

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**

TESE

Francisco Singulani Castanon

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE E POTENCIAL CATABÓLICO DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE AQUÍFERO CONTAMINADO COM CREOSOTO
PARA FORMAÇÃO DE UM CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS
DEGRADADORAS DESSE COMPOSTO**

BELO HORIZONTE

2018

Francisco Singulani Castanon

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE E POTENCIAL CATABÓLICO DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE AQUÍFERO CONTAMINADO COM CREOSOTO
PARA FORMAÇÃO DE UM CONSÓRCIO DE BACTÉRIAS
DEGRADADORAS DESSE COMPOSTO**

Versão final

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Vera Lúcia dos Santos

BELO HORIZONTE

2018

- 043 Castanon, Francisco Singulani.
Caracterização da diversidade e potencial catabólico de bactérias isoladas de aquífero contaminado com creosoto para formação de um consórcio de bactérias degradadoras desse composto [manuscrito] / Francisco Singulani Castanon. - 2018.
180 f. : il. ; 29,5 cm.
Orientadora: Vera Lúcia dos Santos.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.
1. Microbiologia. 2. Creosoto. 3. Biodegradação Ambiental. I. Santos, Vera Lúcia dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

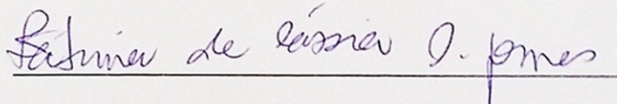
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Relatora e Suplente: Dra. Alaine de Brito Guerra

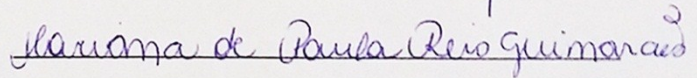
Suplente externo: Prof. Dr. Daniel Bonoto Gonçalves

Às 13:00 horas do dia 19 de setembro de 2018, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pela Dra. Fatima de Cassia Oliveira Gomes (Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais), Dra. Mariana de Paula Reis Guimarães (Universidade Federal de Minas Gerais), Dra. Miriam Cristina Santos Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), Dra. Valéria Martins Godinho (Centro Universitário Newton Paiva) e pela Dra. Vera Lúcia dos Santos (Universidade Federal de Minas Gerais - Orientadora), para julgar o trabalho final "Caracterização da diversidade e potencial catabólico de bactérias isoladas de aquífero contaminado com creosoto para formação de um consórcio de bactérias degradadoras desse composto", do aluno **Francisco Singulani Castanon**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Vera, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de setembro de 2018.

Dra. Fatima de Cassia Oliveira Gomes



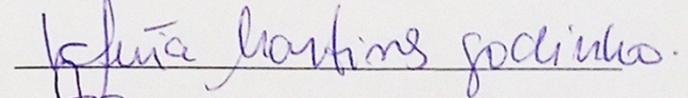
Dra. Mariana de Paula Reis Guimarães



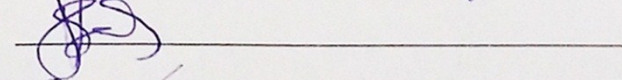
Dra. Miriam Cristina Santos Amaral

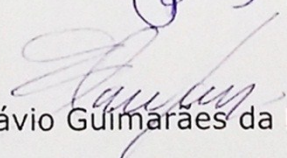


Dra. Valéria Martins Godinho



Dra. Vera Lúcia dos Santos




Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, fundamental para a condução deste trabalho.

À Prof^a. Vera Lúcia dos Santos, que com sua orientação e conselhos tornou a realização deste trabalho possível.

Ao Dr. Ezequias Pessoa de Siqueira Filho pelo auxílio com a utilização do CG-EM e análise dos compostos ativos de superfície, ajuda fundamental para realização do trabalho.

Ao Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana, pela disponibilização de sua estrutura na Embrapa Milho e Sorgo para realização das análises do gel de DGGE.

Ao Prof. Ricardo José Alves, pelo auxílio na metodologia de espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier.

Ao Jamil, técnico do departamento, que auxiliou demais durante o trabalho, ajudando de todas as formas, sempre muito solícito com todos nós.

Aos meus amigos e colegas do laboratório, por tornarem a rotina de trabalho mais agradável e divertida, por estarem sempre dispostos a ajudar, tornando esse grupo quase uma família. Destacar minhas amigas de creosoto Aline e Natália, que dividiram esse projeto comigo e as decisões importantes envolvidas nele.

À Isabela, Mayara e Kasandra, que participaram diretamente do meu trabalho, auxiliando na maioria dos experimentos realizados, sem a ajuda delas vários dos experimentos realizados teriam sido inviáveis.

A todos os meus amigos, que de perto ou de longe estavam sempre comigo, me apoiando e incentivando. Em especial ao Paulo, meu amigo de república, que participou diretamente do dia-a-dia na maior parte desse doutorado.

À minha namorada Aline, minha companheira, meu maior apoio durante esse período. Por estar comigo todos os dias mesmo a distância e por todo amor e carinho.

Aos meus familiares, pela confiança e apoio constantes, mesmo com o obstáculo da distância.

Ao meu irmão, pelo companheirismo desde sempre e pelas experiências que contribuíram para minha formação como pessoa.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para que eu tivesse uma boa formação, pelo apoio, carinho e amor incondicionais.

A Deus, por uma vida cheia de bênçãos.

RESUMO

O creosoto é um óleo formado por diversos compostos, principalmente hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Devido à toxicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade potencial de muitos de seus compostos, os resíduos de creosoto representam uma ameaça ao meio ambiente e a eliminação desse composto do solo e aquíferos contaminados é essencial. Para isso, o tratamento biológico é considerado uma escolha eficiente e financeiramente acessível. Esse trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade de bactérias em aquífero contaminado com creosoto, o potencial de degradação do composto e de produção de compostos ativos de superfície desses isolados e selecionar um consórcio de bactérias degradadoras de creosoto para aplicação em processos de biorremediação. Amostras do aquífero contaminado foram coletadas de oito poços identificados como PP20 (1), PP206 (2), PP207 (3), PM208 (4), PM211 (5), PP29 (6), PP203 (7), e PP223 (8). Os pontos amostrais foram caracterizados quanto à população bacteriana total e degradadora. A densidade média de bactérias heterotróficas totais foi de $1,78 \times 10^7$ NMP/g e das bactérias degradadoras de naftaleno, antraceno e fenol foram de $4,64 \times 10^6$, $2,44 \times 10^6$, $8,26 \times 10^6$ NMP/g, respectivamente, nos poços do aquífero. Foram isoladas e identificadas 77 bactérias através da técnica de enriquecimento utilizando creosoto (1% v/v) como única fonte de carbono. Os gêneros observados foram *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Pseudochrobactrum*, *Delftia*, *Rhizobium*, *Sphingobacterium*, *Kosakonia* e *Alcaligenes*, com predominância para o gênero *Pseudomonas*. Durante o enriquecimento, a técnica de DGGE foi utilizada para monitorar a alteração da estrutura da comunidade bacteriana a cada semana, além de observar mudanças na abundância de cada grupo ao longo do experimento. Os isolados foram avaliados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa quanto ao potencial de degradação de creosoto (0,25%) em meio BHB suplementado com extrato de levedura (0,2%). As

bactérias *Enterobacter* sp. M3P8/2 (33,71%), *Enterobacter* sp. M3P8/1 (33,60%), *Alcaligenes* sp. B/4 (33,55%) e *Bacillus cereus* T9P9/3 (33,42%) obtiveram os maiores valores de degradação. Os isolados também foram avaliados quanto à capacidade de produzir compostos ativos de superfície em meio BHB suplementado com extrato de levedura (0,02%) e creosoto (1%). Em relação à tensão superficial, 31,2% dos isolados reduziram a valores abaixo de 45 mN/m e para atividade emulsificante, 18,2% dos isolados atingiram valores acima de 55%. O bioemulsificante produzido pelo isolado *Pseudomonas putida* grupo T9P4/2 foi caracterizado como um lipopeptídeo. Os 6 isolados que obtiveram as maiores porcentagens de degradação de creosoto em amostras do aquífero (*Pseudomonas* sp. R106-4, *Pseudomonas putida* grupo R206-6, *Achromobacter* sp. R108(10-5), *Stenotrophomonas* sp. R301-5, *Pseudomonas putida* grupo T9P6/1 e *Alcaligenes* sp. B/4) foram escolhidos para formar um consórcio, que foi utilizado em um delineamento fatorial completo 2⁴, variando as condições de presença da microbiota autóctone, aeração, nutrientes e do consórcio, para simular as técnicas de bioestimulação e/ou bioaugmentação em microcosmos com amostras de um aquífero. Nesse experimento, até 86% de degradação de creosoto foi observado em um dos tratamentos, sendo a presença do consórcio, dos micro-organismos autóctones e da aeração considerados fatores significativos durante o processo. Esses dados mostram que o consórcio formado é eficaz na degradação de creosoto em amostras de aquífero e essas informações serão úteis para uma futura biorremediação *in situ* de aquíferos contaminados com creosoto.

Palavras-chave: creosoto, bioestimulação, bioaugmentação, compostos ativos de superfície, CG-EM.

ABSTRACT

Creosote is a complex mixture of chemical constituents comprising diverse chemical structures, especially polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). Due to the potential toxicity, carcinogenicity and mutagenicity of many of its compounds, creosote waste sites represent a threat to the environment and the removal of these compounds from contaminated soil and groundwater is essential. For this purpose, the biological treatment is considered an efficient and financially affordable choice. This study aimed to evaluate the bacteria diversity in aquifers contaminated with creosote, the potential for creosote degradation and production of surface active compounds of these isolates and to select creosote degrading bacteria consortium for application in bioremediation processes. Contaminated aquifer samples were collected from eight wells identified as PP20 (1), PP206 (2), PP207 (3), PM208 (4), PM211 (5), PP29 (6), PP203 (7), and PP223 (8). These sampling points were characterized for total bacterial and degrading bacteria. The average density of total heterotrophic bacteria was 1.78×10^7 NMP/g and the naphthalene, anthracene and phenol degrading bacteria were 4.64×10^6 , 2.44×10^6 , 8.26×10^6 NMP/g respectively, in the aquifer wells. 77 bacteria were isolated and identified by the enrichment technique using creosote (1% v / v) as the sole source of carbon. The observed genus were *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Pseudochromobacterium*, *Delftia*, *Rhizobium*, *Sphingobacterium*, *Kosakonia* e *Alcaligenes*, with predominance of the genus *Pseudomonas*. During the enrichment, the DGGE technique was used to monitor the change in community structure every week, besides observing changes in the abundance of each group during the experiment. Isolates were evaluated by gas chromatography coupled to mass spectrometry for their creosote degradation potential (0.25%) in BHB medium supplemented with yeast extract (0.2%). *Enterobacter* sp. M3P8/2 (33.71%), *Enterobacter* sp. M3P8/1 (33.60%), *Alcaligenes* sp. B/4 (33.55%) e *Bacillus cereus* T9P9/3 (33.42%) obtained the highest values of

degradation. Isolates were also evaluated for the ability to produce surface active compounds in BHB medium supplemented with yeast extract (0.02%) and creosote (1%). Regarding the surface tension, 31.2% of the isolates reduced to values below 45 mN/m and for emulsifying activity, 18.2% of the isolates reached values above 55%. The *Pseudomonas putida* group T9P4/2 bioemulsifier was characterized as a lipopeptide. The six isolates that obtained the highest percentages of creosote degradation in aquifer samples (*Pseudomonas* sp. R106-4, *Pseudomonas putida* group R206-6, *Achromobacter* sp. R108(10-5), *Stenotrophomonas* sp. R301-5, *Pseudomonas putida* group T9P6/1 e *Alcaligenes* sp. B/4) were chosen to form a consortium, which was used in a complete 2⁴ factorial design, varying the conditions of presence of the autochthonous microbiota, aeration, nutrients and the consortium, to simulate the biostimulation and/or bioaugmentation techniques in microcosms with aquifer samples. In this experiment, up to 86% of creosote degradation was observed in one of the treatments, being the presence of consortium, autochthonous microorganisms and aeration considered as significant factors during the process. These data show that the consortium formed is effective in creosote degradation in aquifer samples and this information will be useful for future *in situ* bioremediation of creosote contaminated aquifers.

Key words: creosote, biostimulation, bioaugmentation, surface active compounds, GC-MS.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Comparação do conceito de zoneamento redox (A) e do conceito de franjas de pluma (B).....27
- Figura 2** Via de degradação de naftaleno por algumas bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Aeromonas*.....34
- Figura 3** Via proposta para a degradação do antraceno por *Mycobacterium* sp.....37
- Figura 4** Via proposta para a degradação de fenantreno por *Brevibacterium* sp. HL4 e *Pseudomonas* sp. DLC-P11.....38
- Figura 5** Via proposta para a degradação de pireno por *Mycobacterium* sp.....40
- Figura 6** As vias propostas para o metabolismo de benzo[a]pireno por *Mycobacterium* sp. RJGII-135.....42
- Figura 7** Análise por PCA das oito amostras do aquífero em relação à presença de COV, COSV e compostos inorgânicos.....85
- Figura 8** Gráfico de loadings da componente principal 1 (CP1) para os COV, COSV e compostos inorgânicos.....86
- Figura 9** Gráfico de loadings da componente principal 2 (CP2) para os COV, COSV e compostos inorgânicos.....87
- Figura 10** Densidade de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de componentes do creosoto nas amostras de aquífero dos poços em estudo.....89
- Figura 11** Densidade geral de bactérias heterotróficas totais e bactérias degradadoras dos compostos analisados presentes nas amostras do aquífero.....89
- Figura 12** Dendrograma representativo das comunidades bacterianas presentes nas amostras do aquífero, construído utilizando o coeficiente Euclidiano da matriz de distância do perfil das bandas das amostras no DGGE.....97
- Figura 13** Análise de nMDS da matriz de presença e ausência gerada a partir do perfil de bandas da DGGE de cada amostra relacionada aos metadados.....98

Figura 14	Análise de agrupamento utilizando o índice de Jaccard, dos perfis de DGGE das amostras das três semanas de enriquecimento, comparadas com suas respectivas amostras originais de cada poço onde foram coletadas as frações líquidas.....	100
Figura 15	Perfil de DGGE das comunidades bacterianas submetidas a três semanas de enriquecimento utilizando creosoto como única fonte de carbono.....	102
Figura 16	Porcentagem de degradação total de creosoto pelos isolados selecionados.....	108
Figura 17	Degradação do creosoto total e dos 12 compostos presentes em maior concentração na amostra por todos os isolados analisados.....	109
Figura 18	Número de isolados de cada gênero que degradaram cada um dos 12 compostos analisados.....	110
Figura 19	Perfil de degradação analisado por PCA dos 12 principais compostos presentes no creosoto por todos os isolados selecionados.....	111
Figura 20	Análise por PCA dos 77 isolados pela capacidade de degradação dos 12 principais compostos presentes no creosoto analisado.....	114
Figura 21	Crescimento dos isolados durante o teste de degradação por meio de medidas de densidade ótica a 600 nm.....	116
Figura 22	Redução da tensão superficial pelos surfactantes brutos produzidos pelos isolados analisados.....	121
Figura 23	Atividade emulsificante dos surfactantes brutos produzidos pelos isolados analisados.....	122
Figura 24	Análise de cromatografia de camada delgada do bioemulsificante produzido pelo isolado <i>Pseudomonas putida</i> grupo T9P4/2.....	124
Figura 25	Espectro no infravermelho do bioemulsificante produzido pelo isolado <i>Pseudomonas putida</i> grupo T9P4/2.....	125
Figura 26	Cromatograma dos ácidos graxos presentes no bioemulsificante produzido pelo isolado <i>Pseudomonas putida</i> grupo T9P4/2.....	126
Figura 27	Degradação de creosoto pelos 10 isolados testados nas condições com e sem aeração.....	129

Figura 28 Densidade dos isolados após 10, 20 e 30 dias de experimento na condição aerada (A) e não aerada (B).....	129
Figura 29 Densidade de bactérias em cada tratamento realizado ao longo dos 30 dias.....	131
Figura 30 Degradação de creosoto após 30 dias considerando as diferentes variáveis combinadas nos tratamentos.....	132
Figura 31 Porcentagem média de degradação de creosoto para cada tratamento de biorremediação após 30 dias.....	135

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Concentração dos compostos presentes em cada amostra do aquífero coletada e valores de investigação para águas subterrâneas.....84
- Tabela 2** Identificação dos isolados por meio da comparação das sequências obtidas da região 16S do DNA ribossomal com sequências depositadas no GenBank ou através da técnica de MALDI-TOF.....90
- Tabela 3** Resumo das sequências 16S rDNA obtidas das bandas do gel de DGGE e comparação com sequências depositadas no banco de dados GenBank.....103
- Tabela 4** Produção de precipitado em miligramas por litro de extrato bruto e atividade emulsificante das amostras precipitadas.....123
- Tabela 5** Degradação de creosoto após 30 dias por diferentes tratamentos em um delineamento 2⁴.....134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BHB** - Caldo Bushnell Haas
- BHT** - Bactérias Heterotróficas Totais
- CAT** - Ciclo do Ácido Tricarboxílico
- CETESB** - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
- CG-EM** - Cromatógrafo Gasoso Acoplado a Espectrômetro de Massa
- CONAMA** - Conselho Nacional do Meio Ambiente
- COSV** - Compostos Orgânicos Semi-Voláteis
- COV** - Compostos Orgânicos Voláteis
- DGGE** - Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
- DO** - Densidade Óptica
- E₂₄** - Atividade Emulsificante
- EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- EPA** - Engenharia de Proteção Ambiental Ltda.
- FTIR** - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
- HPA** - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
- MALDI-TOF MS** - Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz: Tempo de Voo
- MMM** - Meio Mínimo Mineral
- mN/m** - MiliNewton por Metro
- NAPL** - Fase Líquida Não Aquosa
- nMDS** - Escalonamento Multidimensional Não Métrico
- NMP** - Número Mais Provável
- PCA** - Análises dos Componentes Principais
- PCR** - Reação de Polimerase em Cadeia
- TSA** - meio de cultura Trypticase Soy Agar
- USEPA** - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
- UTD** - Unidade de Tratamento de Dormentes
- VI** - Valor de Intervenção
- VP** - Valor de Prevenção
- VRQ** - Valor de Referência de Qualidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. O uso da biorremediação em ambientes contaminados	19
1.2. Micro-organismos utilizados no processo de biorremediação.....	20
1.3. Estratégias de biorremediação	21
1.3.1. Biorremediação <i>in situ</i>	22
1.3.2. Biorremediação <i>ex situ</i>	23
1.4. Características de um aquífero: dinâmica dos contaminantes e diversidade microbiológica	25
1.5. Características do creosoto	28
1.6. Legislação para remediação das áreas contaminadas	30
1.7. Biodegradação dos compostos presentes no creosoto.....	32
1.7.1. Metabolismo bacteriano de naftaleno.....	33
1.7.2. Metabolismo bacteriano de hidrocarbonetos aromáticos tricíclicos	35
1.7.3. Metabolismo bacteriano de hidrocarbonetos de quatro ou mais anéis aromáticos	39
1.7.4. Metabolismo fúngico de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	42
1.7.5. Biodegradação de compostos fenólicos	43
1.7.6. Biodegradação de compostos heterocíclicos	45
1.8. Fatores que afetam a biorremediação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)	48
1.9. Utilização de técnicas moleculares para o estudo de comunidades microbianas	52
1.9.1. Ferramentas para identificação de isolados bacterianos.....	53
1.9.2. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) para o estudo de comunidades microbianas durante o processo de biorremediação	56
2. JUSTIFICATIVA.....	58
3. OBJETIVOS.....	60

3.1. Objetivo geral	60
3.2. Objetivos específicos.....	60
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
4.1. Amostragem.....	61
4.2. Análises físico-químicas das amostras	62
4.3. Determinação da densidade de bactérias pelo método do NMP	63
4.3.1. Determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais (BHT) das amostras.....	63
4.3.2. Determinação da densidade de bactérias degradadoras de creosoto e/ou HPAs	64
4.4. Isolamento de bactérias degradadoras de creosoto pelo método de enriquecimento.....	64
4.5. Identificação dos isolados bacterianos por métodos moleculares.....	65
4.5.1. Extração de DNA	66
4.5.2. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) de regiões do gene do rRNA 16S	66
4.5.3. Purificação do produto da PCR.....	67
4.5.4. Reação de sequenciamento.....	67
4.6. Identificação dos isolados bacterianos pela técnica de MALDI-TOF.....	68
4.7. Análise da alteração da estrutura da comunidade bacteriana durante o enriquecimento pela técnica de PCR-DGGE	68
4.8. Avaliação da capacidade de degradação de creosoto pelos isolados	70
4.9. Avaliação da produção de compostos tensoativos pelas bactérias isoladas crescendo em meio de cultura com creosoto como fonte de carbono	71
4.9.1. Medida da atividade surfactante pela redução da tensão superficial.....	71
4.9.2. Medida da atividade emulsificante	72
4.9.3. Precipitação do extrato bruto com melhores resultados	72
4.10. Caracterização do bioemulsificante produzido pelo isolado <i>Pseudomonas putida</i> grupo T9P4/2 em meio de cultura com creosoto como fonte de carbono.....	73
4.10.1. Análise de cromatografia de camada delgada	73

4.10.2. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)....	73
4.10.3. Cromatografia gasosa e espectrometria de massa para avaliar as moléculas presentes no bioemulsificante.....	74
4.11. Biorremediação de creosoto em amostras de aquífero raso saturado da UTD pelos isolados com maior potencial de degradação	74
4.12. Biorremediação de amostras de aquífero contaminado com creosoto por meio das técnicas de bioestimulação e bioaugmentação com consórcio das bactérias isoladas com maior potencial de degradação.....	76
4.13. Análises estatísticas	79
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.1. Análises físico-químicas das amostras do aquífero contaminado	82
5.2. Determinação da densidade de bactérias heterotróficas e degradadoras de naftaleno, antraceno e fenol pelo método do NMP de amostras do aquífero contaminado.....	88
5.3. Isolamento de bactérias presentes nas amostras do aquífero pelo método de enriquecimento.....	90
5.4. Identificação dos isolados selecionados	90
5.5. Análise da alteração da estrutura da comunidade bacteriana durante o enriquecimento das amostras da fração líquida pela técnica de PCR-DGGE.....	96
5.6. Avaliação dos isolados bacterianos quanto à capacidade de degradação de creosoto	105
5.7. Avaliação da produção de compostos tensoativos pelas bactérias isoladas crescendo em meio de cultura com creosoto como fonte de carbono	117
5.7.1. Medida da atividade surfactante pela redução da tensão superficial.....	117
5.7.2. Método da atividade emulsificante	118
5.7.3. Precipitação do extrato bruto	119
5.8. Caracterização do bioemulsificante produzido pelo isolado <i>Pseudomonas putida</i> grupo T9P4/2 em meio de cultura com creosoto como fonte de carbono	123
5.8.1. Análise de cromatografia de camada delgada	123
5.8.2. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)....	124
5.8.3. Cromatografia gasosa e espectrometria de massa para avaliar as moléculas presentes no bioemulsificante.....	125

5.9. Biorremediação de creosoto em amostras de aquífero pelos isolados com maior potencial de degradação	126
5.10. Biorremediação de amostras de aquífero contaminado com creosoto por meio das técnicas de bioestimulação e bioaugmentação com consórcio das bactérias isoladas com maior potencial de degradação.....	130
6. CONCLUSÃO	136
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137
8. ANEXOS.....	168

1. INTRODUÇÃO

1.1. O uso da biorremediação em ambientes contaminados

O meio ambiente é continuamente contaminado por uma grande variedade de produtos químicos perigosos com estruturas e níveis de toxicidade diferentes, que são liberados a partir de várias fontes antropogênicas. Atualmente, é amplamente reconhecido que a contaminação do ambiente é uma potencial ameaça para a saúde humana e de impacto ambiental relevante, por isso, muitos projetos para a descontaminação dessas áreas têm sido realizados. Os métodos mais utilizados nestes projetos são principalmente físicos ou químicos. No entanto, essas tecnologias são caras e podem levar a decomposição incompleta dos contaminantes, formando intermediários tóxicos (Paul et al., 2005; Sonawdekar, 2012).

Devido a esses problemas, a biorremediação aparece como uma boa alternativa. A biorremediação é definida como o processo pelo qual os poluentes orgânicos são biologicamente degradados, sob condições controladas, a um estado inócuo ou para níveis inferiores aos limites de concentração estabelecidos pelas autoridades reguladoras, utilizando principalmente micro-organismos ou suas enzimas (Mueller et al., 1996). As técnicas utilizadas agregam custo relativamente baixo, alta aceitação pública e podem frequentemente ser realizadas no local da contaminação (Vidali, 2001; Sonawdekar, 2012).

Como a biorremediação é eficaz apenas quando as condições ambientais permitem o crescimento e a atividade microbiana, a sua aplicação muitas vezes envolve a manipulação dos parâmetros ambientais para permitir o crescimento microbiano e a degradação em um ritmo mais acelerado. Assim, ao integrar a utilização adequada de recursos microbianos com projetos de engenharia para proporcionar ambientes adequados de crescimento, a biorremediação pode ser bem sucedida (Kumar et al., 2011).

As técnicas têm sido cada vez mais eficazes e não há dúvidas de que a biorremediação tem um grande potencial de aplicação na recuperação de áreas contaminadas com os mais diversos poluentes químicos (Castaldi &

Ford, 1992; Fava et al., 2000; Fava et al., 2004; Fuller & Manning, 2004; Chen et al., 2015; Dixit et al., 2015). Entretanto, os princípios, técnicas, vantagens e desvantagens da biorremediação não são amplamente conhecidos ou compreendidos, principalmente pelos responsáveis pela tomada de decisão e que terão que avaliar as propostas de biorremediação, como os proprietários das áreas afetadas e as agências reguladoras (Kumar et al., 2011). Por isso, a realização e divulgação de pesquisas envolvendo as técnicas de biorremediação devem ser estimuladas, tornando essa metodologia mais bem conhecida para o público em geral.

1.2. Micro-organismos utilizados no processo de biorremediação

Bactérias e fungos filamentosos se apresentam como os principais micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos (Balba et al., 1998). As bactérias são os micro-organismos mais estudados, dentre as quais as do gênero *Pseudomonas* foram as primeiras a serem postas em evidência em função da sua capacidade de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (Sonawdekar, 2012). A primeira patente de um agente biológico de remediação foi registrada em 1974, uma linhagem de *Pseudomonas putida* (Chakrabarty, 1974). Alguns dos principais gêneros de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos são: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* e *Rhodococcus* (Watanabe, 2001; Kumar et al., 2011; Sonawdekar, 2012).

Assim como as bactérias, os fungos também desempenham importante papel na degradação de hidrocarbonetos, isso devido as suas características morfológicas, estratégias fisiológicas e reprodutivas, que os auxiliam na adaptação a ambientes contaminados com estes compostos (Bennett et al., 2001). Os fungos constituem um grupo de micro-organismos atrativo e promissor para a investigação como agentes degradadores, pois apresentam um grande potencial para degradar HPAs de alto peso molecular e outros compostos orgânicos recalcitrantes por meio de sistemas enzimáticos já bastante caracterizados (Kirk & Farrell, 1987; Mester & Tien, 2000; Atagana et al., 2006).

Mas para que a degradação ocorra, é necessário que os micro-organismos e os contaminantes estejam em contato. Isto não é simples, uma vez que nem os micro-organismos, nem os contaminantes estão uniformemente espalhados no ambiente. Algumas bactérias são móveis e apresentam uma resposta quimiotática, em que podem sentir o contaminante e se mover em direção a ele. Outros micro-organismos como os fungos, crescem em uma forma filamentosa em direção ao contaminante (Vidali, 2001). Outra dificuldade é que muitos compostos devido à baixa solubilidade a água ou por estarem adsorvidos em substratos diversos, como argilas do solo, não estão biodisponíveis a ação microbiana. O principal processo utilizado pelos micro-organismos para aumentar essa biodisponibilidade dos contaminantes é a produção de biossurfactantes, que são moléculas anfipáticas de grande diversidade estrutural, variando de glicolipídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas até ácidos graxos, lipídeos neutros e fosfolipídeos (Das et al., 2008a). Devido à sua estrutura anfifílica, os biossurfactantes aumentam a área de superfície e a solubilidade de compostos hidrofóbicos, além de alterarem as propriedades da superfície das células bacterianas, aumentando o contato dos micro-organismos com os poluentes e favorecendo sua degradação por esses micro-organismos (Pacwa-Płociniczak et al., 2011). Além disso, para que a degradação ocorra com sucesso, o micro-organismo precisa ser tolerante ao poluente. Algumas características propiciam sua adaptação a várias condições ambientais adversas, como seu crescimento rápido, versatilidade metabólica, plasticidade genética e rápida adaptação a variações do meio, tornando-os capazes de degradar contaminantes em diversos locais (Tonini et al., 2010).

1.3. Estratégias de biorremediação

O tratamento dos solos e das águas contaminadas por hidrocarbonetos pode ser realizado por diversas técnicas, desde que consideradas as condições intrínsecas e singulares de cada local contaminado. Esses métodos podem ser aplicados *in situ* ou *ex situ*, com o propósito de se obter maior efetividade aliada ao menor impacto ambiental e reduzido custo financeiro (Bisognin, 2012). As técnicas *in situ* são definidas como aquelas que são

aplicadas ao solo e águas subterrâneas no local da contaminação, com o mínimo de perturbação do ambiente. As técnicas *ex situ* envolvem a remoção e a destinação do material para uma instalação específica e apropriada, onde será realizado o tratamento (Vidali, 2001).

1.3.1. Biorremediação *in situ*

Os métodos *in situ* possuem geralmente um custo menor e causam menor perturbação e liberação de contaminantes do que as técnicas *ex situ*. Além disso, um grande volume de amostra pode ser tratado de uma vez só utilizando essa metodologia. No entanto, as técnicas *in situ*, normalmente, são mais demoradas do que as técnicas *ex situ*, podem ser difíceis de manejar e não são muito eficazes em locais menos permeáveis (Sonawdekar, 2012). Alguns dos métodos de biorremediação *in situ* incluem:

Bioventilação e biosparging. O bioventing e o biosparging são tratamentos semelhantes, usando injeção de ar atmosférico. A aeração tem como objetivo fornecer oxigênio ao ambiente, favorecendo o crescimento de micro-organismos aeróbios que utilizam este elemento como aceptor final de elétrons, viabilizando a oxidação do poluente (Trindade et al., 2005). A diferença entre as duas técnicas está relacionada com o local onde o ar é injetado; na zona não saturada do solo, no caso da bioventilação, e na zona saturada, no caso do biosparging (Silva, 2009). Essas técnicas apresentam baixo custo, requerem o uso de poucos equipamentos e técnicos. No entanto, apresentam a dificuldade de aplicação em solos argilosos, principalmente quando estes têm elevado grau de compactação e elevado teor de umidade, o que dificulta a circulação do ar (Boopathy, 2000).

