



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**INSTITUTO CIÊNCIAS DO MAR**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

**NATÁLIA MARIA SOUSA FALCÃO**

**DEGRADAÇÃO DE *N*-HEXADECANO POR CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS EM  
MICROCOSMOS DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAL**

**FORTALEZA**

**2014**

NATÁLIA MARIA SOUSA FALCÃO

DEGRADAÇÃO DE *N*-HEXADECANO POR CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS EM  
MICROCOSMOS DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAL

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Labomar, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Marinhas Tropicais.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vânia Maria Maciel  
Melo

Co-orientador: Dr. Alysson Lira Angelim

FORTALEZA

2014

NATÁLIA MARIA SOUSA FALCÃO

DEGRADAÇÃO DE N- HEXADECANO POR CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS EM  
MICROCOSMOS DE SEDIMENTOS DE MANGUEZAL

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Labomar, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Marinhas Tropicais.

Aprovada em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra<sup>a</sup>. Vânia Maria Maciel Melo  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Dr. Alysson Lira Angelim  
Biotrends, Soluções Biotecnológicas

---

Prof. Dr. Marcelo de Oliveira Soares  
Instituto de Ciências do Mar - UFC

A todos aqueles que de alguma forma lutam  
pela conservação deste planeta.

## AGRADECIMENTOS

Durante esta trajetória do mestrado existem muitos a quem devo agradecer, mas de antemão agradeço à professora Vânia Maria Maciel Melo pela oportunidade, confiança, investimento e tempo que foram depositados em mim. Muito obrigada, professora, tudo o que a senhora fez por mim contribuiu não só para o meu crescimento como pesquisadora, mas também como pessoa. Agradeço muito, de coração.

Agradeço também ao meu co-orientador Alysson Lira Angelim por tudo que fez pelo bom desenvolvimento do meu mestrado. Todas as vezes que sentou comigo para discutir planejamentos e resultados, pelos conselhos, pelo apoio, por sempre arranjar um tempo para mim quando mal tinha tempo para ele mesmo. Muito, muito, muito obrigada.

Às minhas queridas e amadas amigas Bárbara Cibelle e Vanessa Câmara que nessa nova empreitada da minha vida largaram minhas mãos, mas não soltaram meus pés. Permitiram que eu aprendesse a me guiar sozinha, mas sempre se mantiveram presentes para me ajudar em tudo que fosse necessário. Friends, obrigada por tudo e principalmente por todos os experimentos que vocês me ajudaram a montar. Eu sei, não foi fácil encher centenas de potes de vidro e tubos de ensaio. Amo vocês.

Agradeço muito aos meus companheiros e amigos de LEMBIOTECH: Wal Melgaço, Júlio Ximenes, Luis Henrique, Samantha Pinheiro, Hortência Barroso, Vanessa Nogueira, Tallita Tavares, Denise Hissa, Leonardo Normando, Lyanderson Aquino, Camila Tauane, Geórgia Colares, Samuel Araújo, Lara Gomes, Vanessa Câmara e Bárbara Cibelle. Todos, mas absolutamente todos me ajudaram de alguma forma nesses dois últimos anos. Espero sempre poder retribuir de alguma forma, queridos. Mesmo.

Um agradecimento especial à Lara Gomes e ao Jean Michel que trabalharam mais diretamente comigo neste período, indo ao Pici de domingo a domingo. Muito obrigada, sem o esforço de vocês eu não teria conseguido concluir este trabalho.

Aos demais amigos feitos durante todos esses anos na UFC, que mesmo distantes, estão sempre presentes. À *volvox*: Vanessa Câmara, Bárbara Cibelle, Kizeane Fajardo, Danilo José, Jéssica Oliveira e Heideger Nascimento. Ao Handerson Ribeiro, sempre em contato, me encorajando, conversando e me trazendo chocolates para melhorar o dia. Ao Gustavo Amaral, sempre me fazendo rir e melhorar o meu humor. Tenho certeza que você foi a pessoa que mais me ouviu nesses últimos tempos, sempre me botando para cima com o seu ano Falcônico. Amaral, eu agradeço muito. À Laís Machado, que mesmo do Rio de Janeiro

tem sempre mandado vibrações positivas e palavras de carinho e companheirismo. Lala, não te esqueço!

Não posso esquecer meus companheiros de Labomar, minha turma do mestrado e os agregados do doutorado. Eduardo Lacerda, Renan Guerra, Juliana Gaeta, Pollyana Morais, Carolina Coelho, Maciel Moura, Daniel Silva, Nádia Bonnet, Anamaria Betanho e Samuel Valentim. Minha turma não poderia ter sido melhor! Nossos dias no Labomar foram os melhores. Tenho certeza de que fiz amigos para a vida inteira.

Aos meus amigos Tales Melo, Camila Haidê, Cristiano Rocha, Mariana Farias, Júnior Müller, Amanda Gomes, Paula Gomes, Andressa Camille, Victor Girão e Gabriela Silva que mesmo sem entender bem o que eu estava fazendo, me apoiaram e foram compreensivos neste período.

Agradeço aos meus pais Henrique e Delma, e a minha irmã Beatriz por tudo, mas agradeço mais especialmente ao meu pai, sempre o meu maior ídolo e o meu maior fã. Pai, em todas as conquistas que eu obtive até hoje, o senhor sempre esteve envolvido de uma forma ou de outra. O senhor sempre foi o meu maior incentivador e eu sempre vou ser grata por isso. Muito, muito obrigada.

Por fim, agradeço à Universidade Federal do Ceará, ao Labomar e a CAPES pelo investimento intelectual e financeiro.

“Devemos promover a coragem onde há medo,  
promover o acordo onde existe conflito, e  
inspirar esperança onde há desespero”.

Nelson Mandela

## RESUMO

Os manguezais são muito suscetíveis a derramamentos de óleos, como resultado das diversas atividades humanas, entre elas àquelas *on shore* e *off shore* da indústria petrolífera. A necessidade de métodos de limpeza é cada vez maior para remediar tais ecossistemas, e técnicas cada vez menos prejudiciais ao ambiente têm sido requeridas, destacando-se entre elas, a biorremediação. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi analisar a biodegradação do *n*-hexadecano, um dos derivados do petróleo, em sedimentos de manguezal por um consórcio de bactérias previamente isolado de um manguezal impactado por petróleo, visando sua aplicação em biorremediação. Para tal, as linhagens de bactérias foram testadas isoladamente e em consórcio. Para o consórcio foram montados quatro microcosmos que diferiram apenas na fonte de carbono. O primeiro continha apenas a matéria orgânica inerente dos sedimentos, o segundo recebeu glucose, ao terceiro foram adicionados glucose e *n*-hexadecano e o último recebeu apenas *n*-hexadecano. Para os isolados foi testada apenas a capacidade de degradar o *n*-hexadecano. O monitoramento da biodegradação foi feito por meio de contagens do número de células viáveis e determinação da atividade desidrogenásica. Os resultados obtidos mostraram que tanto a atividade metabólica quanto o número de células foi significativamente maior nos microcosmos que receberam uma fonte de carbono extra, confirmando o estabelecimento e metabolismo do consórcio nos sedimentos. Além disso, ficou provado não ser necessário à adição de glucose, haja vista que o consórcio foi capaz de crescer usando apenas *n*-hexadecano como fonte de carbono e energia. A partir da análise das sete linhagens do consórcio isoladamente foi possível identificar que duas linhagens, nomeadas HEX 5 e HEX 6, são essenciais para o consórcio, já que são capazes de iniciar a degradação do *n*-hexadecano, enquanto HEX 1 e HEX 4 também são capazes de usar o *n*-hexadecano, embora com fase de adaptação mais demorada do que HEX5 e HEX6. As demais linhagens do consórcio, HEX 2, HEX 3 e HEX 7 não mostraram atividade metabólica significativa neste experimento até o final dos 25 dias de monitoramento. O consórcio formado pelas linhagens de bactéria HEX 1, HEX 4, HEX 5 e HEX 6, compreendendo respectivamente os gêneros *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Gordonia* e *Micrococcus*, representa um produto em potencial para biorremediação de sedimentos de manguezal contaminados com *n*-hexadecano por estratégia de bioaugmentação.

**Palavras-chave:** Manguezal, biorremediação, consórcios bacterianos, *n*-hexadecano.

## ABSTRACT

Mangroves are very susceptible to oil spills as a result of various human activities, including those on shore and off shore of oil industry. The need of cleaning methods is increasing to remedy such ecosystems, and techniques increasingly less harmful to the environment have been required, highlighting among them, the bioremediation. In this context, the aim of this study was to analyze the biodegradation of *n*-hexadecane, one of the derivatives of oil, in mangrove sediments by a consortium of bacteria previously isolated from a mangrove impacted by oil, for their application in bioremediation. To this, the bacterial strains were tested alone and in consortium. For the consortium, four microcosms were mounted which differed only in the source of carbon. The first contained only the organic matter inherent in the sediments, the second received glucose, the third were fed with *n*-hexadecane and glucose, and the last received only *n*-hexadecane. For the isolates, only the ability to degrade *n*-hexadecane was tested. The monitoring of biodegradation was done by counting the number of viable cells and determining the dehydrogenase activity. The results showed that both the metabolic activity and cell number were significantly higher in the microcosms which received an extra source of carbon, confirming the establishment and metabolism of the consortium in the sediments. Moreover, it was proved not to be necessary the addition of glucose, given that the consortium was able to grow only using *n*-hexadecane as a source of carbon and energy. From the analysis of the seven strains of the consortium alone, it was possible to infer that two strains HEX 5 and HEX 6, are essential for the consortium, since they are able to initiate the degradation of *n*-hexadecane, while HEX 1 and HEX 4 are also able to use *n*-hexadecane although need a longer adaptation phase. The remaining strains, HEX 2, HEX 3 and HEX 7 showed no significant metabolic activity in this experiment by the end of 25 days of monitoring. The consortium formed by HEX 1, HEX 4, HEX 5 and HEX 6, comprising respectively strains of the genera *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Gordonia* e *Micrococcus*, is a potential product for bioremediation of hexadecane-contaminated mangrove sediments by the strategy of bioaugmentation.

**Keywords:** Mangrove, bioremediation, bacterial consortium, *n*-hexadecane.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alastramento de óleo para ecossistemas costeiros após o derrame no golfo do México.....	18
Figura 2: Rotas metabólicas básicas para a degradação de n- alcanos realizada por micro-organismos.....	24
Figura 3: Reação de redução do sal de tetrazólio em formazan. ....	30
Figura 4: Relação entre a cor do Formazan e a intensidade da atividade metabólica. Quanto mais escuro, maior concentração de Formazan no meio. ....	30
Figura 5: Área de coleta.....	32
Figura 6: Aspecto das colônias e células das linhagens de bactérias do consórcio HEX, cultivadas em meio ATGE com 2% (m/v) de NaCl. As colônias foram fotografadas em lupa com aumento de 400x e as lâminas foram coradas pelo método de Gram e fotografadas em microscópio óptico com aumento de 1000x. ....	34
Figura 7: Esquema representativo do desenho experimental utilizado para monitorar biorremediação de <i>n</i> -hexadecano em microcosmos de sedimentos de manguezal. Sete microcosmos foram usados em cada condição experimental e desmontados nos tempos 0, 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 21 e 25 dias, sendo quatro microcosmos usados para pesquisa de atividade desidrogenase e três usados para contagem de células viáveis. ....	37
Figura 8: Curva padrão obtida a partir de soluções de calibração com concentrações conhecidas de formazan.....	40
Figura 9: Atividade metabólica do consórcio bacteriano HEX em microcosmos de sedimentos de manguezal submetidos aos seguintes tratamentos: SC= Sedimento e consórcio; SCG= sedimento, consórcio e glucose; SCGH= sedimento, consórcio, glucose e <i>n</i> -hexadecano; SCH= sedimento, consórcio e <i>n</i> -hexadecano. Atividade avaliada pelo método do TCC (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio) e expressa em concentração de formazan. Letras iguais dentro de cada grupo de colunas significam resultados estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. ....	42
Figura 10: Crescimento do consórcio HEX em microcosmo de sedimentos de manguezal submetidos a diferentes tratamentos: SC= Sedimento e consórcio; SCG= sedimento, consórcio e glucose; SCGH= sedimento, consórcio, glucose e <i>n</i> -hexadecano; SCH= sedimento, consórcio e <i>n</i> -hexadecano. O crescimento foi monitorado por contagens de células viáveis e expresso em Unidades Formadoras de Colônias por grama de sedimentos (UFC/g). Letras iguais dentro de cada grupo de colunas significam resultados estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. ....	44

Figura 11: Atividade metabólica de isolados bacterianos em microcosmos de sedimentos de manguezal contaminados com *n*-hexadecano, expressa em função da atividade da enzima desidrogenase. Letras iguais significam resultados estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey .....47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos produtos de origem petrolífera e alguns de seus respectivos micro-organismos degradadores de acordo com OLIVEIRA, 2013. ....	20
Tabela 2: Propriedades físico-químicas do <i>n</i> -hexadecano. ....	22
Tabela 3: Identificação molecular e classificação taxonômica das linhagens de bactérias do consórcio HEX. ....	35
Tabela 5: Composição dos microcosmos de sedimento de manguezal nas diferentes condições testadas nesse estudo. ....	36
Tabela 6: Valores de pH, salinidade, matéria orgânica e teor de silte + argila encontrados no sedimento. ....	41

## LISTA DE SIGLAS

ADH: Atividade desidrogenásica

ATGE: Ágar Triptona Glucose Extrato de levedura

INT: 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-cloreto de tetrazólio

LEMBIOTECH: Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia

MTT: 2-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-3,5-difenil-brometo de tetrazólio

TGE: Triptona Glucose Extrato de levedura

TPF: 2,3,5- trifeniltetrazólio formazan

TTC: 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
	2.1 Manguezais.....	13
	2.2 Micro-organismos nos manguezais.....	15
	2.3 Impactos no ecossistema manguezal.....	17
	2.4 Biodegradação.....	19
	2.5 Biorremediação.....	25
3	OBJETIVOS.....	31
	3.1 Geral.....	31
	3.2 Específicos.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
	4.1 Coleta e caracterização dos sedimentos de manguezal.....	32
	4.2 Consórcio de bactérias hidrocarbonoclástico.....	33
	4.2 Ensaio de biorremediação em microcosmos de sedimentos de manguezal.....	35
	4.2.1 Ativação do consórcio bacteriano e preparação de inóculo.....	37
	4.2.2 Soluções de glucose e n-hexadecano.....	38
	4.2.3 Estudo de biodegradação de hexadecano utilizando as linhagens de bactérias do consórcio isoladamente.....	38
	4.3 Avaliação da carga bacteriana nos microcosmos.....	38
	4.4 Avaliação da atividade desidrogenásica nos microcosmos.....	39
5	RESULTADOS.....	41
	5.1 Caracterização dos sedimentos.....	41
	5.2.2 Dinâmica de crescimento do consórcio bacteriano.....	44
	5.3 Estudo da dinâmica de atividade metabólica dos isolados bacterianos.....	46
6	DISCUSSÃO.....	50
7	CONCLUSÃO.....	59
8	REFERÊNCIAS.....	60

## 1 INTRODUÇÃO

Em Julho de 2008 a população mundial alcançou 6.7 bilhões de habitantes e as estimativas para 2050 chegam a 9.1 bilhões de habitantes. Em um mundo que cresce tão rapidamente em população, com sua taxa de geração de lixo correspondente e com seus níveis de consumo individuais, a eliminação de uma grande variedade de resíduos é um requerimento absoluto para promover o desenvolvimento sustentável e garantir a qualidade ambiental. Na realidade, há um número sempre crescente de resíduos perigosos em todo o mundo e esses representam um risco constante para a saúde humana e para o ambiente (STENUIT *et al.*, 2008).

Os manguezais são ecossistemas que se encontram sempre em perigo de contaminação por resíduos domésticos e industriais devido a sua localização em áreas costeiras e por estarem estritamente relacionados à atividade humana (YU *et al.*, 2005). Dentre os tipos de contaminação que podem atingir os manguezais, a contaminação por óleo é a mais comum, devido a localização dos manguezais próximo a regiões ativas de produção, refino e transporte de petróleo (BURNS; CODI, 1998). O óleo representa um impacto ecológico importante nos sistemas marinhos e terrestres (SANTOS *et al.*, 2011 b), sendo os hidrocarbonetos do petróleo os contaminantes de solos mais comuns em todo o mundo (DANDIE *et al.*, 2010).

Uma gama de técnicas de limpeza tem sido desenvolvida com sucesso para limitar o impacto causado pela poluição por óleo. Uma ênfase tem sido dada às técnicas que auxiliam os processos ambientais naturais para remover os poluentes do óleo. A biorremediação é uma dessas técnicas, e no contexto dos derramamentos de óleo, tem como objetivo aumentar a taxa de degradação do óleo (RAMSAY *et al.*, 2000).

A biorremediação é uma técnica de maior custo benefício, eco-amigável e eficiente na limpeza dos ambientes contaminados do que os tratamentos físico-químicos. Ela pode ser realizada *in situ*, no local da contaminação, ou *ex situ*, fora da área de contaminação ou em biorreatores. Dentre as estratégias existentes, se destacam a bioaugmentação que consiste na adição de micro-organismos com características catabólicas específicas, capazes de degradar o contaminante, e o bioestímulo, que consiste na estimulação da microbiota nativa para o mesmo fim degradativo (YAKUBU, 2007). Numerosos estudos laboratoriais tem demonstrado a eficácia do bioestímulo e do bioaumento no aumento das taxas de degradação de hidrocarbonetos tanto em solos quanto em sedimentos (XU *et al.*, 2005).

Nesse panorama, o objetivo desse trabalho consistiu em avaliar a capacidade de um consórcio de bactérias, isolado de sedimentos de um manguezal contaminado com petróleo, para degradar *n*-hexadecano em sedimentos, visando sua aplicação em biorremediação.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Manguezais

Os manguezais são ecossistemas situados na área de confluência entre os ecossistemas terrestre e marinho, nas zonas tropicais e subtropicais do planeta (ALONGI, 2002). Nessas zonas, cerca de 75% da linha costeira e aproximadamente 18 milhões de hectares são ocupados por florestas de manguezais (KATHIRESAN; QASIM, 2005). O Brasil juntamente com a Austrália, Nigéria, Indonésia e o Pacífico Oeste detém cerca de 43% dos manguezais do mundo (ALONGI, 2009).

Os manguezais são caracterizados por estarem submetidos a condições restritivas e dinâmicas intensas devido ao regime das marés, as variações de temperatura e salinidade, e os diferentes graus de anoxia. Estes ecossistemas são ricos e apresentam uma diversidade animal e vegetal que é morfológicamente, fisiologicamente e ecologicamente adaptada às constantes inundações, variações de pH e salinidade típicas do ambiente no qual se encontram (SPALDING; KAINUMA; COLLINS, 2010; SPALDING; BLASCO; FIELD, 1997; KATHIRESAN; BINGHAM, 2001; ALONGI, 2007; ).

A vegetação dos manguezais é composta por poucas espécies que se distribuem de forma característica dentro do ecossistema, estabelecendo um padrão típico de zonação relacionado à salinidade, ao tipo de solo e à sua química, quantidade de nutrientes, tolerâncias fisiológicas, predação e competição (SCHAEFFER-NOVELLI; CINRTÓN, 1990; SMITH, 1992). A vegetação apresenta adaptações morfológicas para viver nesse tipo de ambiente, entre elas estão os pneumatóforos, raízes aéreas, glândulas de sal nas folhas, embriões vivíparos, propágulos dispersos pelas marés e outros (SPALDING; KAINUMA; COLLINS, 2010; ALONGI, 2002).

