomonas* spp., in soil microcosms as evaluated by 16S rRNA based PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 93-98,.
- FRANCO, N.O., CUNHA, C.D. & ROSADO, A.S. 2006. Métodos moleculares para análise de comunidades microbianas em ambientes aquáticos: II. DGGE. *Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia*. 35(3): 67-71.

- GALVEZ-CLOUTIER, R. & DUBE, J. S. 2002. "Impact of residual NAPL on water flow and heavy metal transfer in a multimodal grain size soil under saturation conditions: Implications for contaminant mobility." ASTM Special Technical Publication, West Conshohocken, Pa. 126–137.
- GOMES, N.C.M., BORGES, L.R., PARANHOS R., PINTO, F.N., MENDONÇA-HAGLER, L.C.S. & SMALLA, K. 2008. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. *FEMS Microbiology Ecology*. 66(1):96 – 109.
- GOMES, N.C.M., HEUER, H., SCHONFELD, J., COSTA, R., MENDONÇA-HAGLER, L. & SMALLA, K. 2001. Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient gel electrophoresis. *Plant Soil* 232:167-80.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T. & RYAN, P.D. 2001. Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 9.
- HEAD, L.M., SAUNDERS, J.R. & PICKUP, R.W. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial ecology*. 35: 1-21.
- HEUER, H. KRSEK, M., BAKER, P., SMALLA, K. & WELLINGTON, E.M.H. 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of gene encoding 16S rDNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradient. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3233-41.
- HILL, E. C. 1984. Biodegradation of petroleum products. in: Atlas, R. M. *Petroleum microbiology*. (McMillan Publishing Co, New York) 579-612.
- HOOPER, D. U., CHAPIN, F. S., EWEL, J. J., HECTOR, A., INCHAUSTI, P., LAVOREL, S., LAWTON, J. H., LODGE, M D., LOREAU, M., NAEEM, S., SCHMID, B., SETÄLÄ, H., SYMSTAD, A. J., VANDERMEER, J. & WARDLE, D. A. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs*. 75(1):3-35.

- IRHA N., SLET, J. & PETERSELL, V.. 2003. Effect of heavy metals and PAH on soil assessed via dehydrogenase assay. U.S. Patent 8. Environment international 28:779-82.
- KELLY, J.J. & TATE, R.L., 1998. Use of BIOLOG for the analysis of microbial communities from zinc contaminated soils. Journal of Environmental Quality 27, 600–608.
- KELLY, J.J., HAGGBLOM, M. & TATE, R.L. 1999. Effects of the land application of sewage sludge on soil heavy metal concentrations and soil microbial communities. Soil Biology and Biochemistry 31, 1467–1470.
- KNOX, E.G. & GILMAN, E.A. 1997. Hazard proximities of childhood cancers in Great Britain from 1953–80. Journal of Epidemiology Community. H. 51, 151–159.
- KORDA, A., SANTAS, P., TENENTE, A. & SANTAS, R. 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: Sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. Applied Microbiology and Biotechnology. 48:677-686.
- KOZDRÓJ, J. & VAN ELSAS, J.D. 2001. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. Journal of Microbiological Methods. 43: 197-212.
- MAILA M., & CLOETE, T. 2005. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants—perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. U.S. Patent 1. International Biodeterioration & Biodegradation 55:1-8.
- MALISZEWSKA-KORDYBACH B. & SMRECZAK, B.. 2003. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. U.S. Patent 8. Environment international 28:719-28.
- MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. 2002. Microbiologia e bioquímica do solo. Editora: UFLA. Lavras.

- MUHLING, M., WOOLVEN-ALLEN, J., MURRELL, J.C. & JOINT, I. 2008. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J* 2: 379-392.
- NADAL, M., SCHUHMACHER, M. & DOMINGO, J.L. 2007. Levels of metal, PCBs, PCNs and PAHs in soil of a highly industrialized chemical/petrochemical area: Temporal trend. *Chemosphere*, v.66, p.267-276.
- NASCIMENTO, A.R., ARARUNA, J. & ZIOLLI, R.L. 2003. Otimização e avaliação do desempenho de um método de determinação de TPH (Total Petroleum Hydrocarbons) em areia por detecção no infravermelho. In: *METROLOGIA-2003- Metrologia para a Vida*. Sociedade Brasileira de Metrologia (SBM). Recife, Pernambuco.
- OBLINGER, J.L. & KOBURGER, J.A. 1975. "Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique." *J. Milk Food Technol.* 38(9), 540–545.
- POPP, N., SCHLÖMANN, M. & MAU, M. 2006. Bacterial diversity in the active stage of a bioremediation system for mineral oil hydrocarbon-contaminated soils. *Microbiology* 152:3291-3304.
- RIZZO, A.C.L. 2008. Desenvolvimento de biorreator não convencional para o tratamento de solos contaminados por petróleo. 188p. Tese (Doutorado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil).
- RIZZO, A.C.L., SANTOS, R.M., SANTOS R.L.C., SORIANO, A.U., CUNHA, C.D., ROSADO, A.S., SOBRAL, L.G.S. & LEITE, S.G.F. 2010. Petroleum-contaminated soil remediation in a new solid phase bioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. In press.
- RON, E.Z. 2000. Microbial life on petroleum. In *Journey to Diverse Microbial Worlds*. Edited by Seckback J. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers; 303-305.