Bioaugmentação. Este processo envolve a introdução de micro-organismos ou enzimas microbianas ao solo contaminado para estimular a degradação dos contaminantes orgânicos presentes. Os biocatalizadores introduzidos devem apresentar a capacidade de degradação dos contaminantes e serem capazes de permanecer viáveis e competir com os micro-organismos existentes no local (Top et al., 2002; Teng et al., 2010). Esta técnica também pode ser realizada na remediação *ex-situ*.

Bioestimulação. Esta técnica envolve a identificação e o ajuste de fatores que podem estar afetando a taxa de degradação dos poluentes pelos micro-organismos degradadores já existentes no local da contaminação (Tyagi et al., 2011). Entre eles, destacam-se o pH, o teor de umidade, a temperatura, a correção dos níveis de nutrientes (fontes de carbono orgânico, fósforo, nitrogênio, etc.) e de aceptores finais de elétrons (Ollivier & Magot, 2005). Este processo também pode ser aplicado nas técnicas de remediação *ex-situ*.

1.3.2. Biorremediação *ex situ*

Nestas técnicas de remediação, o solo contaminado é removido do local onde estava originalmente para tratamento em outro local. Esta descrição se aplica tanto ao material que é levado para outro local, quanto ao que simplesmente é movido para outra parte do mesmo local (Tonini et al., 2010). Estes tratamentos podem ser mais bem controlados e monitorados, e como resultado, normalmente demandam menos tempo quando comparado aos tratamentos *in situ*. No entanto, os custos de escavação e transporte tornam-os mais onerosos que os tratamentos *in situ* (Sayara, 2010). Alguns dos tratamentos *ex-situ* são:

Landfarming. O sistema de landfarming é um sistema de tratamento de resíduos contaminados em fase sólida. Nesta técnica, os micro-organismos da camada superficial do solo são estimulados a degradar os poluentes transformando-os em substâncias inertes como CO₂ e água, por meio do revolvimento do solo usando arados agrícolas, além da adição de nutrientes e água (Boopathy, 2000; Tonini et al., 2010).

Compostagem. Técnica na qual o solo contaminado é removido do local onde estava originalmente e colocado na forma de pilhas, num local que permita o controle da lixiviação do chorume produzido na degradação dos compostos e do escoamento superficial da água de irrigação e da chuva (Jacques et al., 2007; Tonini et al., 2010). Neste solo, será desencadeado um processo em que os micro-organismos aeróbios irão degradar os contaminantes orgânicos, transformando-os em CO₂ e água. Nesta estratégia, ocorre a adição de um agente estruturante ao solo, a fim de aumentar a sua

permeabilidade, conseqüentemente promovendo maior velocidade de transferência de oxigênio. Normalmente, utilizam-se os seguintes materiais como agentes estruturantes: pedaços de grama e madeira, folhas, bagaço de cana, serragem ou esterco. Devido à natureza de maior biodegradabilidade destes materiais quando comparada aos contaminantes recalcitrantes, eles são prontamente degradados em material orgânico estabilizado, favorecendo o aumento da população e conseqüentemente do potencial catalítico do processo (Riser-Robert, 1998). Nestas células, realiza-se controle mais rigoroso, o que não ocorre no landfarming, sendo, portanto, mais seguro e apropriado para tratamento de solos contendo compostos que oferecem elevado risco ambiental (Sayara et al., 2009).

Biopilhas. Esta técnica é um híbrido de landfarming e compostagem. Essencialmente, as células manipuladas são construídas como pilhas de compostagem aeradas. Esta tecnologia envolve o empilhamento de solos contaminados, onde ocorre a estimulação da atividade microbiana aeróbia através de aeração e adição de nutrientes (Kumar et al., 2011; Sonawdekar, 2012). As biopilhas são construídas de tal forma que passe, sob elas, um duto perfurado com a finalidade de recolher o material lixiviado e succionar o ar das colunas do solo promovendo vácuo, que força, por sua vez, a renovação do ar no interior do sistema, através da entrada de uma nova corrente (Seabra, 2006).

Biorreator de lama. O solo contaminado é removido do local de contaminação e tratado em um biorreator controlado, onde a lama é misturada para manter os sólidos em suspensão, eliminando a heterogeneidade de distribuição dos contaminantes no solo e aumentando a disponibilidade dos contaminantes aos micro-organismos degradadores (Khan et al., 2004). Além disso, no interior do biorreator, as condições de pH, disponibilidade de nutrientes, aeração e temperatura são otimizadas para aumentar o crescimento e as taxas de degradação dos poluentes (Tonini et al., 2010).

1.4. Características de um aquífero: dinâmica dos contaminantes e diversidade microbiológica

Aquífero é toda formação geológica em que a água pode ser armazenada e que possua permeabilidade suficiente para permitir que esta se movimente sob a ação de um diferencial de pressão hidrostática (Borghetti et al., 2004). O fluxo dessa água subterrânea no solo permeável forma uma zona não saturada, onde o solo está apenas parcialmente preenchido por água, e uma zona saturada, onde o solo está completamente preenchido por água. Esta heterogeneidade pode afetar diretamente o fluxo de contaminantes, tornando o aquífero um ambiente complexo e difícil de ser estudado (Gueting et al., 2015).

A contaminação orgânica forma plumas e seu destino no aquífero é controlado por uma multiplicidade de processos abióticos e bióticos, como transporte, diluição, dispersão e degradação química ou microbiana (Winderl et al., 2008). Esses contaminantes podem ser solúveis em água, mas podem formar uma fase líquida individual, conhecida como NAPL (fase líquida não aquosa). NAPLs podem ser divididos em dois grupos, de acordo com sua densidade em relação à água, os menos densos que a água (LNAPLs) e os mais densos que água (DNAPLs). Os LNAPLs tendem a acumular entre a região não saturada e a região saturada, ficando acima da camada de água. Vários hidrocarbonetos, como o tolueno, o benzeno e o xileno podem formar LNAPs. Enquanto os DNAPLs permeiam a zona saturada e tendem a se acumular na base do aquífero, tornando mais difícil o acesso e a remediação. Entre esses compostos estão o creosoto (incluindo os HPAs) e solventes clorados (Müller & Sedláčková, 2003; Soga et al., 2004). Vários métodos de remediação têm sido utilizados para tratar esse tipo de contaminação, incluindo sistemas de bombeamento para remoção dos NAPLs, lavagem química com surfactantes e solventes, oxidação química e ar comprimido para remover os compostos voláteis, com eficiências variáveis e limitações (Huling & Weaver, 1991; Soga et al., 2004) . A biorremediação é um método econômico e que causa menos impacto ambiental que alguns dos citados, o que pode ser muito útil para complementar esses tratamentos (Lien et al., 2016; Thornton et al.,

2016) e por isso, estudar todos os fatores que envolvem esse processo é muito importante.

Devido às baixas taxas de reabastecimento de oxigênio nos sistemas de água subterrânea, o oxigênio é rapidamente esgotado após a entrada de grandes cargas do contaminante (Anderson & Lovley, 1997). Por isso, dentro de aquíferos contaminados com hidrocarbonetos, formam-se plumas anóxicas de contaminantes com compartimentos redox distintos, e conseqüentemente distribuição diferenciada de grupos microbianos capazes de usar os doadores e aceptores de elétrons disponíveis no local. Por exemplo, a metanogênese ocorreria mais próxima à fonte da contaminação, onde o potencial redox é mais negativo, seguida de redução de sulfato, manganês (IV) e redução de óxido de ferro (III), redução de nitrato e, finalmente, os processos aeróbios em direção à extremidade distal da pluma, onde o potencial redox é mais positivo (Christensen et al., 2000). Porém, este conceito de zoneamento redox (Figura 1A) tem sido questionado. Os aceptores de elétrons dissolvidos, esgotados na zona de origem, não podem ser prontamente reabastecidos na pluma logo em seguida, devido ao fluxo laminar e à dispersão transversal limitada em meios porosos (Meckenstock et al., 2015). Evidências de campo têm apoiado este conceito teórico, mostrando o esgotamento dos aceptores de elétrons no centro da pluma (Anneser et al., 2010). Com isso, outras teorias têm surgido para tentar explicar a biodegradação em plumas de contaminação. O “conceito de franjas de pluma” (Figura 1B) é uma hipótese que indica que os gradientes redox são encontrados somente em escalas espaciais muito finas nas bordas da contaminação e não em zonas longitudinais ao longo da contaminação. Nas bordas da pluma ocorreria sobreposição de contra-gradientes de doadores e aceptores de elétrons através do reabastecimento dos mesmos por dispersão e difusão através das águas subterrâneas circundantes e nesse ponto seria o local de maior biodegradação (Bauer et al., 2008). Assim, uma caracterização detalhada das espécies redox e microbiota presentes nas plumas de contaminação são pré-requisitos para uma melhor compreensão dos processos de biodegradação nesses locais.

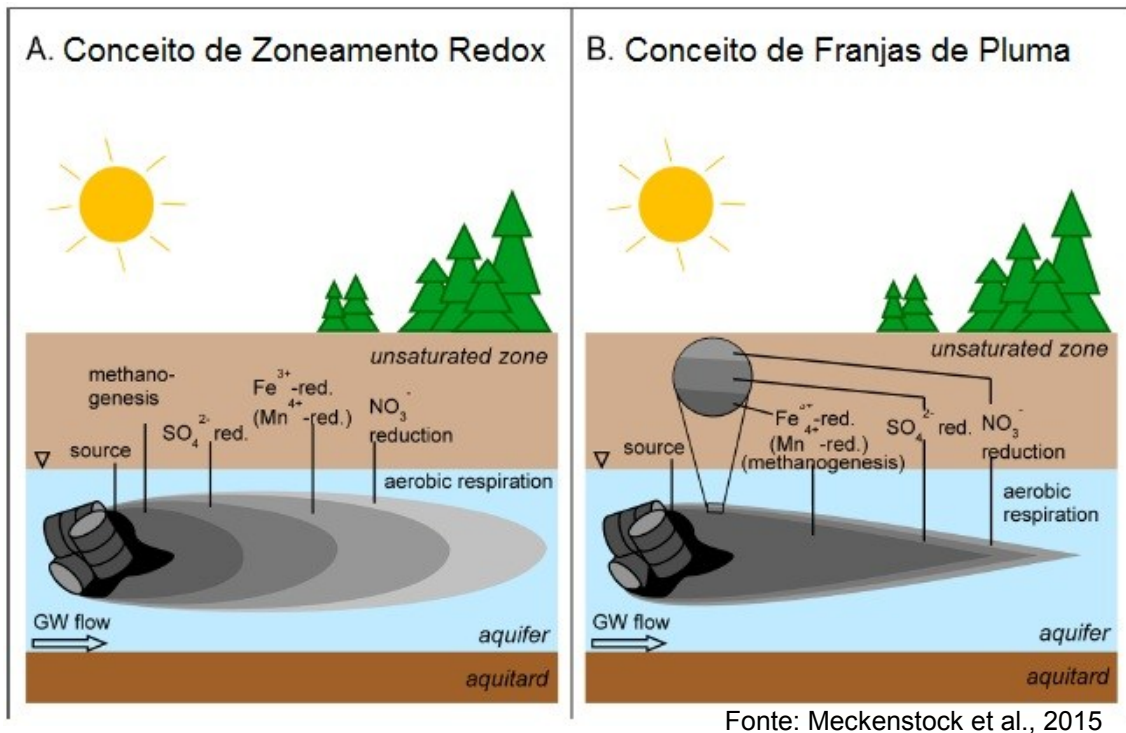


Figura 1 – Comparação do conceito de zoneamento redox (A) e do conceito de franjas de pluma (B), ambos descrevendo a distribuição espacial de aceptores de elétrons e processos respiratórios em uma pluma de contaminantes de hidrocarbonetos.

Convencionalmente, acredita-se que os ecossistemas de aquíferos sejam alimentados por matéria orgânica vinda da superfície e dominados por micro-organismos heterotróficos que vivem sob condições frequentemente oligotróficas. Mas em um estudo de dois meses em um aquífero em Rifle (EUA) alterado pela adição de nitrato, a análise metatranscriptômica revelou uma atividade bacteriana quimiolitotrófica difundida e relevante para os ciclos de C, S, N e Fe (Jewell et al., 2016). Lozupone & Knight (2007) analisaram a diversidade bacteriana em diferentes ambientes físicos do mundo (por exemplo: superfície do solo, água não salina de rios e lagos, água salina superficial, sedimento de ambientes salinos, gelo marinho, dentre outros), utilizando 21.752 sequências de rRNA 16S de 111 estudos e agruparam essas amostras baseadas nas similaridades das linhagens filogenéticas. Considerando essas similaridades, as amostras de aquífero formaram um grupo com outras amostras de solos submersos (arrozal, solos pantanosos e

sedimentos de caverna), grupo esse próximo ao formado pelas amostras de sedimentos de lagos e reservatórios não salinos.

Em relação aos aquíferos contaminados, a variedade de micro-organismos encontrados também é grande e varia de acordo com a contaminação e a região da pluma analisada. Em um aquífero contaminado com BTEX, Alfreider & Vogt (2007) encontraram dominando o centro da pluma várias bactérias das classes Proteobacteria e Firmicutes, incluindo diferentes bactérias redutoras de sulfato formadoras e não formadoras de esporos e membros do gênero *Geobacter*. Amostras não poluídas recuperadas de fora da pluma revelaram vários filotipos que também foram observados no centro da pluma. As sequências bacterianas recuperadas da borda da pluma foram dominadas por vários gêneros da subclasse Betaproteobacteria, que não foram associados a outros filotipos obtidos no estudo. A comunidade da região da borda da pluma de contaminação foi caracterizada pelo alto número de bactérias cultiváveis aeróbias degradadoras de benzeno e tolueno. Zhu e colaboradores (2016) encontraram uma diversidade filogenética inesperada e alta abundância dos genes da putativa óxido nítrico dismutase (Nod), enzima que catalizaria a dismutação oxigenada do NO em N₂ e O₂, em aquíferos contaminados e águas residuais. O O₂ formado nessa reação permitiria aos micro-organismos empregar vias catabólicas aeróbias em habitats anóxicos, que seria uma opção de grande apelo para a biorremediação.

1.5. Características do creosoto

O creosoto é um líquido oleoso espesso, de cor âmbar a preta, formado principalmente da destilação do alcatrão de hulha, um subproduto da produção de gás a partir do carvão (Rasmussen et al., 2002; Mateus et al., 2008). De forma geral, pode-se dizer que toda matéria vegetal, seja na forma natural, parcialmente decomposta ou fossilizada, quando submetida a um processo de carbonização liberará gases que quando condensados formarão o alcatrão. A destilação desse alcatrão fornece, entre outros produtos, o creosoto. Assim, existe a possibilidade de se obter o alcatrão e, conseqüentemente, o creosoto a partir de matérias primas diversas, tais como madeira, turfa, lignito, hulha,

xistos betuminosos e petróleo (Jankowsky, 1986). Este óleo é composto por uma mistura complexa de 85% de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), principalmente naftaleno, 2-metilnaftaleno, fenantreno, antraceno, 1-metilnaftaleno e fluoreno, 10% de compostos fenólicos, predominantemente fenol, os três isômeros de cresol, pentaclorofenol, xilenol e 2,3,5-trimetilfenol e 5% de compostos heterocíclicos aromáticos de oxigênio (dibenzofurano), enxofre (benzo[b]tiofeno e dibenzotiofeno), e nitrogênio (quinolina, isoquinolina e carbazol) (Mueller et al., 1989). Ao todo, podem ser encontrados pelo menos 200 compostos (Mueller et al., 1989). Sua principal utilização é como preservante de madeira para dormentes de vias férreas, postes, cruzetas, mourões para cercas rurais, esteios e vigas, sendo amplamente utilizado no mundo todo (Organização Mundial da Saúde, 2004; Anvisa, 2013).

Devido à toxicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade potencial de muitos destes compostos, os resíduos de creosoto representam uma ameaça ao meio ambiente (Richardson & Gangolli, 1992). Derramamentos acidentais e práticas incorretas de eliminação de resíduos de creosoto levaram a uma grave contaminação de solos e águas subterrâneas (Mueller et al., 1989; Rasmussen et al., 2002; Kulik et al., 2006). De 20 a 40% do peso total do creosoto pode ser representado por 16 HPAs, definidos como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) (Kohler et al., 2000; Kulik et al., 2006). No Brasil, o creosoto se enquadra na Classe I da classificação toxicológica da Anvisa, classe dos compostos agrotóxicos considerados extremamente tóxicos (Anvisa, 2013). A classificação toxicológica de um produto formulado é feita com base nos resultados dos estudos toxicológicos agudos realizados com a formulação pretendida (Anvisa, 2018).

O creosoto pode contaminar o ambiente de diversas formas, afetando o ar, a água e o solo próximos à fonte de contaminação. Os dados sobre produção e emissão de creosoto são antigos e escassos. A produção de creosoto na União Europeia (UE) foi estimada em cerca de 60.000-100.000 t por ano (Organização Mundial Da Saúde, 2004). A contaminação associada ao setor ferroviário já foi considerada muito significativa. Cerca de 1710 t de compostos do creosoto foram emitidos na atmosfera pelas dormentes da rede

ferroviária suíça a cada ano (Kohler et al., 2000). O solo e conseqüentemente, plantações próximas às fontes de contaminação também podem ser afetadas. Uma plantação de azeitonas próxima a uma área utilizada para tratar dormentes de ferrovias na Itália também foi contaminada com creosoto. Quantidades muito elevadas de HPAs (variando de 114,7 a 3121,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de HPAs) foram encontradas em amostras de solo em até 1 m da fonte de contaminação. A carga de HPAs diminuiu rapidamente a medida que a distância das dormentes ferroviárias ia aumentando. Altas concentrações de HPA, até 6359,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, também foram encontradas no óleo extraído das azeitonas colhidas nessa área rural, onde velhas dormentes ferroviárias foram armazenadas (Moret et al., 2007).

Há muito tempo, sabe-se que os HPAs podem ter efeitos prejudiciais graves a saúde humana. Quando ingeridos, estes compostos são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal, devido ao seu caráter lipofílico (Cerniglia, 1984). A principal via de absorção de HPA é a absorção dérmica, como demonstrou um estudo com 12 trabalhadores em uma produção de coque (Vanrooij et al., 1993). Foi observado que 75% da quantidade total absorvida de HPA (especificamente pireno) foi por via dérmica. Em geral, quanto maior for o número de anéis de benzeno, maior será a toxicidade destes compostos (Cerniglia, 1992).

1.6. Legislação para remediação das áreas contaminadas

Por muitos anos, o Brasil não contou com uma legislação específica que determinasse valores de referência para proteção ou remediação de solos e águas subterrâneas. A primeira iniciativa para estabelecimento de limites para presença de determinados compostos no ambiente foi tomada em nível local, no Estado de São Paulo, através da CETESB em cooperação técnica com o governo da Alemanha, que estabeleceu restrições por meio de valores de concentração ideais para alguns compostos no solo e água subterrânea (Bisognin, 2012). Estes valores foram conceituados e passaram a ser utilizados como: Valor de Referência de Qualidade (V.R.Q.), concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea, que define um solo

como limpo e a água como de qualidade natural; Valor de Prevenção (V.P.), concentração de determinada substância acima da qual podem ocorrer alterações prejudiciais à qualidade do solo e da água subterrânea e; Valor de Intervenção (V.I.), concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea acima da qual, existem riscos potenciais, diretos ou indiretos à saúde humana (CETESB, 2001).

Ao definir os valores em 2001, a CETESB estabeleceu limites de contaminação para solo e água subterrâneas, incluindo apenas o naftaleno, entre os HPAs. Em 2005, a Companhia ampliou a lista, informando os valores de VRQ, VP e VI para áreas agrícolas, residenciais e industriais, bem como os Valores de Intervenção de vários outros compostos, incluindo outros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como o antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(a)pireno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno e indeno(1,2,3-c,d)pireno (Bisognin, 2012).

Em 28 de dezembro de 2009, o CONAMA publicou a Resolução n° 420, adotando os mesmos valores orientadores estipulados pela CETESB, 2005. Esta Resolução ainda estabeleceu um prazo de quatro anos para os órgãos ambientais estaduais determinarem seus Valores de Referência de Qualidade, baseados especificamente no tipo de solo de cada região (Bisognin, 2012). Este prazo foi estendido por mais 1 ano pela Resolução n° 460, de 2013 e mais um parágrafo foi adicionado a resolução anterior, indicando que os Estados e o Distrito Federal deverão informar trimestralmente ao Ministério do Meio Ambiente e ao Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) os resultados das ações adotadas para o cumprimento do disposto.

Em nível mundial, as legislações referentes à contaminação por hidrocarbonetos são de iniciativa de órgãos ambientais nos Estados Unidos, sob competência da US EPA, e na União Européia, através da Comissão das Comunidades Européias e da Lista Holandesa de valores de qualidade do solo e da água subterrânea (Vaz, 2010).

1.7. Biodegradação dos compostos presentes no creosoto

O creosoto é considerado um composto recalcitrante, sua persistência no ambiente deve-se a hidrofobicidade de seus componentes principais (Mesquita, 2004). A diminuição das concentrações destes compostos no ambiente pode ocorrer através de volatilização, biodegradação, transferência para organismos, ligação às partículas do solo e percolação para o lençol freático (Mesquita, 2004). As interações solo-contaminante ocorrem devido a vários tipos de forças interativas, como dipolo-dipolo, dipolo/dipolo-induzido e pontes de hidrogênio. A matéria orgânica presente no solo é considerada o fator dominante da interação entre o solo e o contaminante orgânico (Pignatello, 1998). Entre esses processos, a biodegradação pode representar a principal via de remoção do creosoto de ambientes contaminados, e por isso, a exploração desse processo, que ocorre naturalmente, pode render um meio eficiente para remediar esses locais. A grande variedade de componentes químicos presentes no creosoto dificulta uma definição clara de um processo para a degradação desse composto. No geral, os estudos que tentam descrever a biodegradabilidade de misturas químicas complexas, como o creosoto, tendem a ser inconclusivos. Por outro lado, a degradação microbiana dos componentes individuais do creosoto tem sido mais bem descrita (Bamforth & Singleton, 2005; Haritash & Kaushik, 2009; Lu et al., 2011).

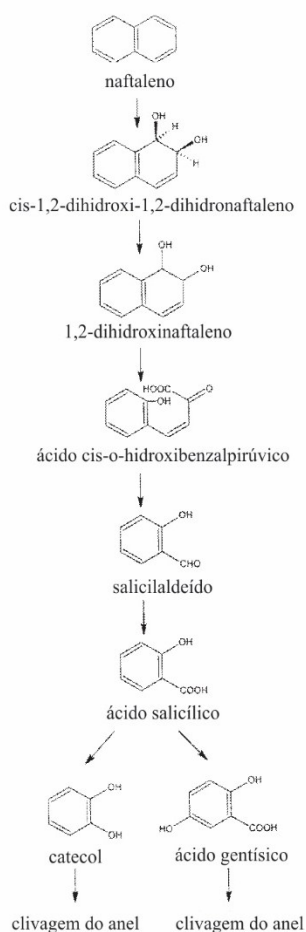
Na literatura existem muitas pesquisas sobre a degradação de HPAs, que são hidrocarbonetos aromáticos com dois ou mais anéis de benzeno fundidos (Haritash & Kaushik, 2009). Estes hidrocarbonetos são sólidos incolores ou amarelo pálido, com baixa solubilidade em água, altos pontos de fusão e ebulição e baixa pressão de vapor. O aumento do número de anéis aromáticos geralmente faz com que haja a diminuição da solubilidade e o aumento da hidrofobicidade do HPA, além de diminuir a volatilidade do composto (Mesquita, 2004). Alguns dos HPAs normalmente estudados são: antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, dibenzo(a,c)antraceno, fenantreno, fluoreno, fluoranteno, naftaleno e pireno (Haritash & Kaushik, 2009).

Devido ao risco que os HPAs representam, a eliminação desses compostos do solo contaminado é essencial. Para isso, o tratamento biológico é considerado uma escolha eficiente e financeiramente acessível comparado ao tratamento físico-químico, uma vez que apresenta vantagens como a degradação completa dos poluentes, menor custo de tratamento, menor perturbação do solo e maior segurança (Habe & Omori, 2003). Várias bactérias que degradam HPAs têm sido descritas, e algumas podem utilizar HPAs de baixa massa molecular como sua única fonte de carbono (Peng et al., 2008a).

1.7.1. Metabolismo bacteriano de naftaleno

A biodegradação do naftaleno é a mais bem estudada entre os HPAs, por ser o HPA mais simples e solúvel, além do fato dos micro-organismos que o degradam serem relativamente fáceis de isolar. Estes micro-organismos são geralmente bactérias gram-negativas, a maioria delas pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (Mrozik et al., 2003). As vias biodegradativas também têm sido relatadas em bactérias do gênero *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Aeromonas*, *Rhodococcus* e *Bacillus* (Cerniglia, 1984; Neilson & Allard, 1998; Annweiler et al., 2000). Inicialmente, as bactérias oxidam naftaleno incorporando os dois átomos do oxigênio molecular na molécula aromática para formar cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno. Este processo é realizado pelas enzimas naftaleno dioxigenases, que em *Pseudomonas* sp. NCIB 9816 e *Pseudomonas putida* ATCC 17 484 agem como sistemas de enzimas de componentes múltiplos, que são responsáveis pela formação de cis-dihidrodiol naftaleno (Jeffrey et al., 1975; Cerniglia, 1984). Este complexo consiste em três componentes protéicos: flavoproteína (redutase_{NAP}), ferredoxina_{NAP} de dois ferros e enxofres e oxigenase terminal ISP_{NAP}. O segundo passo na oxidação bacteriana do naftaleno é a conversão de cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno em 1,2-dihidroxi-naftaleno. Esta reação é catalisada pela naftaleno (+)-cis-dihidrodiol desidrogenase e requer NAD⁺ como um aceptor de elétrons (Mrozik et al., 2003). Em *Pseudomonas* sp. o próximo passo leva à clivagem enzimática do 1,2-dihidroxi-naftaleno para cis-2-hidroxibenzalpiruvato, que é então convertido através de uma série de dioxigenases a ácido salicílico e

piruvato. O ácido salicílico é oxidado pela salicalato hidroxilase a catecol, que pode passar por uma orto ou meta clivagem do anel benzeno, dependendo do metabolismo bacteriano (Figura 2) (Dagley, 1971). Uma via semelhante foi descrita para o metabolismo de naftaleno por *Aeromonas* sp. Somente o metabolismo do ácido salicílico é diferente, pois é convertido em ácido gentísico (Figura 2) (Kiyohara & Nagao, 1978).



Fonte: Mrozik et al., 2003

Figura 2 - Via de degradação de naftaleno por algumas bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Aeromonas*.

Muitos pesquisadores indicaram que os genes que codificam as enzimas responsáveis pela degradação de naftaleno em *Pseudomonas* são encontrados em plasmídeos (Habe & Omori, 2003; Lu et al., 2011). O plasmídeo NAH7 é o mais estudado, sendo que os genes catabólicos estão organizados em três operons (Habe & Omori, 2003). O primeiro operon codifica as enzimas da via superior, envolvidas na conversão de naftaleno para salicilato, enquanto o

segundo codifica as enzimas da via inferior, envolvidas na conversão do salicilato para um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (CAT) através da meta clivagem do anel e o terceiro codifica uma proteína reguladora de ambas as vias (NahR). Tanto o operon superior, quanto o inferior são regulados por essa proteína reguladora de controle positivo de ação trans codificada pelo gene *nahR* (Lu et al., 2011). Neste sistema, os genes que codificam a dioxigenase terminal são altamente conservados e a proteína reguladora desses genes é composta de uma grande subunidade α e uma pequena subunidade β (Cébron et al. 2008). A subunidade α contém duas regiões conservadas: uma é o centro Rieske [Fe²⁺-S₂] e a outra é o domínio catalítico mononuclear que contém ferro. A dioxigenase de HPA mais estudada (HPA-RHD α) é a naftaleno 1,2 dioxigenase de *P. putida* NCIB 9816-4, em que a subunidade α é codificada pelo gene *nahAc* (Lu et al., 2011).

Outros genes catabólicos de HPAs também existem em bactérias Gram-negativas, incluindo os genes *phd* de *Comamonas testosterona* GZ39 (Stach & Burns, 2002), genes *nag* de *Pseudomonas* sp. U2 (Fuenmayor et al., 1998), e os genes *phn* de *Burkholderia* sp. RP007 (Lloyd-Jones et al., 1999), e em bactérias Gram-positivas, incluindo os genes *nar* de *Rhodococcus* sp. NCIMB12038 (Kimura et al., 2006) e genes *phd* de *Nocardioides* sp. KP7 (Saito et al., 2000). A maioria desses genes não é similar ou possui pouca similaridade com os genes clássicos do tipo *nah* (Habe & Omori, 2003). Além da degradação de naftaleno, os genes citados também estão relacionados com a degradação de outros compostos como o fenantreno e o antraceno (Peng et al., 2008a).

1.7.2. Metabolismo bacteriano de hidrocarbonetos aromáticos tricíclicos

Os hidrocarbonetos aromáticos tricíclicos antraceno e fenantreno têm sido usados como substratos modelo nos estudos sobre a degradação ambiental de HPAs, já que ambas as estruturas são encontradas em HPAs carcinogênicos como benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno e 3-metilcolantreno (Mrozik et al., 2003). O antraceno pode ser completamente mineralizado por *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Nocardia*, *Beijerinckia*, *Rhodococcus* e

Mycobacterium com o dihidriol como intermediário oxigenado inicial (Evans et al., 1965; Dean-Ross et al., 2001; Moody et al., 2001). Com exceção de *Mycobacterium*, estas espécies oxidam o antraceno nas posições 1,2 para formar cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidroantraceno e, em seguida, convertem este composto em 1,2-hidroxiantraceno através de uma dihidrodiol desidrogenase dependente de NAD⁺. Na etapa seguinte, estas bactérias oxidam 1,2-dihidroxiantraceno para o ácido cis-4-(2-hidroxinaft-3-il)-2-oxobutenóico, produto da clivagem do anel, com a subsequente conversão a ácido 2-hidroxinaftóico. Outra clivagem do anel leva a formação de 2,3-di-hidroxinaftaleno, que é metabolizado para salicilato e catecol. O catecol é degradado em compostos alifáticos simples por uma via semelhante à conversão de catecol na via de degradação de naftaleno (Evans et al., 1965; Cerniglia, 1984). Várias espécies de *Mycobacterium* metabolizam o antraceno, podendo realizar a reação nos carbonos 1 e 2 ou nos carbonos 9 e 10, supostamente através do ataque tanto de dioxigenases, quanto de mono-oxigenases ao núcleo aromático. O antraceno cis-1,2-dihidrodiol resultante é desidrogenado a 1,2-dihidroxiantraceno. O acúmulo de 1-metoxi-2-hidroxiantraceno fornece uma evidência adicional da desoxigenação do antraceno (Figura 3) (Mrozik et al., 2003).