No Brasil, os principais gêneros de árvores típicas desse bioma são *Rhizophora*, *Laguncularia*, *Avicennia* e *Conocarpus*. A sua distribuição varia de forma que a porção mais próxima do leito do rio é comumente pelo gênero *Rhizophora*, em direção ao ecossistema terrestre ocorrem predominantemente os gêneros *Avicennia* e a *Laguncularia*. A vegetação de transição do manguezal para o ecossistema terrestre é comumente ocupada por *Conocarpus* (SCHAEFFER-NOVELLI; CINRTÓN, 1990). Essas árvores dominam o fluxo de nutrientes do ecossistema, retendo principalmente carbono e nitrogênio (ALONGI, 2002).

Os animais que habitam os manguezais são bastante diversificados, devido à influência do ambiente marinho e terrestre na região estuarina. Devido a alta abundância de

alimentos e abrigos, além da baixa pressão de predação, os manguezais consistem no habitat ideal para uma grande variedade de espécies animais. Suas interações ecológicas com a vegetação e entre si, conferem aos manguezais características únicas (NAGELKERKEN *et al.*, 2008).

A importância ecológica do manguezal deriva do grande número de funções que o mesmo desempenha. Os manguezais possuem funções ambientais de grande importância, atuando como uma área de reprodução, crescimento, alimentação e abrigo para diversas espécies animais (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001). São ecossistemas bastante produtivos, que suportam uma grande diversidade através da sua cadeia alimentar, a qual se inicia com as espécies vegetais e com sua microbiota única (BOUILLON *et al.*, 2004). Além dessas importâncias ecológicas, eles são responsáveis pela redução da erosão costeira, seus sedimentos atuam como filtros biológicos de nutrientes e até mesmo de poluentes (SPALDING; BLASCO; FIELD, 1997) devido à sua granulometria fina, com elevadas porções de silte e argila, favorecem essa retenção e a depuração desses compostos nesse ecossistema (SANTOS *et al.*, 2011; LAW, 1981).

Além disso, as regiões costeiras constituem uma das regiões mais bioquimicamente ativas da biosfera, representando uma fonte de carbono bastante importante. Como os manguezais são os ecossistemas dominantes nessas regiões, são eles os principais agentes nesse ciclo do carbono, sendo responsáveis pela troca de sedimento, matéria orgânica e gases entre o oceano, o continente e o rio (ALONGI *et al.*, 2004).

Manguezais são ricos em relação à diversidade microbiana, e esses micro-organismos são fundamentais para a manutenção da produtividade, conservação e recuperação desses ecossistemas. Bactérias, arqueias e fungos constituem cerca de 91% da biomassa microbiana, enquanto microalgas e protozoários correspondem apenas a 7% e 2% respectivamente (ALONGI, 2002). Esses micro-organismos estão diretamente envolvidos nos ciclos biogeoquímicos, na transformação dos nutrientes, fotossíntese, fixação do nitrogênio, metanogênese, solubilidade do fosfato, redução do sulfato, produção de metabólitos, como antibióticos e enzimas, e na formação do solo (VAN DER HEIDJEN; BARDGETT; VAN STRAALLEN, 2008; HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHA, 2001). Além disso, são responsáveis pela degradação da matéria orgânica e dos poluentes (URAKAWA *et al.*, 2000), tendo um papel central e importante no equilíbrio e na saúde do mesmo (GOMES *et al.*, 2008).

Apesar de desempenhar esses diversos papéis de grande importância, os manguezais são comumente localizados em áreas urbanas, logo sob constantes impactos das atividades humanas, causadores da deterioração desses ecossistemas (GOMES *et al.*, 2008).

Desvio de água doce para irrigação e ocupação das terras têm destruído extensivamente as florestas de manguezal. A exploração intensiva desse ecossistema tem deixado os habitats restantes bastante degradados (KATHIRESAN; BINGHAM, 2001). Segundo Duke e colaboradores (2007), as florestas de manguezais estão desaparecendo em todo mundo em uma velocidade igual ou maior à degradação das florestas tropicais e dos recifes de coral.

Diante da atual situação de deterioração dos manguezais ao redor do mundo, maior importância tem sido dada a esse ecossistema. Tanto o governo como a opinião pública tem aumentado o seu apoio à conservação dos manguezais (ALONGI, 2009). No Brasil, os manguezais são considerados Áreas de Preservação Permanente (APP) e são protegidos por legislação nacional. Esse ecossistema está incluído em diversos dispositivos constitucionais (Constituição Federal de 1988, art. 225) e infra-constitucionais (Lei nº 6.938/81 – Lei da Política Nacional do Meio Ambiente; Lei nº 4.771/65 – Código Florestal; Lei nº 6.766/79 – Lei de Parcelamento do Solo; Lei Federal nº 9.605/98 – Lei dos Crimes Ambientais; Lei Federal nº 7.661/98 – Plano Nacional de Gerenciamento Costeiro; Resolução CONAMA nº 04/1985); porém, apesar desses aspectos positivos, muito ainda tem que ser feito para conservar, proteger e recuperar efetivamente tais ecossistemas (SPALDING, KAINUMA, COLLINS, 2010).

## **2.2 Micro-organismos nos manguezais**

A atividade microbiana nos manguezais se encontra relacionada à grande dinâmica desses ambientes e aos diferentes nichos disponíveis, tanto no solo como na água. No solo, os microhabitats existentes podem variar em relação ao teor de oxigênio, ferro, salinidade, matéria orgânica, pH, dentre outros, havendo uma grande diversidade de bactérias que atuam nesses distintos nichos nos manguezais (HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001).

Micro-organismos residentes de manguezais são organismos dinâmicos, e devido à sua grande plasticidade genotípica, são capazes de manifestar em pouco tempo fenótipos distintos podendo se adaptar às diversas mudanças ambientais (ROSZAK; COLWELL, 1987). Portanto, variações em fatores ambientais acabam por direcionar o crescimento e desenvolvimento das populações microbianas (MANDIGAN; MARTINKO; PARKER, 2010).

A variedade genotípica reflete diretamente na diversidade metabólica encontrada nesse ecossistema. Essas características aliadas à sua rápida capacidade de multiplicação fornecem aos micro-organismos um grande potencial de degradação de diferentes moléculas (RAMSAY *et al.*, 2000). A taxa e extensão da biodegradação podem variar e dependem da estrutura da comunidade microbiana e das condições ambientais existentes (ALVAREZ; ILLMAN, 2006).

Além de serem responsáveis pela degradação da matéria orgânica no ambiente e repor os nutrientes no ecossistema, a biodegradação realizada por micro-organismos também é o mecanismo primário de eliminação de poluentes e substâncias xenobióticas do ambiente (ATLAS, 1981). A utilização do potencial metabólico de organismos vivos, como vegetais ou micro-organismos, ou de seus metabólitos para recuperar ambientes impactados através da eliminação, redução ou transformação dos compostos nocivos ao ambiente é chamada biorremediação (ALVAREZ; ILLMAN, 2006).

Vários micro-organismos têm se mostrado extremamente versáteis em catabolizar moléculas recalcitrantes. Trabalhos atuais na área têm mostrado que as bactérias juntamente com os fungos se destacam da degradação de diversos poluentes, apresentando alto potencial de ação na recuperação de ambientes contaminados (PEREIRA; FREIRAS, 2012). A eficiência desses organismos na degradação desses compostos depende, em muitos casos, da estrutura da molécula e da presença de enzimas hábeis em degradar o produto (TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

O acúmulo de poluentes urbanos derivados do petróleo e os acidentes ambientais envolvendo derrames desse composto em ecossistemas costeiros consistem em um sério problema ambiental e têm sido significativamente registrados nas últimas décadas. Dentre os tratamentos para remediação existentes, a descontaminação biológica tem se mostrado uma técnica eficiente, tanto como uma alternativa aos tratamentos físicos e químicos, como uma complementação a esses tratamentos. A maior atenção dada à preservação do ambiente e redução dos impactos no mesmo são uns dos maiores atrativos dessa técnica de remediação dos ambientes.

Micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos são ubíquos na maioria dos ecossistemas onde os contaminantes podem servir como fonte de carbono (MARGESIN; ZIMMERBAUER; SCHINNER, 2000; RAMSAY *et al.*, 2000). Dessa forma, como os manguezais se localizam próximos aos polos de atividade humana e acabam por acumular grandes quantidades de poluentes antropogênicos, não é surpreendente que os micro-

organismos encontrados nesse ecossistema tenham desenvolvido a habilidade de metabolizar diversos compostos orgânicos, como hidrocarbonetos do petróleo (ATLAS, 1981).

### **2.3 Impactos no ecossistema manguezal**

Os manguezais apresentam um histórico de diversos impactos devido à sua relação com o crescimento populacional e desenvolvimento das cidades. Os principais impactos para perda e degradação dos manguezais compreendem as atividades relacionadas à extração de madeira, conversão das áreas para agricultura, produção de sal, extração de estanho, aquicultura, atividades industriais, lançamentos de esgotos, lixo e agrotóxicos, turismo e sobre-exploração dos recursos (MACINTOSH; ASHTON; HAVANON, 2002; ALONGI, 2002; SPALDING; KAINUMA; COLLINS, 2010).

Os impactos associados às essas atividades são extensos e a magnitude considerada preocupante em todo mundo. Quando atingem os níveis basais da cadeia alimentar, acabam por alterar todo o sistema. Uma vez que a microbiota sofre alterações na sua composição, todo o ambiente sofre com essas alterações (KUIPER *et al.*, 2004).

A poluição tornou-se uma preocupação global devido à contaminação do ambiente com compostos indesejáveis e ao efeito negativo que esses poluentes causam não somente no ambiente, mas também na saúde humana (KUIPER *et al.*, 2004). Dentre os poluentes mais perigosos estão os hidrocarbonetos do petróleo, maiores poluidores dos ambientes marinhos (GENTILI *et al.*, 2006; MARGESIN; ZIMMERBAUER; SCHINNER, 2000) e um dos grandes responsáveis pela contaminação de solos urbanos e de solos próximos às infraestruturas. De acordo com a Agência Ambiental Européia, as atividades industriais são responsáveis por mais de 60% da poluição encontrada nos solos da Europa, onde o setor petrolífero corresponde sozinho a 14% desse total. Dentre os contaminantes conhecidos mais perigosos estão os metais pesados (37%) e os óleos minerais (33%) (EPA, 2009).

Dentre os exemplos mais recentes de grandes contaminações consiste no derrame de óleo que ocorreu no golfo do México (Figura 1). Tal derrame foi considerado o maior acidente registrado, e que causou impactos nos ecossistemas da região e na economia de diversos países.

Figura 1: Alastramento de óleo para ecossistemas costeiros após o derrame no golfo do México.



Fonte:

[http://www.oregonlive.com/news/index.ssf/2010/05/bp\\_concedes\\_oil\\_spill\\_in\\_gulf.htm](http://www.oregonlive.com/news/index.ssf/2010/05/bp_concedes_oil_spill_in_gulf.htm)

Os manguezais funcionam como um reservatório de tais poluentes devido à sua alta capacidade de retenção que é favorecida pela circulação das marés devido aos processos de inundação e escoamento, que permitem que maiores quantidades do poluente entrem no ecossistema e sejam retidos (SANTOS *et al.*, 2011; BURNS; GARRITY; LEVINGS, 1993). Essa retenção de poluentes magnifica a toxicidade dos compostos e acaba afetando a saúde do ecossistema (SANTOS *et al.*, 2011; BRITO *et al.*, 2009).

O impacto do óleo no manguezal, como também em outros ecossistemas, é relacionado ao tipo de poluente, quantidade derramada, toxicidade, padrão de deposição e tempo de retenção. Todos esses fatores causam danos para a vegetação, o que consequentemente é transferido para os outros elementos componentes do sistema, influenciando processos e alterando as características ambientais locais através de modificações químicas e/ou físico-químicas (SANTOS *et al.*, 2011).

Os componentes do petróleo são conhecidos como os mais prejudiciais aos manguezais, causando danos imediatos aos organismos residentes. (NANSINGH; JURAWAN, 1999). O petróleo é composto por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, incluindo alifáticos, alicíclicos e aromáticos, que varia de acordo com a localização geográfica e condições físicas, químicas e biológicas que o originaram (CRÁPEZ *et al.*,

2002). Apesar da maior parte de seus componentes ser biodegradável, cerca de 10% a 40% do petróleo é recalcitrante no estado bruto ou refinado. Tais compostos são nocivos aos organismos vivos por serem tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, podendo causar impactos agudos e crônicos, causando efeitos adversos no equilíbrio do ecossistema (CRÁPEZ *et al.*, 2002; DUKE *et al.*, 2000).

Em muitos casos envolvendo acidentes com derramamento de óleo, a degradação dos poluentes no sedimento pode ser seriamente retardada por diversos fatores, envolvendo tanto fatores ambientais como a própria composição do óleo. Nesses casos, a recuperação pode levar um longo tempo, ou o dano pode ser permanente, e nessas situações a melhor estratégia é intervir nesse processo para acelerar a recuperação do ambiente (BURNS; CODI, 1998).

A legislação brasileira exige que áreas contaminadas devam ser remediadas, para minimizar a interferência ambiental e restaurar os ecossistemas. Para isto, são necessários o diagnóstico, a análise e o monitoramento do impacto e medidas mitigadoras (CETESB, 2010).

A Resolução do CONAMA 273/2000, define que toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais, considerando que os vazamentos de derivados de petróleo e outros combustíveis podem causar contaminação de corpos de água subterrâneos e superficiais, do solo e do ar. Dentro desse contexto, atualmente, inúmeras pesquisas relacionadas à remediação de áreas atingidas por produtos petroquímicos são realizadas com a finalidade de restaurar a qualidade desses ecossistemas.

## **2.4 Biodegradação**

Mesmo que uma porção menor do petróleo seja considerada recalcitrante, em um derrame, isso pode representar toneladas de poluentes impactando ecossistemas, onde são bioacumulados e biomagnificados na cadeia trófica. O destino destes compostos irá depender da interação de diversos fatores, destacando-se a degradação microbiana (CRÁPEZ *et al.*, 2002).

A presença de hidrocarbonetos em toda a biosfera explica a capacidade de muitos micro-organismos serem capazes de utilizar esses compostos como substratos de crescimento (RAMSAY *et al.*, 2000; MARGUEZIN; ZIMMERBAUER; SCHINNER, 2000). Muitos micro-organismos, como bactérias, cianobactérias, fungos, leveduras além de algumas algas

verdes, são capazes de oxidar hidrocarbonetos, crescendo em sua superfície e os utilizando como doadores de elétrons. Durante esse processo, as bactérias utilizam o seu potencial fisiológico para remover poluente do meio transformando o petróleo em biomassa, água e dióxido de carbono (CRÁPEZ *et al.*, 2002).

A tabela 1 indica os principais gêneros de bactérias e fungos capazes de degradar os produtos orgânicos de origem petrolífera.

Tabela 1: Relação dos produtos de origem petrolífera e alguns de seus respectivos micro-organismos degradadores de acordo com OLIVEIRA, 2013.

Produto	Micro-organismo – Gênero	Alvo de degradação	Referência
<b>Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP's)</b>	<i>Mucor, Gliocadium, Penicillium, Phialophora, Trichoderma, Scopulariopsis e Coniothyrium</i>	Degradação do pireno	Ravelet <i>et al.</i> (2000)
	<i>Cladosporium, Fusarium, Penicillium, Aspergillus e Pleorotus Phanerochaete</i>	Biodegradação de HAP's	Mollea <i>et al.</i> (2005)
<b>Hidrocarbonetos</b>	<i>Aspergillus, Penicillium, Paecilomyces e Fusarium</i>	Metabolizar hidrocarbonetos aromáticos	Araújo <i>et al.</i> (2002)
	<i>Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Amorphoteca, Neosartorya, Paecilomyces Talaromyces e Graphium</i>	Capazes de degradar compostos fenólicos	Chaillan <i>et al.</i> (2004)
	<i>Paecilomyces Aspergillus, Cladosporium., Penicilium sp. e Phoma sp. Aspergillus sp. LEBM2</i>		Conceição <i>et al.</i> (2005)
			Silva <i>et al.</i> (2007)
			Passos <i>et al.</i> (2009)

<b>Hidrocarbonetos aromáticos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno)</b>	<i>Microbacterium</i> <i>Rhodococcus</i> <i>Cladophialophora</i> <i>Ccladosporium</i> <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i>	Capazes de catabolizar benzeno, tolueno, etilbenzeno xilenos (BTEX).	Kang <i>et al.</i> (2005); Nikolova; Nenov (2005) Teixeira; Bento (2007)
<b>Tolueno e Xileno</b>	<i>Pseudomonas</i>	Degradação de tolueno e xileno	Otenio <i>et al.</i> (2005)
<b>n- hexadecano</b>	<i>Bacillus e</i> <i>Ochrobactrum</i>	Biodegradação de hidrocarbonetos de cadeias longas	Costa (2006)
<b>Atrazine + simazine</b>	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium e</i> <i>Trichoderma</i>	Apresentam maior velocidade de crescimento radial a partir de solo contaminado com Atrazine + simazine	Colla <i>et al.</i> (2008)
<b>Alcanos</b>	<i>Rhodococcus</i>	Capazes de degradar alcanos normais (C10-36 alcanos) e alcanos ramificados (pristano, fitano)	Makiko <i>et al.</i> (2010)

Fonte: OLIVEIRA, 2013.

O petróleo é constituído por diferentes classes de hidrocarbonetos e devido a esse fato, a degradação de seus compostos não pode ser realizada por uma só espécie microbiana, sendo necessária a formação de consórcios compostos por espécies distintas. O uso de consórcios microbianos é mais efetivo do que culturas puras na biodegradação, pois a complementação metabólica e a diversidade enzimática proporcionada por esses consórcios

permitem a degradação do óleo, remediando os compostos químicos, reduzindo as concentrações no ambiente ou reduzindo a toxicidade dos compostos (CRÁPEZ *et al.*, 2002).

Os hidrocarbonetos saturados, especialmente os alcanos (C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub>), constituem a maior fração do óleo cru por massa, portanto, a biodegradação desses hidrocarbonetos é quantitativamente o processo mais importante na remoção do óleo cru do ambiente (HEAD; JONES; RÖLING, 2006; WENTZEL *et al.*, 2007; ROJO, 2009).

Os n-alcanos são moléculas apolares que não possuem grupos funcionais. Eles são quimicamente muito inertes e precisam de uma energia externa para serem ativados, porém micro-organismos podem utilizá-los como fonte de energia (WENTZEL *et al.*, 2007; ROJO, 2009). Entretanto, a sua atenuação natural por micro-organismos potenciais pode ser reduzida devido à sua baixa solubilidade em água e afinidade por membranas celulares microbianas.

Pertencente a essa categoria, o *n*-hexadecano (C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>) tem sido usado como molécula modelo por muitos pesquisadores devido a sua presença em muitos ambientes contaminados com derivados do petróleo e conhecida biodegradabilidade por distintas populações microbianas (PARTOVINIA; NAEIMPOOR; HEJAZI, 2010; GRAHAM *et al.*, 1999). O uso de um composto químico puro em vez de uma fração permite acompanhar a degradação do contaminante com mais precisão (MERINO; BUCALÁ, 2007). As propriedades físico-químicas do *n*-hexadecano se encontram na tabela 2.