- RON, E. & ROSENBERG, E.. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. U.S. Patent 3. Current opinion in biotechnology. Elsevier 13:249–252.
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Third Edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SHEN G., LU, Y., ZHOU, Q. & HONG, J. 2005. Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme. U.S. Patent 8. Chemosphere 61:1175-82.
- TELHADO, M.C.S.C.L. 2009. Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo. 124p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Brasil).
- TESTA, S.M. 1997. The reuse and recycling of contaminated soil. Boca Raton (FL): Lewis.
- TRINDADE, P.V.O. Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro, UFRJ/Escola de Química, 2002. 127p.
- URURAHY, A.F.P. Biodegradação de resíduo oleoso proveniente de refinaria de petróleo, 344p, 1998. Tese DSc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 1998.
- USEPA. 1996. "Cleaning up the nation's waste sites: Markets and technology trends, 1996 Ed." EPA 542-R-96-005, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, D.C.
- USEPA. 2004. "Cleaning up the nation's waste sites: Markets and technology trends, 4th Ed." EPA 542-R-04-015, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, D.C.
- VAN ELSAS, J.D., DUARTE, G.E., ROSADO, A.S. & SMALLA, K. 1998. Microbiological and molecular methods for monitoring



microbial inoculants and their effects in the environment. *Journal of Microbiological Methods*. 32: 133-154.

WANG X., ZHAO, C., ZHAO, P., DOU, P., DING, Y. & XU, P. 2009. Gellan gel beads containing magnetic nanoparticles: an effective biosorbent for the removal of heavy metals from aqueous system. U.S. Patent 7. Bioresource technology. Elsevier Ltd 100:2301-4.

WATANABE, K. & HAMAMURA, N. 2003. Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 14:289-295.

## SÉRIES CETEM

As Séries Monográficas do CETEM são o principal material de divulgação da produção científica realizada no Centro. Até o final do ano de 2010, já foram publicados, eletronicamente e/ou impressos em papel, cerca de 200 títulos, distribuídos entre as seis séries atualmente em circulação: Rochas e Minerais Industriais (SRMI), Tecnologia Mineral (STM), Tecnologia Ambiental (STA), Estudos e Documentos (SED), Gestão e Planejamento Ambiental (SGPA) e Inovação e Qualidade (SIQ). A Série Iniciação Científica consiste numa publicação eletrônica anual.

A lista das publicações poderá ser consultada em nossa homepage. As obras estão disponíveis em texto completo para download. Visite-nos em <http://www.cetem.gov.br/series>.

### Últimos números da Série Tecnologia Ambiental

#### **STA-58 - Monitoramento da Atenuação Natural de Solos Artificialmente Contaminados com Óleo Diesel B0 e B4.**

Cláudia Affonso Barros, Andréa Camardella de Lima Rizzo, Claudia D. da Cunha e Eliana Flávia Camporese Sérvulo, 2010.

**STA-57 - Resíduos de origem eletrônica.** Fábio Henrique Silva dos Santos e Carlos Eduardo Gomes de Souza, 2010.

#### **STA-56 - Avaliação da biodisponibilidade de contaminantes orgânicos em solo contaminado.**

Maria Clara S. C. L. Telhado, Selma Gomes Ferreira Leite, Andréa Camardella de Lima Rizzo, Danielle Reichwald e Claudia D. da Cunha, 2010.

## **INFORMAÇÕES GERAIS**

CETEM – Centro de Tecnologia Mineral  
Avenida Pedro Calmon, 900 – Cidade Universitária  
21941-908 – Rio de Janeiro – RJ

Geral: (21) 3867-7222

Biblioteca: (21) 3865-7218 ou 3865-7233

Telefax: (21) 2260-2837

E-mail: [biblioteca@cetem.gov.br](mailto:biblioteca@cetem.gov.br)

Homepage: <http://www.cetem.gov.br>

## **NOVAS PUBLICAÇÕES**

Se você se interessar por um número maior de exemplares ou outro título de uma das nossas publicações, entre em contato com a nossa biblioteca no endereço acima.

Solicita-se permuta.

We ask for interchange.