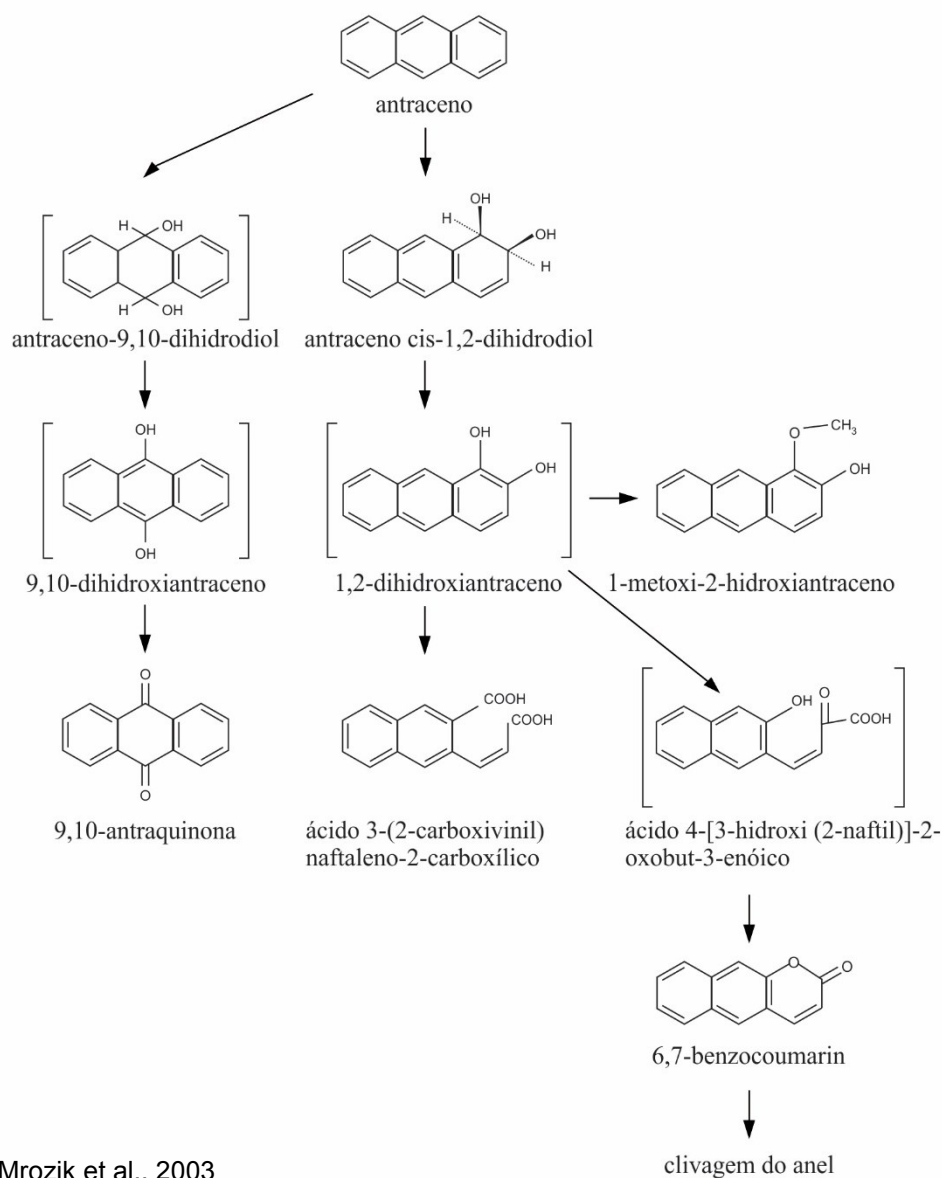
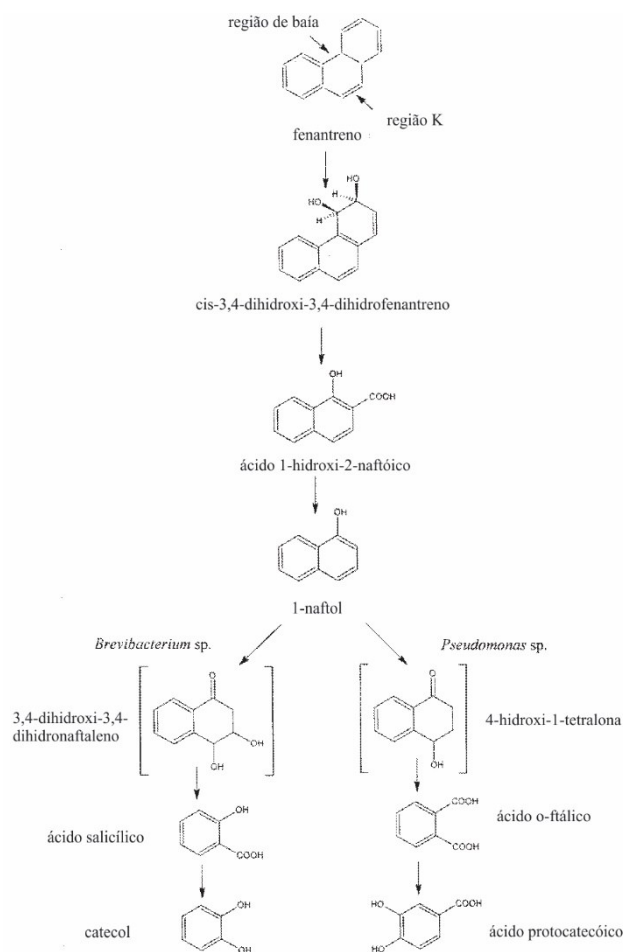


Figura 3 - Via proposta para a degradação de antraceno por *Mycobacterium* sp. PYR-1.

As vias de degradação do fenantreno têm sido descritas em muitas linhagens de *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Aeromonas*, *Sphingomonas*, *Acidovorax*, *Brevibacterium*, *Mycobacterium* e *Nocardia* (Kiyohara et al., 1976; Molina et al., 1999; Samanta et al., 1999; Pinyakong et al., 2000; Mrozik et al., 2003). Em geral, as bactérias inicialmente oxidam fenantreno nas posições 1,2 e 3,4 para formar cis-1,2-di-hidroxi-1,2-dihidrofenantreno ou cis-3,4-dihidroxi-3,4-dihidrofenantreno. O fenantreno-cis-3,4-dihidrodiol é o isômero

predominante, que é convertido em 3,4-dihidroxifenantreno. Em seguida, o produto da clivagem do anel é metabolizado em ácido 1-hidroxi-2-naftóico, que é subseqüentemente descarboxilado a 1,2-di-hidroxi-naftaleno e, em seguida, submetido à meta clivagem para formar o ácido salicílico (Figura 4) (Evans et al., 1965; Jerina et al., 1976; Gibson & Subramanian, 1984). O ácido salicílico também pode ser degradado para a formação de catecol ou ácido gentísico. Tanto catecol, quanto ácido gentísico passam por clivagem do anel para formar intermediários do CAT (Houghton & Shanley, 1994).



Fonte: Mrozik et al., 2003

Figura 4 - Via proposta para a degradação de fenantreno por *Brevibacterium* sp. HL4 e *Pseudomonas* sp. DLC-P11.

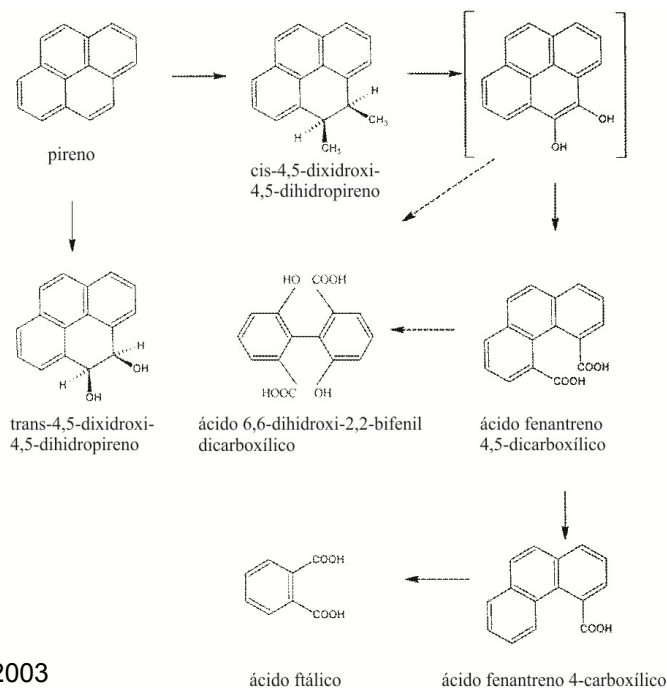
1.7.3. Metabolismo bacteriano de hidrocarbonetos de quatro ou mais anéis aromáticos

A biodegradação de HPAs que contêm mais que três anéis aromáticos não é tão conhecida como a utilização de hidrocarbonetos aromáticos di e tricíclicos. Isto pode ser devido ao maior tamanho e extrema insolubilidade desses HPAs como fluoranteno, benzo[a]pireno e pireno, que tornam estes compostos inacessíveis para a grande maioria dos micro-organismos, tornando as vias de degradação desses compostos mais raras (Cerniglia, 1984). Por exemplo, a meia vida ($t_{1/2}$) da molécula de fenantreno (3 anéis) no solo e nos sedimentos pode variar de 16 a 126 dias, enquanto que a meia vida da molécula de cinco anéis benzo[a]pireno (BaP) pode variar de 229 a 1400 dias (Shuttleworth & Cerniglia, 1995).

A degradação do fluoranteno tem sido observada principalmente por bactérias do gênero *Mycobacterium* e *Alcaligenes*. A degradação por *Mycobacterium* sp. PIR-1 envolve dioxigenação nas posições 1,2 e 7,8, produzindo fluoreno-9-ona ou acenafteno-7-ona, depois da clivagem do anel (Habe & Omori, 2003). Em uma linhagem de *A. denitrificans* este último composto é oxidado a 3-hidroximetil-3,4-dihidrobencocumarina (Neilson & Allard, 1998). Em outra linhagem de *Mycobacterium* sp. KR20, pelo menos, sete metabólitos foram produzidos durante o metabolismo do fluoranteno. Cinco deles foram identificados como: cis-2,3-dihidriol fluoranteno, ácido 9-carboximetileno-fluoreno-1-carboxílico, ácido cis-1,9-dihidroxi-1-hidro-fluoreno-9-ona-8-carboxílico, ácido 4-hidroxibenzocromene-6-ona-7-carboxílico e ácido benzeno-1,2,3-tricarboxílico (Rehmann et al., 2001).

Várias vias de degradação de pireno foram descritas para *Mycobacterium vanbaalenii* PIR-1, incluindo dioxigenação e mono-oxigenação típicos (Heitkamp & Cerniglia, 1988; Brezna et al., 2005). Embora as linhagens de micobactérias possam oxidar pireno através de dioxigenação inicial nas posições 1,2, o metabólito formará derivados o-metilados de pireno-1,2-diol ou o produto final não utilizável 4-hidroxi-perinaftenona (Peng et al., 2008a). A principal via de degradação de pireno é baseada na dioxigenação nas posições 4,5 para produzir os isômeros cis e trans-4,5-pirenedihidrodil por dioxigenase

e monooxigenase, respectivamente. A rearomatização do dihidrodiol e subsequente orto-clivagem leva a formação de ácido 4,5-dicarboxifenantreno, que é descarboxilado para 4-fenantroato. Depois de outra reação de dioxigenação, 4-fenantroato forma cis-3,4-dihidroxifenantreno-4-carboxilato. A rearomatização desse metabólito gera 3,4-dihidroxifenantreno, o qual é posteriormente metabolizado para 1-hidroxi-2-naftoato. As reações enzimáticas subsequentes, incluindo dioxigenação através da clivagem intradiol do anel, resultam na produção de o-ftalato. Em seguida, o ftalato é transformado para intermediários do ciclo dos ácidos tricarbóxicos pela via β -cetoadipato (Figura 5) (Wang et al., 2000; Kim et al., 2003a). Além de *M. vanbaalenii* PYR-1, muitos outros isolados de *Mycobacterium* sp. foram identificados com a capacidade de mineralizar pireno. A maioria das micobactérias degradadoras de HPA descritas são espécies de crescimento rápido dentro do gênero. A presença de paredes celulares ricas em ácidos micólicos nestas bactérias do solo pode ser um fator importante na utilização de substratos hidrofóbicos, incluindo os HPAs, pois como são hidrofóbicos também, otimizam o contato e a solubilização desses compostos (Peng et al., 2008a).



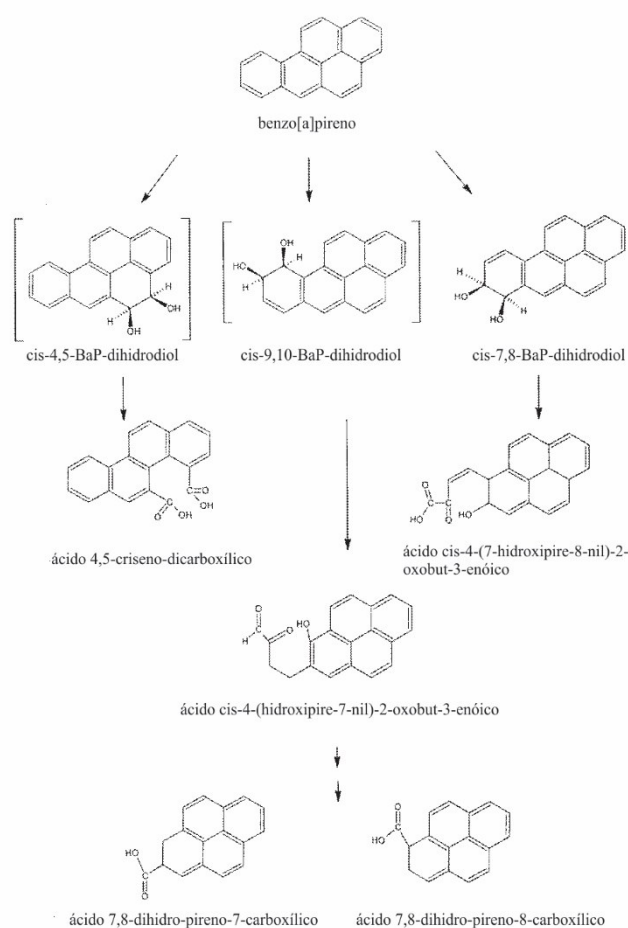
Fonte: Mrozik et al., 2003

Figura 5 - Via proposta para a degradação de pireno por *Mycobacterium* sp. AP1.

Genes que codificam dioxigenases que clivam anéis aromáticos policíclicos, com estruturas diferentes dos clássicos genes *nah*, foram clonados e sequenciados em *Mycobacterium* sp. PYR-1, que é capaz de degradar pireno, fluoranteno, fenantreno e benzo[a]pireno, estes genes foram denominados de genes *nid* (Khan, et al., 2001; Moody et al., 2001). Posteriormente, as 27 enzimas da via completa de degradação pireno foram identificadas. A via envolve quatro etapas de hidroxilação dos anéis catalisadas pelas dioxigenases correspondentes NidAB2, MvanDraft_0817/0818, PhtAaAb, e NidA3B3. As proteínas NidA e NidB apresentam 40-56% de similaridade com as enzimas correspondentes descritas em *Nocardioides* sp. KP7 e *Pseudomonas* sp. NCIMB12038. Três cópias das subunidades terminais das oxigenases (NidAB2, MvanDraft_0817/0818 e PhtAaAb), dihidrodiol desidrogenase (Mvan-Draft_0815) e dioxigenase (Mvan-Draft_3242) foram induzidos em células cultivadas em pireno, demonstrando sua importância no processo de degradação desse composto (Kim et al., 2007).

Existem apenas estudos limitados que documentam a mineralização de HPAs que têm mais de quatro anéis (Kanaly & Harayama, 2000). A maioria das pesquisas é focada no composto de cinco anéis benzo[a]pireno (BaP), porque ele é um dos contaminantes ambientais mais importantes, devido ao potencial conhecido de mutagênese e carcinogênese deste composto (Kalf & Crommentuijn, 1997). A oxidação de BaP por bactérias ocorre quando elas são cultivadas em outros substratos, que podem induzir a produção de algumas enzimas que podem degradar BaP (Peng et al., 2008a). Uma análise dos produtos de degradação de *Mycobacterium* sp. RJGII-135 mostrou que o benzo[a]pireno foi transformado por dioxigenação nas posições 4,5; 7,8 e 9,10. Criseno-4,5-dicarboxilato foi presumivelmente formado por clivagem intradiol do 4,5-di-hidroxi[a]pireno, enquanto que o 7,8 e 9,10-dihidrodiols passaram por clivagem extradiol para formar dihidropireno carboxilatos (Figura 6) (Neilson & Allard, 1998). Zafra e colaboradores (2016) encontraram proporções significativamente maiores de vários genes codificadores de enzimas de ampla especificidade, como naftaleno 1,2-dioxigenase e a cis-PAH dioxigenase, que eventualmente permitem a cis-hidroxilação de vários outros compostos

aromáticos, incluindo HPAs de alto peso molecular, através de análises metagenômicas funcionais em solo contaminado com fenantreno, pireno e benzo[a]pireno, o que indica que essas enzimas desempenham um papel importante nas etapas inicial e intermediária da degradação de desses compostos.



Fonte: Mrozik et al., 2003

Figura 6 - As vias propostas para o metabolismo de benzo[a]pireno por *Mycobacterium* sp. RJGII-135.

1.7.4. Metabolismo fúngico de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os fungos também são capazes de degradar HPAs. Existem dois tipos principais de metabolismo fúngico de HPA, aqueles mediados por fungos não ligninolíticos e os que são mediados por fungos ligninolíticos (também conhecidos como fungos da podridão branca) (Bamforth & Singleton, 2005). A primeira etapa no metabolismo de HPA por fungos não ligninolíticos é oxidar o anel aromático em uma reação catalisada pela enzima citocromo P450

monooxigenase para produzir um óxido de areno (Sutherland et al., 1995). Embora a maioria dos fungos não ligninolíticos não seja capaz de mineralizar completamente os HPAs, os produtos formados dessa degradação são geralmente menos tóxicos e mais solúveis do que os compostos originais (Bamforth & Singleton, 2005). Os fungos ligninolíticos, por sua vez, devido à estrutura irregular da lignina, produzem enzimas extracelulares com especificidade muito baixa ao substrato, tornando-as adequadas a degradação de diferentes compostos, incluindo os HPAs (Cajthaml et al., 2001). O sistema ligninolítico consiste em três grupos de enzimas principais: lignina peroxidase, manganês peroxidase e fenoxidases (lacases, tirosinases) (Haritash & Kaushik, 2009). Diversos estudos tem demonstrado a capacidade destas enzimas purificadas de oxidarem HPAs (Hofrichter et al., 1998). Essas enzimas oxidam os HPAs por gerarem radicais livres para doação de um elétron, que oxida o anel dos HPAs levando a formação de quinonas (Vyas et al., 1994).

1.7.5. Biodegradação de compostos fenólicos

Como os compostos fenólicos compõem uma quantidade menor do creosoto, um número menor de trabalhos foca na remediação de áreas contaminadas com fenóis, cuja fonte tenha sido o creosoto (Ghaly et al., 2012). Fenóis têm solubilidades relativamente altas em água e são conhecidos por serem altamente tóxicos para uma grande variedade de organismos (Guerin, 1999). Devido a essa solubilidade, compostos fenólicos, N-heterocíclicos e benzenos metilados representaram cerca de 80% da toxicidade medida em águas subterrâneas contaminadas com creosoto, enquanto os HPAs correspondem a somente 13% dessa toxicidade, mesmo constituindo até 85% do creosoto puro (Hartnik et al., 2007).

Para a biodegradação aeróbia do fenol, o oxigênio molecular é utilizado pela enzima fenol hidroxilase para adicionar um segundo grupo hidroxila na molécula, na posição orto do grupo hidroxila já presente na molécula, essa reação necessita de NADH_2 . A molécula de catecol resultante (1,2-dihidroxibenzeno) pode então ser degradada por meio de duas vias alternativas,

dependendo do micro-organismo responsável, as vias de orto e meta clivagem. (Basha et al., 2010).

No metabolismo aeróbio de *p*-cresol em *Pseudomonas putida*, *p*-cresol é hidroxilado por uma *p*-cresol metil-hidroxilase periplasmática (PCMH) em *p*-hidroxibenzaldeído com a formação transitória de álcool *p*-hidroxibenzila. A enzima é constituída por duas subunidades em uma composição $\alpha 2\beta 2$: uma subunidade α sítio ativa contendo flavina-adenina-dinucleotídio (FAD) covalentemente ligada a tirosina e uma subunidade β citocromo tipo c. O produto de PCMH, *p*-hidroxibenzaldeído, é oxidado por uma desidrogenase específica dependente de NAD^+ ou NADP^+ formando *p*-hidroxibenzoato. Este composto é hidroxilado por uma oxigenase formando protocatecoato (3,4-dihidroxibenzoato), que serve como substrato para dioxigenases, que o transformam em intermediários do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (CAT) pela via β -cetoadipato (Peters et al., 2007).

O pentaclorofenol (PCP) pode ser degradado por uma grande variedade de vias. O trabalho de Kuwatsuka & Igarashi (1975) mostrou a presença dos intermediários da degradação de pentaclorofenol 2,3,4,6-, 2,3,4,5-, 2,3,5,6-tetraclorofenóis, 2,3,5-, 2,3,4-, 2,4,6-, e 2,3,4- ou 2,4,5-triclorofenóis no solo. Destes, 2,3,4,5-tetraclorofenol, 2,3,6-triclorofenol, e 2,4,6- triclorofenol foram os principais produtos, demonstrando que a degradação foi principalmente por desalogenação redutiva. Enquanto Nevalainen e colaboradores (1993) obtiveram o produto 2,6-diclorohidroquinonana na degradação de PCP, sugerindo que esta reação foi catalisada pela enzima amônio mono-oxigenase, a partir de uma desalogenação pela incorporação de O_2 (Mcallister et al., 1996).

Apesar dos compostos fenólicos estarem presentes em menor quantidade no creosoto, eles são amplamente encontrados em compostos orgânicos na natureza como vegetais em decomposição e no carvão e em efluentes de indústrias siderúrgicas (Michlowicz & Zwolińska, 2011) e de papel e celulose (Peralta-Zamora et al., 1997). Além disso, o fenol é uma unidade estrutural básica de uma grande variedade de compostos orgânicos sintéticos, incluindo os produtos químicos agrícolas e pesticidas (Mueller et al., 1989;

Basha et al., 2010). Devido a isso, uma grande variedade de micro-organismos (leveduras, bactérias e fungos) com capacidade de degradar fenol e compostos fenólicos já foram isolados (Varga & Neujhar, 1970; Roberts & Hedrick, 1979). Espécies de *Bacillus* e *Brachybacterium* foram identificadas como boas degradadoras de fenol (Velmurugan & Arunachalam, 2009). Linhagens fúngicas de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Monicillium*, *Penicillium* e *Phanerochaete* isoladas de um solo contaminado com creosoto também apresentaram grande potencial na degradação de fenóis, degradando de 84 a 100% do fenol quando o solo foi suplementado com nutrientes (Atagana, 2004).

Estudo conduzido por Guerin (1999) mostrou que a utilização da técnica de landfarming, caracterizada pela estimulação da degradação microbiana pela incorporação de oxigênio e de nutrientes à camada reativa de solo, reduziu as concentrações de HPAs e fenóis do solo de uma antiga fábrica de creosoto de 290 mg/kg e 40 mg/kg para menos de 200 mg/kg e 2 mg/kg, respectivamente. Durante o processo, as populações de micro-organismos nativos degradadores de HPA e fenol aumentaram, indicando que a bioestimulação foi eficaz (Guerin, 1999). Em outro trabalho, aproximadamente 74% dos compostos fenólicos presentes em resíduos de madeira tratados com creosoto foram degradados em 15 dias por meio de compostagem (Ghaly et al., 2012).

1.7.6. Biodegradação de compostos heterocíclicos

Apesar de o creosoto possuir apenas 5-13% de compostos heterocíclicos, eles representam até 40% da fração do creosoto solúvel em água (Licht et al., 1997). A maior polaridade e solubilidade em água dessas substâncias são baseadas na substituição de um átomo de carbono por nitrogênio, enxofre ou oxigênio (NSO-HET). Estas propriedades químicas resultam em um aumento da biodisponibilidade e mobilidade destes compostos, em comparação com os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) homólogos (Hote & Bhoyar, 2014). Diversos estudos concluíram que os compostos heterocíclicos contribuem significativamente para o risco ecotoxicológico de água, sedimentos e solo contendo estes contaminantes (Brack et al., 2007; Wolz et al., 2008; Keiter et al., 2008).

Dibenzotiofeno (DBT), carbazol (CA) e dibenzofurano (DBF) são alguns dos compostos heterocíclicos presentes no creosoto (Seo et al., 2009). Dibenzotiofeno (DBT) é um composto heterocíclico de enxofre e pode persistir por mais de três anos no ambiente. Porém, pouca informação sobre sua toxicidade está disponível na literatura. É o composto mais utilizado para os estudos de biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos contendo enxofre (Yu et al., 2006a). Muitos micro-organismos, tais como os dos gêneros *Rhodococcus* (Yu et al., 2006b), *Mycobacterium* (Li et al., 2003) e *Pseudomonas* (Gupta et al., 2005) podem degradar DBT e as reações podem ser classificadas em três categorias independentes: oxidação do enxofre, clivagem carbono-carbono e de clivagem específica do enxofre. A última categoria é a mais estudada porque um átomo de enxofre é liberado do DBT deixando intacto o esqueleto de carbono, que é útil na remoção de enxofre do petróleo (Monticello, 2000). A biotransformação do DBT por oxidação do enxofre é catalisada por enzimas lacases presente em fungos da podridão branca (Villasenor et al., 2004) e dioxigenases de bactérias, que convertem DBT em sulfona dibenzotiofeno e/ou derivados hidroxilados (Nojiri et al., 1999; van Herwijnen et al., 2003). A clivagem carbono-carbono, na qual o esqueleto de carbono de DBT é quebrado, é realizada pela via de Kodama (Gupta et al., 2005). Na clivagem específica do enxofre de DBT, 2-hidroxibifenila (2-HBP) é formado com a perda do sulfito através da via 4S (Xu et al., 2006). Duas linhagens de *Mycobacterium* sp. capazes de converter 2-HBP em 2-metoxibifenila (2-MBP) já foram relatadas (Okada et al., 2002; Li et al., 2005).

Carbazol (CA) é um composto heterocíclico de nitrogênio, cancerígeno e tóxico. É usado como modelo nos estudos devido a sua abundância em amostras de petróleo e por rapidamente sofrer reações químicas para gerar hidroxinitrocarbazol, que é mais genotóxico que o CA (Yu et al., 2006a). A maioria das espécies isoladas que degrada carbazol segue uma via metabólica semelhante, em que o composto passa por uma clivagem do anel produzindo ácido antranílico como intermediário chave, que em seguida, é completamente mineralizado (Schneider et al., 2000; Kilbane et al., 2002; Riddle et al., 2003a; Li et al., 2004). Nesta via, o carbazol é primeiramente degradado para 2'-

aminobifenila-2,3-diol pela carbazol 1,9a-dioxigenase (CARDO) (Riddle et al., 2003b).

Os passos iniciais na biodegradação de dibenzofurano (DBF), um composto heterocíclico de oxigênio, são classificados em três vias: dioxigenação angular, dioxigenação lateral e oxigenação lateral (Xu et al., 2006). O ataque angular ocorre nos átomos de carbono 4 e 4a do DBF. O oxigênio molecular é incorporado na posição angular do DBF, que cria hemiacetais instáveis que se quebram espontaneamente para dar origem a 2,3,2'-trihidroxibifenilas (THBP). Em seguida, a clivagem do anel de THBP é catalisada por dioxigenase extradiol para produzir ácido 2-hidroxi-6-(2-hidrofenoila)-6-oxo-2,4-hexadienóico, que é então hidrolisado para 3-(croman-4-on-2-il)-piruvato e ácido salicílico. O ácido salicílico é então convertido em catecol ou ácido gentísico. Estes compostos são ainda mais degradados e utilizados no CAT. Seguindo esta via, que é semelhante ao processo de degradação do carbazol realizada por *P. resinovorans* CA10, o DBF é completamente mineralizado (Benedik et al., 1998). Em contrapartida, a dioxigenação lateral, que é realizada principalmente por bactérias que utilizam naftaleno ou bifenila, ocorre nas posições 1,2; 2,3 e 3,4 para produzir DBF-dihidrodiols (Becher et al., 2000; Yamazoe et al., 2004). A clivagem do anel de 1,2-dihidroxi-dibenzofurano resulta na produção de ácido 2-hidroxi-4-(3'-oxo-3'H-benzofurano-2'-ilideno)but-2-enóico, que é degradado para ácido salicílico. O ácido salicílico é metabolizado formando catecol ou ácido gentísico seguido pela incorporação ao CAT, semelhante à via de dioxigenação angular. Há apenas alguns relatos de bactérias que transformam DBF por dioxigenação angular e lateral (Stope et al., 2002; Fuse et al., 2003; Yamazoe et al., 2004). Na oxigenação lateral do DBF, o acúmulo de um elevado nível de DBF monohidroxilado e a formação de derivados dihidroxilados a partir de 2-hidroxi-dibenzofurano e 3-hidroxi-dibenzofurano indica a ação de uma mono-oxigenase durante as etapas iniciais de degradação. O fungo *Trichosporon mucoides* SBUG 801 degrada DBF a 2,3-dihidroxi-dibenzofurano e a subsequente clivagem do anel leva à formação do ácido 2-(1-carboximetilideno)-2,3-di-hidrobenzo-[b]-furanilideno glicólico (Hammer et al.,

1998). Presumidamente, a clivagem do anel dihidroxilado utiliza um mecanismo semelhante ao descrito para a degradação de éter bifenila por *Trichosporon* sp. SBUG752. Em ambas as espécies, um terceiro grupo hidroxila deve ser introduzido nos intermediários dihidroxilados antes que a orto clivagem do anel benzeno possa acontecer (Xu et al., 2006). O estudo da degradação de DBF serve como modelo para a degradação de seus análogos halogenados, em especial os seus derivados de cloro/bromo, que geram uma grande preocupação ambiental devido a sua alta toxicidade (Seo et al., 2009).