Tabela 2: Propriedades físico-químicas do *n*-hexadecano.

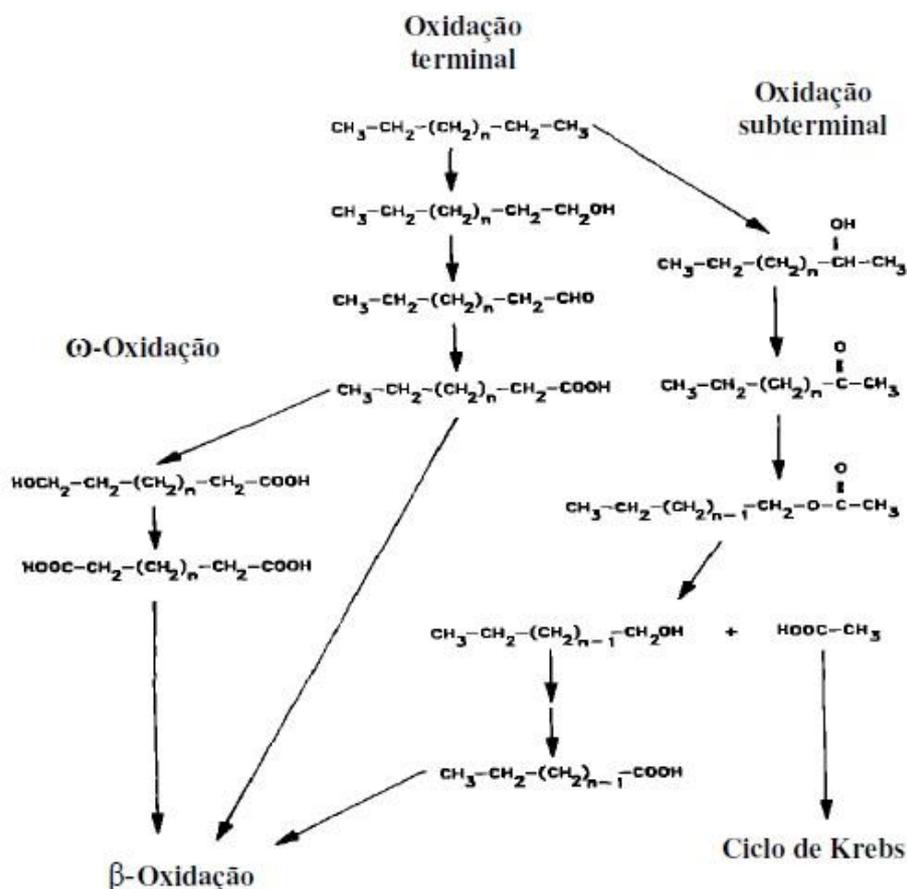
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>
<b>Peso molecular</b>	226,44
<b>Ponto de fusão</b>	18°C
<b>Ponto de ebulição</b>	287°C
<b>Solubilidade</b>	0,00628
<b>Low Kow</b>	9,1

Fonte: ROCHA, 2008 (adaptado de STROUD *et al.*, 2007).

Em relação ao comportamento do *n*-hexadecano em organismo vivos, estudos realizados por Little e colaboradores (1986) mostraram a grande persistência do *n*-hexadecano em tecidos (hepatopâncreas, músculo da cauda e hemolinfa) da lagosta espinhenta e da lagosta americana. A radioatividade derivada do *n*-hexadecano se mostrou persistente tanto na lagosta espinhenta (meia-vida: 4.6 semanas) como na lagosta americana (meia-vida: 11.2 semanas). Nas duas lagostas, o hepatopâncreas adquiriu a maior atividade específica e o músculo da cauda apresentou as maiores meias-vidas para eliminação de um tecido específico, mostrando o longo tempo de residência desse composto em tecidos vivos.

Para a degradação de alcanos, oxidação de alcanos, a reação catalisada inicialmente pela enzima alcano mono-oxigenase resulta na formação de um álcool, o qual também é oxidado ao seu ácido graxo correspondente através das enzimas álcool-desidrogenase e aldeído-desidrogenase, respectivamente. A presença de álcoois primários e ácidos graxos alifáticos de mesmo comprimento de cadeia indica que o ataque oxidativo se inicia em um dos grupos metil da molécula do hidrocarboneto, similar a outros sistemas bacterianos que metabolizam *n*-alcanos (ABDEL-MEGEED; AL-HARBI; AL-DEYAB, 2010). As rotas catabólicas microbianas para a degradação de *n*-alcanos envolvem rotas de hidroxilação comuns, tais como as rotas de oxidação terminal, seguida ou não por uma  $\omega$ -oxidação, e a menos comum rota de oxidação subterminal (WATINKSON; MORGAN, 1990). A figura 2 demonstra as rotas de degradação dos *n*-alcanos.

Figura 2: Rotas metabólicas básicas para a degradação de *n*-alcanos realizada por micro-organismos.



Fonte: ROCHA, 2008 (adaptado de WATKINSON & MORGAN, 1990).

A biodegradação do *n*-hexadecano tem sido reportada em diversos estudos que tem como objetivo investigar a mineralização dessa molécula, o efeito de surfactantes nessa mineralização e as rotas metabólicas e intermediários oxidados gerados a partir da degradação bioquímica desse composto (PARTOVINIA; NAEIMPOOR; HEJAZI, 2010). Tais estudos permitem utilizar as transformações microbianas como formas de desintoxicação e mineralização do poluente (ABDEL-MEGEED; AL-HARBI; AL-DEYAB, 2010), e auxiliar em procedimentos de remediação dos solos, já que os alcanos são um dos poluentes de solo mais globalmente distribuídos (PARTOVINIA; NAEIMPOOR; HEJAZI, 2010).

Trabalhos envolvendo a degradação do *n*-hexadecano em diferentes tipos de sedimento têm sido desenvolvidos por diversos grupos de estudos no mundo inteiro. Dentre eles se encontram trabalhos em sedimentos Árticos (BØRRESEN; RIKE, 2007), Antárticos (AISLABIE *et al.*, 2012); agroecológicos (YUAN *et al.*, 2013); de origem marinha e fluvial

(STROUD; PATON; SEMPLE, 2008); porém estudos envolvendo a degradação deste composto em sedimentos de manguezal são escassos e bastante importantes, pois os manguezais são um dos ecossistemas mais impactados por petróleo e seus componentes, se encontrando em constante risco de impacto.

## 2.5 Biorremediação

A biorremediação é um processo no qual organismos vivos, normalmente plantas ou micro-organismos, são utilizados tecnologicamente para remover ou reduzir poluentes no ambiente. Esse processo biotecnológico tem sido intensamente pesquisado e recomendado pela comunidade científica atual como alternativa viável, ecologicamente adequada e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005; STROUD; PATON; SEMPLE, 2007). Ao contrário dos processos físicos e/ou químicos, a biodegradação elimina o contaminante sem dispensá-los no meio ambiente, tendo como produtos finais dióxido de carbono, água e biomassa (CRÁPEZ *et al.*, 2002).

Alta diversidade, adaptabilidade genética e especialização de comunidades microbianas fazem destes organismos um bom instrumento para esta biotecnologia (VIDALI, 2001). Além disso, a sua capacidade de passar por uma rápida evolução genética aumenta as chances desses micro-organismos de adquirir novo potencial metabólico para a degradação de poluentes recém-introduzidos no ambiente (PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009). Entretanto, a degradação eficiente dos poluentes pode ocorrer de maneira lenta ou mesmo parcial. Nestes casos, a estimulação da atividade microbiana têm um papel fundamental na otimização do processo (URGUN-DERMITAS; STARK; PAGILLA 2006).

As estratégias usadas para a biorremediação dos hidrocarbonetos podem ser divididas entre as técnicas *in situ*, em que não há necessidade de remoção do substrato contaminado, sendo a biorremediação realizada no próprio local contaminado, e as técnicas *ex situ*, em que é necessário remover o substrato, sendo a remediação realizada em outro local com instalações apropriadas (JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRAVITOL, 2010, VIDALI, 2001; PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009).

Esses dois métodos principais de remediação são significativamente diferentes no que se refere aos controles experimentais e à consistência dos resultados. Por exemplo, os processos *in situ* apresentam taxas de biodegradação mais variáveis do que os processos *ex situ*, sendo considerados mais imprevisíveis. Somado a essa menor variabilidade, os métodos

*ex situ* são independentes dos fatores ambientais que podem afetar adversamente a eficácia do processo. Além disso, o fato da biorremediação *ex situ* ser realizada em ambientes não naturais pode ser facilmente manipulada por tratamentos físico-químicos dos poluentes-alvo tanto antes quanto depois da degradação. Devido a essas características, esse é o processo de biorremediação mais aplicado para a remediação de solos/sedimentos contaminados com altos níveis de compostos recalcitrantes, solos argilosos com baixa permeabilidade de poluentes, ambientes com condições não favoráveis para os processos biológicos e onde a liberação de micro-organismos não é viável por razões legais (PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009).

Apesar de todas as vantagens relacionadas às técnicas *ex situ*, as abordagens *in situ* são as mais comumente utilizadas para a restauração ecológica de ambientes contaminados. Os tratamentos *in situ* também não requerem que o solo ou amostra contaminada seja removida, portanto são tratamentos de menor custo financeiro. Outra faceta importante da biorremediação *in situ* é a sua aplicabilidade a diversos ambientes, indo de instalações industriais ao solo do Ártico polar. A significância dessas técnicas é aumentada pela distribuição ubíqua e a atividade dos micro-organismos, o que proporciona uma descontaminação eficaz até mesmo de microambientes remotos, que são normalmente inacessíveis aos métodos *ex situ* (PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009).

A técnica *in situ* mais comum consiste na atenuação natural. Nessa abordagem, o contaminante permanece no local e a degradação ocorre através de processos físicos, químicos e biológicos naturais, como volatilização, diluição e sorção do poluente. Já dentre as técnicas *ex situ*, a compostagem e os tratamentos em biorreatores são os mais comuns. Na compostagem os solos contaminados são removidos e colocados em pilhas, controlando-se a lixiviação e o escoamento dos líquidos superficiais originados dessas pilhas. Nos biorreatores a degradação ocorre em um recipiente onde o material contaminado é misturado com água formando uma suspensão, que é agitada mecanicamente, aumentando a aeração, a homogeneidade dos poluentes e sua disponibilidade aos micro-organismos. (JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

As técnicas que abrangem os dois tipos de tratamentos são diversas. Entre as mais comuns estão o sistema *landfarming*, a bioventilação, a fitorremediação, o bioestímulo e o bioaumento. O sistema *landfarming* consiste na estimulação dos micro-organismos da camada superficial do solo a degradação dos poluentes, transformando-os em substâncias inertes como CO<sub>2</sub> e água. A técnica da bioventilação consiste na introdução de oxigênio no substrato para estimular a atividade microbiana aeróbia e a degradação do composto (JACQUES *et al.*, 2007; TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

A fitorremediação baseia-se na utilização de plantas para remediar ambientes contaminados por metais pesados e compostos orgânicos. A grande maioria das pesquisas em fitorremediação estuda a utilização de plantas acumuladoras, que são capazes de estocar grandes quantidades de contaminantes sem uso aparente em seu metabolismo (JACQUES *et al.*, 2007).

O bioestímulo consiste em uma técnica realizada a partir da estimulação da microbiota indígena, otimizando suas condições de crescimento por meio da adição de nutrientes orgânicos e inorgânicos, regulação de pH, temperatura e aeração. É uma técnica que tem sua eficácia diretamente relacionada à presença de populações microbianas indígenas capazes de degradar o contaminante (TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

A bioaugmentação é uma técnica de biorremediação *in situ* que envolve a adição de micro-organismos, autóctones ou alóctones, com comprovada atividade metabólica na degradação do poluente em questão. A maioria das aplicações utilizando essa técnica ocorre em ambientes onde não existe um número suficiente de micro-organismos para promover uma remediação natural ou que a população indígena não possua as rotas metabólicas necessárias para metabolizar os contaminantes (YAKUBU, 2007; TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2010).

As técnicas mais comuns de bioaumento envolvem a utilização de culturas puras ou consórcios bacterianos pré-adaptados, introdução de bactérias geneticamente modificadas e adição de genes específicos inseridos em vetores para serem transferidos por conjugação dentro das comunidades (TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010; TYAGI; FONSECA; CARVALHO, 2010). Tais técnicas se baseiam na diversidade genética e metabólica comumente encontrada em micro-organismos, tornando-os capazes de degradar uma grande variedade de componentes.

Dentre as técnicas de biorremediação existentes, duas delas são recorrentemente utilizadas quando se é abordada a restauração dos manguezais, a fitorremediação e o bioaumento. Estudos realizados por Moreira e colaboradores (2010; 2013) mostraram a eficiência de *Rhizophora mangle* e *Avicennia schaueriana* na degradação de hidrocarbonetos totais de petróleo em sedimentos de manguezal, enquanto estudos realizados por Brito e colaboradores (2009) e Angelim e colaboradores (2013) demonstraram a capacidade dos consórcios bacterianos em degradar hidrocarbonetos em sedimentos lamosos de manguezais.

Atualmente, nos processos biorremediativos que utilizam o bioaumento, os consórcios microbianos capazes de degradar certos poluentes vêm recebendo destaque, pois em contraste as culturas puras, apresentam maior efetividade na degradação desses

compostos, por apresentarem uma maior capacidade de utilizar essas substâncias como fonte de carbono, conseqüentemente uma taxa de degradação, aumentando assim a probabilidade de que um processo de degradação eficiente ocorra (ANGELIM *et al.*, 2013; SILVA, 2008).

É importante ressaltar que a eficiência dos processos de degradação depende de fatores físicos, químicos e biológicos, como a biomassa microbiana, diversidade populacional, atividades enzimáticas, características físico-químicas do substrato, estrutura molecular do poluente e sua concentração. Dentre os fatores ambientais, o pH, temperatura, umidade, atividade de água, oxigênio dissolvido e outros estão entre os mais influentes na eficácia do processo. Devido a esse grande número de variáveis envolvidas, geralmente um processo de biorremediação deve ser acompanhado por um monitoramento para aferir a evolução do processo biodegradativo (STENUIT *et al.*, 2008).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para a obtenção de uma avaliação abrangente do potencial de biodegradação no local de contaminação e monitorar as mudanças na estrutura e nas atividades dos micro-organismos envolvidos na biorremediação. Atualmente, métodos independentes de cultivo baseados em técnicas de biologia molecular, têm sido utilizadas com esse objetivo (STENUIT *et al.*, 2008). O uso de metodologias que descrevem a atividade microbiana no curso do processo de biorremediação como a respiração, a atividade desidrogenásica e a contagem de células também são comumente utilizadas (MARGUESIN; ZIMMERBAUER; SCHINNER, 2000).

A atividade biológica do solo tem sido sugerida como um dos mais importantes indicadores da qualidade do solo (DICK, 1994); e atualmente tem sido proposto que o *status* bioquímico e microbiológico de um solo pode ser utilizado como um indicador inicial e sensível do estresse ecológico do solo e de processos de restauração tanto em ecossistemas naturais como agrossistemas (RUF *et al.*, 2003). Dentre esses fatores bioquímicos e microbiológicos, enzimas do solo têm sido propostas como potenciais indicadores da qualidade do solo devido sua natureza biológica, simples medição e de apresentar rápidas respostas às mudanças que ocorrem no solo quando comparadas a outras propriedades biológicas do mesmo (LING; HUANG; OUYANG, 2010).

A atividade enzimática do solo é a expressão direta da comunidade microbiana ali presente aos requerimentos metabólicos e nutrientes disponíveis. Essas atividades têm sido relacionadas às propriedades físico-químicas, a estrutura da comunidade microbiana, vegetação, distúrbios e processos de sucessão (CALDWELL, 2005). Dessa forma, a atividade enzimática funciona como um sensor da degradação do solo, já que combina informações do

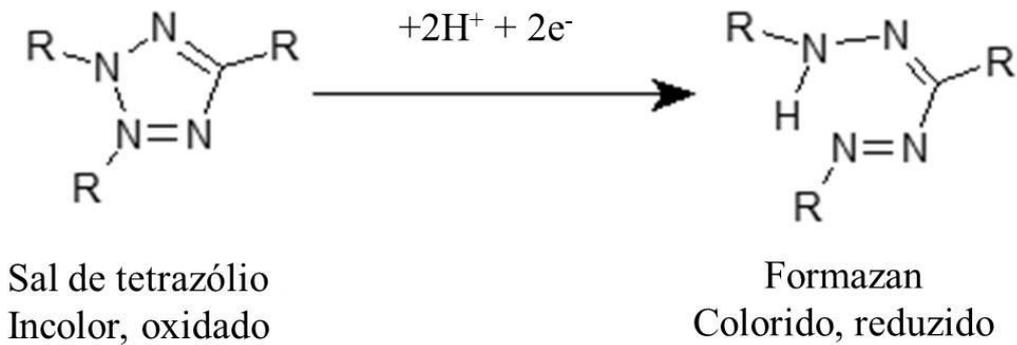
*status* da microbiota com os demais fatores que a influenciam diretamente (AON; COLANERI, 2001).

Dentre as diversas enzimas pesquisadas, a atividade da desidrogenase (ADH) tem sido reconhecida como um importante indicador bioquímico do solo, pois é um indicador da atividade microbiana geral (RYOICHI; SENARATNE, 2009). A ADH é considerada um indicador do metabolismo oxidativo nos solos, e assim da atividade microbiológica devido ao fato de ser ligada às células viáveis. Tal atividade reflete o alcance da atividade oxidativa da microbiota do solo (SKUJINS, 1976).

O conceito da utilização da atividade da desidrogenase como forma de determinar a atividade metabólica dos micro-organismos do solo e de outros habitats foi introduzido por Lenhard (1956). Diversos trabalhos têm sido feitos envolvendo tais atividades no solo; alguns exemplos de seu uso são a avaliação da poluição do solo por metais pesados (HIJINOSA *et al.*, 2004), restauração de solos semi-áridos (ROS; HERNANDEZ; GARCÍA, 2003), avaliação de um processo de degradação-regeneração em savanas na Tailândia (RYOICHI & SENARATNE, 2009), dentre outros.

Um dos métodos utilizados para a quantificação dessa atividade enzimática em solos consiste na incubação desse solo com um sal de tetrazólio, entre os exemplos estão o 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC), o 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-cloreto de tetrazólio (INT) e 2-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-3,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT), tanto na presença como na ausência de um substrato doador de elétron (CASIDA, 1977). Essa metodologia é considerada fácil e relativamente simples. O sal de tetrazólio em solução penetra na célula bacteriana e se torna um aceptor de elétrons e prótons artificial transportado por uma desidrogenase dentro da cadeia transportadora de elétrons. A atividade desidrogenásica microbiana resulta da redução do sal de tetrazólio, incolor e solúvel em água, em um outro sal, chamado formazan, que é solúvel apenas em solventes orgânicos. A solução do formazan no solvente orgânico apresenta uma coloração cuja intensidade pode ser medida (GNIDA; SURMACZ-GÓRSKA, 2012; CASIDA, 1977). A coloração depende do sal de tetrazólio utilizado. A reação que ocorre com o TTC pode ser visualizada na figura abaixo.