1.8. Fatores que afetam a biorremediação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

Nos locais contaminados, a variação de alguns fatores ambientais influencia diretamente no processo de biorremediação por afetar o crescimento dos micro-organismos degradadores de poluentes. Dentre eles, a temperatura tem um efeito considerável sobre a capacidade dos micro-organismos em degradar HPA *in situ*, o que pode dificultar bastante o processo, já que em alguns locais contaminados, a temperatura ótima pode não ser alcançada em todas as estações do ano, principalmente no inverno. O aumento da temperatura leva ao aumento da solubilidade dos HPAs, aumentando a biodisponibilidade de suas moléculas, porém a solubilidade do oxigênio diminui, o que reduz a atividade metabólica de micro-organismos aeróbios (Bamforth & Singleton, 2005), algo que pode ser contornado com a utilização de aeração.

Outro fator importante para a atividade de biodegradação é o pH do solo ou sedimento, que afeta o crescimento dos micro-organismos degradadores (Lu et al., 2011). Pelo fato da grande maioria das bactérias terem crescimento ótimo em valores próximos ao pH neutro, a maioria dos estudos de biodegradação em laboratório têm sido realizados na faixa de 5,0-7,0 (Yuan et al., 2001; Kim et al., 2003b; Chang et al., 2008). Como a contaminação pode levar a mudança de pH da área, muitas vezes o pH destes locais são ajustados, por exemplo, pela adição de cal, para favorecer a degradação dos HPAs pelos micro-organismos nativos (Alexander, 1995; Lu et al., 2011).

Além de uma fonte de carbono facilmente degradável, os micro-organismos necessitam de nutrientes minerais, como nitrogênio, fósforo e

potássio (N, P e K) para o seu metabolismo celular. As quantidades de N e P necessárias para o crescimento microbiano e conseqüentemente biorremediação ótima foram previamente estimadas a partir da razão de C:N:P da biomassa microbiana, entre 100:15:3 (Alexander, 1977) e 120:10:1 (Bogan et al., 1996). Em locais contaminados, onde os níveis de carbono orgânico são frequentemente elevados devido à natureza dos poluentes, os nutrientes disponíveis (N/P) podem ser rapidamente esgotados pela utilização microbiana. Por isso, suplementar estes locais com nutrientes é uma prática comum para estimular a comunidade microbiana *in situ* (Breedveld & Sparrevik, 2000). Os níveis de nutrientes adicionados ao solo para degradação de HPAs são geralmente considerados semelhantes aos utilizados para outros poluentes orgânicos, como compostos de petróleo (Lu et al., 2011). Betancur-Galvis e colaboradores (2006) demonstraram que a adição de nitrogênio e fósforo diminuiu a quantidade de fenantreno no solo em mais de 25 vezes. Enquanto outro estudo demonstrou que a adição desses mesmos compostos durante 6 meses em uma amostra da camada superficial de um solo contaminado com creosoto, resultou em um aumento de mais de 70% na degradação de HPAs de 4 anéis aromáticos, comparado a outra amostra desse mesmo solo em que não houve a adição desses nutrientes (Breedveld & Sparrevik, 2000).

Embora seja bem estabelecido que a biorremediação de contaminantes orgânicos, como os HPAs, pode ser realizada sob condições tanto aeróbias, quanto anaeróbias, a maioria dos trabalhos tende a concentrar-se na dinâmica do metabolismo aeróbio de HPAs. Isto se deve, em parte, à facilidade de estudo e cultivo de micro-organismos aeróbios em relação aos micro-organismos anaeróbios. Para contaminações superficiais, uma simples mistura do solo pode arejar o substrato o suficiente para permitir que a degradação aeróbia dos HPAs aconteça (Bamforth & Singleton, 2005).

Os HPAs também são contaminantes comuns em ambientes anaeróbios como aquíferos e sedimentos marinhos (Genthner et al., 1997; Bakermans et al., 2002). Mesmo ambientes aeróbios, como solos contaminados, sedimentos e águas subterrâneas podem apresentar zonas anaeróbias, pelo consumo de oxigênio em uma maior taxa que sua reposição (Anderson & Lovley, 1997). A

degradação anaeróbia seria uma opção para evitar a necessidade de aeração dessas áreas. Porém, existe ainda um debate sobre se os benefícios da biorremediação anaeróbia são superados pelos pontos negativos, já que a aeração dos aquíferos anaeróbios contaminados tem sido utilizada com sucesso para estimular comunidades microbianas aeróbias, resultando em reduções significativas nas concentrações de HPAs nas águas subterrâneas e no solo (Bamforth & Singleton, 2005). Além disso, estudos indicam que a biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos tem eficácia muito maior que a biodegradação anaeróbia (Rockne & Strand, 1998). No entanto, também há relatos de que as taxas de degradação anaeróbia de HPAs sob condições desnitrificantes são comparáveis as taxas de degradação em condições aeróbias (Mcnally et al., 1998). Estas dúvidas evidenciam a necessidade de mais pesquisas para compreender plenamente as implicações associadas à utilização da biorremediação anaeróbia. A descoberta de uma grande diversidade de micro-organismos anaeróbios degradadores de poluentes é um passo significativo na compreensão dos processos envolvidos na biorremediação, e na definição e aplicação da remediação anaeróbia tanto *in situ*, quanto *ex situ* para os locais contaminados (Bamforth & Singleton, 2005). Uma linhagem *Microbacterium* sp. M.CSW3 isolada de solos contaminados com HPAs, que pode utilizar benzo[a]pireno como fonte de carbono e energia sob condições desnitrificantes (Qin et al., 2017), uma linhagem degradadora de pireno *Hydrogenophaga* sp. PYR1 isolada de sedimentos de rios contaminados com HPA, capaz de degradar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de alto peso molecular sob condições anaeróbias (Yan et al., 2017) e uma linhagem de *Pseudomonas* capaz de degradar aproximadamente 40% de benzo[a]pireno em condições anaeróbias na presença de nitrato (Liang et al., 2014), são exemplos de bactérias capazes de degradar HPAs em condições anaeróbias.

A biodisponibilidade do potencial substrato, o poluente, também é um fator que deve ser considerado, juntamente com a necessidade de interação organismo-substrato. Os HPAs têm uma baixa biodisponibilidade, e são classificados como contaminantes orgânicos hidrofóbicos (Semple et al., 2003). Além disso, eles podem sofrer adsorção rápida às superfícies minerais (por

exemplo, argilas) e a matéria orgânica (por exemplo, ácidos húmicos e fúlvicos) na matriz do solo. O escoamento dos hidrocarbonetos em meio saturado sempre é bifásico por serem compostos orgânicos que apresentam baixa miscibilidade em água. Os HPAs são classificados como DNAPL - *dense non-aqueous phase liquid* ou fase líquida não aquosa mais densa que a água. Os DNAPL's possuem alta densidade, baixa viscosidade e são pouco solúveis em água. A combinação da alta densidade e baixa viscosidade faz com que o DNAPL infiltre, deslocando os fluidos mais viscosos e menos densos dos poros do solo. Se a quantidade de DNAPL lançada for pequena, ele migrará através da zona não saturada e cessará seu movimento quando atingir a saturação residual. Se a quantidade de DNAPL for elevada, o material percolará através da franja de capilaridade chegando até a zona saturada atingindo a saturação residual. Nessa região haverá um sistema trifásico constituído por DNAPL, água e sólidos, em que componentes do DNAPL podem ser adsorvidos pelos minerais. Se o volume de DNAPL for suficientemente elevado para sobrepor as forças capilares ao longo da zona saturada, o contaminante poderá atingir profundidades maiores até chegar a zonas impermeáveis onde acumulará (Bisognin, 2012).

Quanto mais tempo o HPA fica em contato com o solo, mais irreversível é sua adsorção, e mais baixa é a possibilidade de extração química, mecânica e biológica do contaminante (Sutherland et al., 1995). Este fenômeno é conhecido como "envelhecimento". Por isso, a baixa biodisponibilidade de um poluente está ligada à sua persistência em um determinado ambiente. A liberação dos HPAs dos minerais e da matéria orgânica pode ser feita com a utilização de surfactantes. Estes compostos contêm tanto um grupo hidrofóbico, quanto um hidrofílico, proporcionando assim uma "ponte" entre a molécula hidrofóbica de HPA e a célula microbiana hidrofílica, além de formar agregados micelares que reduzem a tensão superficial e interfacial dos compostos orgânicos hidrofóbicos com a água, aumentando assim sua solubilidade e biodisponibilidade (Pacwa-Płociniczak et al., 2011). Alguns micro-organismos podem produzir biosurfactantes, que favorecem a liberação dos HPAs da matriz do solo e solubilização dos compostos em água,

possibilitando a absorção pelos micro-organismos. Estes compostos possuem algumas vantagens, pois são biodegradáveis, menos tóxicos e possuem maior seletividade comparada aos seus equivalentes de síntese química (Bamforth & Singleton, 2005). O lipopeptídeo biossurfactante produzido por *Bacillus cereus* SPL-4 auxiliou na remoção de 64% dos HPAs de 4 anéis e 79% dos HPAs de 5 e 6 anéis, comparada a remoção de 29% dos HPAs de 4 anéis e 25,5% dos HPAs de 5 e 6 anéis, do tratamento sem o biossurfactante. Em relação à remoção dos HPAs de menos anéis aromáticos, não houve diferença significativa entre os tratamentos, o que indica uma influência do biossurfactante na biodisponibilidade dos HPAs de maior peso molecular (Bezza & Chirwa, 2017).

Devido à importância que a biodisponibilidade dos contaminantes tem para o sucesso de um projeto de biorremediação, muitos métodos foram desenvolvidos para analisar a biodisponibilidade de HPAs, que podem ser químicos (extração dos contaminantes com solventes orgânicos leves ou solventes a base de água) (Hatzinger & Alexander, 1995; Reid et al., 2000) ou biológicos (medidas indiretas de bioluminescência de micro-organismos e contaminantes, taxa de difusão dérmica e absorção gastrointestinal de HPAs por minhocas) (Reid et al., 1998; Johnson et al., 2002). É difícil determinar qual tipo de teste é mais representativo da biodisponibilidade de contaminantes orgânicos hidrofóbicos no solo, já que ambas as abordagens têm limitações inerentes. Mas a combinação dos dois métodos pode aumentar a precisão dessa avaliação, levando a uma maior utilização desse tipo análise (Reid et al., 2000).

1.9. Utilização de técnicas moleculares para o estudo de comunidades microbianas

Os solos e aquíferos são ambientes dinâmicos e heterogêneos em que bactérias, fungos, protozoários e outros eucariotos competem por nutrientes e espaço (Kakirde et al., 2010). A biogeoquímica e complexidade espacial desses ambientes não são completamente entendidas e nem como essas propriedades e processos interagem entre si (Mocali & Benedetti, 2010). Sabe-se que o solo mineral e as partículas orgânicas interagem fortemente com a

biota através da formação e estabilização de microagregados, microporos e complexos de matéria orgânica, que são as características estruturais dominantes da matriz do solo e estão entre os parâmetros mais importantes que afetam a composição microbiana (Girvan et al., 2003). Além disso, não é só a matriz do solo que é extremamente complexa e heterogênea. As comunidades microbianas estão distribuídas seguindo os gradientes de nutrientes, umidade, dentre outros fatores, determinando a chamada distribuição de "hot-spot" (Nunan et al., 2002). Devido a estas características, analisar as funções e a diversidade da comunidade microbiana nesses ambientes é um grande desafio para os microbiologistas (Mocali & Benedetti, 2010).

A diversidade microbiana pode ser avaliada por meio de métodos dependentes e independentes de cultivo baseados em ferramentas moleculares. No entanto, as abordagens microbiológicas tradicionais apresentam muitas limitações, já que apenas uma pequena fração das bactérias no meio ambiente é cultivável utilizando os métodos convencionais (Mocali & Benedetti, 2010). Baseado nesses fatos, nos últimos 30 anos tem-se aumentado a utilização de técnicas independentes de cultivo, uma vez que essas metodologias mostram o perfil da comunidade microbiana abrangendo uma enorme variedade de vertentes (Gao & Tao, 2012).

1.9.1. Ferramentas para identificação de isolados bacterianos

A análise da sequência de RNA ribossomal 16S tem sido usada na afiliação filogenética de uma ampla gama de taxa (Kim et al., 2014; Yarza et al., 2014; Yoon et al., 2017) e como uma ferramenta poderosa para avaliar a diversidade genética de amostras ambientais (Smets et al., 2016; Brandt et al., 2017). Esse marcador genético é o mais utilizado para estudar a filogenia e a taxonomia bacteriana por várias razões, algumas delas são: (i) sua presença em quase todas as bactérias, muitas vezes existindo como uma família multigênica, ou operons; (ii) sua constância funcional, sugerindo que mudanças aleatórias de sequência são uma medida precisa da evolução; e (iii) possuir tamanho suficiente (1.500 pb) para ser sequenciado diretamente (e, portanto,

rapidamente) por meio de uma enzima DNA polimerase e analisado por ferramentas computacionais (Patel, 2001; Janda & Abbott, 2007). A função altamente conservada do rRNA 16S, leva a regiões de sequências hiperconservadas dentro do gene rRNA 16S. Os oligonucleotídeos iniciadores podem ser projetados para atingir essa região conservada e amplificar regiões de sequência hipervariáveis próximas que não estão sob restrição funcional como um código de barras potencialmente único (Fuks et al., 2018). As sequências geradas são depositadas em bancos específicos, que apresentam controle de qualidade rigoroso como ribosomal database project (RDP-II) (Cole et al., 2007), greengenes (DeSantis et al., 2006) e SILVA (Pruesse et al., 2007).

Utilizar um único gene marcador para avaliar a diversidade é desafiador, dada a prevalência de transferência horizontal de genes e a dificuldade inerente à definição de espécies bacterianas (Rosselló-Mora & Amann, 2001; McDonald et al., 2005; Konstantinidis et al., 2006), bem como a resolução limitada do gene rRNA 16S entre espécies estreitamente relacionadas (Poretsky et al., 2014). Enquanto certas taxa abrigam genes rRNA 16S diferentes, outros contêm sequências comuns a várias espécies (Větrovský & Baldrian, 2013). Para obter melhor separação de espécies intimamente relacionadas, marcadores moleculares alternativos têm sido utilizados. O gene *rpoB*, um gene que codifica a subunidade β da RNA polimerase bacteriana, é uma opção muito utilizada quando os resultados do gene 16S rRNA não podem discriminar entre as taxa (Kenna et al., 2018). Além disso, os dados da sequência *rpoB* são mais diretos, sem variantes de cópia, porque as bactérias possuem apenas 1 cópia desse gene (Reller et al., 2007). Outros genes bacterianos alvos que podem fornecer uma melhor separação de certas espécies incluem *tuf* (fator de alongamento Tu) (Bergeron et al., 2018), *gyrA* ou *gyrB* (girase A ou B) (Ménard et al., 2016; Zhou et al., 2016) e *sodA* (superóxido dismutase dependente de manganês) (Sánchez-Herrera, et al., 2017).

Outra ferramenta que pode ser utilizada para identificar microorganismos é a espectrometria de massa, as primeiras tentativas foram realizadas já em 1975 (Anhalt & Fenselau, 1975). No entanto, os resultados

eram irreprodutíveis, variando com as condições de crescimento e meios de cultura usados. Esta limitação foi resolvida na década de 1980, com a descoberta da espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz: tempo de voo (MALDI-TOF MS) que permite a análise de biomoléculas relativamente grandes, incluindo proteínas ribossômicas (Hillenkamp & Karas, 1990). Como as sequências de aminoácidos das proteínas ribossômicas são altamente conservadas, e também há pequenas diferenças entre as bactérias, essas características fazem das proteínas ribossômicas boas candidatas a biomarcadores para tipagem filogenética ou identificação de bactérias (Sun et al., 2006). A técnica consiste na irradiação de um laser que vaporiza o material biológico levando a ionização de várias moléculas, que são aspiradas em um tubo de vácuo e levadas a um detector e conforme a molécula, o tempo de chegada ao detector (time of flight) é diferente (Patel, 2015).

Nos últimos anos, a MALDI-TOF MS foi implementada em laboratórios de rotina e utilizada como uma abordagem completamente nova para a identificação de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. O software compara automaticamente os espectros coletados com um banco de dados de referência que contém uma grande variedade de isolados relevantes. Os espectros medidos estão sujeitos ao ruído inerente ao método e, portanto, nunca serão exatamente idênticos para um isolado individual. O software que compara os espectros gera um valor numérico (valor de pontuação) com base nas semelhanças entre os conjuntos de dados observados e armazenados. Este valor de pontuação fornece informações sobre a validade da identificação. Um valor de pontuação acima de 2,0 é geralmente considerado uma identificação válida de nível de espécie. Valores entre 2,0 e 1,7 representam identificações confiáveis no nível de gênero. Além disso, o software exibe resultados adicionais ao lado da melhor correspondência para verificações de plausibilidade (Wieser et al., 2012).

Como em qualquer sistema de diagnóstico, existem limitações para a MALDI-TOF MS. Até o momento, em quase todos os casos, é necessária uma pré-cultura para uma análise bem-sucedida da maioria das amostras. Essa

técnica tem sido usada principalmente no campo clínico, mas também possui um potencial significativo no campo ambiental. Alguns desafios são encontrados devido à complexidade das amostras ambientais e a diversidade de micro-organismos ambientais. No entanto, avanços futuros, como o aprimoramento dos bancos de dados de proteínas e a preparação de amostras, permitirão que essa técnica seja implementada como um método de rotina para a microbiologia ambiental, eventualmente substituindo os métodos convencionais. Essa técnica pode ser mais explorada na pesquisa de biorremediação como uma ferramenta importante para a rápida identificação de bactérias específicas do local, presentes em um ambiente contaminado ou a identificação de enzimas responsáveis pela produção ou remoção de riscos químicos (Santos et al., 2016).

1.9.2. Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) para o estudo de comunidades microbianas durante o processo de biorremediação

A eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) é uma técnica baseada na amplificação do rDNA ou de outros genes a partir do DNA da comunidade, com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores (primers) que apresentam uma região denominada grampo G-C, que é rica em guanina e citosina (Nocker et al., 2007). Nessa técnica, os fragmentos de DNA com mesmo comprimento, mas que possuem sequências diferentes, podem ser separados. Essa separação se baseia na diminuição da mobilidade eletroforética da molécula de DNA, parcialmente desnaturada em géis de poliacrilamida que contém um gradiente linear de agentes desnaturantes (mistura formada por uréia e formamida) (Muyzer & Smalla, 1998). Para o estudo da comunidade bacteriana em sua totalidade, é mais comum a amplificação de sequências de DNA correspondentes ao 16S rRNA, a partir de oligonucleotídeos iniciadores universais para bactéria (Heuer & Smalla, 1997) pelo fato de serem sequências conservadas, presentes em todas as bactérias (Smith & Read, 1997), disponíveis em bancos de dados (Kirk et al., 2004) e que infere relações filogenéticas entre os micro-organismos (Woese, 1987). A

desnaturação somente parcial da molécula é obtida pela adição do grampo G-C nos fragmentos de DNA, que pode ter entre 30 e 50 nucleotídeos, (Muyzer et al., 1993; Muyzer, 1999), e permite que todas as sequências com variações sejam detectadas (Myers et al., 1985). A desnaturação parcial da molécula faz com que a migração do produto de PCR seja interrompida em uma posição única, determinada também por sua sequência nucleotídica, formando bandas no gel. Esse padrão de bandas é usualmente visualizado pela utilização de corantes, como o brometo de etídio ou SYBR Green, e para que se obtenha a melhor separação dos diferentes fragmentos de DNA é necessário otimizar o gradiente e o tempo de duração da eletroforese (Muyzer & Smalla, 1998). Muyzer & Waal (1994) demonstraram ainda que é possível identificar os membros de certa comunidade microbiana através do sequenciamento do DNA eluído a partir das bandas excisadas da DGGE.

Esta técnica pode ser utilizada para monitoramento das alterações na estrutura de comunidades microbianas que passaram por algum tipo de contaminação ambiental. Estudos baseados na utilização de PCR-DGGE têm demonstrado que, depois da adição de poluentes, a diversidade dentro da comunidade microbiana pode ser substancialmente reduzida, devido à forte seleção de um número limitado de espécies capazes de degradar esses poluentes (McKew et al., 2007; Wakase et al., 2007).

Apesar de todos os benefícios da técnica da DGGE, ela apresenta também algumas limitações inerentes, uma vez que demanda trabalho intenso, além da possibilidade de co-migração de fragmentos de DNA com sequências diferentes, criando bandas em posições idênticas no gel, mas que não são derivadas necessariamente das mesmas espécies (Muyzer et al., 1993; Muyzer, 1999).

2. JUSTIFICATIVA

O creosoto é uma mistura complexa de várias substâncias, principalmente HPAs. Devido à toxicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade potencial de muitos desses compostos, os resíduos de creosoto representam uma grande ameaça ao meio ambiente, já que este composto foi amplamente utilizado em todo o mundo como preservante de madeira para dormentes de vias férreas, postes, cruzetas, mourões para cercas rurais, esteios e vigas. Devido à intensa utilização e manuseio incorreto desse material, graves contaminações aconteceram no solo, aquíferos e águas subterrâneas. Por isso, o CONAMA estabeleceu restrições por meio de valores de concentração ideais para alguns compostos no solo e água subterrânea, vários deles presentes no creosoto. Então, proprietários de áreas contaminadas, principalmente empresas, tem buscado reduzir as concentrações desses compostos para valores abaixo daqueles estabelecidos. Neste contexto, a biorremediação oferece uma possibilidade atrativa de reduzir a toxicidade ou até mesmo eliminar esses contaminantes usando apenas a atividade biológica natural.

Muitos fatores devem ser considerados antes de iniciar um processo de biorremediação e por isso, o desenvolvimento de estratégias que possam prever e favorecer a eficácia do processo é fundamental. Em geral, os consórcios microbianos são mais eficientes em eliminar hidrocarbonetos de locais contaminados comparados ao uso de um único isolado. Isso ocorre principalmente pela presença de diferentes vias metabólicas e sua ação sinérgica na degradação dos HPAs, aumentando a capacidade total de biodegradação dos mesmos. O uso da técnica de enriquecimento, usando como inóculo amostras de substratos com histórico de contaminação com o composto de interesse, permite a seleção de micro-organismos capazes de degradar esse composto. A avaliação da capacidade catabólica dos micro-organismos obtidos nesse processo permitirá a escolha de um consórcio eficiente para a biorremediação de locais contaminados com creosoto. Além disso, avaliar a alteração da população microbiana durante o enriquecimento fornecerá informações sobre quais espécies serão favorecidas nesse processo e que conseqüentemente, são as principais degradadoras desses compostos.

Em um aquífero ou água subterrânea, o creosoto dissolve parcialmente na água, dependendo da solubilidade dos compostos individualmente, que é variável, o que cria uma fonte de contaminação recalcitrante. Alguns micro-organismos produzem compostos que diminuem a tensão superficial e são capazes de emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água possibilitando sua degradação, esses compostos são chamados de biossurfactantes. Encontrar micro-organismos que produzam esses biossurfactantes em grande quantidade para ser adicionado juntamente aos micro-organismos degradadores pode otimizar o processo de biorremediação. Além disso, os aquíferos são ambientes geralmente de difícil acesso e baixa aeração. Esses fatores aumentam a dificuldade de remediação de uma área com essas características e isto requer intervenções como o uso de fatores que estimulem a degradação dos contaminantes pela microbiota local e/ou adição de consórcios bacterianos degradadores adaptados às condições da área, por isso o estudo da combinação desses fatores, como aeração e adição de nutrientes, é importante para definir a melhor condição de biorremediação para a área.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a diversidade de bactérias em aquífero contaminado com creosoto, o potencial de degradação do composto e de produção de compostos ativos de superfície desses isolados e selecionar um consórcio de bactérias degradadoras de creosoto para aplicação em processos de biorremediação.

3.2. Objetivos específicos

- Analisar as características físico-químicas do aquífero contaminado, incluindo a concentração de HPAs considerados prioritários pela US EPA.

- Analisar a densidade de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de HPAs e/ou creosoto em amostras do solo contaminado;

- Isolar bactérias degradadoras de creosoto utilizando o método de enriquecimento;

- Avaliar a alteração da comunidade microbiana ao longo do enriquecimento pela técnica de PCR-DGGE;

- Avaliar os isolados em relação ao potencial de degradação de creosoto em meio líquido e os de melhores resultados em amostras de aquífero;

- Avaliar os isolados bacterianos quanto à produção de compostos ativos de superfície e caracterizar a molécula do isolado que produzir em maior quantidade, utilizando cromatografia de camada delgada, espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;

- Testar as técnicas de bioestimulação e bioaugmentação utilizando o consórcio das bactérias isoladas com maior potencial de degradação para biorremediar microcosmos simulando as condições do aquífero da unidade de tratamento de dormentes (UTD) de onde as amostras foram coletadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

As amostras foram coletadas de um aquífero contaminado, localizado na área de uma unidade de tratamento de dormentes (UTD) desativada na cidade de João Neiva, no Espírito Santo, que durante anos tratou dormentes de madeira utilizando creosoto. Os poços a partir de onde foram coletadas as amostras foram: PP20 (1), PP206 (2), PP207 (3), PM208 (4), PM211 (5), PP29 (6), PP203 (7), e PP223 (8). O código PM se refere aos poços de monitoramento raso e o código PP se refere aos poços de monitoramento profundo. As profundidades dos poços e da coleta em metros, respectivamente, foram: PP20 (17,8/5,45), PP206 (19,3/5,64), PP207 (16,0/5,83), PM208 (8,1/6,44), PM211 (6,9/5,43), PP29 (15,5/3,91), PP203 (11,8/6,26), e PP223 (13,6/6,15). O pH nos poços apresentou características levemente ácidas variando entre 5,19 e 6,85 com média de 6,02. A temperatura esteve entre 24,20 °C e 28,10 °C, com média de 25,78 °C. A condutividade elétrica variou entre 36,00 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e 399,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$, com média de 180,38 $\mu\text{S}/\text{cm}$. O potencial redox apresentou valores entre -52,80 mV e 215,90 mV e o oxigênio dissolvido apresentou variação entre 0,00 e 3,57 mg/L com média de 0,88 mg/L.

A camada onde as amostras foram coletadas é composta pelo solo de alteração de rocha (gnaisse). Material principalmente composto por silte arenoso, com presença de cristais de quartzo semi-transparente de tamanhos variados entre (1mm e 50 mm), também de muscovitas, feldspatos, biotitas e outros minerais máficos não distinguíveis a olho nu. A coloração apresenta-se com camadas cinza esbranquiçadas e tonalidades amarelas, em certos pontos a gama de cores dessa camada também varia entre finas camadas de marrom, cinza claro e vermelhas dispostas e compactas horizontalmente. Presença de estrutura reliquiar (foliação). Pelo valor de condutividade hidráulica (K) obtido, da ordem de 10^{-4} cm/s, o solo pode ser classificado como solo siltoso a silto arenoso. Essa coleta foi realizada com amostradores tipo bailers descartáveis de primeiro uso e durante o processo os equipamentos foram lavados entre

cada ponto com água e álcool 70% para evitar contaminação cruzada. Foram coletados aproximadamente 6 litros de amostras a partir de cada poço e os mesmos foram acondicionados em galões de plástico de primeiro uso previamente limpos com álcool 70% e aclimatados com a água do poço onde seria realizada a coleta. As amostras foram pré-filtradas em membranas de policarbonato com poros de 20 µm de diâmetro, com a utilização de bomba de filtração a vácuo acoplada a kitasatos, para a remoção de partículas e sujeira. Ao longo dessa pré-filtração, a suspensão resultante foi armazenada novamente em galões de primeiro uso aclimatados e ao final, filtrada com a utilização de membranas de policarbonato com poros de 1,2 e 0,22 µm de diâmetro, que foram acopladas juntas. Foi filtrado um volume de aproximadamente 1 litro das amostras em cada conjunto de membranas e ao final do processo, um desses conjuntos foi armazenado em falcon de 15 mL contendo 9 mL de solução salina 0,85% estéril, para posterior isolamento de micro-organismos e os conjuntos restantes em falcons de 15 mL vazios, para posterior extração de DNA. Todos os falcons foram armazenados em recipiente térmico preservado com gelo, onde foram mantidos resfriados durante todos os dias da coleta e o transporte até o Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA), no Departamento de Microbiologia (ICB/UFMG).

4.2. Análises físico-químicas das amostras

Amostras do aquífero contaminado foram enviadas pela Engenharia de Proteção Ambiental Ltda. (EPA), empresa responsável pelo manejo da área, para análise da concentração de compostos orgânicos voláteis (COV), compostos orgânicos semi-voláteis (COSV) e compostos inorgânicos (metais e nitrato). Essas análises foram realizadas pelo laboratório Bioagri Ambiental, seguindo as metodologias US EPA 8260B, US EPA 8270C e US EPA 3125B, respectivamente.

Os poços amostrados foram agrupados pela análise multivariada de componentes principais (PCA) utilizando o software PAST. Essa modelagem foi feita utilizando as concentrações dos COV, COSV e compostos inorgânicos encontradas em cada uma das amostras.

4.3. Determinação da densidade de bactérias pelo método do NMP

Para extrair os micro-organismos das amostras, a membrana com os micro-organismos filtrados, descrita no tópico 4.1, foram ressuspensos em 100 mL de solução salina estéril (NaCl a 0,85%) e agitados a 150 rpm e 25 °C durante 1 h. Estas soluções foram diluídas serialmente até a diluição 10^{-7} e utilizadas nos ensaios de determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais (BHT) e da densidade de bactérias degradadoras de creosoto e HPAs individuais.

4.3.1. Determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais (BHT) das amostras

A população bacteriana total foi determinada pelo método do número mais provável (NMP/mL). O cálculo do NMP/mL foi realizado em microplacas de 96 poços, seguindo a metodologia de Binet e colaboradores (2000), com modificações. Neste caso, alíquotas de 25 μ L das diluições 10^{-1} a 10^{-7} foram inoculadas nos poços da microplaca contendo 200 μ L de Caldo Nutriente, sendo realizadas seis repetições para cada diluição. As placas ficaram incubadas por 1 semana a 30 °C. Após esse período, foi adicionado aos poços 50 μ L da solução do indicador redox 2,3,5-trifenila cloreto de tetrazólio (TTC) na concentração de 3 g/L. Após 24 horas, o crescimento foi avaliado por meio de observação de uma coloração rosa nos poços e pela medida de absorbância a 485 nm, sendo considerados positivos os poços de cada diluição cujas densidades celulares diferiram estatisticamente do controle não inoculado. Após a determinação do número de poços positivos e negativos, para cada diluição, o cálculo do NMP/mL das amostras foi realizado utilizando o software da Microsoft Excel, associado a uma equação descrita por Briones e colaboradores (1999):

$$a_1 p_1 / 1 - e^{-a_1 x} + a_n p_n / 1 - e^{-a_n x} = a_1 n_1 + a_n n_n$$

na qual a é o volume inoculado no poço, p , o número de poços positivos, e n , o número de poços inoculados.

4.3.2. Determinação da densidade de bactérias degradadoras de creosoto e/ou HPAs

A população de micro-organismos aptos a degradar creosoto e HPAs, presentes nas amostras também foi determinada pelo método do NMP, utilizando a metodologia descrita por Wrenn & Venosa (1996), com modificações. Para isso, foi utilizado o meio mínimo mineral (MMM), contendo por litro: 0,5 g de ureia, 0,2 g de sulfato de amônio, 0,1 g de cloreto de sódio, 0,2 g de sulfato de magnésio hepta hidratado, 5 g de potássio de potássio dibásico, suplementado com 0,02 g de extrato de levedura e as seguintes fontes de carbono: creosoto comercial (Sigma), creosoto bruto esterilizado, naftaleno, antraceno e fenol. Primeiramente, foi adicionado individualmente aos poços da microplaca 180µL do MMM, 20µL de naftaleno (100 mg/L), antraceno (100 mg/L), fenol (100 mg/L), creosoto extraído da unidade de tratamento de dormentes (UDT) (10%) ou creosoto da Sigma (1%) e 20µL de cada diluição das amostras dos poços, sendo realizadas seis repetições para cada. As placas foram vedadas com adesivo óptico e incubadas por duas semanas a 30°C. Após esse período, 50 µL da solução do indicador redox 2,3,5-trifenila cloreto de tetrazólio (TTC) na concentração de 3 g/L foi adicionada aos poços. Após 24 horas, o crescimento foi avaliado por meio de observação de uma coloração rosa nos poços e pela medida de absorbância a 485 nm, sendo considerados positivos os poços de cada diluição cujas densidades celulares diferiram estatisticamente do controle com meio de cultura e inóculo, mas sem a adição da fonte de carbono. O cálculo do NMP/mL das amostras também foi realizado como descrito anteriormente no tópico 4.3.1.

4.4. Isolamento de bactérias degradadoras de creosoto pelo método de enriquecimento

As membranas utilizadas na filtração de cada poço foram adicionadas a frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de MMM. O creosoto extraído da UTD, esterilizado, foi adicionado a cada frasco na concentração de 1% (v/v), como única fonte de carbono. Os frascos foram tampados com rolhas de borracha para evitar a volatilização dos compostos e incubados a 30° C, sob agitação de 180 rpm por 7 dias. Após esse período, 10 mL das culturas foram

transferidas para um novo frasco com o mesmo meio e concentração de creosoto do início do processo, e submetidos a mais um período de incubação de 7 dias nas mesmas condições anteriores, processo que foi repetido mais uma vez. Após cada semana de enriquecimento e ao final das três passagens, 1 mL de cada cultura foi diluída em tubos com 9 mL de solução salina estéril (NaCl a 0,85%). Alíquotas de 100 µL dessas diluições de 10^{-1} a 10^{-7} foram plaqueadas em meio Trypticase Soy Agar (TSA) e incubadas a 30 °C durante 24h. Colônias com morfotipos diferentes foram estriadas em outras placas com TSA para o isolamento dessas bactérias. Para a manutenção das culturas estoques, as bactérias foram mantidas a 4°C em meio Lignieri (13 g de Caldo Nutriente, 7 g de ágar e 5 g de gelatina de biomol, para 1L de meio) (inoculação por picada), para que pudessem ser utilizadas para os experimentos seguintes e em criotubos contendo 20% de glicerol a -80°C. Algumas bactérias também foram isoladas a partir de biomídia de PVC, usados como suporte para formação de biofilmes em um biorreator de leito fluidizado para tratamento da água contaminada com creosoto da área em estudo, porém essa amostra não passou pelo método de enriquecimento. Esse material suporte foi colocado em frasco Erlenmeyer com caldo nutriente a 30°C e 180 rpm por 48h e após esse período, a amostra foi diluída serialmente até a diluição 10^{-7} e plaqueada em meio TSA. Os diferentes morfotipos que cresceram no meio sólido foram isolados e estocados da mesma forma que as demais bactérias.

Ao final de cada semana dos enriquecimentos, a parte das alíquotas das culturas que não foi utilizada no isolamento das bactérias foi centrifugada, lavada com solução salina e estocada em microtubos a -20 °C, para posterior extração de DNA. Essas amostras foram utilizadas para conhecer o perfil da comunidade de bactérias durante o processo de enriquecimento através da técnica de PCR-DGGE.

4.5. Identificação dos isolados bacterianos por métodos moleculares

Para a identificação, os diferentes isolados obtidos tiveram seu DNA extraído e as regiões do gene do rRNA 16S amplificados por PCR.

4.5.1. Extração de DNA

Células dos isolados bacterianos congeladas durante o processo de isolamento foram utilizadas na extração do DNA genômico pelo método descrito por Pitcher e colaboradores (1989), com adaptações. Inicialmente as células foram ressuspensas em 300 µL de tampão TE (Tris-HCl 10mmol/L, EDTA 1 mm/L, pH 8). Em seguida, pérolas de vidro foram adicionadas a cada tubo e os mesmos foram agitados em vortex por 2 min. Após esse período, foi adicionado 600 µL de uma solução contendo tiocinato de guanidina (5 mol/L) (Sigma), 100 mmol/L de EDTA (pH 8) e 0,5% v/v de sarcosil (GES reagent). Os tubos foram agitados por inversão e incubados por 10 min à temperatura ambiente para que ocorresse a lise. Os tubos foram resfriados em banho de gelo por 2 min e, em seguida, 300 µL de solução de acetato de amônio gelada (7,5 mol/L) foi adicionada. Os tubos foram novamente agitados por inversão e incubados por mais 10 min no banho de gelo. Após esse período, 600 µL de uma mistura de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foram adicionados aos tubos. Após a homogeneização da mistura em agitador tipo vortex, os tubos foram centrifugados a 12.000 g por 10 min e a fase aquosa transferida para novos tubos nos quais foi adicionado o mesmo volume de isopropanol gelado. Ao final desse processo, os tubos foram incubados a -20 °C por 12 h e, a seguir, centrifugados a 5.000 g por 20 min para precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes com etanol 70%. Após estarem totalmente secos, os sedimentos foram ressuspensos em 50 µL de água livre de nucleases e estocados a -20 °C. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1%, e a concentração determinada em Nanodrop™ 1000 a 260 e 280 nm.

4.5.2. Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) de regiões do gene do rRNA 16S

A amplificação de regiões do gene do rRNA 16S foi realizada com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores universais para bactérias 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Lane, 1991) e 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3') (Muyzer et al., 1995). A reação de 50 µL foi

constituída de 5 µL de PCR Buffer (10X), 1,5 µL de dNTP (10 mmol/L de cada), 1,5 µL do oligonucleotídeo iniciador 8F (10 pmol/L), 1,5 µL do oligonucleotídeo iniciador 907R (10 pmol/L), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) (Sinapse), 2,0 µL de DNA (100-150 ng/µL) e completada com água deionizada. A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada utilizando o termociclador (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min seguido de 26 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 57 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min, finalizado por extensão final de 72 °C por 5 min (Kushmaro et al., 2006), com modificações. O produto da PCR foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop™ 1000 a 260 e 280 nm e a integridade do fragmento, de aproximadamente 900 pares de bases, analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0% com a utilização de um padrão de DNA ladder 1Kb.

4.5.3. Purificação do produto da PCR

Os produtos da PCR foram purificados adicionando-se 11,25 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA (125 mmol L⁻¹) e 135 µL de etanol absoluto, sendo a mistura incubada por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 2.000 g por 45 min, o sobrenadante descartado e 120 µL de etanol 70% (v/v) foi então adicionado para lavagem. Os tubos de microcentrífuga foram homogeneizados por inversão, centrifugados a 2.000 g por 15 min e o sobrenadante novamente descartado. Após evaporação do etanol residual, o produto foi ressuscitado em 10 µL de água deionizada estéril. A solução obtida foi dosada em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies).

4.5.4. Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento, o volume final foi de 10 µL. Foram adicionados 20 ng do produto de amplificação purificado, o tampão de reação, a mistura de reação BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix e os iniciadores 8F e 907R nas concentrações de 5 µmol L⁻¹. A reação foi conduzida seguindo uma desnaturação do DNA a 96°C por 1 min, 35 ciclos com

desnaturação a 96°C por 15 s, anelamento a 50°C por 15 s e extensão a 60°C por 5 min e, por fim, um resfriamento a 4°C.

Para a precipitação da reação de sequenciamento foi adicionado a cada poço um volume de 2,5µL de EDTA (125 mmol L⁻¹) e 30µL de etanol (95%). Após agitação por vórtex, a placa foi incubada à temperatura ambiente por 15 min no escuro. Após esse período, foi feita centrifugação a 2.500 g por 45 min, o sobrenadante foi descartado e 30µL de etanol 70% (v/v) adicionados a cada poço. Mais uma vez, houve centrifugação a 2.500 g por 15 min, o sobrenadante foi descartado e a placa secou a temperatura ambiente. A placa com os produtos da purificação foi enviada para o instituto Rene Rachou (Fundação Oswaldo Cruz) e analisada no sequenciador automático ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). As sequências de nucleotídeos obtidas foram editadas utilizando-se o programa BioEdit e sempre que possível as sequências geradas pelos oligonucleotídeos iniciadores “forward” e “reverse” foram alinhadas para gerar sequências consenso (contigs), que foram comparadas com sequências gênicas de rDNA depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando o programa Blast (Altschul et al., 1997). Para ser considerado pertencente a uma determinada espécie, o isolado terá que apresentar identidade de pelo menos 97% a outra sequência já depositada no GenBank (Stackebrandt & Goebel, 1994) e não haver outra espécie alcançando essa porcentagem de 97%.

4.6. Identificação dos isolados bacterianos pela técnica de MALDI-TOF

Para confirmar as identificações obtidas e tentar uma identificação mais completa, os isolados foram crescidos em placas com TSA por 24h e submetidos à análise de espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz: tempo de voo (MALDI-TOF), seguindo o protocolo descrito por Benagli e colaboradores (2011).

4.7. Análise da alteração da estrutura da comunidade bacteriana durante o enriquecimento pela técnica de PCR-DGGE

A técnica de PCR juntamente com a de DGGE (PCR-DGGE) foi utilizada para conhecer o perfil da comunidade de bactérias durante o processo de

enriquecimento realizado. O DNA total foi extraído pelo método descrito por Pitcher e colaboradores (1989), com adaptações, como descrito no tópico 4.5.1.

As regiões variáveis V3 a V5 do gene 16S rRNA foram amplificadas usando os oligonucleotídeos iniciadores 341F-GC e 907R (grampo GC: 5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCC CCG CCC-3') (Muyzer et al., 1995). A reação de amplificação foi realizada utilizando 1x do tampão da enzima, 0,3 µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,03 U de Taq DNA polimerase (Sinapse), e 200 ng do DNA, em uma reação final de 50 µL. A PCR foi realizada em termociclador sob as seguintes condições: 5 min de desnaturação inicial a 94°C, seguidos por 30 ciclos de 1 min à 94 °C (desnaturação), 1 min a 52°C (anelamento do primer), e 2 min a 72 °C (extensão do primer), e uma extensão final de 10 min a 72°C (Molina et al, 2009). A verificação da qualidade dos produtos da PCR foi realizada em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio.

A eletroforese foi realizada com a utilização do equipamento “Hoefer SE600 Vertical Dual Cooler System” (Hoefer Scientific, San Francisco, CA). Os produtos da PCR foram aplicados em um volume de 20µL diretamente no gel de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 37,5:1) a 6% (p/v), que foi preparado com gradiente desnaturante de 45 a 60 %. O gradiente foi obtido pela mistura de uma solução de poliacrilamida com 80% de agentes desnaturantes (formamida 32% e uréia 5,6 mol/L) e uma com 0% desses agentes. A eletroforese foi realizada em tampão – TAE 1X, à temperatura de 60°C e voltagem constante de 60V por 16 horas. O gel foi corado com a utilização de solução de brometo de etídio em tampão TAE 1X (0,5 µg/mL), por 20 minutos no escuro e sua imagem, sob luz UV, foi capturada e digitalizada em Fotodocumentador Alphamager HP system. As imagens dos géis obtidos na DGGE foram analisadas pelo método UPGMA, com a utilização do software BioNumerics, versão 7.1 (Applied Maths, Belgium), que determina a similaridade entre o perfil genômico das amostras. Os dendogramas resultantes foram baseados na matriz de similaridade entre as amostras, com a utilização do coeficiente Jaccard, que analisa a similaridade baseada na

fórmula $d_j = [1 - a / (a + b + c)]$, em que a é o número de bandas compartilhadas entre as duas unidades, b é o número de bandas que ocorrem na unidade h mas não na unidade i ; c é o número de bandas que ocorrem na unidade i , mas não na unidade h .

4.8. Avaliação da capacidade de degradação de creosoto pelos isolados

Para testar a capacidade de degradação, primeiramente, os 77 isolados foram ativados em placas de TSA. Dessas bactérias, 72 foram isoladas do aquífero pelo método de enriquecimento e 5 do material suporte do biorreator de leite fluidizado. Após esse período, esses isolados foram retirados da placa com alça de repicagem e suspensos em solução salina estéril (NaCl a 0,85%) até alcançar turvação semelhante ao tubo número 9 da escala de McFarland, que corresponde a densidade ótica (D.O.) de 1,68 a 600 nm. A suspensão de cada isolado foi adicionada a tubos de vidro de 20 mL com tampa de algodão e papel alumínio contendo 5 mL de meio de cultura Bushnell Haas Broth (BHB), suplementado com 0,2% de extrato de levedura e 0,25% de creosoto extraído da UTD estéril, em volume definido de forma a obter uma D.O. a 600 nm de 0,1. Esses frascos foram incubados em agitador orbital tipo shaker durante 21 dias, a temperatura de 30 °C e rotação de 150 rpm. O experimento foi realizado em triplicata.

Após esse período, o crescimento dos isolados foi medido pela densidade ótica, em espectrofotômetro a 600 nm. Logo após, o conteúdo do frasco foi extraído com acetato de etila, em duas etapas com adições de 1,5 mL do solvente e agitação a 1000 rpm em termobloco a temperatura ambiente, para extrair o creosoto da fase aquosa. Esses extratos foram então injetados em um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM), para avaliação de quantidade de creosoto degradada por cada isolado. A coluna utilizada no aparelho foi a PTE5 (30 m, diâmetro interno de 0,32 mm e espessura de 0,25 μ m). O programa utilizado começa com a temperatura do forno a 40 °C mantida por 1 min, aumentando 40 °C/min até alcançar 150 °C, mantida por 5 min, aumentando 5 °C/min até alcançar 280 °C e em seguida, aumentando 4 °C/min até alcançar 300 °C, mantida por 10 min. O tempo total

de cada corrida foi de 49,75 min. A temperatura da fonte de íons foi de 260 °C, da interface de 300 °C e o tempo de corte do solvente foi de 3 min. O gás transportador foi o hélio a 5 atm. O EM foi operado a 70 eV, varredura total (TIC): faixa de m/z 30 ± 450, velocidade de varredura de 0,3 u/s. O programa foi adaptado a partir do que foi utilizado por Rocha e colaboradores (2011).

Para quantificar a degradação de creosoto e seus componentes por cada isolado, os valores obtidos dos frascos inoculados foram comparados a controles sem inóculo deixados incubados pelo mesmo período, para estimar a porcentagem de degradação de creosoto desconsiderando as perdas abióticas. Os 12 compostos presentes em maior concentração nos controles foram utilizados para essa comparação: 2-metiltetracosano, 4H-ciclopenta[def]fenantreno, acenafteno, antraceno, benz[a]antraceno, dibenzofurano, dibenzotiofeno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, criseno e pireno, sendo que 8 deles estão na lista dos 16 HPAs considerados poluentes prioritários pela US EPA (Kohler et al., 2000; Kulik et al., 2006).

4.9. Avaliação da produção de compostos tensoativos pelas bactérias isoladas crescendo em meio de cultura com creosoto como fonte de carbono

As 77 bactérias utilizadas foram inoculadas em volume definido em frascos de vidro tipo penicilina de 50 mL com 25 mL de meio BHB, suplementado com 0,02% de extrato de levedura e 1% de creosoto, de forma a obter uma densidade ótica (D.O) a 600 nm de 0,1. Os frascos foram fechados com rolha de algodão e incubados em agitador orbital do tipo shaker a 180 rpm e 30 °C, por 21 dias. O líquido foi centrifugado a 10.000 g por 15 minutos e o sobrenadante livre de células utilizado para as análises.

4.9.1. Medida da atividade surfactante pela redução da tensão superficial

A tensão superficial dos extratos brutos livres de células (sobrenadantes) foi determinada empregando-se a metodologia da placa e utilizando-se um tensiômetro KRÜSS GmbH K100C-MK2, acoplado com placa de platina. As análises foram realizadas com aproximadamente 15 mL de sobrenadante em

temperatura ambiente e comparadas com os valores de tensão superficial do meio BHB (69,4 mN/m). Os valores de tensão superficial foram expressos em mN/m.

4.9.2. Medida da atividade emulsificante

A atividade emulsificante (E_{24}) foi avaliada pelo método do índice de emulsificação, conforme descrito por Cameron et al. (1988). Alíquotas de 1 mL do sobrenadante da cultura foram adicionadas a tubos contendo 1,5 mL de tolueno. Cada tubo foi submetido à homogeneização em agitador de tubo (tipo Vortex), em velocidade máxima por 2 min e deixado em repouso por 24 h. O índice E_{24} foi determinado pela Equação 1. Inicialmente foi medida a altura da camada emulsionada (cm), que foi dividida pela altura da camada total do líquido. O valor obtido foi multiplicado por 100.

$$E_{24} = \frac{\text{Altura da camada emulsionada}}{\text{Altura total do líquido}} \times 100\%$$

Equação 1: equação para determinação do índice de emulsificação (E_{24}) expresso em porcentagem.

4.9.3. Precipitação do extrato bruto com melhores resultados

Os 16 isolados que apresentaram os melhores resultados nos testes de redução da tensão superficial e/ou atividade emulsificante foram crescidos novamente, dessa vez em frascos Erlenmeyer de 500 mL com 280 mL de meio BHB, suplementado com 0,05% de extrato de levedura e 0,5% de creosoto, durante 10 dias, a 30 °C e 180 rpm em agitador orbital do tipo shaker. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos e o sobrenadante livre de células obtido foi acidificado com 1N de HCl até alcançar pH 2 e deixado a 4 °C por 48h. Em seguida, esse material foi centrifugado novamente e o sobrenadante descartado. O precipitado formado ao fundo foi separado por centrifugação a 5.000 g por 15 minutos e, após o descarte da fase líquida, foi submetido a secagem a 60 °C por 48 h. O produto obtido foi pesado para cálculo da produção, expressa em mg. Os precipitados foram

ressuspendidos na concentração de 5 mg/mL e sua atividade emulsificante em tolueno avaliada seguindo a metodologia descrita no tópico 4.9.2.

4.10. Caracterização do bioemulsificante produzido pelo isolado *Pseudomonas putida* grupo T9P4/2 em meio de cultura com creosoto como fonte de carbono

Para conseguir uma quantidade maior de precipitado para a caracterização, o isolado *Pseudomonas putida* grupo T9P4/2 (escolhido pela maior produção entre os isolados avaliados e pela alta atividade emulsificante) foi inoculado em 5L de meio BHB, suplementado com 0,05% de extrato de levedura e 0,5% de creosoto, durante 10 dias, a 30°C e 180 rpm em agitador orbital do tipo shaker. A obtenção do extrato bruto e a precipitação foram realizadas da mesma forma descrita no tópico 4.9.3.

4.10.1. Análise de cromatografia de camada delgada

O bioemulsificante extraído foi analisado por cromatografia de camada delgada em placas de sílica. O material foi hidrolisado com ácido trifluoroacético a 120 °C e os compostos foram separados usando uma fase móvel de clorofórmio/ metanol/ ácido acético em uma proporção de 65:12:2 (v/v/v) (Silva et al., 2014). As manchas na placa foram visualizadas borrifando uma solução de 0,25% de ninidrina em acetona para grupos amina e uma solução de orcinol em H₂SO₄ para carboidratos. Após a adição das soluções reveladoras, as placas foram aquecidas a 110 °C por 5 minutos para visualização das manchas (Janek et al., 2013).

4.10.2. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros no infravermelho foram obtidos em espectrômetro Spectrum One Perkin Elmer, modo ATR, no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Cerca de 2 mg de material seco foi moído com 200 mg de KBr para formar um pó muito fino. Este pó foi então comprimido em um sedimento fino

que pudesse ser analisado por FTIR na faixa de comprimento de onda de 4000-650 cm^{-1} , a uma resolução de 4 cm^{-1} .

4.10.3. Cromatografia gasosa e espectrometria de massa para avaliar as moléculas presentes no bioemulsificante

Para determinar as moléculas que formam o bioemulsificante por CG-EM, a amostra seca (20 mg) foi adicionada a um tubo de microcentrífuga com 150 μL de HCl 0,1 M e homogeneizada em agitador tipo vortex por 3 minutos com *beads* de vidro. Em seguida, o material foi centrifugado a 5000 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido pra outro tubo. Nesse tubo foi adicionado então 250 μL de acetonitrila e o mesmo foi centrifugado a 5000 g por 3 minutos a 4°C. Depois, 200 μL desse sobrenadante foram transferidos para outro tubo e seco utilizando um concentrador a vácuo de amostras (centrífuga Univapo 100H, Uniequip e condensador Unicryo MC2L-60°C, Uniequip) durante 2h. Para remover a água residual, 50 μL de diclorometano foi adicionado ao tubo, que foi seco novamente em speed vacuum por 30 minutos. A amostra foi derivatizada então utilizando 20 μL de metoxamina diluída em piridina na concentração de 20 g/L e 40 μL de *N,O*-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) + 1% clorotrimetilsilano (TCMS) e aquecendo em termobloco a 70 °C durante 30 minutos (Pasikanti et al., 2008). Esse extrato derivatizado (1 μL) foi aplicado no CG-EM (SHIMADZU, modelo QP2010 SE) equipado com uma coluna PTE-5-Supelco (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 μm) usando He como gás de arraste. A temperatura da coluna foi programada para 170 °C (5 min), aquecendo a uma taxa de 4 °C/min para 200 °C (3 min), aquecendo novamente a uma taxa de 4 °C/min para 290 °C (1 min) e em seguida para 300 °C a uma taxa de 10 °C/min, mantendo nesta temperatura durante 15 minutos (Pérez-Palacios et al., 2015).

4.11. Biorremediação de creosoto em amostras de aquífero raso saturado da UTD pelos isolados com maior potencial de degradação

Os 4 isolados de espécies sem restrições de uso *in situ*, considerando a Resolução N° 467, de 2015, do CONAMA, com os maiores potenciais de degradação de creosoto em meio de cultura líquido (*Enterobacter* sp. M3P8/1,

Serratia marcescens T9P1/3, *Pseudomonas putida* grupo T9P6/1 e *Alcaligenes* sp. B/4), juntamente com outras 6 bactérias (*Pseudomonas citronellolis* R106, *Sphingomonas* sp. R105, *Pseudomonas* sp. R106-4, *Pseudomonas putida* grupo R206-6, *Achromobacter* sp. R108(10-5) e *Stenotrophomonas* sp. R301-5), que também tiveram grande potencial de degradação de creosoto em meio de cultura líquido, avaliadas em outro trabalho de prospecção do laboratório, foram escolhidas para este experimento.

Esses 10 isolados foram adicionados, na concentração de aproximadamente 1×10^8 células, a frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 20 g de solo coletado do aquífero raso saturado da UTD e 80 mL do meio de cultura Bushnell Haas (0,2 g/L de sulfato de magnésio, 0,02 g/L de cloreto de cálcio, 1 g/L de fosfato de potássio monobásico, 1g/L de fosfato de potássio dibásico, 1 g/L de nitrato de amônio e 0,05 g/L de cloreto férrico), com creosoto adicionado na concentração de 0,5%. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema 2x10, com 20 tratamentos (10 isolados nas condições com e sem aeração), 3 repetições, totalizando 60 unidades experimentais. A aeração foi realizada utilizando dois compressores de ar (Boyu) com vazão contínua de 10 L/min de ar ambiente estéril através de mangueiras ligadas a cada frasco do experimento. Os frascos sem aeração foram vedados com rolhas de borracha. Controles sem a adição de microorganismos foram montados em triplicata para as duas condições (com e sem aeração).

O crescimento das bactérias foi avaliado a cada 10 dias por diluição seriada seguida de plaqueamento e a degradação do creosoto foi avaliada ao final do experimento, após 30 dias de incubação em temperatura ambiente. Para isso, o creosoto de cada frasco foi extraído três vezes utilizando 10 mL de tolueno. Esse extrato foi então diluído 100 vezes e aplicado no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM) (SHIMADZU, modelo QP2010 SE) equipado com uma coluna PTE-5-Supelco (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 μ m) usando He como gás de arraste. O programa utilizado começa com a temperatura do forno a 40 °C mantida por 1 min, aumentando 40 °C/min até alcançar 150 °C, mantida por 5 min, aumentando 5 °C/min até alcançar 280 °C

e em seguida, aumentando 4 °C/min até alcançar 300 °C, mantida por 10 min. O programa foi adaptado a partir do que foi utilizado por Rocha e colaboradores (2011). A diferença nas áreas dos compostos presentes no cromatograma das amostras dos frascos inoculados comparadas as amostras controles foram utilizadas para inferir a porcentagem de creosoto degradada por cada isolado.

4.12. Biorremediação de amostras de aquífero contaminado com creosoto por meio das técnicas de bioestimulação e bioaumentação com consórcio das bactérias isoladas com maior potencial de degradação

Os 6 isolados com maiores porcentagens de degradação no experimento anterior (*Pseudomonas* sp. R106-4, *Pseudomonas putida* grupo R206-6, *Achromobacter* sp. R108(10-5), *Stenotrophomonas* sp. R301-5, *Pseudomonas putida* grupo T9P6/1 e *Alcaligenes* sp. B/4) foram escolhidos para formar o consórcio para degradação do creosoto em microcosmos com amostras do aquífero raso saturado da UTD. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2⁴, com 16 tratamentos, 3 repetições e 48 parcelas. Esses microcosmos foram montados em frascos do tipo Schott de 100 mL com 20 g de solo coletado a 5,34 m do aquífero raso saturado da UTD, 80 mL de líquido e 0,5% de creosoto. O pH no poço coletado apresentou característica ácida com valor de 5,32. A concentração de nitrato encontrada foi de 11,2 mg/L. Os valores de temperatura, condutividade elétrica, potencial redox e oxigênio dissolvido foram de 29,02 °C, 42 µS/cm, 245,2 mV e 0,05 mg/L, respectivamente. Os tratamentos consistiram na presença ou ausência de 4 variáveis: micro-organismos autóctones (solo estéril ou não), aeração, nutrientes e consórcio, que foram organizados da seguinte forma:

Solo estéril – tindalização Solo não estéril – utilização sem tratamento	Aerado – dois compressores de ar de 30L/min Não aerado – fechado com tampa
Com nutrientes – meio BHB Sem nutrientes – água destilada	Consórcio – 6 isolados com melhores resultados Sem consórcio – sem isolados

Tratamentos	Fatores			
	Micro- organismos autóctones (MA)	Aeração (A)	Nutrientes (N)	Consórcio (C)
1	+	+	+	+
2	+	+	+	-
3	+	+	-	+
4	+	+	-	-
5	+	-	+	+
6	+	-	+	-
7	+	-	-	+
8	+	-	-	-
9	-	+	+	+
10	-	+	+	-
11	-	+	-	+
12	-	+	-	-
13	-	-	+	+
14	-	-	+	-
15	-	-	-	+
16	-	-	-	-

Os tratamentos com presença de microbiota autóctone e ausência de consórcio, que foram aerados e/ou adicionados nutrientes foram considerados os tratamentos de bioestimulação (Tratamentos 2, 4 e 6). Os tratamentos com

adição do consórcio e presença da microbiota autóctone, que não foram aerados e/ou adicionados nutrientes e os tratamentos com adição de consórcio e sem presença de microbiota autóctone foram considerados os tratamentos de bioaugmentação (Tratamentos 7, 9, 11, 13 e 15). Os tratamentos com presença de microbiota autóctone e consórcio, que foram aerados e/ou adicionados nutrientes foram considerados uma combinação das técnicas de bioestimulação e bioaugmentação (Tratamentos 1, 3 e 5). O tratamento 8 seria para avaliar a atenuação natural, enquanto os tratamentos 10, 12, 14 e 16 foram montados para avaliar a perda abiótica.

Pré-inóculos com os isolados utilizados no consórcio foram realizados em meio Caldo Nutriente com 0,5% de creosoto e deixados agitando a 30 °C e 180 rpm em agitador orbital durante 48h. As culturas foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos e as células obtidas lavadas com solução salina 0,85% e inoculadas nos frascos dos tratamentos em que o consórcio foi adicionado na concentração de aproximadamente 1×10^8 células para cada isolado. A aeração foi realizada utilizando dois compressores de ar (Boyu) com vazão contínua de 10 L/min de ar ambiente estéril através de mangueiras ligadas a cada frasco do experimento. Os frascos dos tratamentos sem aeração foram vedados com tampa.

Os frascos dos tratamentos com nutrientes receberam 80 mL de água destilada tipo 2 adicionadas de 216,6 mg do meio de cultura Bushnell Haas (BHB) (0,2 g/L de sulfato de magnésio, 0,02 g/L de cloreto de cálcio, 1 g/L de fosfato de potássio monobásico, 1g/L de fosfato de potássio dibásico, 1 g/L de nitrato de amônio e 0,05 g/L de cloreto férrico), enquanto nos frascos do tratamento sem nutrientes esse volume foi somente de água destilada tipo 2. A água destilada e o meio BHB foram autoclavados antes de serem adicionados aos frascos do experimento. Nos tratamentos com solo esterilizado, o solo passou por um processo de tindalização, enquanto nos tratamentos com solo não estéril, o solo foi adicionado diretamente. O solo utilizado em todos os tratamentos foi peneirado antes de ser adicionado aos frascos para evitar partículas grandes.