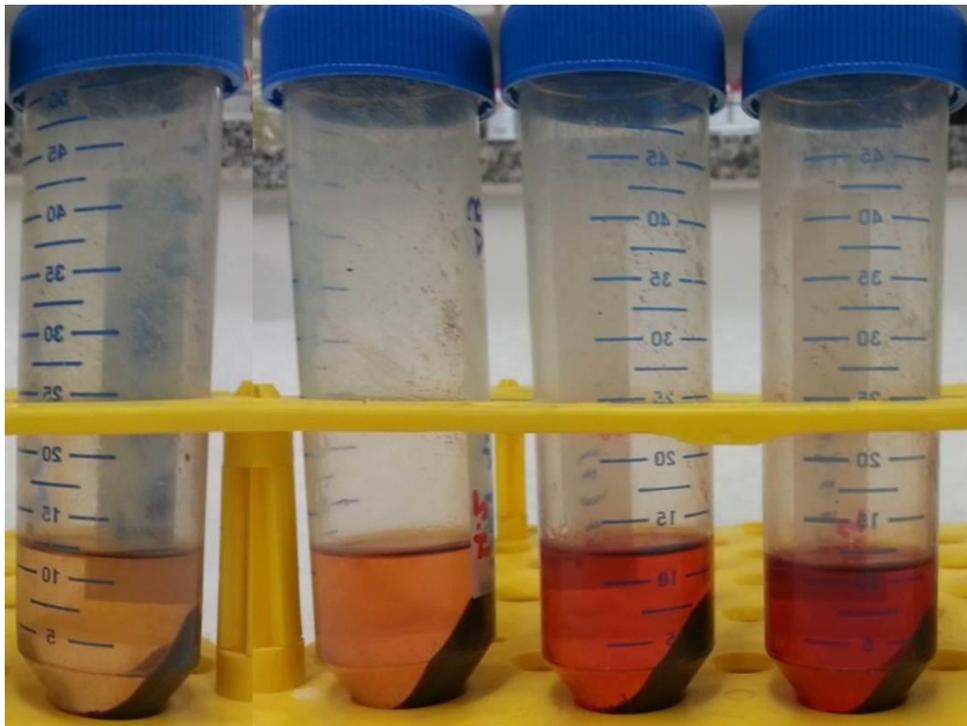
Figura 3: Reação de redução do sal de tetrazólio em formazan.



Fonte: Adaptado de KREGIEL, 2012.

Um dos sais de tetrazólio mais utilizados para esses experimentos é o 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio, o TTC que na reação é reduzido a 2,3,5- trifeniltetrazólio formazan (TPF). O formazan apresenta coloração avermelhada, cuja intensidade está diretamente relacionada à atividade metabólica microbiana (RYSOV-NIELSEN, 1975), como pode ser observado na figura 4.

Figura 4: Relação entre a cor do Formazan e a intensidade da atividade metabólica. Quanto mais escuro, maior concentração de Formazan no meio.



Fonte: Elaborada pela autora.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Este trabalho teve por objetivo avaliar a biodegradação de *n*-hexadecano por um consórcio de bactérias em microcosmos de sedimentos de manguezal, visando sua aplicação em biorremediação.

#### **3.2 Específicos**

1. Testar e implementar o protocolo da atividade desidrogenásica como forma de monitorar a degradação de *n*-hexadecano em sedimentos de manguezal.
2. Monitorar o desempenho de um consórcio de bactérias durante a biodegradação do *n*-hexadecano por contagem de células viáveis.
3. Avaliar a taxa metabólica do consórcio por determinação da atividade desidrogenásica.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e caracterização dos sedimentos de manguezal

As amostras de sedimentos de manguezal foram coletadas em uma região de raízes de *Rhizophora mangle* no manguezal do rio Pacoti, Ceará, durante a maré baixa (figura 5).

Figura 5: Área de coleta.



Os sedimentos foram coletados com o auxílio de um amostrador cilíndrico de PVC, com dimensões de 30 cm de comprimento x 10 cm de diâmetro. As amostras foram condicionadas em sacos plásticos e levadas ao Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTECH), do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Uma fração dos sedimentos foi utilizada para medir pH, salinidade, teor de matéria orgânica e granulometria e o restante foi armazenado a 4 °C até a montagem dos microcosmos.

Em laboratório, a fração dos sedimentos destinada às análises físico-químicas foi centrifugada (centrífuga UNIVERSAL 320R, Hettich) durante quinze minutos a 9720 g para retirada da água intersticial, a qual foi utilizada para a medição do pH e da salinidade. As medições foram realizadas em triplicada e o resultado foi obtido a partir da média dos valores. Para a determinação do teor de matéria orgânica total (MOT) e granulometria, as amostras

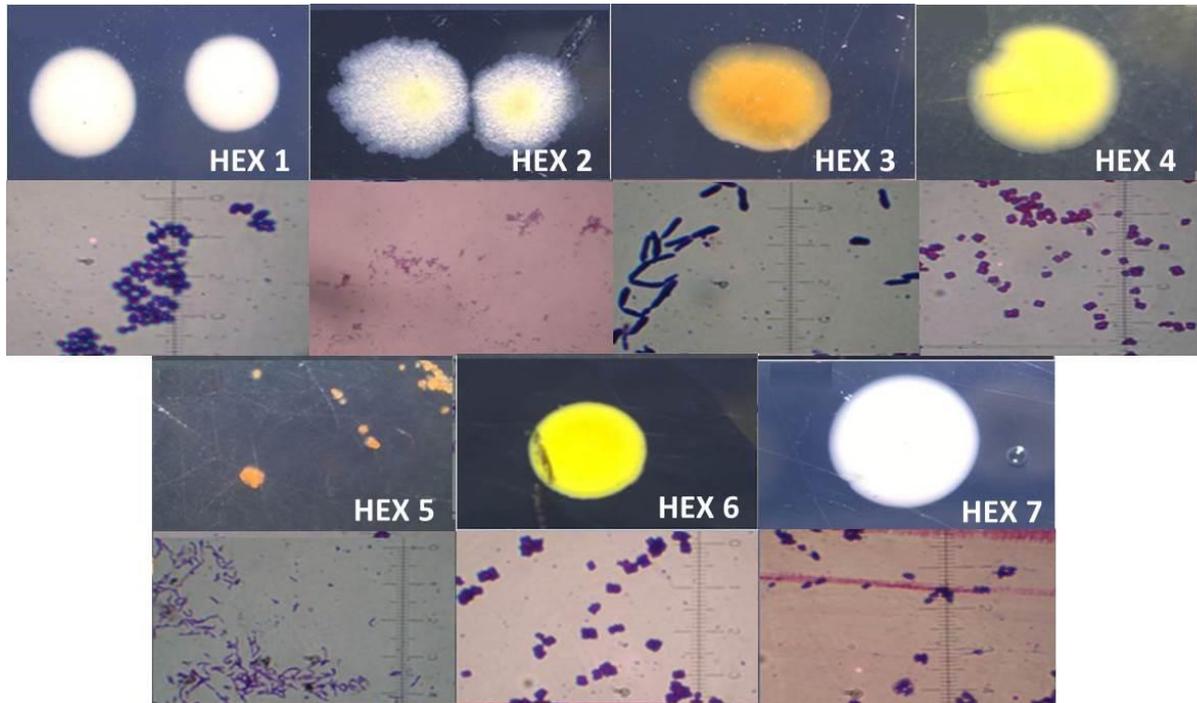
foram secas em estufa a 60 °C e depois maceradas. Para a obtenção da MOT, as amostras foram pesadas em triplicatas, em cadinhos secos, contendo 0,5 g de sedimentos cada; posteriormente foram colocadas em um forno a 550 °C por 4 horas para total combustão e determinação do peso residual. O cálculo da MOT foi realizado através da equação: MOT (g/Kg) = [(Mi – Mf) / Mi] \* 1000, na qual Mi consiste na matéria orgânica inicial e Mf na final (SCHULTE; HOPKINS, 1996).

Para a análise granulométrica, as amostras depois de secas foram fracionadas em triplicatas de 100 g cada. A pseudoréplica foi levada ao processo de peneiramento úmido, onde o sedimento foi lavado e peneirado para retirada dos grãos de tamanhos inferiores a 0,062 mm de diâmetro, visando à separação da fração lamosa da arenosa. A fração retida na peneira após a lavagem do sedimento foi novamente seca em estufa a 60 °C e submetida em seguida ao peneiramento mecânico em um conjunto de 12 peneiras de malhas de diâmetros diferenciados, indo do maior ao menor diâmetro. As frações retidas em cada peneira foram pesadas e os dados obtidos foram analisados em um programa de análise granulométrica (SUGUIO, 1973).

#### **4.2 Consórcio de bactérias hidrocarbonoclástico**

O consórcio de bactérias utilizado no presente estudo, denominado HEX, é composto por sete linhagens de bactérias que foram previamente isoladas em um cultivo de enriquecimento de sedimentos de manguezal com 1% de *n*-hexadecano por 45 dias, realizado por ANGELIM, 2012. Esse consórcio atualmente faz parte da coleção de micro-organismos do LEMBIOTECH e se encontra preservado em -80 °C (Figura 6).

Figura 6: Aspecto das colônias e células das linhagens de bactérias do consórcio HEX, cultivadas em meio ATGE com 2% (m/v) de NaCl. As colônias foram fotografadas em lupa com aumento de 400x e as lâminas foram coradas pelo método de Gram e fotografadas em microscópio óptico com aumento de 1000x.



Fonte: Elaborada pela autora.

Tais linhagens de bactérias foram isoladas de uma área de manguezal contaminada com petróleo na Baía de Todos os Santos- BA, próximo a Refinaria Landulpho Alves-Mataripe. Os isolados foram identificados por Angelim e colaboradores (2012) através do sequenciamento do gene codificador para o RNAr 16S, como pertencentes aos gêneros mostrados na tabela seguinte.

Tabela 3: Identificação molecular e classificação taxonômica das linhagens de bactérias do consórcio HEX.

<b>Isolados</b>	<b>Filo</b>	<b>Classe</b>	<b>Gênero</b>
<b>HEXBA01</b>	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>
<b>HEXBA02</b>	Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Gordonia</i>
<b>HEXBA03</b>	Não identificada	Não identificada	Não identificada
<b>HEXBA04</b>	Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>
<b>HEXBA05</b>	Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Gordonia</i>
<b>HEXBA06</b>	Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i>
<b>HEXBA07</b>	Não identificada	Não identificada	Não identificada

Fonte: ANGELIM, 2012.

#### 4.2 Ensaio de biorremediação em microcosmos de sedimentos de manguezal

Os microcosmos foram montados em tubos de vidro rosqueados, de dimensões de 15 cm de comprimento por 1,5 cm de diâmetro. Em cada um deles foi pesado 2 g de sedimento de manguezal; onde em seguida, os microcosmos foram autoclavados a 121°C durante 60 minutos. Amostras de sedimentos recém-autoclavadas foram diluídas até  $10^{-5}$  em solução salina esterilizada e plaqueadas em meio Ágar Triptona Extrato de Levedura (ATGE). Após incubação a 30 °C por 48 horas foi feita análise das placas para confirmação de que as condições da autoclavagem (tempo x temperatura) tinham sido adequadas para esterilizar sedimentos de manguezal, garantindo assim que toda atividade que iria ser medida no estudo seria da microbiota introduzida e não da microbiota nativa do sedimento.

Após a esterilização do sedimento, os microcosmos foram montados em quatro condições específicas. A condição SC representa o controle negativo, ou seja, condição sem fonte de carbono. A condição SCG representa o controle positivo, considerando que a glucose é uma fonte de carbono de fácil degradação e assimilação; a condição SCGH, além de glucose também recebeu *n*-hexadecano como fonte de carbono. Nesse caso, foi avaliada uma possível facilitação da degradação do *n*-hexadecano pela presença da glucose. A condição SCH representa a condição que se quer provar, ou seja, que o consórcio HEX é capaz de usar eficientemente *n*-hexadecano como única fonte de carbono em sedimentos de manguezal.

No microcosmo também foi adicionado um volume de água estéril com o objetivo de formar uma fina lâmina de água acima do sedimento para manter ajustar a atividade de

água em todos os microcosmos e mantê-la a mesma. O volume final de cada condição foi ajustado de forma a não ultrapassar o volume final de 500 µl. A composição de cada condição experimental encontra-se apresentada na tabela abaixo.

Tabela 4: Composição dos microcosmos de sedimento de manguezal nas diferentes condições testadas nesse estudo.

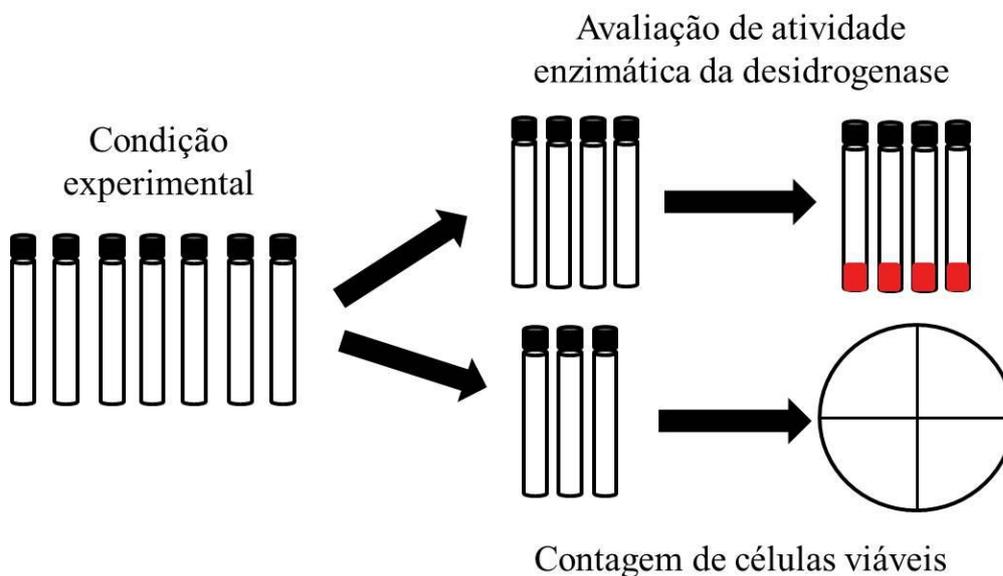
<b>Condição</b>	<b>Consórcio (10<sup>7</sup> UFC/mL)</b>	<b>Glucose 1%</b>	<b><i>n</i>- hexadecano 1%</b>	<b>Água (µL)</b>
<b>SC</b>	50 µl	-	-	450µL
<b>SCG</b>	50 µl	80 µl	-	370µL
<b>SCGH</b>	50 µl	80 µl	20 µl	350µL
<b>SCH</b>	50 µl	-	20 µl	430µL

Fonte: Elaborada pela autora.

Foram utilizados 280 microcosmos totais por experimento, os quais foram mantidos em temperatura constante e abertos somente dentro do fluxo laminar (Pa410, Pachane) para assegurar a esterilidade do sistema. As amostragens foram realizadas em dez tempos, envolvendo os dias 0, 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 21 e 25. Em tais dias, as amostragens foram feitas para realização dos ensaios de atividade enzimática e contagem de células viáveis, totalizando dez tempos de análises.

Para cada condição foram compreendidos sete microcosmos por tempo: quatro para o teste da desidrogenase e três para as contagens de células viáveis, totalizando 28 microcosmos por tempo de análise. Os microcosmos foram desmontados a cada dois dias e os dados compilados em tabelas e gráficos. A figura abaixo demonstra o esquema de desmonte realizado a cada tempo de análise por condição.

Figura 7: Esquema representativo do desenho experimental utilizado para monitorar biorremediação de *n*-hexadecano em microcosmos de sedimentos de manguezal. Sete microcosmos foram usados em cada condição experimental e desmontados nos tempos 0, 2, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 21 e 25 dias, sendo quatro microcosmos usados para pesquisa de atividade desidrogenase e três usados para contagem de células viáveis.



Fonte: Elaborada pela autora.

O uso de microcosmos para simular ecossistemas *in vivo* têm sido de grande importância para a obtenção de resultados confiáveis e verídicos de diversos experimentos, a importância deste tipo de experimento está ligada ao fato de permitirem uma análise da expressão e da dinâmica da comunidade em tempo real, permitindo monitorar, passo a passo, o processo de biodegradação.

#### ***4.2.1 Ativação do consórcio bacteriano e preparação de inóculo***

As linhagens bacterianas foram crescidas individualmente em meio ATGE 2% (m/v) por 48 horas e suas purezas foram confirmadas. A preparação do inóculo com o consórcio se iniciou dois dias antes da montagem do experimento. Inicialmente, cada linhagem foi crescida separadamente em caldo TGE salino (triptona, glicose, extrato de levedura e 2% (m/v) de NaCl) durante aproximadamente 16 horas a 30°C e agitação de 150 rpm (TE-420, TECNAL). Após esse período, cada cultura teve sua densidade óptica medida a 600 nm em espectrômetro (Thermo Scientific) e ajustada para 0,1. As linhagens formadoras do consórcio foram em seguida cultivadas conjuntamente em caldo TGE salino na proporção

de 5% (v/v), onde novamente cresceram por 16 horas nas mesmas condições anteriores, atingindo uma absorvância de 2,0 a 600 nm, equivalente a  $10^8$  UFC/mL. Esse consórcio foi centrifugado a 7870 g (Hettich, Universal 320) por 10 minutos para precipitação das células e descarte do meio de cultura, as células foram lavadas duas vezes em salina 0,9% (m/v), sob centrifugação nas mesmas condições, e por fim ressuspensas em 50 mL de salina.

#### ***4.2.2 Soluções de glucose e n-hexadecano***

Para o ensaio foi preparada uma solução estoque de glucose a 25% (m/v). Essa solução foi esterilizada por autoclavagem a 110 °C por 10 minutos. A concentração de glucose utilizada nos microcosmos foi 1% (v/v) da solução estoque. A quantidade de *n*-hexadecano adicionada aos microcosmos foi 1% (v/m) em relação à massa final de sedimentos. Antes de ser usado, o *n*-hexadecano foi filtrado em membrana polietersulfônica (PES) (TPP) de 0,45 µm.

#### ***4.2.3 Estudo de biodegradação de hexadecano utilizando as linhagens de bactérias do consórcio isoladamente***

Para avaliar o potencial de cada linhagem do consórcio separadamente para degradar *n*-hexadecano, apenas uma condição experimental foi testada, a condição onde a única fonte de carbono adicionada ao sedimento consistiu de *n*-hexadecano.

O procedimento experimental de preparação dos microcosmos foi o mesmo utilizado para o consórcio, ressaltando-se que foi utilizado como inóculo apenas uma única linhagem em cada microcosmo. Foram utilizados 420 microcosmos para avaliar os sete isolados em 10 tempos diferentes.

Cada isolado consistiu em um total de 60 microcosmos, onde a cada tempo de análise, seis microcosmos eram avaliados, dois para a contagem do número de células viáveis e três para o teste do TTC.

#### **4.3 Avaliação da carga bacteriana nos microcosmos**

Para a contagem de bactérias heterotróficas totais em cada tempo de análise foi utilizada a técnica de contagem em microgota (ROMEIRO, 2008). Nesse procedimento, os sedimentos de três microcosmos de cada condição foram suspensos em 20 mL de solução salina 0,9%, previamente esterilizada, e essa suspensão foi homogeneizada vigorosamente em

*vortex* (Vixar). Em seguida, essas suspensões foram seriadamente diluídas em solução de NaCl 0,9% até  $10^{-6}$  e alíquotas de 10  $\mu$ L foram inoculadas na superfície do meio ATGE-salino 2%, em quadruplicata. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 h, e em seguida, o número de colônias foi contado com o auxílio de uma lupa (Nikon, SMZ 745T), sendo os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/g de sedimentos. Os valores obtidos nas contagens nos diferentes tempos foram expressos em escala logarítmica e submetidos à análise de variância, ANOVA, e pós-teste de Tukey, com significância de 95% ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism 5.0*.