O crescimento das bactérias foi avaliado a cada 10 dias e a degradação do creosoto foi avaliada ao final do experimento, após 30 dias de incubação a 30 °C. A avaliação do crescimento foi realizada por meio da determinação da densidade de bactérias expressa em UFC/mL. Para isto, alíquotas de 100 µL da amostra de cada tratamento foram diluídas serialmente. As diluições foram plaqueadas em volume de 100 µL em placas de meio Ágar Nutriente e incubadas a 30 °C durante 24 ou 48h. Após esse período, as UFC foram contadas e o crescimento expresso em UFC/mL. Para avaliação da degradação, o creosoto de cada frasco foi extraído três vezes utilizando 10 mL de tolueno nível HPLC. Esse extrato foi então diluído 100 vezes em tolueno e aplicado no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM) (SHIMADZU, modelo QP2010 SE) equipado com uma coluna PTE-5-Supelco (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm) usando He como gás de arraste. O programa utilizado começa com a temperatura do forno a 40 °C mantida por 1 min, aumentando 40 °C/min até alcançar 150 °C, mantida por 5 min, aumentando 5 °C/min até alcançar 280 °C e em seguida, aumentando 4 °C/min até alcançar 300 °C, mantida por 10 min. O programa foi adaptado a partir do que foi utilizado por Rocha e colaboradores (2011). Amostras de solo estéril e não estéril adicionados de água ou meio BHB e creosoto, nas mesmas quantidades e concentrações dos tratamentos, foram extraídas com tolueno da mesma forma e aplicadas no CG-EM, e seus cromatogramas foram utilizados como controle da diminuição das concentrações dos compostos presentes no creosoto por perda abiótica. A diferença nas áreas dos compostos presentes no cromatograma dos tratamentos comparadas às amostras controles foi utilizada para inferir a quantidade de creosoto degradada em cada tratamento. Para quantificar os principais HPAs presentes no creosoto, o padrão SS TCL Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix foi utilizado para montar uma curva padrão para cada composto.

4.13. Análises estatísticas

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas utilizando o teste F em nível de significância de 5% e os testes de médias foram realizados

utilizando o teste Scott Knott em nível de significância de 5%, através do programa SISVAR, para avaliar a porcentagem de bactérias degradadoras de compostos presentes no creosoto comparada as bactérias heterotróficas presentes nos poços amostrados; a densidade de bactérias degradadoras de compostos presentes no creosoto, independente dos poços amostrados; a degradação total de creosoto pelos isolados selecionados; a degradação dos 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto utilizado; o crescimento dos isolados durante o experimento de degradação, avaliado pelo parâmetro densidade ótica a 600 nm; a atividade surfactante dos isolados, avaliado pelo parâmetro redução de tensão superficial em meio com creosoto como fonte de carbono; a atividade emulsificante (E24) em tolueno dos sobrenadantes produzidos pelos isolados selecionados e a diferença de degradação entre as condições aerada e não aerada entre todos os isolados. Enquanto que para avaliar a significância das variáveis testadas durante o processo de biorremediação através de delineamento fatorial completo 2^4 , foi realizada uma análise de variância (ANOVA) por meio do modelo linear generalizado (MLG), com teste F (significância de 5%), utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS).

As análises dos componentes principais (PCA) foram realizadas para avaliar o agrupamento dos poços amostrados em função da concentração de COV e COSV, o padrão de degradação dos 12 compostos presentes no creosoto em função dos isolados e o padrão de degradação dos isolados degradadores em função dos compostos degradados. Com o resultado da PCA são obtidos gráficos bi ou tridimensionais de scores (permite a visualização da distribuição das amostras em função dos componentes principais) e loadings (indica a contribuição das variáveis para a discriminação das amostras), que facilitam a visualização das informações dos dados experimentais, isto é, a distribuição das amostras e a importância das variáveis. A análise de escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) foi utilizada para gerar agrupamentos hierárquicos a partir da utilização do coeficiente de similaridade ou índice qualitativo de Jaccard, o qual, com base na matriz de presença e ausência de bandas, avalia o número de espécies encontradas em duas

amostras diferentes (beta-diversidade), sendo calculado sempre para um par de amostras. As duas análises foram realizadas utilizando o programa PAST.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análises físico-químicas das amostras do aquífero contaminado

As concentrações de cada um dos compostos orgânicos voláteis (COV), compostos orgânicos semi-voláteis (COSV) e compostos inorgânicos (metais e nitrato) presentes nas amostras do aquífero contaminado estão informadas na Tabela 1. Uma análise de PCA utilizando as concentrações de todos esses compostos foi realizada para agrupar os poços amostrados. Essa informação é importante, pois indica quais poços possuem características mais próximas e quais mais diferem em relação aos compostos avaliados, que podem afetar diretamente a densidade e perfil da microbiota isolada. 76,3% da variância total dos dados podem ser explicadas pelos dois componentes principais, sendo 50,0% descrita pela primeira componente principal (CP1) e 16,3% pela segunda componente principal (CP2) (Figura 7). O gráfico de loadings indica que a CP1 representou 33 dos 41 compostos analisados como variáveis positivas (Figura 8). A CP2 concentrou informação das variáveis estireno (0,32), tolueno (0,33), 2,3,4,6-tetraclorofenol (0,35), 2-metilfenol (0,35), acenaftileno (0,25), pentaclorofenol (0,35) e boro (0,25), os quais apresentaram os maiores valores positivos e etilbenzeno (-0,20), ferro (-0,19) e manganês (-0,17), que apresentaram os maiores valores negativos (Figura 9).

Analisando a projeção das duas componentes principais (Figura 7), é possível observar que os poços PP20, PP206 e PM211 apresentaram as maiores concentrações dos compostos representados pela CP1, já que ficaram na parte positiva do eixo X. Esses poços não agruparam entre si, devido à diferença dos compostos que apresentaram maior concentração em cada um desses poços. O poço PP20 apresentou alta contaminação de benzeno, etilbenzeno, xilenos totais, 1,2,4-trimetilbenzeno, carbazol, fluoranteno, naftaleno, bário e manganês, incluindo 2 dos 3 compostos que possuíam os maiores valores negativos na CP2, o que explica o posicionamento desse poço na parte mais negativa do eixo Y. No poço PP206, os compostos de maior concentração foram estireno, tolueno, 2,3,4,6-tetraclorofenol, 2-metilfenol, acenaftileno e pentaclorofenol, maioria dos compostos que possuíam valores

positivos na CP2, o que explica o seu posicionamento na parte mais positiva do eixo Y; e o poço PM211 de 1,3,5-trimetilbenzeno, 2-metilnaftaleno, acenafteno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g, h, i)perileno, criseno, dibenzofurano, fenantreno, fluoreno, indeno (1,2,3, cd) pireno, pireno, boro e ferro. Os poços PP223, PP203, PP207 e PM208 formaram um grupo (marcado em vermelho) dos poços com menores concentrações da maioria dos compostos analisados, já que ficaram posicionados na região mais negativa do eixo X, que representa a CP1. Enquanto o poço PP29 ficou um pouco afastado desse grupo de compostos marcados em vermelho, mas ainda na parte negativa do eixo X, indicando uma concentração intermediária dos compostos analisados.

Essa variação dos HPAs presentes em diferentes amostras contaminadas por compostos complexos é muito comum. Larsson e colaboradores (2018) encontraram maior concentração de HPAs de quatro e três anéis em amostras de solos intemperizados de uma antiga instalação de preservação de madeira com creosoto, enquanto em amostras de solos de uma antiga fábrica de gás havia uma porção maior de HPAs com cinco e seis anéis. Suman e colaboradores (2016) encontraram diferentes HPAs em maior concentração em diferentes amostras da cidade de Dhanbad City, Índia: fluoranteno (Steel Gate e Dhaiya), dibenzo(a,h)antraceno (Bartand, Raharghora e Saraidhela) e pireno (Hirapur, Govindpur e Bank More Chowk). Diferentes fatores físico-químicos podem influenciar essa distribuição, a porosidade do solo e o tempo de contaminação estão intimamente ligados à biodisponibilidade desses compostos (Ranc et al., 2016). Outros fatores como temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes e concentração de matéria orgânica afetam a atividade biológica e também tem relação direta com a variação na concentração dos HPAs (Okere & Semple, 2012).

Tabela 1 – Concentração dos compostos presentes em cada amostra do aquífero coletada e valores de investigação para águas subterrâneas.

	PP20	PP206	PM211	PP29	PP223	PP203	PP207	PM208	CONAMA 420 (1)	Lista Holandesa (2)	RSL (3)
VOC (Compostos Orgânicos Voláteis)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)
1,2,4-Trimetilbenzeno	134	56,6	103,95	47,85	1,5	<1,00	<1,00	<1,00	-	-	15
1,3,5-Trimetilbenzeno	75,5	33,25	100,65	1,9	1,3	<1,00	<1,00	<1,00	-	-	8,7
Benzeno	4815	1775	15,95	751	429,5	<1,00	<1,00	<1,00	5	-	-
Estireno	9,8	61,15	21,7	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	20	-	-
Etilbenzeno	182	11,15	12,05	282,5	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	300	-	-
Tolueno	76,95	414	34,05	4,1	2,55	<1,00	<1,00	<1,00	700	-	-
Xilenos totais	1301,5	533	208,45	127,05	108,3	<2,00	<2,00	<2,00	500	-	-
SVOC (Compostos Orgânicos Semi-Voláteis)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)
2,3,4,6-Tetraclorofenol	<0,01	5,65	1,06	0	0,24	<0,01	<0,01	<0,01	10,5	-	-
2,4-Dimetilfenol	12,6	<1,00	<1,00	139,5	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	-	-	27
2-Metilfenol (o-cresol)	<1,00	7,9	<1,00	0	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	-	-	72
2-Metilnaftaleno	161,95	123,35	250,5	142,25	13,78	<1,00	<1,00	<1,00	-	-	2,7
Acenafteno	91,8	56,25	366,5	66,85	39	<0,05	<0,05	<0,05	-	-	40
Acenaftileno	0,42	5,12	3,84	1,33	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	-	-
Antraceno	6,69	6,16	12,05	0,43	<0,05	0,09	<0,05	0,05	-	5	-
Benzo(a)antraceno	0,94	0,57	2,01	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	1,75	-	-
Benzo(a)pireno	0,39	<0,05	0,71	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,7	-	-
Benzo(b)fluoranteno	0,55	<0,05	1,26	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	-	0,03
Benzo(k)fluoranteno	0,27	<0,05	0,42	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	0,05	-
Benzo(g,h,i)perileno	0,17	<0,05	0,31	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	0,05	-
Carbazol	361	112,05	222	123,5	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	-	-	-
Criseno	0,75	0,43	1,63	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	-	0,2	-
Di(2-etilhexil)ftalato	<1,00	<1,00	<1,00	1,31	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	8	-	-
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,05	<0,05	0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	0,18	-	-
Dibenzofurano	114,8	106,5	151,5	42,7	15	<1,00	<1,00	<1,00	-	-	0,58
Fenantreno	77,95	66,3	88,45	3,92	1,59	<0,05	<0,05	0,06	140	-	-
Fluoranteno	9,9	8,51	9,72	0,14	0,72	0,06	0,51	0,05	-	1	-
Fluoreno	74,05	75,5	166,5	28,2	0,25	<0,05	<0,05	<0,05	-	-	22
Indeno(1,2,3,cd)pireno	0,29	0	0,43	0	0	<0,05	<0,05	<0,05	0,17	-	-
Naftaleno	8475	4755	2065	2065	1515	<1,00	<1,00	<1,00	140	-	-
Pentaclorofenol	<0,05	21	1,92	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	9	-	-
Pireno	6,46	8,21	12,49	<0,05	0,29	<0,05	0,29	<0,05	-	-	8,7
Inorgânicos	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)
Alumínio	4,29	36,8	12,9	134	68,7	51,4	17,2	22,4	3500	-	-
Antimônio	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	5	-	-
Arsênio	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	10	-	-
Bário	624	206	49,5	273	121	182	154	46,4	700	-	-
Boro	10,2	24,3	24,6	12,7	8,87	12,4	10,3	14,8	500	-	-
Cádmio	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	5	-	-

Chumbo	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	5,11	<1,00	<1,00	10	-	-
Cobalto	5,44	4,53	3,01	<1,00	13,6	11,8	8,42	<1,00	70	-	-
Cobre	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	2000	-	-
Cromo	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	2	<1,00	<1,00	<1,00	50	-	-
Ferro	8830	131	16000	12700	119	100	103	70,4	2450	-	-
Manganês	8060	328	479	589	427	313	599	108	400	-	-
Mercúrio	< 0,10	<0,10	<0,10	<0,10	<0,10	< 0,10	<0,10	< 0,10	1	-	-
Molibdênio	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	70	-	-
Níquel	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	3,12	6,75	20	-	-
Prata	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	50	-	-
Selênio	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	10	-	-
Vanádio	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	-	70	-
Zinco	2,31	33,6	46	27,7	56,1	117	94,1	47,9	1050	-	-

(1) Resolução CONAMA N° 420, de 28 de Dezembro de 2009, para concentração de investigação em águas subterrâneas.

(2) Lista de Referência Holandesa - VROM (Dutch Ministry of Housing, Physical Planning and Environment) de fevereiro de 2000. Valores de referência para um solo com conteúdo de argila de 20,0% e conteúdo de matéria orgânica de 1,1%.

(3) RSL's - (Regional Screening Levels - U, S, Environmental Protection Agency) de novembro de 2013.

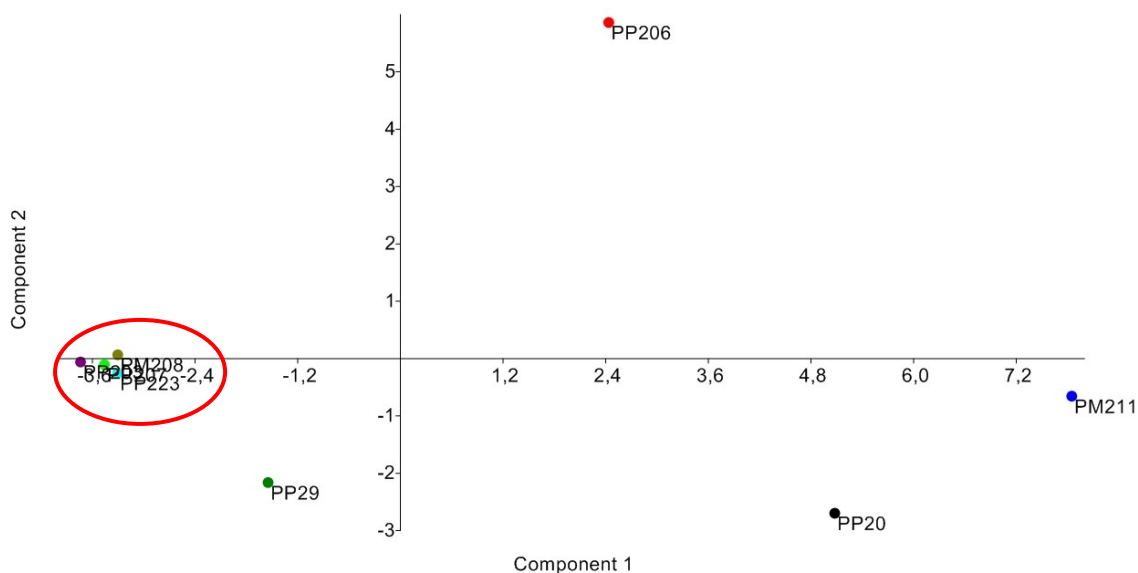


Figura 7 – Análise por PCA das oito amostras do aquífero em relação a presença de COV, COSV e compostos inorgânicos. Componente 1 (50,0%) e Componente 2 (16,3%).

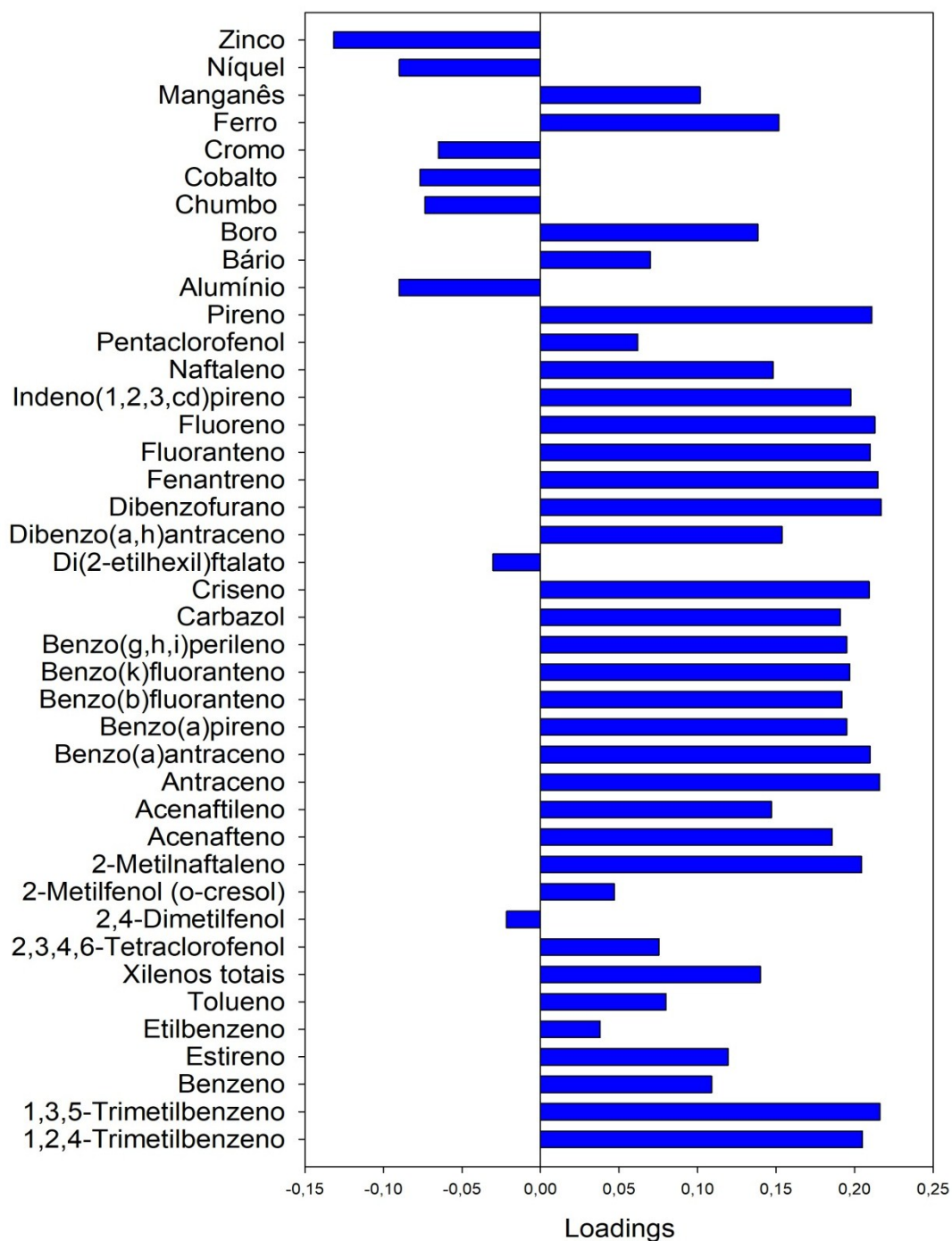


Figura 8 – Gráfico de loadings da componente principal 1 (CP1) para os COV, COSV e compostos inorgânicos.

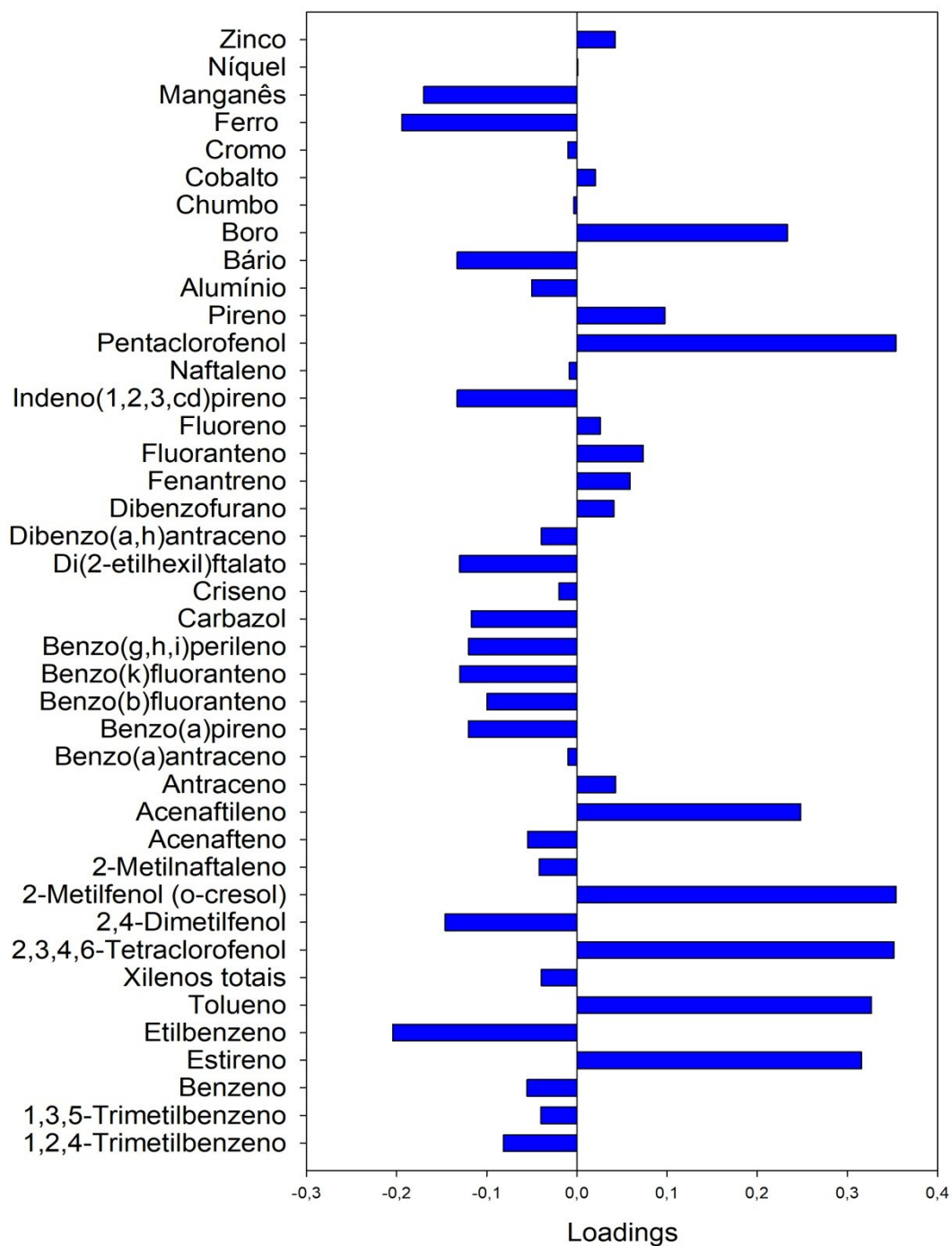


Figura 9 – Gráfico de loadings da componente principal 2 (CP2) para os COV, COSV e compostos inorgânicos.

5.2. Determinação da densidade de bactérias heterotróficas e degradadoras de naftaleno, antraceno e fenol pelo método do NMP de amostras do aquífero contaminado

A densidade de bactérias heterotróficas foi semelhante entre os poços do aquífero, variando entre 10^6 e 10^7 células/mL (Figura 10). Essas densidades são semelhantes às encontradas em 10 amostras de água subterrânea não contaminada na cidade de Lagos, na Nigéria, que estavam entre $1,0 \times 10^5$ e $1,8 \times 10^7$ células/mL (Majolagbe et al., 2017). Não foram encontrados trabalhos analisando as densidades de bactérias heterotróficas por NMP em aquíferos e águas subterrâneas contaminados com HPAs, mas em trabalhos com amostras de solo contaminadas, a densidade de bactérias heterotróficas reduz nas regiões mais contaminadas por esses compostos (Molnár et al., 2007; Cébron et al., 2015). Em relação à densidade de bactérias degradadoras dos três compostos analisados independentemente do poço, as médias de bactérias degradadoras de naftaleno ($4,64 \times 10^6$ células/mL), antraceno ($2,50 \times 10^6$ células/mL) e fenol ($8,38 \times 10^6$ células/mL) também não diferiram de forma significativa (Anexo 1 e Figura 11). Isso indica que as bactérias presentes nos poços analisados possuem potencial semelhante para a degradação de naftaleno, antraceno e fenol, compostos mais simples de serem oxidados, quando comparados a outros presentes no creosoto. Essa densidade de bactérias degradadoras é semelhante a encontrada por Abercron e colaboradores (2016) em amostras de água e solo de um arrozal e de uma lagoa não contaminados, que foram de 10^7 e 10^6 células/g e mL de bactérias degradadoras de naftaleno, respectivamente, e 10^6 e 10^4 células/g e mL de bactérias degradadoras de antraceno, respectivamente. Mas foram maiores que as encontradas nesse mesmo trabalho em amostras de lodo ativado, pilha de compostagem e sedimento marinho não contaminados, que foram de 10^4 , 10^1 e 10^1 células/g e mL de bactérias degradadoras de naftaleno, respectivamente, e 10^5 , 10^5 e 10^2 células/g e mL de bactérias degradadoras de antraceno, respectivamente. Não foram encontrados trabalhos descrevendo a densidade de bactérias degradadoras de HPAs por NMP em aquíferos contaminados, mas o fato de altas densidades de bactérias degradadoras desses compostos serem encontradas em alguns ambientes não contaminados, indica que

bactérias com potencial de degradação desses compostos mais simples podem ser encontradas com maior facilidade.

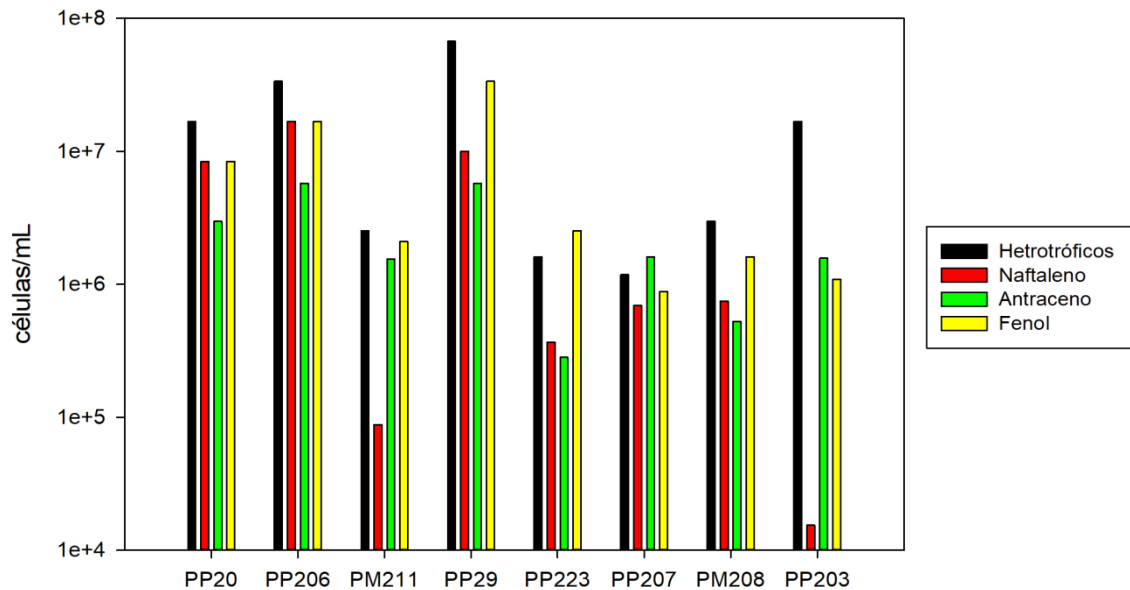


Figura 10 - Densidade de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de componentes do creosoto nas amostras de aquífero dos poços em estudo.

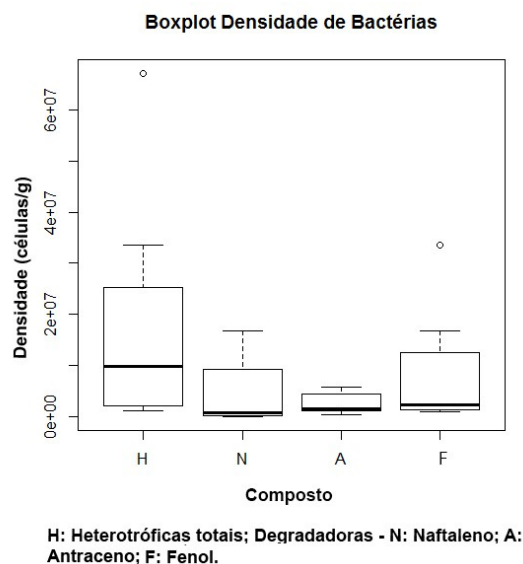


Figura 11 – Densidade geral de bactérias heterotróficas totais e bactérias degradadoras dos compostos analisados presentes nas amostras do aquífero.

5.3. Isolamento de bactérias presentes nas amostras do aquífero pelo método de enriquecimento

As 72 bactérias isoladas na terceira semana do processo de enriquecimento, além dos 5 isolados obtidos do material suporte enviado, foram escolhidas para serem utilizadas nos próximos experimentos, totalizando 77 bactérias (Tabela 2). A descrição de todas as bactérias isoladas e suas densidades absolutas estão relacionadas no Anexo 2.

5.4. Identificação dos isolados selecionados

Os 77 isolados obtidos ao final do enriquecimento foram identificados, sendo 76 pelo menos ao nível de gênero e 1 ao nível de família. E foram distribuídos em 14 gêneros diferentes: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Pseudochrobactrum*, *Delftia*, *Rhizobium*, *Sphingobacterium*, *Kosakonia* e *Alcaligenes*. O isolado identificado ao nível de família pertence à família Enterobacteriaceae (Tabela 2). Esses gêneros estão distribuídos em três filos, Proteobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes na proporção de 87,0%, 11,7% e 1,3%, respectivamente. O filo Proteobacteria é representado pelas classes Alphaproteobacteria (4,5%), Betaproteobacteria (7,5%) e Gammaproteobacteria (88,0%). Os dois gêneros da classe Alphaproteobacteria são da ordem Rhizobiales, os três gêneros da classe Betaproteobacteria são da ordem Burkholderiales, enquanto que os gêneros da classe Gammaproteobacteria são divididos entre as ordens Pseudomonadales (53,2%), Xanthomonadales (8,1%) e Enterobacteriales (38,7%).

Tabela 2 - Identificação dos isolados por meio da comparação das sequências obtidas da região 16S do DNA ribossomal com sequências depositadas no GenBank ou através da técnica de MALDI-TOF.