#### **4.4 Avaliação da atividade desidrogenásica nos microcosmos**

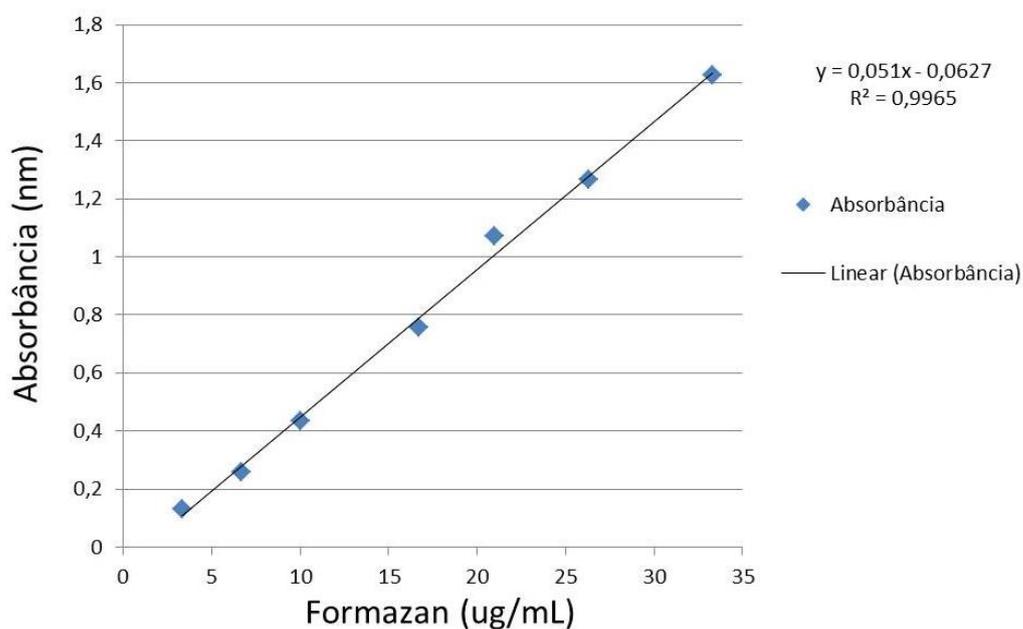
A pesquisa da atividade desidrogenásica foi feita pelo método do TTC (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio) de acordo com o protocolo desenvolvido pelo *Laboratory of Ecotoxicology and LCA- Department of Environmental Chemistry, ICT Prague*, com adaptações. A solução de TRIS-HCl 0,1 M teve seu pH ajustado para 7,6 devido ao pH neutro do sedimento. A solução após ajustada foi autoclavada a 121°C por 15 minutos e mantida estéril ao ser utilizada apenas no fluxo laminar.

A solução de TTC 1% (m/v) foi preparada diluindo 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (SIGMA) em TRIS-HCl 0,1M, (pH 7,6). Essa solução foi esterilizada em membrana de 0,22  $\mu$ m de polietersulfônica (PES) (TPP) e mantida estocada a 4 °C por no máximo uma semana.

A cada tempo de análise, quatro microcosmos por condição foram utilizados para determinação da atividade desidrogenásica. Para tanto foram adicionados 2 mL da solução de TTC a 3 microcosmos e no quarto microcosmo foi adicionado apenas o tampão TRIS 0,1M (controle), de forma a eliminar qualquer resposta que não estivesse relacionado à atividade enzimática. Todos os frascos foram recobertos com papel alumínio para evitar fotoxidação do produto formado. Os microcosmos foram agitados em *vortex* para permitir o contato de todo o sedimento com a solução de TCC ou do tampão. Em seguida foram mantidos a 25 °C, durante 24 h. Após esse período, foram adicionados 10 mL de acetona a cada microcosmo, seguido de outra agitação vigorosa, para solubilizar o formazan precipitado. As amostras foram centrifugadas a 4000 g por 10 minutos para recuperação da fase líquida. As soluções resultantes tiveram suas absorbâncias medidas a 485 nm tendo o controle como referência.

A curva padrão foi obtida utilizando-se o 1,3,5-trifeniltetrazólio formazan (SIGMA). Soluções de calibração com concentrações conhecidas foram preparadas e em seguida, tiveram suas absorbâncias medidas em espectrofotômetro (Thermo Scientific) a 485 nm. Os valores de absorbância obtidos nos experimentos foram colocados na equação da reta da curva padrão e as concentrações foram obtidas em  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 8).

Figura 8: Curva padrão obtida a partir de soluções de calibração com concentrações conhecidas de formazan.



Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores de concentrações obtidos foram classificados como paramétricos e submetidos à análise de variância, ANOVA, e pós-teste de *Tukey*, com uma significância de 95% ( $p < 0,05$ ). As estatísticas foram realizadas no programa *GraphPad Prism 5.0*.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização dos sedimentos

Os sedimentos utilizados nos microcosmos apresentaram valores médios de pH, salinidade, matéria orgânica e conteúdo de silte-argila na tabela abaixo.

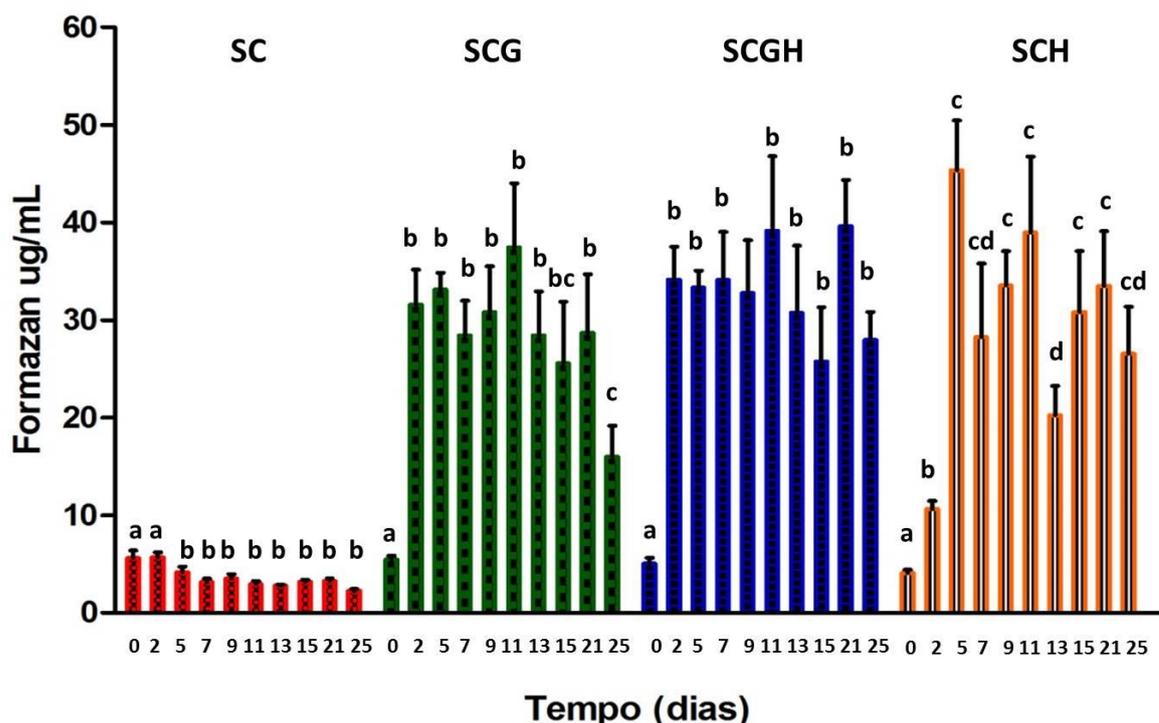
Tabela 5: Valores de pH, salinidade, matéria orgânica e teor de silte + argila encontrados no sedimento.

	<b>Média</b>				<b>Desvio Padrão</b>
<b>pH</b>	6,97	7,1	7	7,023333	0,068068593
<b>Salinidade</b>	45	45	45	45	0
<b>Matéria Orgânica (g/Kg)</b>	78,6	79,8	78,3	78,9	0,64807407
<b>Teor silte + argila (%)</b>	46,4	45,8	45,5	45,9	0,458257569

#### 5.2.1 Estudo da atividade metabólica do consórcio bacteriano em microcosmos de sedimento de manguezal contaminados com *n*-hexadecano

Os resultados da determinação da atividade desidrogenásica estão mostrados na figura abaixo.

Figura 9: Atividade metabólica do consórcio bacteriano HEX em microcosmos de sedimentos de manguezal submetidos aos seguintes tratamentos: SC= Sedimento e consórcio; SCG= sedimento, consórcio e glucose; SCGH= sedimento, consórcio, glucose e *n*-hexadecano; SCH= sedimento, consórcio e *n*-hexadecano. Atividade avaliada pelo método do TCC (2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio) e expressa em concentração de formazan. Letras iguais dentro de cada grupo de colunas significam resultados estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey



Fonte: Elaborada pela autora.

Na condição SC, controle negativo, a atividade desidrogenásica foi praticamente nula durante os 25 dias de monitoramento, demonstrando que os nutrientes dos sedimentos apenas mantiveram a população ao longo do experimento. Tal resultado obtido demonstra claramente, ao se comparar com as demais condições, que uma fonte de carbono externa promove toda a atividade metabólica e o crescimento celular do consórcio no sedimento de manguezal.

Na presença de glucose, condição SCG, a atividade enzimática foi significativamente detectada a partir do 2º dia, demonstrando que a glucose foi utilizada como fonte de carbono e energia. O uso deste composto proporcionou o aumento significativo da atividade metabólica no microcosmo, onde a concentração de formazan aumentou de 5,4 µg/mL (tempo zero) para 30,6 µg/mL (2º dia). A atividade metabólica manteve-se elevada

durante quase todo o experimento, começando a declinar significativamente após o 21º dia, quando provavelmente a glucose ou seus sub-produtos começaram a se esgotar. A partir desse dia, a concentração de formazan diminuiu significativamente, atingindo 18,1 µg/mL, no último dia (25º dia) de medição.

Na condição SCGH, onde glucose e *n*-hexadecano foram adicionados juntos, verificou-se um perfil semelhante à condição SCG. O rápido aumento da atividade metabólica e a manutenção da mesma durante todo o experimento. Em comparação com a condição SCG, a atividade enzimática ao final do experimento, nos dias 21 e 25, manteve-se alta com valores de 38,9 µg/mL e 28,9 µg/mL de formazan, respectivamente, sem apresentar declínio como na condição SCG. Isso demonstra que o consócio usou inicialmente a glucose, uma fonte de carbono mais facilmente assimilável, e posteriormente o *n*-hexadecano, mantendo a atividade enzimática alta no 25º dia.

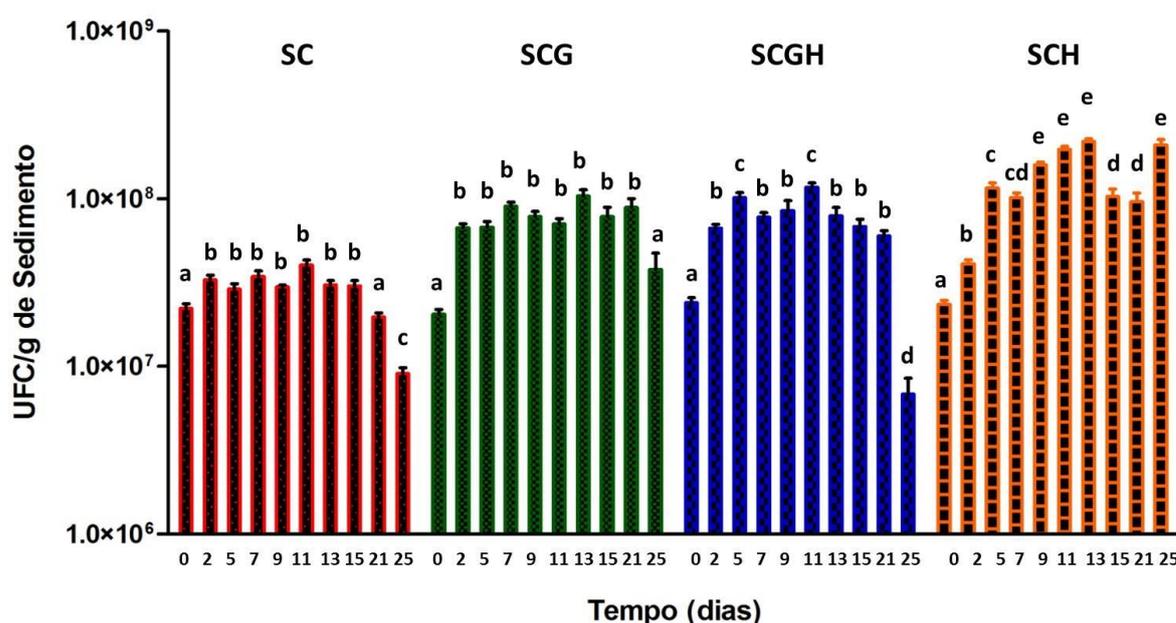
Na condição SCH, onde tinha apenas *n*-hexadecano como fonte de carbono e energia, verificou-se que a atividade metabólica aumentou mais lentamente, alcançando 45,9 µg/mL de formazan no 5º dia. Ao contrário das outras duas condições, onde a atividade foi elevada já no segundo dia. O início da atividade metabólica deve estar relacionado ao período necessário para ativar os genes de rotas metabólicas de degradação do *n*-hexadecano. Observaram-se quedas da atividade nos dias 7º e 13º, ambas seguidas de um aumento na atividade metabólica nos dias 11º e 21º dias, respectivamente. Isso sugere que a mineralização do substrato leva a formação de intermediários, que vão sendo metabolizados sequencialmente por membros do consócio. Nesse caso, geralmente, uma variedade metabólica é requerida para degradar os diferentes intermediários e isso só pode ser obtido quando se tem uma diversidade de micro-organismos que atuam em diferentes etapas da mineralização; onde o produto de degradação de um micro-organismo pode ser o substrato do outro.

O crescimento microbiano na condição SCH confirma que o consócio é capaz de usar *n*-hexadecano com única fonte de carbono, não havendo necessidade de se adicionar glucose como estímulo. Tais resultados reforçam o uso de consórcios microbianos como alternativa viável aos processos de biorremediação de sedimentos de manguezal contaminados.

### 5.2.2 Dinâmica de crescimento do consórcio bacteriano

Os resultados das contagens de células viáveis nos diferentes tempos de monitoramento da biodegradação utilizando a técnica de contagem em microgota estão representados na figura 10.

Figura 10: Crescimento do consórcio HEX em microcosmo de sedimentos de manguezal submetidos a diferentes tratamentos: SC= Sedimento e consórcio; SCG= sedimento, consórcio e glucose; SCGH= sedimento, consórcio, glucose e *n*-hexadecano; SCH: sedimento, consórcio e *n*-hexadecano. O crescimento foi monitorado por contagens de células viáveis e expresso em Unidades Formadoras de Colônias por grama de sedimentos (UFC/g). Letras iguais dentro de cada grupo de colunas significam resultados estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborada pela autora.

As contagens de células viáveis na condição SC foram mais baixas do que àquelas obtidas para os demais grupos. Os resultados obtidos mostraram que na realidade, o inóculo inicial praticamente manteve-se inalterado ao longo do período do experimento. Sendo significativamente menores no começo do experimento, 0 dias, e no final, 21 e 25 dias, onde o 25º dia apresentou os menores valores de número de células, sendo essa redução estatisticamente significativa. Esse resultado corrobora o resultado obtido com a medida da atividade metabólica, provando que o consórcio não encontrou nutrientes suficientemente metabolizáveis que sustentassem o aumento significativo da população.

Comparando a condição SC, com as demais (SCG, SCGH, SCH), observou-se que o inóculo inicial foi o mesmo para as quatro condições, e que o crescimento dos micro-

organismos ao longo do experimento variou. O número de células do consórcio aumentou significativamente apenas quando houve a presença de uma fonte externa de carbono; o que mostra que tanto a glucose como o *n*-hexadecano foram capazes de estimular a comunidade.

Na condição SCG percebe-se claramente que a glucose estimulou o consórcio bacteriano. No 2º dia de experimento as contagens apresentaram um aumento significativo em relação ao número inicial de células, atingindo valores de  $6,5 \times 10^7$  UFC/g, o que comprova o rápido consumo da glicose. Este crescimento expressivo refletiu no aumento da atividade metabólica no mesmo período, como demonstrado na análise de atividade desidrogenásica. O número de células se mantém constante durante todo o experimento, atingindo valor médio de  $8,0 \times 10^7$  UFC/g. Após o 21º dia, há um decaimento no número de células, atingindo valores de  $3,8 \times 10^7$  UFC/g no 25º dia de experimento, o que coincide com a redução da atividade metabólica observada no mesmo período, sugerindo a metabolização total da glucose.

Os resultados obtidos no microcosmo SCGH, onde tanto glucose como *n*-hexadecano foram adicionados, foram bem semelhantes àqueles encontrados na condição SCG. A glucose se mostrou o grande estímulo na condição SCGH para o crescimento celular e para a alta atividade metabólica. A glucose por ser uma fonte de carbono amplamente distribuída na natureza, de tamanho reduzido e de fácil assimilação se torna a fonte de carbono imediatamente utilizada quando está presente no ambiente, estimulando rapidamente a atividade metabólica e o crescimento celular.

Em relação ao crescimento celular encontrado nessa condição, já há um aumento significativo no 2º dia de experimento, com valores de  $6,6 \times 10^7$  UFC/g. No 5º dia, já se observou um novo crescimento significativo, com valores de  $1,0 \times 10^7$  UFC/g de células. Após o 5º dia houve uma redução no número de células, entre os dias 7 e 9, que foi seguido novamente por outro aumento significativo no 11º dia, com valores de  $1,2 \times 10^7$  UFC/g, que foi seguido por uma redução entre o 13º e 21º dias, e por fim um decaimento no 25º dia, atingindo  $6,8 \times 10^7$  UFC/g. Padrão semelhante àquele encontrado na atividade metabólica do consórcio na mesma condição experimental.

A condição SCH apresentou um perfil de crescimento celular bem diferente daquele encontrado na condição SC, mostrando que o consórcio bacteriano na condição SCH estava consumido *n*-hexadecano como fonte de carbono e se multiplicando. O perfil de crescimento em geral mostrou o mesmo perfil observado para atividade metabólica, com aumentos e reduções no número de células encontradas ao longo do experimento. Tanto a

atividade metabólica como o crescimento celular se mostraram mais tardios em comparação às condições que apresentavam glicose.

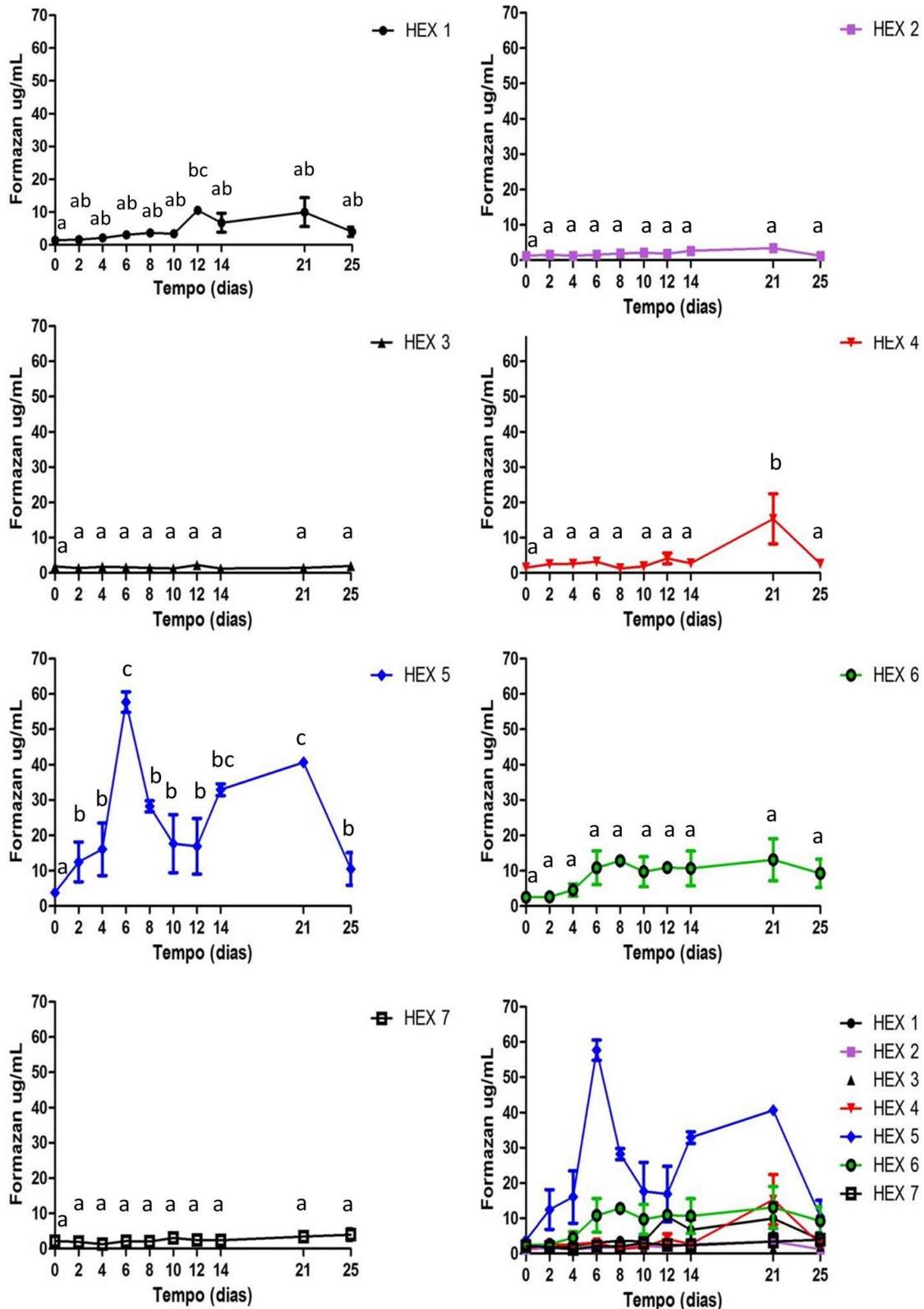
Diferente da condição SCG, o aumento do número de células ocorre em estágios, onde o número aumenta significativamente do inicial para o 2º dia, e do segundo dia para o 5º dia de experimento, atingindo  $1,15 \times 10^7$  UFC/g nesse tempo. Tal fato corrobora a hipótese de que na degradação do *n*-hexadecano é necessário um tempo para a ativação de genes e rotas metabólicas específicas para a degradação desse composto. Após o 7º dia, observou-se um novo crescimento significativo da comunidade entre os dias 9 e 13, atingindo  $1,9 \times 10^8$  UFC/g nesse período. Esse crescimento é seguido de uma redução significativa na população entre 15 e 21 dias de experimento, a qual é seguida de um novo aumento no 25º dia de experimento.

O grande crescimento celular encontrado no 25º dia de experimento nessa condição não é acompanhado pelo aumento da atividade metabólica no mesmo período, porém os números mais reduzidos de células nos dois tempos anteriores (15 e 21 dias) associados a uma maior taxa metabólica encontrada nesses mesmos tempos podem sugerir um crescimento tardio, onde o consumo da fonte de carbono estimula posteriormente o aumento do número de células.

### **5.3 Estudo da dinâmica de atividade metabólica dos isolados bacterianos**

A avaliação da atividade metabólica das linhagens de bactérias do consórcio isoladamente está mostrada na figura 11.

Figura 11: Atividade metabólica de isolados bacterianos em microscosmos de sedimentos de manguezal contaminados com *n*-hexadecano, expressa em função da atividade da enzima desidrogenase. Letras iguais significam resultados estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ), como comprovado pelo teste de análise de variância (ANOVA) com um pós-teste de Tukey.



Fonte: Elaborada pela autora.

Dentre as sete linhagens que compoem o consórcio, HEX5 e HEX6 destacaram-se como os principais degradadores, sendo capazes de iniciar a mineralização do *n*-hexadecano e de usar alguns dos subprodutos gerados.

A HEX5 apresentou os melhores resultados em relação à atividade metabólica, a qual se mostrou bem mais rápida em comparação àquela encontrada nos demais isolados. Pode-se observar que logo nos dois primeiros dias de experimento já há uma atividade relativamente alta, a qual atingiu seu primeiro pico significativo em torno do 6º dia, com concentrações de formazan atingindo 57,7 µg/mL. Essa alta atividade coincide com o período do primeiro pico de atividade desidrogenásica encontrado na condição SCH nos experimentos utilizando o consórcio, demonstrando que essa atividade pode ser atribuída principalmente a HEX5. Após esse primeiro pico, a atividade diminuiu nos dias seguintes, observando-se uma redução mais abrupta no 8º dia, a qual se mantém até o 12º dia.

Essa queda na atividade metabólica que ocorre entre o 6º e o 8º dia pode estar relacionada à mudança da fonte de carbono. Após a degradação inicial do *n*-hexadecano, são gerados metabólitos secundários, resultantes da quebra sequencial da cadeia de carbonos. Nesse contexto, uma queda na atividade pode ocorrer devido ao tempo requerido para outros genes serem ativados e novas enzimas serem produzidas para a degradação tais compostos. Isso é ainda mais sugerido pelo fato de logo após a queda no 8º dia a atividade se estabilizar ao invés de continuar decaindo. No 14º dia houve um novo aumento significativo do metabolismo dos micro-organismos, o qual culminou em um novo pico ao 21º dia com concentrações de 40,6 µg/mL de formazan. No final do experimento, 25º dia, observou-se que a atividade voltou a cair, reduzindo os valores de formazan para 10,5 µg/mL, sugerindo a exaustão da fonte de carbono.

HEX6 também se mostrou capaz de iniciar a degradação do *n*-hexadecano e de usar intermediários da degradação, haja vista que a atividade metabólica foi constante durante todo o experimento, embora bem mais baixa do que a atividade enzimática de HEX5. A HEX 6 mostrou um pico de atividade metabólica, apesar de não ter se mostrado significativo estatisticamente, no 6º dia de experimento, atingindo uma concentração de 10,9 µg/mL de formazan que se manteve constante até o fim do experimento, no 25º dia.

As demais linhagens ou não foram capazes de usar o *n*-hexadecano diretamente como fonte de carbono, como HEX2, HEX3 e HEX7, ou começaram a degradar tardiamente esse composto, como HEX1 e HEX4. A HEX 1 mostrou-se significativamente diferente a

partir do 2º dia de análise, a qual se manteve constante até o 10º dia de experimento. Após esse período, a atividade apresentou um aumento significativo no 12º dia, alcançando concentrações de 10,5 µg/mL. Essa atividade se manteve constante até o 21º dia, seguido de decaimento da atividade no 25º dia. Apesar desse decaimento não ter se mostrado estatisticamente significativo, pode-se supor que houve a metabolização total do composto. Por fim, a HEX 4 foi o isolado que apresentou a resposta metabólica mais tardia. Seu pico de atividade ocorreu apenas no 21º dia, seguido pelo decaimento da atividade metabólica no 25º dia, sugerindo um rápido consumo do substrato neste curto espaço de tempo.

Esses resultados mostram que embora essas linhagens sejam provenientes de consórcio obtido por enriquecimento de 45 dias com *n*-hexadecano como única fonte de carbono (ANGELIM, 2012), algumas linhagens isoladamente não são capazes de iniciar a degradação do composto. Essas linhagens, quando em consórcio, devem utilizar intermediários tardios da rota de biodegradação ou auxiliar as demais linhagens na degradação do composto, sendo fonte de metabólitos, co-fatores, que auxiliam nesse processo.

## 6 DISCUSSÃO

O ensaio da atividade da enzima desidrogenase em solo contaminado pode ser utilizado como um método simples de avaliar e quantificar a atividade metabólica dos microorganismos e do possível efeito inibitório de contaminantes nas atividades microbianas do solo, assim como a capacidade de degradação dos contaminantes pela microbiota (BALBA; AL-AWADHI; AL-DAHER, 1998).

De acordo com Schaffner e colaboradores (1996), os fatores que controlam a densidade populacional e a diversidade de bactérias em solos incluem fatores físico-químicos e biológicos. Os fatores físico-químicos incluem o carbono orgânico, receptores de elétrons, o potencial de oxidação-redução, nutrientes inorgânicos, pH, teor de água, temperatura, salinidade, e textura do solo. A densidade da população bacteriana geralmente diminui com a profundidade, em função da disponibilidade de carbono orgânico e de oxigênio molecular. Já os fatores biológicos incluem a competição por recursos, predação por protozoários, microartrópodes e inibidores metabólicos. Considerando tais fatores e sob condições de crescimento ótimas, a abundância microbiana no solo pode exceder  $10^8$  unidades formadoras de colônias por grama de solo (UFC/g) para as bactérias. No entanto, em solos que passam por processo de recuperação, as densidades populacionais geralmente variam entre  $10^4$  e  $10^7$  UFC/g.

Em experimentos de solos poluídos por óleo, um aumento na atividade de desidrogenase é atribuído à adaptação e reprodução dos degradadores de hidrocarbonetos. A biomassa microbiana do solo é um importante indicador do estado da vitalidade do solo. Esse método é recomendado para determinar os efeitos dos compostos orgânicos na microbiota do solo e é utilizado para solos contaminados com diferentes compostos orgânicos (MARGUESIN, ZIMMERBAUER, SCHINNER, 2000).

Em um estudo de monitoramento de biorremediação através das atividades biológicas do solo, realizado por Marguesin e colaboradores (2000), foi mostrado que o conteúdo de hidrocarbonetos encontrados no solo se correlaciona positivamente com a biomassa ( $P < 0.001$ ) e com a atividade desidrogenásica, ( $P < 0.01$ ).

Os resultados obtidos neste estudo em relação à degradação do *n*-hexadecano foram relacionados à variação da atividade enzimática da desidrogenase e das contagens de número de células viáveis nos dez tempos de análise do monitoramento dos microcosmos.

A condição SC deste experimento, caracterizada por constituir apenas o sedimento e o consórcio, apresentou os menores valores tanto de atividade metabólica quanto

de crescimento, com ambos sendo praticamente nulos. Esta condição funcionou como controle negativo, servindo para mostrar o comportamento do consórcio em meio contendo apenas nutrientes encontrados no sedimento do manguezal. Portanto, o crescimento observado nas demais condições está diretamente relacionado à adição das demais fontes de carbonos.

O crescimento dos micro-organismos do solo é limitado predominantemente pela fonte de carbono disponível (LEMANSKI; SCHEU, 2014), portanto quantidades reduzidas de substrato limitam o crescimento microbiano, como foi observado no controle. De acordo com CHENU e colaboradores (2001), a maioria dos estudos sobre distribuições microbianas na estrutura de solo mostram que os micro-organismos respondem rapidamente a um substrato local disponível, utilizando-o como fonte de carbono e energia.

A condição SCG, diferentemente do controle, apresentou aumento significativo do crescimento e atividade metabólica. Esse comportamento pode ser associado ao fato da glucose ser uma fonte de carbono facilmente metabolizável pela maioria dos seres vivos. Tal tratamento funcionou como controle positivo, visando conhecer o perfil metabólico do consórcio microbiano utilizando uma fonte de carbono de fácil degradação.

Matéria orgânica de baixo peso molecular, como ácidos orgânicos, aminoácidos e açúcares, tem pouco tempo de residência no solo devido a sua rápida captação e assimilação pelos micro-organismos (VAN HEES *et al.*, 2005). Portanto, uma fonte de carbono como a glucose é rapidamente assimilada pela população local, estimulando o crescimento celular e provocando o aumento da taxa metabólica, sendo mineralizada a CO<sub>2</sub> e água.

A terceira condição SCGH teve duas fontes de carbono distintas adicionadas ao sedimento, a glucose e o *n*-hexadecano. O perfil da atividade metabólica foi bastante semelhante àquele encontrado na condição SCG, porém manteve-se alta ao final do experimento, dias 21 e 25, em contraste com o decaimento estatisticamente significativo apresentado no mesmo período pela condição SCG. A manutenção de atividade ao final do experimento no 25º dia, provavelmente, deve estar relacionada à atividade de degradação de *n*-hexadecano. A glucose foi o grande estímulo para o crescimento celular e atividade metabólica inicial, já que o crescimento e atividade metabólica tiveram início no 2º dia como apresentado na condição anterior.

A condição SCH envolveu avaliar a taxa de degradação do *n*-hexadecano como única fonte de carbono. Nessa condição foram encontrados altos valores de atividade metabólica e crescimento celular durante o experimento demonstrando a utilização do *n*-hexadecano como fonte de carbono, visto que na condição controle (SC), que possuía as

mesmas condições exceto pela fonte adicional de carbono (*n*-hexadecano), não ocorreram elevações de atividade metabólica.

Na condição SCH o aparecimento do 1º pico de atividade apenas no 5º dia, em contraste com as condições SCG e SCGH, que apresentaram atividades no 2º dia, sugere que alguns ou todos os micro-organismos do consórcio precisam de tempo para se adaptar às condições do ambiente contaminado, e para tal, um conjunto de genes envolvidos na degradação de *n*-hexadecano precisa ser ativado.

Em estudos voltados à degradação de compostos orgânicos torna-se necessário a compreensão do período requerido à adaptação do micro-organismo a determinado composto, sendo este o tempo de indução das enzimas responsáveis pelo consumo dos contaminantes (NIGAM; PHALE; WNGIKAR, 2012; JACQUES *et al.*, 2007).

Em um estudo semelhante ao realizado nesse trabalho, Mao e colaboradores (2012) montaram um microcosmo para investigar a capacidade de um consórcio bacteriano de biorremediar um solo contaminado por HPAs. Os resultados obtidos mostraram que no controle do experimento, constituído pelo sedimento estéril e o consórcio, o tamanho da população heterotrófica se manteve constante durante o experimento. Em contraste, contagens microbianas muito altas foram observadas quando o consórcio e contaminantes foram adicionados nos diferentes tratamentos.

Ramsay e colaboradores (2000) em estudo dos efeitos da biorremediação na comunidade microbiana em manguezais contaminados com óleo também mostraram que a contagem de bactérias aeróbias heterotróficas nas amostras de sedimento do controle experimental se manteve relativamente constante durante o período do estudo. Nas amostras contaminadas por óleo e submetidas a processos de biorremediação houve aproximadamente um aumento cem vezes maior nas contagens das células viáveis em comparação ao controle.

A biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos por micro-organismos pode ser melhorada aumentando a sua biodisponibilidade através da solubilização ou emulsificação, ou por aderência e captação do óleo diretamente da interface óleo-água (MISHRA; SINGH, 2012; STROUD; PATON; SEMPLE, 2008). Os micro-organismos possuem diversas estratégias para superar a baixa solubilidade dos *n*-alcanos e facilitar o seu transporte através da membrana. A natureza hidrofóbica da superfície da parede celular bacteriana possui um papel importante, já que o contato com substratos hidrofóbicos é crucial para o estágio inicial da degradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos mediada pelas oxigenases associadas à superfície celular.

No caso de *n*-alcanos de cadeia longa, existem dois mecanismos de captura. O primeiro envolve o acesso interfacial do hidrocarboneto pelo contato direto com a célula, mediada pela hidrofobicidade da superfície celular, e a segunda é mediada por biosurfactantes, os quais facilitam o contato das células com esses compostos (BOUCHEZ-NAITALI *et al.*, 2001; WENTZEL *et al.*, 2007; MISHRA; SINGH, 2012; STROUD; PATON; SEMPLE, 2008). A hidrofobicidade da superfície celular, a pseudo-solubilização e o acúmulo do hidrocarboneto intracelularmente já foram provados em relação à biodegradação do *n*-hexadecano (MISHRA; SINGH, 2012).

As quedas mais bruscas de atividade e de crescimento celular observadas na condição SCH devem estar relacionadas à degradação de produtos intermediários gerados da degradação do *n*-hexadecano, que levam a uma adaptação da comunidade e geram uma transação/alteração do perfil da mesma no sedimento. O processo de mineralização do composto pode não ser direto e diversos intermediários podem ser formados até a degradação completa do hidrocarboneto.

Os produtos intermediários formados pela degradação de *n*-alcanos também servem como fontes de carbono e energia para as bactérias degradadoras de alcanos (DASHTI *et al.*, 2008). Nesses casos, geralmente uma variedade metabólica é requerida para degradar os diferentes intermediários. Essa variedade metabólica pode ser obtida quando se tem uma variedade genética, onde os micro-organismos atuam em diferentes etapas da mineralização, onde o produto de um pode ser o substrato do outro. Além desses fatores, a degradação de hidrocarbonetos por co-metabolismo microbiano torna-se essencial, já que compostos considerados tóxicos para um determinado micro-organismo podem servir de fonte de carbono para outro (WETLER-TONINI; REZENDE; GRAVITOL, 2011).

Singer e Finnerty (1984) observaram a degradação terminal do *n*-hexadecano por *Acinetobacter* HO1-N e *Pseudomonas putida* e identificaram cinco intermediários diferentes durante a degradação desse composto, como o *n*-hexadecilhidroperoxidase, *n*-hexadecanol, *n*-hexadecilaldeído, ácido *n*-hexadecanóico e *n*-hexadecil-*n*-hexadecanoato no processo de degradação. Os resultados obtidos nesse estudo demonstram e comprovam a formação de metabólitos intermediários durante o processo de mineralização do *n*-hexadecano, o que pode corroborar os padrões de degradação e crescimento celular durante o processo de degradação na condição SCH.

Associada a uma mudança no substrato disponível para degradação pode ocorrer a uma alteração no perfil da comunidade naquele momento, já que a fonte de carbono disponível se modifica. A cada metabólito secundário que é formado, o requerimento

enzimático necessário para quebrar a cadeia do composto pode modificar, o que potencialmente leva a uma ativação de novos genes específicos, seja esta ativação dentro da mesma população que já degradou o composto anterior, ou de outra população dentro da comunidade. Usando a técnica do DGGE, Tian e colaboradores (2008) verificaram uma variação significativa na composição da comunidade bacteriana de acordo com a presença de hidrocarbonetos de baixo peso molecular ou de alto peso molecular. O número de espécies dominantes degradando determinado composto pode ser maior ou menor.