Nº	Código	Identificação	Organismo de referência (nº de acesso no GenBank)	Identidade (%)	UFC/g
1	M6P1/1	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_042147.1	100	3,9 x 10 ⁹
2	M6P2/1	<i>Rhizobium radiobacter</i>	NR_041396.1	100	1,4 x 10 ⁸
3	M6P2/2	<i>Pseudomonas azotoformans</i>	NR_113600.1	99	1,0 x 10 ⁷

4	M6P2/3	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_113600.1	99	$2,0 \times 10^8$
5	M6P3/1	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_112074.1	100	$6,0 \times 10^8$
6	M6P3/2	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_114192.1	99	incontável
7	M6P4/1	<i>Delftia</i> sp.	NR_113870.1	100	$1,4 \times 10^8$
8	M6P4/2	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1	99	$3,7 \times 10^9$
9	M6P4/3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	$4,4 \times 10^9$
10	M6P5/1	<i>Pseudochrobactrum</i> sp.	NR_042474.1	100	$>3,0 \times 10^{10}$
11	M6P5/2	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	NR_104560.1	100	$3,2 \times 10^9$
12	M6P6/1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_040804.1	100	$>3,0 \times 10^{10}$
13	M6P6/2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	$>3,0 \times 10^{10}$
14	M6P7/1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1	99	$>3,0 \times 10^{10}$
15	M6P7/2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	$5,5 \times 10^9$
16	M6P8/1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1	99	$8,3 \times 10^9$
17	M6P8/2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	incontável
18	M6P8/3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	$1,0 \times 10^9$
19	M6P9/1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	$5,0 \times 10^8$
20	M6P9/2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	$9,1 \times 10^9$
21	M6P10/1	<i>Enterococcus</i> sp.	NR_115762.1	100	$2,8 \times 10^9$
22	M6P10/2	<i>Citrobacter</i> sp.	NR_028688.1	99	$1,7 \times 10^7$
23	M3P1/1	<i>Enterobacter</i> sp.	NR_042154.1	99	$2,0 \times 10^6$
24	M3P1/2	<i>Enterobacter</i> sp.	NR_042154.1	99	$1,8 \times 10^7$
25	M3P1/3	<i>Enterobacter</i> sp.	NR_024640.1	100	$4,0 \times 10^6$
26	M3P2/1	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1	99	$2,2 \times 10^3$
27	M3P2/2	<i>Sphingobacterium</i> sp.	NR_108441.1	99	$6,0 \times 10^7$
28	M3P2/3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	$1,0 \times 10^7$
29	M3P3/1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	$1,8 \times 10^7$
30	M3P4/1	<i>Comamonas</i> sp.	NR_113709.1	99	$4,5 \times 10^7$
31	M3P4/2	<i>Enterobacter</i> sp.	NR_118568.1	100	$1,3 \times 10^7$
32	M3P5/1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	$>3,0 \times 10^{10}$
33	M3P5/2	<i>Serratia marcescens</i>	NR_114043.1	99	$1,1 \times 10^9$
34	M3P6/1	<i>Comamonas</i> sp.	NR_113709.1	99	$2,3 \times 10^7$
35	M3P6/2	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_114041.1	100	$8,0 \times 10^7$
36	M3P7/1	<i>Kosakonia</i> sp.	NR_118333.1	99	incontável
37	M3P7/2	<i>Enterobacter</i> sp.	NR_024640.1	100	incontável
38	M3P8/1	<i>Enterobacter</i> sp.	NR_118011.1	100	$3,0 \times 10^8$
39	M3P8/2	<i>Enterobacter</i> sp.	NR_118011.1	99	$>3,0 \times 10^{10}$
40	M3P8/3	<i>Citrobacter</i> sp.	NR_117752.1	100	incontável
41	M3P9/1	<i>Enterobacter</i> sp.	NR_118011.1	99	$4,2 \times 10^6$
42	M3P9/2	<i>Enterobacter</i> sp.	NR_118011.1	99	incontável
43	M3P10/1	<i>Citrobacter</i> sp.	NR_117752.1	100	$9,0 \times 10^6$
44	M3P10/2	<i>Enterobacter</i> sp.	NR_118011.1	99	$8,1 \times 10^7$

45	T9P1/1	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1	100	1,0 x 10 ⁸
46	T9P1/2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	8,0 x 10 ⁶
47	T9P1/3	<i>Serratia marcescens</i>	NR_114043.1	100	incontável
48	T9P1/4	<i>Serratia marcescens</i>	NR_114043.1	100	incontável
49	T9P2/1	<i>Enterobacter</i> sp.	NR_042349.1	99	6,0 x 10 ⁶
50	T9P2/2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	incontável
51	T9P2/3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	8,0 x 10 ⁸
52	T9P2/4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	2,0 x 10 ⁶
53	T9P2/5	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_113648.1	99	1,0 x 10 ⁵
54	T9P3/1	<i>Bacillus cereus</i> grupo	NR_121761.1	100	1,0 x 10 ⁶
55	T9P3/2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	8,0 x 10 ⁵
56	T9P3/3	<i>Enterobacter</i> sp.	NR_042154.1	99	>3,0 x 10 ⁷
57	T9P3/4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	1,4 x 10 ⁶
58	T9P4/1	<i>Pseudomonas putida</i> grupo	NR_114226.1	100	>3,0 x 10 ⁴
59	T9P4/2	<i>Pseudomonas putida</i> grupo	NR_114226.1	100	incontável
60	T9P4/3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	2,9 x 10 ⁷
61	T9P5/1	<i>Serratia marcescens</i>	NR_114043.1	100	incontável
62	T9P5/2	<i>Serratia marcescens</i>	NR_114043.1	100	incontável
63	T9P6/1	<i>Pseudomonas putida</i> grupo	NR_116172.1	100	incontável
64	T9P6/2	<i>Bacillus cereus</i> grupo	NR_074540.1	100	1,0 x 10 ⁶
65	T9P6/3	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	NR_116172.1	100	incontável
66	T9P6/4	<i>Serratia marcescens</i>	NR_114043.1	100	5,7 x 10 ⁶
67	T9P7/1	<i>Enterobacter</i> sp.	NR_146667.1	99	4,1 x 10 ⁶
68	T9P7/2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	4,2 x 10 ⁷
69	T9P9/1	<i>Bacillus cereus</i> grupo	NR_121761.1	100	4,0 x 10 ⁷
70	T9P9/2	<i>Bacillus cereus</i> grupo	NR_074540.1	100	1,3 x 10 ¹⁰
71	T9P9/3	<i>Bacillus cereus</i>	NR_121761.1	100	1,5 x 10 ⁷
72	T9P9/4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR_114471.1	100	2,0 x 10 ⁶
73	B/1	Enterobacteriaceae	NR_025337.1	100	2,0 x 10 ⁸
74	B/2	<i>Bacillus cereus</i> grupo	NR_121761.1	100	3,0 x 10 ⁸
75	B/3	<i>Pseudochochromatrum</i> sp.	NR_042474.1	100	1,1 x 10 ⁹
76	B/4	<i>Alcaligenes</i> sp.	NR_113606.1	99	2,0 x 10 ⁸
77	B/5	<i>Comamonas</i> sp.	NR_113709.1	99	1,0 x 10 ⁷

- Numeração: 1-72 (aquífero); 73-77(material suporte).

* Membros do grupo de *Pseudomonas putida*: *P. monteilii*, *P. plecoglossicida*, *P. putida*.

** Membros do grupo de *Bacillus cereus*: *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*.

A maioria dos isolados identificados pertence ao gênero *Pseudomonas*, 29 dos 76 isolados identificados (38,2%). Pelo menos quatro espécies do gênero *Pseudomonas* estão presentes nas amostras: *P. azotoformans*, *P. aeruginosa*, *P. taiwanensis* e do grupo *P. putida*. O grupo de *P. putida* engloba as espécies *P. monteilli*, *P. plecoglossicida* e *P. putida*, que são altamente relacionadas, o que dificulta a identificação da espécie utilizando a sequência do gene de 16s rRNA e também utilizando a técnica de MALDI-TOF, mas podem ser diferenciadas por alguns testes bioquímicos, tais como aqueles para a assimilação de inositol e L- e D-tartarato, e atividade de arilamidase (Elomari et al., 1997), além do uso de análises de sequência multilocus, utilizando principalmente as sequências gênicas parciais dos genes 16S rRNA, *gyrB*, *rpoB*, e *rpoD* (Gomila et al., 2015). Vários trabalhos também citam diversas espécies de *Pseudomonas* com grande potencial de degradação de HPAs isoladas de diversos locais, como rejeitos petroquímicos (antraceno) (Jacques et al., 2005), solo antártico (naftaleno e fenantreno) (Ma et al., 2006), sedimento de córregos (fenantreno) e canais contaminados (naftaleno) (Romero et al., 1998; Pathak et al., 2009). Isso se deve a grande diversidade metabólica do gênero, que os tornam capazes de colonizar diferentes ambientes e oxidar o anel aromático dos HPAs (Bamforth & Singleton, 2005). Simarro e colaboradores (2013) realizaram diferentes experimentos de biorremediação *in situ* de um solo contaminado com creosoto utilizando um consórcio, em que a maioria das bactérias identificadas durante o período de biodegradação também pertencia ao gênero *Pseudomonas*.

O segundo gênero com maior número de isolados identificados, 13 de 76 bactérias identificadas (17,1%), é o gênero *Enterobacter*. Alguns trabalhos relataram a presença de bactérias desse gênero em consórcios isolados de amostras de solo de um complexo petroquímico na cidade de Puertollano, na Espanha (Molina et al., 2009; González et al., 2011). Lors e colaboradores (2010) também identificaram a presença de bactérias desse gênero em solo contaminado com HPAs, submetido a seis meses de biorremediação. A presença dessas bactérias durante todo o período do processo, em que houve redução de 88% dos contaminantes, indica um potencial de biodegradação de

HPAs por bactérias desse gênero. Além da presença direta em solos contaminados com HPAs, uma bactéria endofítica degradadora de pireno pertencente ao gênero também foi isolada de uma planta crescendo em solo com esse tipo de contaminação (Sheng et al., 2008).

O gênero *Bacillus* apresentou 7 das 76 bactérias identificadas (9,2%). Os isolados pertencem ao grupo *Bacillus cereus*, que compreende pelo menos seis espécies de características muito semelhantes: *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis*, podendo ser diferenciadas por características fenotípicas, em particular, por padrões específicos de patogenicidade (Rasko et al., 2005; Tourasse et al., 2006). A análise da sequência do gene *gyrB* pode ser utilizada para identificar as espécies desse grupo (La Duc et al., 2004). O gênero é reconhecido pela capacidade de esporulação, que os permite sobreviver em ambientes contaminados e com poucos nutrientes (Rasko et al., 2005). Além disso, as espécies desse gênero estão entre os principais produtores de biossurfactantes, que são muito utilizados para aumentar a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos, como os HPAs, possibilitando a degradação dos mesmos (Makkar & Rockne, 2003; Das et al., 2008a). Consórcios isolados de solos contaminados com HPAs com a presença de espécies do gênero *Bacillus* também têm sido descritos (Mao et al., 2012; Bezza & Chirwa, 2016).

O gênero *Serratia* foi identificado em 6 das 76 bactérias analisadas (7,9%). As espécies desse gênero são ubíquas no ambiente, pois são encontradas no solo e na água, tanto quanto associadas a plantas, insetos e animais (Iguchi et al., 2014). Não existem muitos trabalhos citando o isolamento de bactérias do gênero *Serratia* de locais contaminados com HPAs. Porém, bactérias desse gênero com potencial de degradação desses compostos foram isoladas de uma área agrícola próxima a uma refinaria de petróleo na Índia (Chaudhary et al., 2015) e em um material vegetal utilizado como adubo (Pandey et al., 2012).

Bactérias do gênero *Stenotrophomonas* corresponderam a 6 das 76 bactérias identificadas (7,9%). Apesar das espécies do gênero serem ubíquas no ambiente, o solo e as plantas são os principais reservatórios ambientais

dessas espécies (Ryan et al., 2009). O gênero é muito citado por sua versatilidade metabólica e potencial em relação à biorremediação e fitorremediação (Ryan et al., 2009; Mukherjee & Roy, 2016). Bactérias do gênero *Stenotrophomonas* com potencial de biodegradação de HPAs foram isoladas em solos contaminados com HPAs da Bélgica (Andreoni et al., 2004), de uma antiga fábrica de gaseificação de petróleo no Havaí (Seo et al., 2007) e de uma fábrica abandonada na Austrália (Juhasz et al. 1997), além de amostras de carvão (Nayak et al., 2009) e água marinha (Mangwani et al., 2014), evidenciando a diversidade de ambientes em que as bactérias desse gênero podem ser encontradas.

Três bactérias do gênero *Comamonas* foram identificadas entre os isolados selecionados. Não existem muitos trabalhos de isolamento de bactérias do gênero em amostras contaminadas com HPAs. Em um desses trabalhos, Goyal & Zylstra (1996) isolaram três linhagens de *Comamonas testosteroni* de sedimento de rio, capazes de crescer em um meio de cultura com fenantreno como única fonte de carbono. Duas das linhagens encontradas cresceram também na presença de naftaleno, e uma na presença de antraceno.

Bactérias dos gêneros *Delftia*, *Pseudochrobactrum*, *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Rhizobium*, *Sphingobacterium*, *Kosakonia* e *Alcaligenes* também foram isoladas. Desses gêneros, *Alcaligenes* é o mais descrito em amostras contaminadas com HPAs, tendo sido isolado em solos contaminados com HPAs e creosoto (Andreoni et al., 2004; Viñas et al., 2005) e em resíduos de óleo bruto (Toledo et al., 2006). Uma linhagem do gênero *Delftia*, nomeada Csl-4, foi isolada a partir de solo contaminado com HPAs coletado em Chippewa Falls, EUA, através de enriquecimento utilizando meio mineral e fenantreno como única fonte de carbono (Vacca et al., 2005). Uma linhagem da espécie *Rhizobium petrolearium*, com capacidade de degradar HPAs, também foi isolada de solo contaminado com esses compostos (Huang et al., 2016). Bactérias com capacidade de degradar hidrocarbonetos do gênero *Citrobacter* foram isoladas em sedimento marinho na Nigéria (Chikere et al., 2012) e do gênero *Sphingobacterium*, identificada em consórcio com capacidade de

degradar fenantreno, isolado de resíduos de uma indústria petroquímica (Janbandhu & Fulekar, 2011). Quanto aos demais gêneros, não foram encontrados relatos de isolamentos de representantes a partir de ambientes contaminados com HPAs.

5.5. Análise da alteração da estrutura da comunidade bacteriana durante o enriquecimento das amostras da fração líquida pela técnica de PCR-DGGE

A utilização da técnica de DGGE para analisar a estrutura da comunidade microbiana de amostras ambientais e sua alteração durante o processo de enriquecimento é bastante observada na literatura, como forma de avaliar como os compostos utilizados para selecionar os micro-organismos de interesse afetaram o perfil dessa comunidade ao longo do processo (Hilyard et al., 2008; Akbar et al., 2014; Bacosa & Inoue, 2015).

A análise de agrupamento foi realizada a partir do perfil de bandas das oito amostras do aquífero utilizando o coeficiente de similaridade euclidiana (Figura 12). Analisando o dendrograma gerado para comparar a estrutura da comunidade bacteriana das amostras, pode-se observar que dois grupos principais foram formados, contendo alguns subgrupos. O primeiro grupo foi composto pelas amostras PP20, PP29, PP206, PM208 e PM211, que apresentaram um índice de distância euclidiana entre 4,0 e 4,5. O segundo foram as amostras PP203, PP207 e PP223, com distância de aproximadamente 4,0 (Figura 12). Dentro do primeiro grupo observamos a divisão de algumas amostras em subgrupos. Um deles foi formado pelas amostras PP20 e PP29, que apresentaram distância de aproximadamente 4,0, e outro formado pelas amostras PP206 e PM211, que praticamente não apresentaram diferenças nos padrões de bandas. A amostra de PM208 ficou mais afastada das outras 4 amostras deste primeiro grupo. No segundo grupo, as amostras PP203 e PP223 formaram um subgrupo com uma distância entre 2,5 e 3,0 em relação ao padrão de bandas dessas amostras.

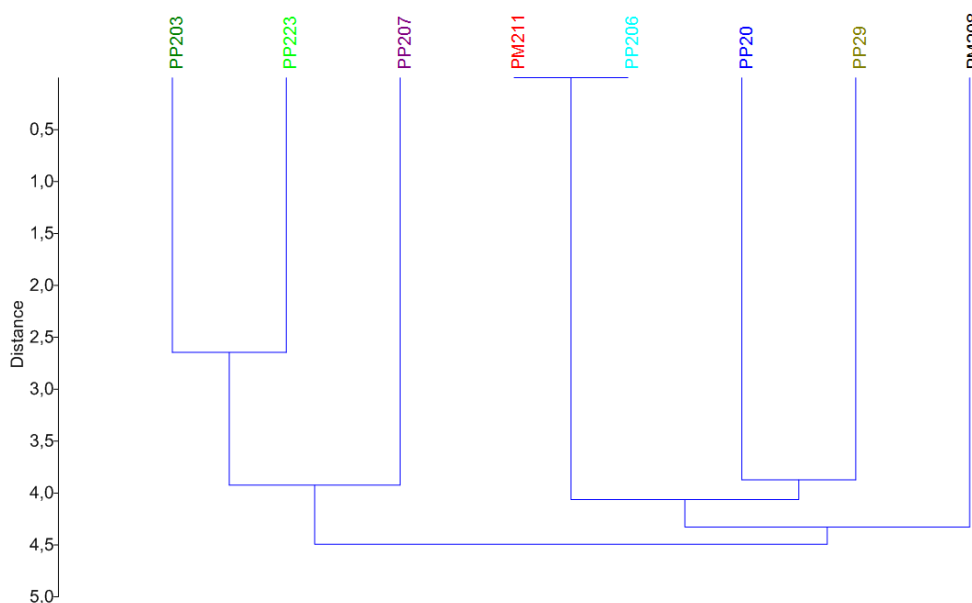


Figura 12 - Dendrograma representativo das comunidades bacterianas presentes nas amostras do aquífero, construído utilizando o coeficiente Euclidiano da matriz de distância do perfil das bandas das amostras no DGGE.

Para avaliar o impacto dos COVs e COSVs presentes nas amostras no agrupamento a partir do padrão de bandas, uma análise de nMDS foi realizada usando a matriz de presença e ausência das bandas DGGE e a concentração de compostos agrupados pelo número de anéis presentes em cada um deles (Figura 13).

Avaliando a influência dos metadados nos grupos, observa-se que eles explicam o grupo formado pelas amostras PM211 e PP206 (circulado de vermelho). Embora as amostras PM206, PM211 e PP20 tenham concentrações mais elevadas dos contaminantes como mencionado anteriormente, a amostra PP20 (indicado com uma seta verde) tem maiores concentrações de hidrocarbonetos de cadeia mais curta (1 e 2 anéis aromáticos), enquanto as outras duas têm concentrações mais altas de hidrocarbonetos de cadeia mais longa (3, 4, 5 e 6 anéis aromáticos). O aumento do número de anéis aumenta a recalcitrância dos HPAs, resultando na redução dos grupos bacterianos capazes de degradá-los no ambiente que os contêm. Essas diferenças nos padrões de contaminação das amostras ajudam a explicar porque as amostras PM211 e PP206 tem uma estrutura de comunidade bacteriana tão próxima, enquanto a amostra PP20 tem uma estrutura de comunidade mais próxima da

amostra PP29. As outras amostras (PM208, PP207, PP203 e PP213) apresentaram menor concentração dos compostos analisados e, portanto, um padrão de bandas variado, o que os deixa mais dispersos na análise.

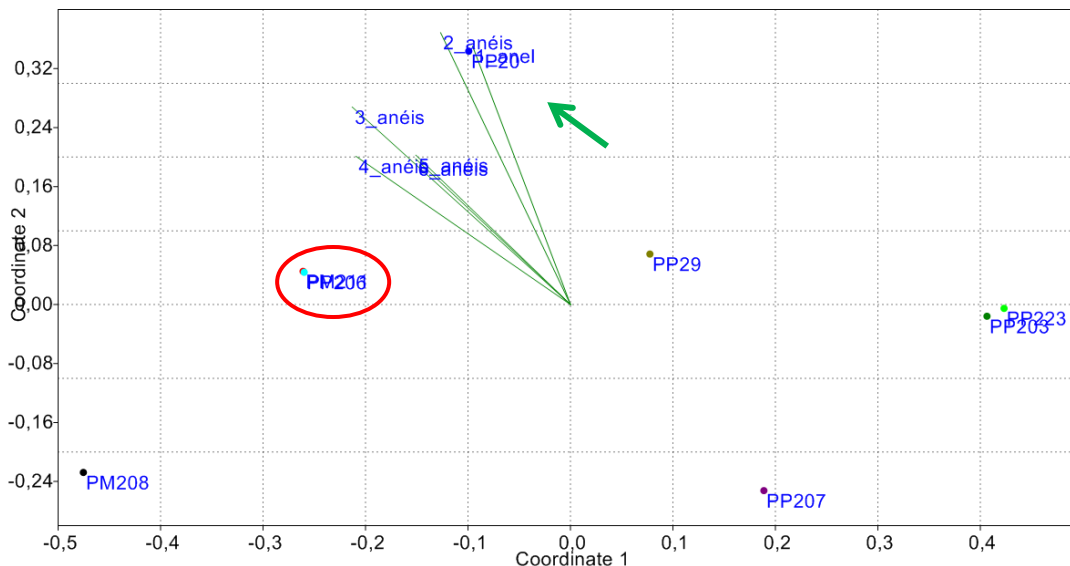


Figura 13 – Análise de nMDS da matriz de presença e ausência gerada a partir do perfil de bandas da DGGE de cada amostra relacionada aos metadados.

A análise da beta diversidade com o coeficiente de similaridade de Jaccard também foi realizada comparando as amostras das três semanas de enriquecimento com a amostra original de cada poço (Figura 14). Nessa análise podemos observar que, com exceção dos poços PP20 e PP223, o perfil de bandas das amostras originais do aquífero foi mais dissimilar comparado às amostras das três semanas de enriquecimento, evidenciando que os enriquecimentos realmente alteraram a comunidade bacteriana presente nas amostras originais.

Os poços que tiveram o perfil da comunidade de bactérias das três semanas de enriquecimento mais similares comparadas à amostra original apresentaram dois padrões de agrupamento entre as semanas. Os poços PP29, PP203 e PP207 tiveram as duas primeiras semanas com maior similaridade comparadas à semana final, enquanto que os poços PP206, PM208 e PM211 apresentaram a duas últimas semanas mais similares que a primeira. Essa separação pode indicar a semana de enriquecimento em que ocorreu o estabelecimento dos micro-organismos degradadores na

comunidade: terceira e segunda semanas, respectivamente. Além disso, essa diferença na semana em que as bactérias degradadoras se estabeleceram pode ter relação com a microbiota inicial encontrada em cada poço.

Nos únicos dois poços em que a amostra original agrupou com uma amostra do enriquecimento, PP20 e PP223, o agrupamento ocorreu com a primeira semana de enriquecimento. Além disso, esses dois poços apresentaram os menores índices de similaridade entre todos os poços. Então, mesmo ocorrendo o agrupamento, o que a análise indica é que todas as semanas de enriquecimento e a amostra original foram muito dissimilares entre si. Esse padrão indica uma grande pressão de seleção no processo de enriquecimento nesses dois poços.

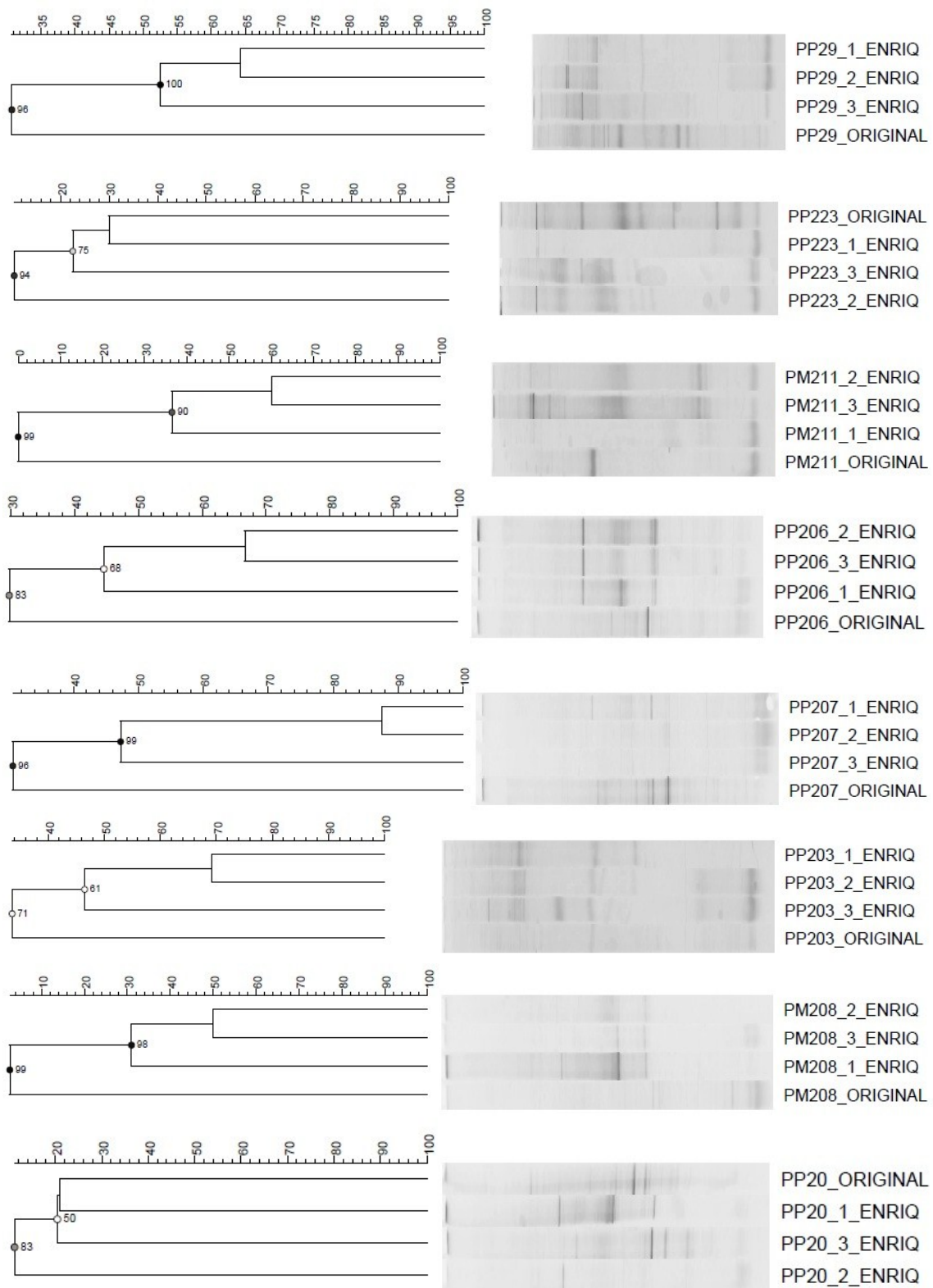


Figura 14 – Análise de agrupamento utilizando o índice de Jaccard, dos perfis de DGGE das amostras das três semanas de enriquecimento, comparadas com suas respectivas amostras originais de cada poço onde foram coletadas as frações líquidas.

As bandas que estavam nítidas e individualizadas no gel de DGGE foram excisadas e sequenciadas (Figura 15). O poço que apresentou maior riqueza foi PP29 com 24 bandas detectadas, enquanto o que apresentou menor riqueza foi o poço PM211 com 4 bandas detectadas. Os poços PP20, PP207, PP29 e PP203 apresentaram redução da riqueza ao longo das 3 semanas do processo, indicando que alguns grupos de bactérias foram substituídos ao longo do processo de seleção. Enquanto que os poços PM211 e PP223 apresentaram aumento da riqueza durante o mesmo período. O poço PM211, inclusive, alcançou a maior riqueza observada ao final da terceira semana de enriquecimento junto com o poço PP29 (19 bandas), indicando que um grande número de grupos de bactérias foi favorecido pelo enriquecimento da amostra desse poço. Esses grupos de bactérias provavelmente já estavam presentes na amostra original em densidades muito baixas, que não foram detectadas pela técnica. A seleção fez com que esses grupos ficassem mais representativos na amostra e aparecessem no gel durante as semanas de enriquecimento. Os poços PP206 e PM208 mantiveram o número de bandas praticamente constante ao longo do processo.

As sequências obtidas a partir das bandas excisadas foram comparadas aquelas disponíveis nos bancos de dados do Genbank, utilizando o algoritmo BLAST (Tabela 3). Em geral, dois grupos de bandas foram observados no gel. O primeiro é formado por aquelas bandas que apareceram muito intensas nas amostras originais (A0, B0, C0, D0, E0, F0, G0 e H0), mas que desapareceram ou ficaram muito fracas ao longo das semanas de enriquecimento. Um exemplo são as bandas 1 e 11, que possuem similaridade a *Acidovorax* sp e *Delftia* sp. Esse grupo de bandas representa as bactérias dominantes nos poços coletados, que provavelmente foram substituídas durante o processo de seleção por outras que apresentavam maior capacidade de degradação de creosoto. O segundo grupo é formado pelas bandas que apresentaram maior intensidade durante as semanas de enriquecimento. Suas sequências apresentaram similaridade a *Sulfurisoma* sp. (3), *Bordetella* sp. (4, 10), *Serratia* sp. (5), *Cupriavidus* sp. (9), *Pandoraea* (12) e *Pseudomonas* (2, 8 e 13), sendo *Pseudomonas* inclusive o gênero com maior número de bactérias isoladas ao

final do enriquecimento. Esse segundo grupo representa as bactérias que foram favorecidas durante o processo de enriquecimento, pelo seu potencial de se adaptar as condições do experimento e potencial para a degradação de creosoto.