Resultados obtidos por Mao e colaboradores (2012) também mostraram mudanças na estrutura da comunidade bacteriana do solo em experimentos de microcosmo para a degradação de HPAs. Ao longo dos 56 dias de experimento, uma mudança significativa na estrutura da comunidade foi percebida pela presença de algumas bandas em diferentes tempos analisados. Os perfis de DGGE do experimento foram diferentes daqueles encontrados no tempo zero.

Os vários exemplos de biodegradação de *n*-hexadecano por consórcios de bactérias corroboram com os resultados encontrados neste estudo, onde se pode inferir que as altas taxas metabólicas encontradas no experimento se correlacionam com a mineralização do *n*-hexadecano.

Mishra e Singh (2012) realizaram experimentos para avaliar a biodegradação do *n*-hexadecano em meio mineral salino na concentração de 1% (v/v) por três cepas bacterianas distintas, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus* sp. e *Ochrobactrum intermedium*. Os resultados obtidos em dois dias de incubação mostraram que *Rhodococcus* sp., *P. aeruginosa* e *O. intermedium* degradaram respectivamente 81%, 50% e 23% do *n*-hexadecano disponível, e ao final dos dez dias de experimento, as taxas de degradação aumentaram para 95%, 99% e 92% respectivamente. Este estudo também revelou a atividade da álcool desidrogenase no processo de degradação do *n*-hexadecano por essas três linhagens. Os resultados obtidos mostraram que o auge da atividade enzimática ocorreu entre o 4º e 6º dia, o que é semelhante ao que foi encontrado na condição SCH nesse estudo.

Dentre os micro-organismos já estudados para a degradação de alcanos, a oxidação terminal é conhecida como a principal via de degradação desses hidrocarbonetos e as enzimas degradativas que realizam essa degradação são comumente codificadas em plasmídios. Na degradação de alcanos, a álcool desidrogenase consiste em uma das principais enzimas envolvidas nesse processo (MISHRA & SINGH, 2012).

Estudo do efeito do *n*-hexadecano em culturas mistas, realizado por ABDEL-MAGEED e colaboradores (2010) mostrou a capacidade e a eficiência de degradação de um

consórcio composto por três cepas na degradação de *n*-hexadecano em meio mineral em três diferentes concentrações. Esse consórcio foi capaz de degradar o *n*-hexadecano em concentrações de até 120 ppm em 12 dias de experimento, o que sugere fortemente a degradação completa do *n*-hexadecano sem o acúmulo de substâncias inibitórias ou metabólitos tóxicos para os micro-organismos. Cerca de 75% (90 ppm) de *n*-hexadecano foi degradado após o segundo dia, e 100% (120 ppm) do *n*-hexadecano foi degradado após o 5º dia. A biodegradação aumentou rapidamente e o metabolismo foi alto o suficiente para manter a estabilidade da atividade bacteriana. As três bactérias tiveram seu pico de crescimento entre 8 e 10 dias de experimento e atingiram o crescimento máximo de  $10^7$  células/mL nesse mesmo período. O crescimento máximo está correlacionado positivamente com a assimilação máxima do *n*-hexadecano; após esse período tanto o crescimento celular quanto a quantidade de *n*-hexadecano decaíram.

Esse experimento reforça o resultado obtido por Marguesin e colaboradores (2000), que apesar das matrizes serem diferentes, o resultado obtido em relação ao conteúdo de hidrocarbonetos encontrados no solo se correlaciona positivamente com a biomassa ( $P < 0.001$ ).

Um outro estudo realizado em microcosmos de solo por Stroud e colaboradores (2008) testou a capacidade de mineralização do *n*-hexadecano pela microbiota indígena em um solo não esterilizado e a capacidade de degradação de um consórcio bacteriano de degradadores de hidrocarbonetos em um solo estéril. Os resultados obtidos demonstraram que tanto a microbiota indígena como o consórcio foram capazes de degradar o *n*-hexadecano. A maior diferença encontrada entre os dois experimentos foi a taxa de mineralização inicial do *n*-hexadecano, que foi aumentando lentamente com a microbiota indígena ao longo de 14 dias, que em comparação com o consórcio apresentou uma taxa de mineralização bem mais rápida, que aumentou de 0% para 40% em apenas dois dias de experimento.

Roy e Greer (2000) analisaram a degradação do *n*-hexadecano em solos contaminados com diesel. A concentração inicial desse contaminante no sedimento consistia em 100 ppm. Nos experimentos realizados por esses dois pesquisadores, a própria microbiota indígena do solo foi capaz de mineralizar o *n*-hexadecano em aproximadamente 40% em cinco dias de experimento.

A ordem de degradação dos compostos do petróleo é: *n*-alcanos, iso-alcanos, alcanos de médio peso molecular e aromáticos, compostos refratários como alcanos policíclicos pesados e aromáticos, esteranos, terpanos, resinas e asfaltenos (ATLAS, 1981; BRITO *et al.*, 2009). É comumente aceito que a biodegradação de hidrocarbonetos de baixo

peso molecular ocorre muito mais rápida e extensivamente do que a dos de alto peso molecular. Alcanos apresentam estruturas químicas menos complexas, as quais devem ser mais fáceis de degradar (ATLAS, 1981), portanto o período experimental de 25 dias para a degradação do *n*-hexadecano, um *n*-alcano de cadeia média e simples, se mostra suficiente para a total mineralização desse composto.

Um fator que se encontra diretamente relacionado à atividade metabólica consiste na concentração de oxigênio disponível. Um aumento na captação de oxigênio denota um aumento da respiração microbiana, e uma mineralização mais exaustiva dos substratos deve ser esperada (YUAN *et al.*, 2013; RAMSAY *et al.*, 2000; OUDOT, 1989). Neste estudo, os experimentos foram realizados em presença de oxigênio a fim de auxiliar a atividade desidrogenásica.

A degradação em condições naturais pode ocorrer além da ação microbiana, podendo acontecer por fotodegradação e/ou evaporação. Usualmente, micro-organismos mantidos *in vitro* não possuem outra fonte de carbono a não ser o contaminante (BRITO *et al.*, 2009), e por serem sistemas totalmente fechados, a degradação resultante por fatores naturais não devem ocorrer, se ocorrerem, são irrelevantes. Outro fator relevante nesses processos de biorremediação consiste nas linhagens de bactérias utilizadas no processo. Para a biorremediação mediada por micro-organismos a disponibilidade e a seleção de micro-organismos degradadores eficientes, além da sua sobrevivência nos ecossistemas introduzidos, são critérios-chaves para o sucesso do processo. O esquema *r* e *k* de biorremediação propõe que a evolução favorece a adaptação bacteriana tanto através de uma alta taxa de reprodução (*r*-estrategistas) ou através da utilização ótima das fontes ambientais (*k*-estrategistas) (SHEN *et al.*, 2008; DORODNIKOV *et al.*, 2009).

As bactérias do gênero *Micrococcus* são conhecidas por serem *k*-estrategistas em seu metabolismo biodegradativo (SLABBERT, 2008). São também classificadas como Gram-positivas e pertencentes ao filo Actinobacteria. São comumente conhecidos por serem eficazes na metabolização de contaminantes, incluindo hidrocarbonetos. São considerados bons candidatos para aplicação em biorremediação de sedimentos. Esse grupo também é capaz de metabolizar uma variedade de fontes de carbono, polímeros complexos, tais como a lignina e possuem algumas características vantajosas de fungos, como produção de esporos, crescimento micelial e produção de enzimas extracelulares (MACCARTHY; WILLIAMS, 1992; SLABBERT, 2008). São recorrentemente relatadas em diversos trabalhos como cepas degradadora de hidrocarbonetos (SANTOS *et al.*, 2011; BRITO *et al.*, 2009; RAMSAY *et al.*, 2000).

Dentre os isolados considerados mais importantes neste estudo, as bactérias HEX 4 e HEX 6, classificadas como *Micrococcus* sp. são conhecidas por apresentarem um crescimento do tipo *k*-estrategista (VIGO, 2009), portanto o crescimento celular e as taxas metabólicas mais lentas apresentadas por esses micro-organismos corroboram a sua classificação como *k*-estrategistas. Um estudo realizado em um manguezal da Austrália mostrou que a cepa de *Micrococcus* utilizada degradou alcanos em uma taxa mais lenta do que as cinco outras cepas utilizadas no experimento (RAMSAY *et al.*, 2000).

A HEX 5 é uma bactéria Gram-positiva do gênero *Gordonia* e também pertencente ao filo Actinobacteria. Como *Micrococcus* sp., é comumente caracterizada como *k*-estrategista. Porém, tal comportamento não foi observado neste estudo, onde HEX 5 apresentou um comportamento típico de bactérias com crescimento *r*-estrategista, com uma alta taxa de reprodução e de atividade metabólica.

Estudos realizados por Asvapathanagul e colaboradores (2012) mostraram que quando as relações de nutriente/massa são altas, as bactérias desse gênero podem mudar para uma estratégia do tipo *r*, já que o substrato não é um fator limitante. É o que se pode observar no experimento, onde a fonte de carbono é abundante e não há competição interespecífica, permitindo pleno crescimento do micro-organismo.

Hidrocarbonetos de baixo peso molecular podem ser metabolizados por linhagens isoladas ou composições simples de espécies (TIAN *et al.*, 2008). Além disso, existe a possibilidade da bactéria excretar compostos (exoenzimas ou surfactantes) que podem reduzir suficientemente a tensão superficial do óleo, e permitir a formação de microemulsões, ou a pseudo-solubilização dos hidrocarbonetos, e conseqüentemente a sua captação (REDDY *et al.*, 1982). Porém não é fácil entender como o óleo é incorporado ou quão diferentemente os hidrocarbonetos atravessam a membrana bacteriana para alcançar as enzimas metabólicas do citoplasma (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995).

Na literatura, o gênero *Gordonia* é descrito como produtor de lipopolissacarídeos com atividade emulsificante localizados na parede celular (LIN *et al.*, 2005). Esses compostos desempenham importantes funções fisiológicas como a emulsificação dos hidrocarbonetos, aumentando a sua biodisponibilidade e facilitando o transporte desses compostos para dentro da célula (BEAL; BETTS, 2000; MISHRA; SINGH, 2012). A produção desses compostos pela HEX 5 pode ser um dos responsáveis pelo rápido crescimento e pelas altas taxas metabólicas apresentadas por esse isolado. Além disso, nos experimentos realizados com o consórcio, o primeiro pico de atividade e de crescimento podem estar mais estritamente relacionados à essa linhagem.

As bactérias do gênero *Sphingomonas* são pertencentes ao filo Proteobacteria, o qual é considerado como o de maior ocorrência e diversificação na natureza, sendo encontrado em diferentes ambientes devido à grande variedade metabólica que apresentam para a obtenção de energia (GARRITY; BELL; LILBURN, 2004). Os organismos contidos neste filo são todos gram-negativos, e são considerados eficazes na degradação de hidrocarbonetos, incluindo os compostos aromáticos (ATLAS, 1981; MANDIGAN; MARTINKO; PARKER, 2010).

Segundo Zhang *et al.*, 2006, as bactérias do gênero *Sphingomonas* são reconhecidas por serem *k*-estrategistas e por crescerem melhor em baixas concentrações de nutrientes/ substratos. Dentre as linhagens do consórcio, a HEX 1 é classificada como *Sphingomonas* sp. O seu comportamento ao ser cultivada em sedimento com *n*-hexadecano revela o seu crescimento do tipo *k*, pois o seu crescimento celular e atividade metabólica passam a ser mais relevantes da metade para o fim do experimento. Da mesma maneira que HEX 4 e HEX 6, é provável que esse isolado tenha maior atividade quando a concentração do *n*-hexadecano no sedimento já se encontra bem mais reduzida do que àquela encontrada no início do experimento.

Os estudos com consórcios bacterianos têm se mostrado muito promissores para o seu uso nos processos de biorremediação por seus efeitos sinérgicos (YU *et al.*, 2005). Tais experimentos servem para elucidar a eficiência de linhagens de bactérias para recuperação de manguezais contaminados por óleo.

## 7 CONCLUSÃO

A implementação da metodologia do uso do TTC como forma de monitorar a degradação do *n*-hexadecano em sedimentos manguezais em distintas condições foi eficaz, o que demonstra o potencial dessa metodologia para aplicações em estudos de processos biorremediativos em área contaminadas por hidrocarbonetos nesse tipo de ecossistema.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram a eficiência e exequibilidade de se usar um consórcio de bactérias, com espécies dos gêneros *Micrococcus*, *Sphingomonas* e *Gordonia*, em processo de biorremediação de área impactadas com *n*-hexadecano. Além disso, esse estudo mostrou que não é necessária a adição de glucose para acionar a degradação desse poluente pelo consórcio.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAGEED, A.; AL-HARBI, N.; AL-DEYAB, S. Hexadecane degradation by bacterial strains isolated from contaminated soils. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 44, p. 7487-7494, 2010.
- AISLABIE, J. M.; RYBURN, J.; GUTIERREZ-ZAMORA, ML.; RHODES, P.; HUNTER, D.; SARMAH, A. K.; BARKER, G. M.; FARRELL, R. L. Hexadecane mineralization activity in hydrocarbon-contaminated soils of Ross Sea region Antarctica may require nutrients and inoculation. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 45, p. 49-60, 2012.
- ALONGI, D. M. Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate changes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, vol. 76, p. 1-13. 2007.
- ALONGI, D. M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental Conservation**, v. 29, n. 3, p. 331-349. 2002.
- ALONGI, D. M. **The Energetics of Mangrove Forests**. Springer, Heidelberg. 2009.
- ALONGI, D. M.; SASEKUMAR, A.; CHONG, V. C.; PFITZNER, J.; TROTT, L. A.; TIRENDIA, F.; DIXON, G. J.; BRUNSKILLA, G. J. Sediment accumulation and organic material flux in a managed mangrove ecosystem: estimates of land-ocean-atmosphere exchange in peninsular Malaysia. **Marine Geology**, v. 208, p. 383-402. 2004.
- ALVAREZ, P. J. J.; ILLMAN, W. A. **Bioremediation and Natural Attenuation: Process Fundamentals and Mathematical Models**. New Jersey: Copyright John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2006, p.612.
- ANGELIM, A. L. **Seleção e imobilização de consórcio de bactérias hidrocarbonoclásticas e produtoras de compostos ativos de superfície para aplicações em processos de biorremediação**. 2012. Tese (Doutorado em Rede Nordeste de Biotecnologia) - RENORBIO, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- ANGELIM, A. L.; COSTA, S. P.; FARIAS, B. C. S.; AQUINO, L. F.; MELO, V. M. M. An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. **Journal of Environmental Management**, v. 127, p. 10-17, 2013.
- AON, M. A.; COLANERI, A. C. Temporal and spatial evolution of enzymatic activities and physico-chemical properties in an agricultural soil. **Applied Soil Ecology**, v. 18, p. 255-270, 2001.
- ARAÚJO, F. S. M.; LEMOS, J. L. S. Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10,2002. **Anais** [S. 1.]: CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL – CETEM/ MCT, 2002.
- ASVAPATHANAGUL, P.; HUANG, Z.; GEDALANGA, P. B.; BAYLOR, A.; OLSON, B. H. Interaction of operational and physicochemical factors leading to *Gordonia amarae* like foaming in an incompletely nitrifying activated sludge plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n.23, p. 8165-8175, 2012.

ATLAS, M. R. Microbial degradation petroleum hydrocarbons: In environmental perspective. **Microbiology reviews**, v. 45, p. 180-209, 1981.

BALBA, M T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 32, p. 155-164, 1998.

BEAL, R.; BETTS, W. B. Role of rhamnolipid biosurfactants in the uptake and mineralization of hexadecane in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 158-168, 2000.

BOUCHEZ-NAITALI, M.; BLANCHET, D.; BARDIN, V.; VANDECASTEELE, J. P. Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus equi*: the importance of cell flocculation. **Microbiology (SMG)**, v. 147, p. 2537-2543, 2001.

BOUILLON, S.; DAHDOUH-GUEBAS, T. M. N. K. F.; BAEYENS, W.; DEHAIRS, F. Variability in the origin of carbon substrates for bacterial communities in mangrove sediments. **FEMS Microbiol Ecology**, v. 49, p.171–17, 2004.

BØRRESEN, M .H.; RIKE, A.G. Effects of nutrient content, moisture content and salinity on mineralization of hexadecane in an Arctic soil. **Cold Regions Science and Technology**, v. 48, p. 129-138. 2007.

BRITO, E. M.; DURAN, R.; GUYONEAUD, R.; GONI-URRIZA, M.; GARCIA DE OTEYZA, T.; CRÁPEZ, M. A.; ALELUIA, I.; WASSERMAN, J. C. A. A case study of *in situ* oil contamination in a mangrove swamp (Rio de Janeiro, Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 418-423, 2009.

BRITO, E. M.; GUYONEAUD, R.; GONI-URRIZA, M.; RANCHOU-PEYRUSE, A.; VERBAERE, A.; CRÁPEZ, M. A. C.; WASSERMAN, J. C. A; DURAN, R. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangroves sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 752-762, 2006.

BURNS, K. A.; CODI, S. Contrasting impacts of localized versus catastrophic oil spills in mangrove sediments. **Mangrove and Salts Marshes**, v. 2, p. 63-74, 1998.

BURNS, K. A.; GARRITY, S. D.; LEVINGS, S. C. How many years until mangrove ecosystems recover from catastrophic oil spills? **Marine Pollution Bulletin**, v. 26, p. 249-257, 1993.

CALDWELL, B. A. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: A review. **Pedobiologia**, v. 49, p. 637-644, 2005.

CASIDA, L. E. JR. Microbial metabolic activity in soil as measure by dehydrogenase determinations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 34, n.6, p. 630-636, 1977.

CETESB. Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. **Gerenciamento de áreas contaminadas: investigação para remediação no Estado de São Paulo**. Dezembro de 2010. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/relacoes-de-areascontaminadas/15\\_publicacoes](http://www.cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/relacoes-de-areascontaminadas/15_publicacoes)> Acesso em: 15 fev. 2014.

CHAILLAN, F.; LEFLECHE, A.; BURY, E.; GRIMONT, P.; SALIOT, A.; OUDOT, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 587-595, 2004.

CHENU, C.; HASSINK, J.; BLOEM, J. Short-term changes in the spatial distribution of microorganisms in soil aggregates as affected by glucose addition. **Biology and Fertility of Soils**, v. 34, p. 349–356, 2001.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M. BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A .V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, D. A.; BIDOIA, E. D.; ANGELIS, D. F. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibais, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 99-106, jan./mar. 2005.

COSTA, M. D. Notas de aula: **Biorremediação de solos contaminados**. MBI 650 Microbiologia do solo. Universidade Federal de Viçosa. 2011.

CRÁPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PREREIRA, D. C. Tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v. 30, n.179, p. 32-37, 2002.

DANDIE, C. E.; WEBER, J.; ALEER, S.; ADETUTU, E. M.; BALL, A. S.; JUHASZ, A. L. Assessment of five bioaccessibility assays for predicting the efficacy of petroleum hydrocarbon biodegradation in aged contaminated soils. **Chemosphere**, v.81, p. 1061-1068, 2010.

DASHTI, N.; AWADHI, H. A.; KHANAFER, M.; ABDELGHANY, S.; RADWAN, S. Potential of hexadecane-utilizing soil-microorganisms for growth on hexadecanol, hexadecanal and hexadecanoic acid as sole sources of carbon and energy. **Chemosphere**, v. 70, p. 475-479, 2008.

DICK, R.P. **Soil enzyme activities as indicators of soil quality**. In: Doran, J.W.; Coleman, D.C.; Bezdicek, D.F.; Stewart, B.A. (Eds.), *Defining Soil for a Sustainable Environment*. SSSA Spec. Pub. SSSA, Madison, WI, 1994.

DORODNIKOV, M.; BLAGODATSKAYA, E.; BLAGODATSKY, S.; FANGMEIER, A.; KUZYAKOV, Y .Stimulation of r- vs. K-selected microorganisms by elevated atmospheric CO<sub>2</sub> depends on soil aggregate size. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 69, p. 43–52, 2009.

DUKE, N .C. Mangrove floristics and biogeography. In: Robertson, A.I. and Alongi, D.M. (eds.). 1992. *Coastal and Estuarine Studies. Tropical Mangrove Ecosystems*. Washington, D.C.: American Geophysical Union, p. 63-100.

DUKE, N. C.; BURNS, K. A.; SWANNEL, R. P. J.; DALHAUS, O.; RUPP, R. J. Dispersant use and bioremediation strategy as alternate means of reducing impacts of large oil spills on mangroves: the Gladstone field trials. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, p. 403-412, 2000.

DUKE, N. C.; MEYNECKE, O.; DITTMANN, S.; ELLISON, A.; ANGER, K.; BERGER, U.; CANNICCI, S.; DIELE, K.; EWEL, K. C.; FIELD, C. D.; KOEDAM, N.; LEE, Y.; MARCHAND, C.; NORDHAUS, I.; DAHDOUGH-GUEBAS, F. A world without mangroves? **Science**, v. 317, p. 41-42, 2007.

EPA – United States Environmental Protection Agency (2009). **Soils Policy: Soil Contamination in Europe**. Disponível em: <[http://www.epa.gov/oswer/international/factsheets/pdfs/200906\\_eu\\_soils\\_contamination.pdf](http://www.epa.gov/oswer/international/factsheets/pdfs/200906_eu_soils_contamination.pdf)>. Acesso em: 18 jul. 2014.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Taxonomic Outline of The Prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2.ed. Release 5.0. New York: Springer, 2004.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. D. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas de biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.34, p. 36-43, 2005.

GENTILI, A. R.; CUBITTO, M. A.; FERRERO, M.; RODRIGUÉZ, M. S. Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbondegrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.57. p. 222-228, 2006.

GNIDA, A.; SURMACZ-GÓRSKA, J. Failure in application of INT in dehydrogenase activity analysis while presence of high nitrate concentration. **Architecture, Civil Engineering, Environment**, v. 2, p. 95-100, 2012.

GOMES, N. C. M. ; BORGES, L. R. ; PARANHOS, R. ; PINTO, F. N. ; MENDONÇA-HALGLER, L. C. S ; SMALLA, K. Exploring the diversity of bacterial communities in sediments of urban mangrove forests. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 66, p. 96–109, 2008.

GRAHAM, D. W.; SMITH, V. H.; CLELAND, D. L.; LAW, K. P. Effects of nitrogen and phosphorus supply on hexadecane biodegradation in soil systems. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 111, p. 1–18, 1999.

HEAD, I. M.; JONES, D. M.; RÖLING, W. F. M. Marine microorganisms make a meal of oil. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 173-182, 2006.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biol Fertil Soils**, v. 33, p. 265-278. 2001.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, 2007.

KANG, S.; OH, K. H.; KAHNG, H. Y. Physiological characterization of BTEX degrading bacteria *Microbacterium* sp. EMB-1 and *Rhodococcus* sp. EMB-2 isolated from reed rhizosphere of sunchon bay. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 169-177, 2005.

KATHIRESAN, K.; BINGHAM, B. L. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. **Advances in marine biology**, v.40, p. 81-251, 2001.

KATHIRESAN, K.; QASIN, S. Z. **Biodiversity of Mangrove Ecosystem**. New Delhi: Hindustan Publishing Corporation, 2005, p. 1-251.

KREGIEL, D. **Succinate Dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* – The Unique Enzyme of TCA Cycle – Current Knowledge and New Perspectives, Dehydrogenases**. Prof. Rosa Angela Canuto (Ed.), ISBN: 978-953-307-019-3, InTech. 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/dehydrogenases/succinate-dehydrogenase-of-saccharomyces-cerevisiae-the-unique-enzyme-of-tca-cycle-current-knowledge>>. Acesso em 02 abr. 2014.

KUIPER, I.; LAGENDIJK, E. L.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. RHIZOREMEDIATION: a beneficial plant-microbe interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 17, p. 6-15, 2004.

LEMANSKI, K.; SCHEU, S. Incorporation of  $^{13}\text{C}$  labelled glucose into soil microorganisms of grassland: Effects of fertilizer addition and plant functional group composition. **Soil Biology and Biochemistry**, v.69, p. 38–45, 2014.

LENHARD, G. The dehydrogenase activity in soil as a measure of the activity of soil microorganisms. **Z. Pflanzenernaehr. Dueng. Bodenk.** Vv.73, p. 1-11, 1956.

LI, X.; LIU, Y.; ZENG, G.; NIU, Y.; XIAO, X.; XU, W.; XIA, W.; ZHU, Y.; LIU, J. Direct current stimulation of *Thiobacillus ferrooxidans* bacterial metabolism in a bioelectrical reactor without cation-specific membrane. **Bioresource Technology**, v.101, p. 6035–6038, 2010.

LIN, T. C.; YOUNG, C. C.; HO, M. J.; YEH, M. S.; CHOU, C. L.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Characterization of floating activity of indigenous diesel-assimilating bacterial isolates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.99, n.5, p. 466-472, 2005.

LING, Da-Jiong; HUANG, Qian-Chun; OUYANG, Ying. Impacts of simulated acid rain on soil enzyme activities in a latosol. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, p. 1914-1918, 2010.

LITTLE, P. J.; JAMES, M. O.; FOUREMAN, G. L.; WEATHERBY, R. P.; BEND, J. R. 1- $^{14}\text{C}$ -n-hexadecane disposition in the spiny lobster, *Panulirus argus* and the American lobster, *Homarus americanus*. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.6, p. 13-27. 1986.

MACINTOSH, D. J.; ASHTON, E. C.; HAVANON, S. Mangrove Rehabilitation and Intertidal Biodiversity: a Study in the Ranong Mangrove Ecosystem, Thailand. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 55, p. 331–345, 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. Microbiologia de Brock. 12ª edição. São Paulo: Artmed, 2010.

MAKIKO, K.; KAZUAKI, S.; SHUNJI, O.; SHIN, T.; AKIKO, M. Identification of alkane degrading bacteria in petroleum hydrocarbon-contaminated soil. **Journal of Japan Society on Water Environment**, v. 29, n. 1, p. 37-43, 2006.

MAO, J.; LUO, Y.; TENG, Y.; LI, Z. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil by a bacterial consortium and associated microbial changes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.70, p. 141-147, 2012.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere**, v.40, p. 339-346, 2000.

MISHRA, S.; SINGH, S. N. Microbial degradation of n-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes. **Bioresource Technology**, v.111, p. 148-154, 2012.

MOLLEA, C.; BOSCO, F.; RUGGERI, B. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. **Chemosphere**, v. 60, n. 5, p. 636-643, 2005.

MOREIRA, I. T. A.; FREITAS, P. F.; NASCIMENTO, R. S. A.; OLIVEIRA, O. M. C.; TRIGUIS, J. A. Selection of species plant mangrove for assessment phytoremediation of contaminated sediments by in oil and derivatives. **In: Rio Oil & Gas Expo and Conference**, IBP2899\_10, 2010.

MOREIRA, I. T. A.; OLIVEIRA, O. M. C.; TRIGUIS, J. A.; QUEIROZ, A. F. S.; FERREIRA, S. L. C.; MARTINS, C. M. S.; SILVA, A. C. M.; FALCÃO, B. A. Phytoremediation in mangrove sediments impacted by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's) using *Avicennia schaueriana*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 67, p. 130-136, 2013.

NAGELKERKEN, I.; BLABER, S. J. M.; BOUILLON, S.; GREEN, P.; HAYWOOD, M.; KIRTON, L. G.; MEYNECKE, J. O.; PAWLIK, J.; PENROSE, H. M.; SASEKUMAR, A.; SOMERFIELD, P. J. The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. **Aquatic Botany**, v.89, n. 2, p. 155–185, 2008.

NANSINGH, P.; JURAWAN, S. Environmental sensitivity of a tropical coastline (Trinidad, West Indies) to oil spills. **Spill Science & Technology Bulletin**, v.5, p. 161-172, 1999.

NIGAM, A.; PHALE, P. S.; WNGIKAR, P. P. Assessment of the metabolic capacity and adaptability of aromatic hydrocarbon degrading strain *Pseudomonas putida* CSV86 in aerobic chemostat culture. **Bioresource technology**, n. 114, p. 484-491, 2012.

NIKOLOVA, N.; NENOV, V. BTEX degradation by fungi. **Water Science & Technology**, v. 51, n. 11, p. 87-93, 2005.

OLIVEIRA, R. M. **Diversidade microbiana utilizada na biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados**. 2013. 16 p. Monografia - Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix – Belo Horizonte/MG.

OTENIO, M. H.; SILVA, M. T. L.; MARQUES, M. L. O.; ROSEIRO, J. C.; BIDOIA, E. D. Benzene, Toluene and Xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM1 852. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 36, p. 258-261, 2005.

OUDOT, J. Hydrocarbon weathering and biodegradation in a tropical estuarine ecosystem. **Marine Environmental Research**, v.27, p. 195-213, 1989.

PANDEY, J.; CHAUHAN, A.; JAIN, R. K. Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of *in situ* bioremediation. **FEMS Microbiology Reviews**, v.33, p. 324-375, 2009.

PARTOVINIA, A.; NAEIMPOOR, F.; HEJAZI, P. Carbon content reduction in a model reluctant clayey soil: Slurry phase n-hexadecane bioremediation. **Journal of Hazardous Materials**, v.181, p. 133–139, 2010.

PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.;  
**Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. Isolada de um solo contaminado do Sul do Brasil.** Química Nova, vol.XY, n. 00 1-5.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. v. 6, nº 6, p. 975 – 1006, 2012.

RAMSAY, M. A.; SWANNELS, R. P. J.; SHIPTON, W. A.; DUKE, N. C.; HILL, R. T. Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v.41, Nos. 1-12, p. 413-419, 2000.

RAVELET, C.; KRIVOBOK, S.; SAGE, L. STEIMAN, R. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. **Chemosphere**, v. 40, p. 557-563, 2000.

REDDY, P. G.; SINGH, H. D.; ROY, P. K.; BARUAH, J. N. Predominant role of hydrocarbon solubilization in the microbial uptake of hydrocarbons. **Biotechnology and Bioengineering**, v.24, p. 1241-1269, 1982.

ROCHA, L. L. **Estudo de comunidades bacterianas de solos do manguezal da Barra Grande, Icapui – CE e seleção de cepas com potencial para degradar hidrocarbonetos.** Fortaleza: UFC, p. 88. (Dissertação de Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências marinhas tropicais, Instituto de Ciências do Mar da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

ROJO, F. Degradation of alkanes by bacteria. **Environmental Microbiology**, v.11, p. 2477-2490, 2009.

ROMEIRO, R. S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em suspensão.** Laboratório de bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV, 2008.

ROS, M.; HERNANDEZ, M. T.; GARCÍA, C. Soil microbial activity after restoration of a semiarid soil by organic amendments. **Soil Biology & Biochemistry**, v.35, p. 463-469, 2003.

ROSZAK, D. B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiological Reviews**, v.51, n.3. p. 365-379, 1987.

ROY, R.; GREER, C. W. Hexadecane mineralization and denitrification in two diesel fuel-contaminated soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v.32, p. 17-23, 2000.

RUF, A.; BECK, L.; DREHER, P.; HUND-RINKE, K.; RÖMBKE, J.; SPELDA, J. A biological classification concept for the assessment of soil quality: “biological soil classification scheme” (BBSK). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.98, p. 263-271, 2003.

RYOICHI, D.; SENARATNE, L. R. Soil dehydrogenase in a land degradation-rehabilitation gradient: observations from a savanna site with a wet/dry seasonal cycle. **Revista De Biologia Tropical**, v. 57, p. 223–234, 2009.

RYSSOV-NIELSEN, H. Measurement of the inhibition of respiration in activated sludge by a modified determination of the TTC-dehydrogenase activity. **Water Research**, v.9, p. 1179-1185, 1975.

SANTOS, H. F.; CARMO, F. L.; PAES, J. E. S.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. **Water Air Soil Pollution**, v.216, p. 329-350, 2011.

SANTOS, H. F.; CURY, J. C.; CARMO, F. L.; SANTOS, A.; L.; TIEDJE, J.; VAN ELSAS, J. D.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. Mangrove bacterial diversity and the impact of oil contamination revealed by pyrosequencing: bacterial proxies for oil pollution. **PLoS ONE**, v.6, p. 1-8, 2011 (b).

SCHAEFFER-NOVELLI Y.; CINTRON, G. Status of mangrove research in Latin America and the Caribbean. **Boletim do Instituto de Oceanografia**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 93-97, 1990.

SCHULTE, E. E.; HOPKINS, B. G. Estimation of soil organic matter by weight loss-ignition. In: MAGDOFF, F. R.; TABATABAI, M.A.; HANLON Jr., E. A. **Soil organic matter: Analysis and interpretation**. Madison, p. 21-31, 1996.

SHEN, Fo-Ting; HO, Mann-Jing; HUANG, Hsuan-Ru; ARUN, A. B.; REKHA, P. D.; YOUNG, Chiu-Chung. Molecular detection and phylogenetic characterization of *Gordonia* species in heavily oil-contaminated soils. **Research in Microbiology**, v.159, p. 522-529, 2008.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **FEMS Microbiology Reviews**, v.59, p. 201-222, 1995.

SILVA, A. S. Caracterização de enzimas bacteriana de degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Porto Alegre: UFRGS, 2008, p.74. (Dissertação de Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em ciências do solo. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SILVA, T. R.; VALDMAN, E.; VALDMAN, B.; LEITE, S. G. F. Salicylic acid degradation from aqueous solutions using *Pseudomonas fluorescens* HK44: parameters studies and application tools. **Brazilian Journal of Microbiology**. n. 38, p. 39-44. 2007.

SINGER, M E.; FINNERTY, W. R. Microbial metabolism of straight-chain and branches alkanes. In: Atlas, R. M. (Eds.). **Petroleum Microbiology**. Macmillan publishers, New York, p. 1-59, 1984.

SKUJINS, J. Extracellular enzymes in soil. **Critical Reviews in Microbiology**, v.4, p. 383-412, 1976.

- SLABBERT, E. **Microbial diversity of soils of the Sand fynbos**. 2008. 202 p. Dissertation presented for the degree of Magister Scientiae at Stellenbosch University - Stellenbosch University, South Africa, 2008.
- SMITH T.J., III **Forest structure**. In: Tropical Mangrove Ecosystems, ed. A.I. Robertson & D.M. Alongi. 1992. p. 101–136. Washington DC, USA: American Geophysical Union.
- SPALDING, M.; BLASCO, F.; FIELD, C. **World mangrove atlas**. Okinawa: International Society for Mangrove Ecosystems, 178 p., 1997.
- SPALDING, M.; KAINUMA, M.; COLLINS, L. **World Atlas of Mangroves**. Spalding, M.; Kainuma, M.; Collins, L (Ed.) London, Washington D.C: Earthscan, 2010, 319 p.
- STENUIT, B.; EYERS, L.; SCHULER, L.; AGATHOS, S. N.; GEORGE, I. Emerging highthroughput approaches to analyse bioremediation of sites of contaminated with hazardous and/or recalcitrant wastes. **Biotechnology Advances**, v.26, p. 561-575, 2008.
- STROUD, J. L.; PATON, G. I.; SEMPLE, K. T. Linking chemical extraction to microbial degradation of <sup>14</sup>C-hexadecane in soil. **Environmental Pollution**, v.156, p. 474-481, 2008.
- STROUD, J.L.; PATON, G. I.; SEMPLE, K. T. Microbe-aliphatic hydrocarbon interaction in soil: implications for biodegradation and bioremediation. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, p. 1239-1253, 2007.
- SUGUIO, K. **Introdução à Sedimentologia**. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blücher/EDUSP, 1973, p. 317.
- TIAN, Y.; LIU, H. J.; ZHENO, T. L.; KWON, K. K., KIM, S. J.; YAN, C. L. PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. **Marine Pollution Bulletin**, v.57, p. 707-715, 2008.
- TEIXEIRA, A. S.; BENTO, F. M. **Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial**. 2007. Dissertação (Mestrado em faculdade de Agronomia) - Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis**, v. 14, n.4, p. 1025-1035, 2010.
- TYAGI, M.; FONSECA, M. M. R.; CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v.22, n.2, p. 231-241, 2010.
- URAKAWA, H.; YOSHIDA, T; NISHIMURA, M; OHWADA, K. Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling. **Environmental Microbiology**, v. 2, n. 5, p. 542-554, 2000.
- URGUN-DERMITAS, M.; STARK, B.; PAGILLA, K. Use of genetically engineered microorganisms (GEMs) for the bioremediation of contaminants. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 26, p. 145-164, 2006.

VAN HEES, P.A.W.; JONES, D.L.; FINLAY, R.; GODBOLD, D.L.; LUNDSTRÖM, U.S. The carbon we do not see—the impact of low molecular weight compounds on carbon dynamics and respiration in forest soils: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37, p. 1–13, 2005.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**. v.73, p. 1163-1172, 2001.

VIGO, J. A. G. **Metagenomic study of autochthonous bacterial communities at different marine ecosystems affected by the Prestige's oil spill in Galicia (NW-Spain)**. Biodegradation potential. 2009. 208 p. Thesis (PHD in Microbiology and Parasitology) - University of Santiago de Compostela – Spain, 2009.

WATKINSON, R. J.; MORGAN, P. Physiology of aliphatic hydrocarbon degrading microorganism. **Biodegradation**, v.1, p. 79-92, 1990.

WENTZEL, A.; ELLINGSEN, T. E.; KOTLAR, H. K.; ZOTCHEV, S. B.; HOLST, M. T. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. **Applied Microbial Biotechnology**, v.76, p. 1209-1221, 2007.

WETLER-TONINI, R. M. C; REZENDE, C. E; GRAVITOL, A. D. Biodegradação bacteriana de petróleo e seus derivados. **Revista virtual de química**, v.3, n.2, p. 78-87, 2011.

XU, R.; LAU, A. N. L; LIM, Y. G.; OBBARD, J. P. Bioremediation of oil-contaminated sediments on an inter-tidal shoreline using a slow-release fertilizer and chitosan. **Marine Pollution Bulletin**, v.51, p. 1062-1070, 2005.

YU, S. H.; KE, L.; WONG, Y.S.; TAM, N. F. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. **Environment International**, v.31, p. 149-154, 2005.

YAKUBU, M. B. Biological approach to oil spills remediation in the soil. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.24, p. 2735-2739, 2007.

YUAN, Y.; SHU-HAI, G.; FENG-MEI, L.; TING-TING, L. Effect of an electric field on n-hexadecane microbial degradation in contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.77, p. 78-84, 2013.

ZHANG, Q-R, ZHOU Q-X, REN, L-P, ZHU, Y-M, SUN, S-L. Ecological effects of crude oil residues on the functional diversity of soil microorganisms in three weed rhizospheres. **Journal of Environmental Sciences**, v.18, n° 6, p.1101-1106, 2006.