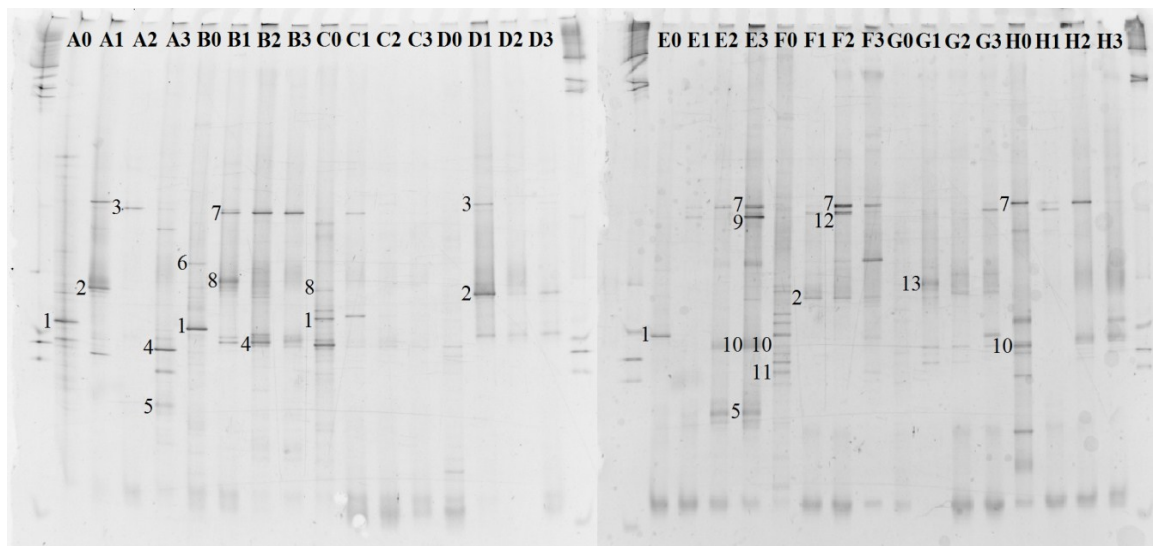


Figura 15 – Perfil de DGGE das comunidades bacterianas submetidas a três semanas de enriquecimento utilizando creosoto como única fonte de carbono. A – PP20, B – PP206, C – PP207, D – PM208, E – PM211, F – PP29, G – PP203 e H – PP223. 0 - original, 1 - primeira semana de enriquecimento, 2 - segunda semana de enriquecimento e 3 - terceira semana de enriquecimento.

Tabela 3 – Resumo das sequências 16S rDNA obtidas das bandas do gel de DGGE e comparação com sequências depositadas no banco de dados GenBank.

Banda	Identificação com maior combinação no banco de dados	Número de acesso Genbank	ID (%)	Poços encontrados
1	<i>Acidovorax caeni</i> R-24608	NR_042427.1	100	PP20, PP206, PP207, PM211
2	<i>Pseudomonas monteilii</i> NBRC 103158	NR_114224.1	100	PP20, PM208, PP29
3	<i>Sulfurisoma sediminicola</i> BSN1	NR_125471.1	98	PP20, PM208
4	<i>Bordetella petrii</i> DSM 12804	NR_074291.1	99	PP20, PP206
5	<i>Serratia marcescens</i> NBRC 102204	NR_114043.1	100	PP20, PM211
6	<i>Diaphorobacter nitroreducens</i> NA10B	NR_024782.1	99	PP206
7	<i>Burkholderia tuberum</i> STM678	NR_118081.1	100	PP206, PM211, PP29, PP223
8	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	NR_102854.1	100	PP206, PP207
9	<i>Cupriavidus necator</i> N-1	NR_102851.1	99	PM211
10	<i>Bordetella bronchiseptica</i> NBRC 13691	NR_113628.1	100	P211, PP29, PP223
11	<i>Delftia acidovorans</i> NBRC 14950	NR_113708.1	100	PP29
12	<i>Pandoraea pulmonicola</i> CCUG 38759	NR_115186.1	99	PP29
13	<i>Pseudomonas flavescens</i> NBRC 103044	NR_114195.1	100	PP203

- ID = Identidade

A análise taxonômica baseada nas sequências do Genbank mostrou que as sequências de todas as bandas identificadas pertencem ao filo Proteobacteria, com 69% pertencente à classe Betaproteobacteria e 31% a classe Gammaproteobacteria. Todas as sequências da classe Betaproteobacteria são da ordem Burkholderiales, com exceção de uma que pertence à ordem Rhodocyclales. As sequências da ordem Burkholderiales são divididas em três famílias: Burkholderiaceae (37,5%), Comamonadaceae (37,5%) e Alcaligenaceae (25%). A relevância da ordem Burkholderiales na degradação de uma vasta gama de compostos aromáticos, incluindo vários poluentes prioritários, tem sido largamente citada (O'Sullivan & Mahenthalingam, 2005; Deneff, 2007; Pérez-Pantoja, et al., 2012). A análise da distribuição de genes codificadores de oxigenases aromáticas entre as sequências disponíveis do genoma bacteriano mostrou que os membros da ordem Burkholderiales abrigam o potencial mais impressionante para o catabolismo de compostos aromáticos (Pérez-Pantoja, et al., 2012). A degradação de HPAs como naftaleno e fenantreno por membros dessa ordem

já foram descritas na literatura (Jeon et al., 2003; Singleton et al., 2005). Poucas bactérias da classe Betaproteobacteria foram isoladas das amostras do aquífero, o que mostra a importância da técnica de DGGE para identificar nas amostras grupos de bactérias que podem ser de difícil isolamento e cultivo. Kalmbach e colaboradores (1997) encontram betaproteobactérias provenientes de amostras de água potável predominando em placas de R2A somente após 10 dias de incubação, enquanto Macdonald & Brözel (2000) relataram o predomínio de betaproteobactérias em sistemas de circulação de água utilizando marcadores fluorescentes, porém no cultivo dessas amostras em placas R2A, observaram predomínio de *Pseudomonas* fluorescentes após 2 dias de incubação, que não foram encontradas na contagem das placas incubadas por 14 dias, indicando um rápido crescimento dessas bactérias, que podem dar uma impressão errada de sua dominância na amostra.

Entre as sequências da classe Gammaproteobacteria, três são pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (75%) e uma ao gênero *Serratia* (25%). Esses dois gêneros estão entre os que tiveram mais representantes isolados na amostra do aquífero. Três espécies do gênero *Pseudomonas* foram identificadas nas bandas da DGGE. Essas sequências foram observadas nos poços PP20, PP206, PM208, PP29 e PP203. Com exceção do poço PP20, os outros 4 poços apresentam frequência relativa do gênero acima de 99%. As bandas com sequência correspondente ao gênero *Serratia* também foram identificadas justamente na terceira semana do enriquecimento das amostras dos poços PP20 e PM211, poços em que a frequência relativa dos isolados desse gênero alcançou valores de 99,82% e 100%, respectivamente. Para esses dois gêneros, a presença das bandas de DGGE normalmente coincidiu com os poços em que as bactérias do respectivo gênero apresentaram maior frequência durante o isolamento, mostrando a eficácia da técnica na avaliação do perfil da comunidade bacteriana. A ocorrência de bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Serratia* em ambientes contaminados já foi citada no tópico de identificação das bactérias isoladas. A degradação de HPAs por espécies de *Pseudomonas* é bastante descrita na literatura (Romero et al., 1998; Jacques et al., 2005; Pathak et al., 2009; Simarro et al., 2013). O sistema naftaleno

dioxigenase, amplamente descrito para o gênero *Pseudomonas* (Habe & Omori, 2003; Lu et al., 2011), é especialmente útil para a oxidação de HPAs bi e tri-cíclicos (Peng et al., 2008a). O grupo de genes relacionados à degradação de HPAs mais estudado são os genes do tipo *nah* e quase todos são de espécies de *Pseudomonas* (Lu et al., 2011), demonstrando a importância desse gênero na degradação de HPAs.

5.6. Avaliação dos isolados bacterianos quanto à capacidade de degradação de creosoto

Os isolados bacterianos selecionados diferiram estatisticamente quanto à degradação do creosoto ($p < 0,05$) (Anexo 3). Para comparar as taxas de degradação total do creosoto entre os diferentes isolados, foi utilizado o teste de médias Scott Knott com 5% de probabilidade. Na análise, 11 isolados com médias estatisticamente iguais apresentaram as maiores taxas de degradação, variando de 24 a 33% ($p < 0,05$) (Figura 16). Outros dois grupos foram observados, um formado por 17 bactérias, com taxas de degradação entre 11 e 20% e outro formado por 49 bactérias, com taxas de degradação abaixo de 10% ou que não foram capazes de degradar o creosoto.

Entre os degradadores com percentuais de remoção superiores a 24%, bactérias de 5 gêneros diferentes foram identificadas: *Enterobacter* (36,4%), *Pseudomonas* (27,3%), *Bacillus* (18,2%), *Serratia* (9,1%) e *Alcaligenes* (9,1%). Sendo as maiores taxas de degradação observadas para os isolados *Enterobacter* sp. M3P8/2 (33,71%), *Enterobacter* sp. M3P8/1 (33,60%), *Alcaligenes* sp. B/4 (33,55%) e *Bacillus cereus* T9P9/3 (33,42%). O gênero *Enterobacter* possui espécies descritas como boas degradadoras de naftaleno, antraceno, fenantreno e pireno (Sheng et al., 2008; Bautista et al., 2009; Molina et al., 2009) e as espécies do gênero *Pseudomonas* já foram indicadas em diversos estudos como degradadoras de grande potencial de HPAs como naftaleno, antraceno e fenantreno, principais componentes do creosoto (Romero et al., 1998; Jacques et al., 2005; Pathak et al., 2009; Simarro et al., 2013). A maioria dos trabalhos relacionados à degradação de creosoto e seus componentes utilizando as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Serratia* e

Alcaligenes têm sido realizadas em consórcio (Mao et al., 2012; Chaudhary et al., 2015; Bezza & Chirwa, 2016). Mas um isolado de *B. subtilis* com potencial de degradar 40% de pireno e 50% de benzo[a]pireno foi avaliado por Hunter e colaboradores (2005). Pandey e colaboradores (2012) observaram que o isolado *Serratia marcescens* L-11 degradou 39-100% de HPAs em sete dias. Deveryshetty & Phale (2010) purificaram a enzima hidroxilase ácida 1-hidroxi-2-naftoico responsável pela degradação de fenantreno por *Alcaligenes* sp. PPH.

Os isolados foram também caracterizados quanto ao potencial de degradação individual de compostos presentes no creosoto. Nesta análise foi avaliada a degradação dos 12 compostos presentes em maior concentração na amostra de creosoto fornecida pela Vale e usada nos ensaios de degradação (Figura 17). O perfil degradativo de cada isolado está apresentado no Anexo 4. A análise de variância mostrou que o percentual de degradação variou com o isolado e com o composto em estudo (Anexo 5).

No geral, independente do isolado em estudo, os compostos com os maiores percentuais de degradação foram 2-metiltetracosano, dibenzofurano e fluoreno, com médias correspondentes a 43,8%, 12,6% e 10,6%, respectivamente ($p < 0,05$) (Figura 17). Estes compostos também foram degradados por um grande número de isolados, 66, 40 e 50, respectivamente, degradaram esses compostos em alguma proporção. Embora com uma taxa média de degradação menor, que foi de 8,0%, dibenzotiofeno também foi degradado por um grande número de bactérias (50 isolados). Os demais compostos apresentaram médias de degradação abaixo de 6,0%.

Assim como para as análises de degradação de HPAs totais e creosoto, as análises de degradação de diferentes HPAs é normalmente descrita para consórcios bacterianos (Eriksson et al., 2003; Viñas et al., 2005; Simpanen et al., 2016), o que dificulta a comparação. Sun e colaboradores (2014) observaram que a degradação de HPAs em mistura levou a taxas de degradação mais baixas, que quando os mesmos compostos foram avaliados de forma individual. É provável, então, que os isolados avaliados alcancem maiores valores em relação à degradação desses compostos, se forem testados com os mesmos individualmente. Apesar disso, o teste de degradação

utilizando o próprio composto extraído da área contaminada permite uma melhor predição da eficácia do uso destas bactérias na remediação da área. Outros fatores que podem otimizar a degradação de compostos presentes no creosoto é a adição de surfactantes, que aumentam a biodisponibilidade desses compostos hidrofóbicos.

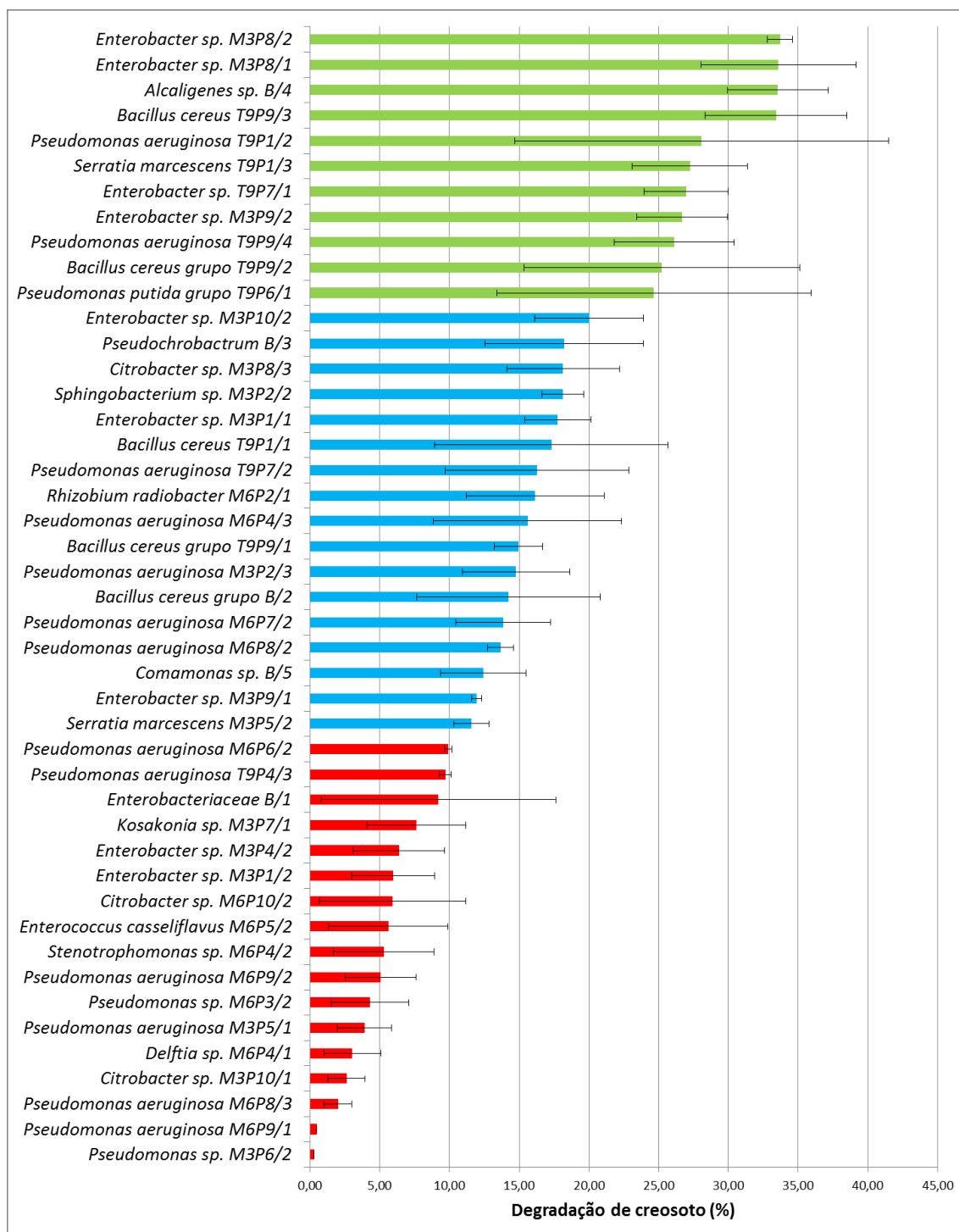


Figura 16 – Porcentagem de degradação total de creosoto pelos isolados selecionados. Os valores com a mesma cor não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade.

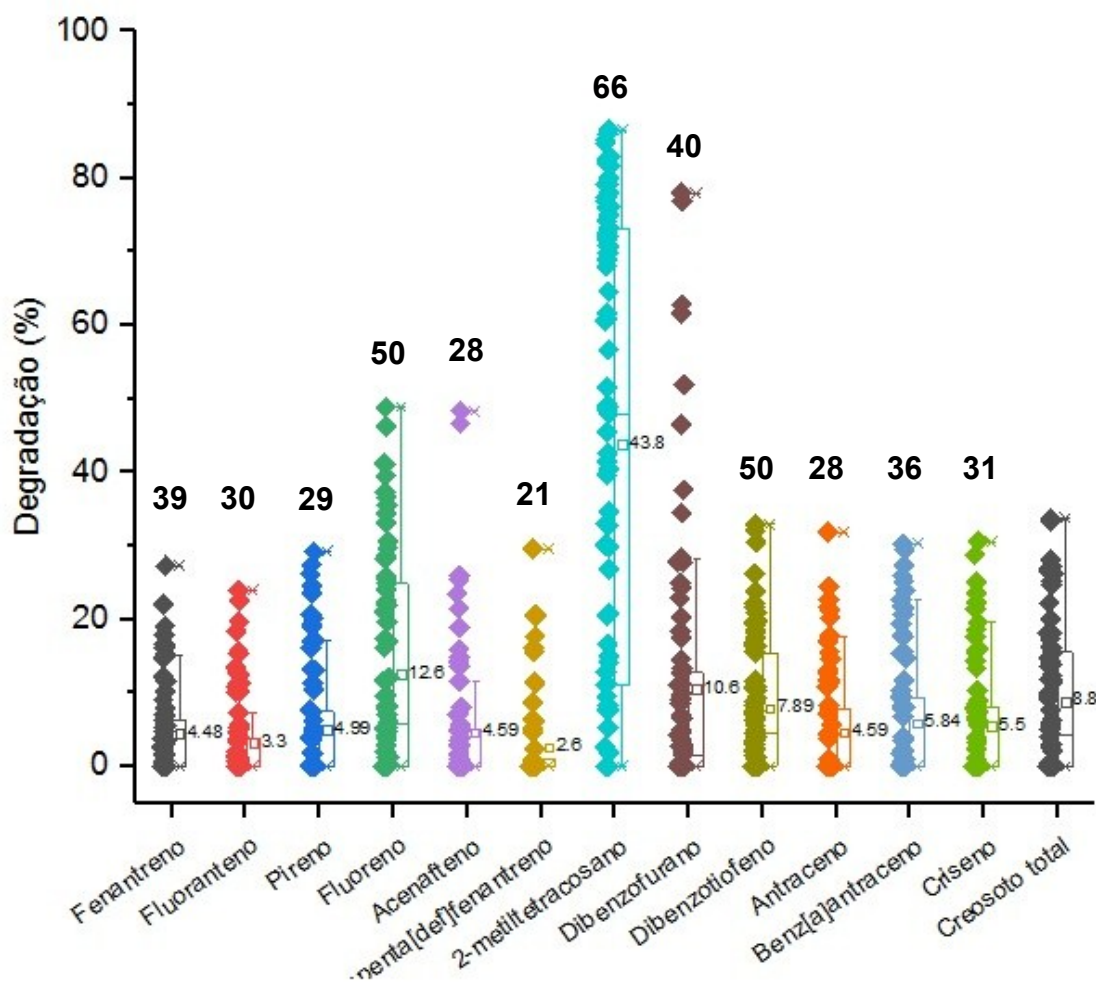


Figura 17 – Degradação do creosoto total e dos 12 compostos presentes em maior concentração na amostra por todos os isolados analisados. Os números acima de cada coluna correspondem aos isolados que conseguiram degradar o composto em alguma proporção e os números na lateral de cada coluna correspondem a média de degradação por todos os 77 isolados.

O número de isolados de cada gênero que degradaram cada um dos 12 compostos está indicado na Figura 18. O gênero *Pseudomonas* teve o maior número de isolados degradadores de todos os compostos. O gênero *Bacillus* teve o segundo maior número de isolados degradadores dos seguintes compostos: fenantreno (5), fluoreno (4), pireno (4), 4H-ciclopenta[def]fenantreno (4), acenafteno (4), antraceno (4), benz[a]antraceno (4) e criseno (4), enquanto o gênero *Enterobacter* teve para os demais compostos: acenafteno (4), fluoreno (8), 2-metiltetracosano (10), dibenzofurano (6) e dibenzotiofeno (7). Os isolados do gênero *Bacillus* tiveram destaque na degradação da maioria dos HPAs presentes na amostra, variando no número

de anéis (3 a 5 anéis), enquanto os isolados do gênero *Enterobacter* se destacaram na degradação de um hidrocarboneto de cadeia aberta (2-metilтетраcosano) e dois compostos heterocíclicos (dibenzofurano e dibenzotiofeno), além de dois HPAs tricíclicos (acenafteno e fluoreno).

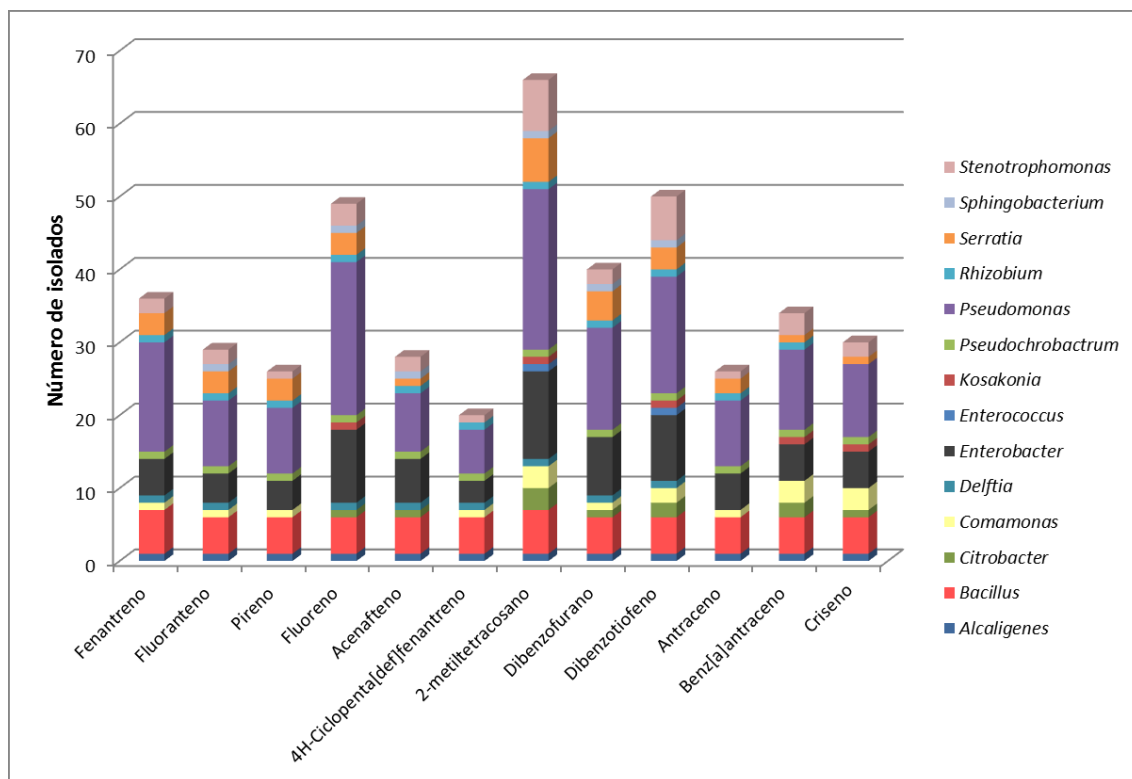


Figura 18 – Número de isolados de cada gênero que degradaram cada um dos 12 compostos analisados.

O padrão de degradação dos 12 compostos foi caracterizado também pela análise de PCA (Figura 19). Essa análise mostrou que 94,83% da variância total dos dados podem ser explicadas pelos dois componentes principais, sendo 84,90% descrita pela primeira (CP1) e 8,93% pela segunda (CP2). O gráfico de loadings, obtido durante a análise indica que a CP1 representou informações de degradação de 41 dos 77 isolados avaliados, as variáveis que representam a degradação desses isolados apresentaram valores positivos acima de 0,1. A CP2 concentrou informação das variáveis de degradação dos isolados 46 (0,23) e 47 (0,23), que apresentaram os maiores valores positivos e das variáveis de degradação dos isolados 34 (-0,21), 38 (-0,34), 39 (-0,41), 40 (-0,26), 70 (-0,26) e 72 (-0,23), que apresentaram os

maiores valores negativos. Analisando a projeção das duas componentes principais, é possível observar que o composto 2-metiltetracosano ficou afastado dos demais compostos no eixo X, por ser o composto mais degradado pelos 41 isolados representados pela CP1, seguido dos compostos dibenzofurano e fluoreno, que também ficaram na parte positiva do eixo X, indicando também maior degradação por esses isolados. No eixo Y, o composto dibenzofurano ficou posicionado na região mais negativa do eixo, indicando alta degradação pelos isolados que apresentaram valores negativos na CP2, seguido dos compostos fluoreno e acenafteno. Apesar da média de degradação baixa, o acenafteno ficou afastado dos demais compostos pela alta taxa de degradação dos isolados 38 (*Enterobacter* sp. M3P8/1) e 39 (*Enterobacter* sp. M3P8/2), com degradação de 48,8% e 43,6%, respectivamente.

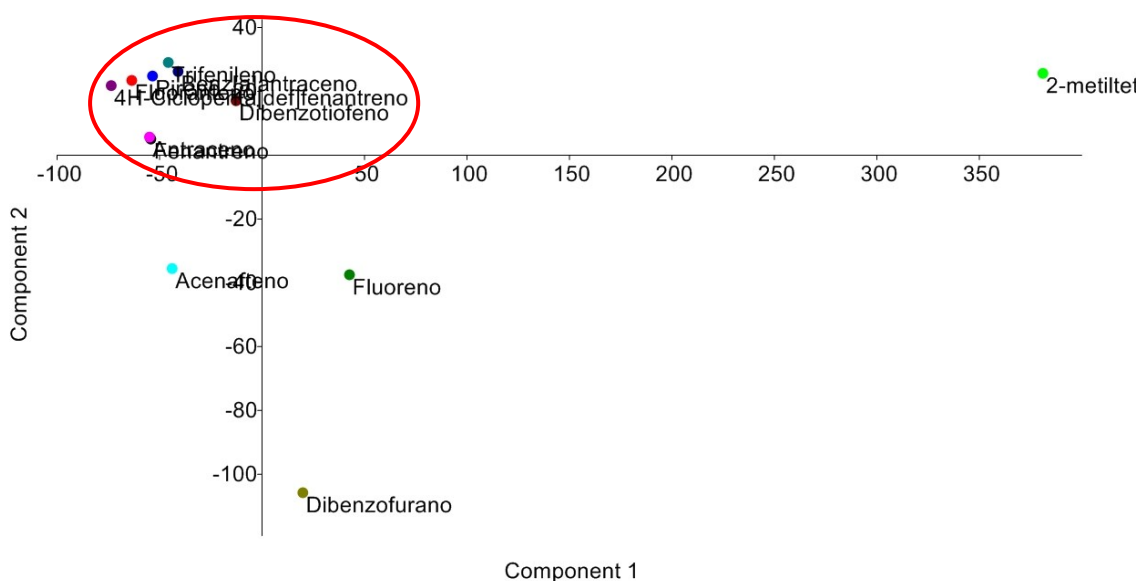


Figura 19 – Perfil de degradação analisado por PCA dos 12 principais compostos presentes no creosoto por todos os isolados selecionados. Componente 1 (84,90%) e Componente 2 (8,93%).

Como os compostos 2-metiltetracosano, fluoreno e dibenzofurano se destacaram nas duas análises, foi realizado o teste de médias Scott Knott para indicar os isolados que se destacaram na degradação individual dos 3 compostos (Anexos 8, 9 e 10).

Dentre os 66 isolados que degradaram 2-metiltetracosano, 30 isolados foram agrupados entre os que apresentaram os maiores percentuais de degradação, com médias estatisticamente iguais, variando de 64% a 86,57%, sendo o maior valor observado para o isolado *Enterobacter* sp. M3P8/1 (Anexo 6). Outros 13 isolados reduziram o composto em um percentual entre 41,44% e 61,63%, enquanto 10 isolados apresentaram porcentagem de degradação entre 20,48% e 39,67%. Os demais isolados degradaram abaixo de 16,67% (Anexo 6). Esse composto é o único dos 12 escolhidos que não é um composto aromático e sim um hidrocarboneto de cadeia aberta, provavelmente por esse motivo teve os valores de degradação mais altos e o maior número de isolados com essa capacidade de degradação.

Em relação à degradação de dibenzofurano, quatro isolados se destacaram: os isolados *Enterobacter* sp. M3P8/1 e *Enterobacter* sp. M3P8/2 degradando 78,02% e 76,91%, respectivamente e os isolados *Bacillus cereus* grupo T9P9/2 e *P. aeruginosa* T9P9/4 que degradaram 62,79% e 61,64% respectivamente. Outros 4 isolados degradaram entre 34,44% e 51,93%, enquanto os demais degradaram abaixo de 28,28% (Anexo 7). O dibenzofurano é um composto heterocíclico aromático, com dois anéis benzeno fundidos a um anel furano central.

Para o fluoreno, 29 bactérias apresentaram percentuais de degradação acima de 16,17%. O isolado *Enterobacter* sp. M3P8/1 apresentou a maior porcentagem de degradação (48,82%) (Anexo 8). O fluoreno também é um composto aromático, com dois anéis benzeno fundidos a um anel furano central. É um dos 16 HPAs considerados contaminantes prioritários pela US EPA (Kohler et al., 2000; Kulik et al., 2006).

Os isolados *Enterobacter* sp. M3P8/1, *Enterobacter* sp. M3P8/2, *Bacillus cereus* grupo T9P9/2 e *Pseudomonas aeruginosa* T9P9/4 são os únicos que aparecem entre os maiores degradadores dos 3 compostos analisados em detalhe. Entre os isolados com degradação significativa de 2-metiltetracosano, dibenzofurano e fluoreno, as bactérias do gênero *Pseudomonas* (46,7%, 25,0% e 48,3%, respectivamente) e *Enterobacter* (26,7%, 50,0% e 24,1%, respectivamente) são maioria. Espécies de *Pseudomonas* capazes de

degradar dibenzofurano e fluoreno são bastante descritas na literatura (Fortnagel et al., 1990; Hong et al., 2004; Rodrigues et al., 2005; Jaiswal et al., 2011; Zhang et al., 2011; Vojtková et al., 2015), enquanto que não foram encontrados relatos de espécies de *Enterobacter* degradando esses compostos, apesar da descrição de isolados desse gênero degradando outros HPAs, como dito anteriormente. A degradação de 2-metiltetracosano não é descrita na literatura, pelo menos com essa nomenclatura.

De modo geral, 71 isolados foram capazes de degradar em alguma extensão pelo menos 1 constituinte do creosoto (Anexo 6). Destes, 15 foram capazes de degradar em alguma extensão os 12 constituintes do creosoto, *Stenotrophomonas* sp. M6P4/2, *Enterobacter* sp. (M3P8/1, M3P8/2 e T9P7/1), *Pseudomonas aeruginosa* (T9P4/3, T9P7/2 e T9P9/4), *Pseudomonas putida* grupo T9P6/1, *Bacillus cereus* (T9P9/1, T9P9/2, T9P9/3 e B/2), Enterobacteriaceae B/1, *Pseudochrobactrum* B/3 e *Alcaligenes* sp. B/4.

Conforme já discutido, a remediação de ambientes contaminados com misturas complexas como é o caso do creosoto requer a adição de inoculantes a base de bactérias com potencial catabólico complementar, de modo a garantir a completa degradação e remediação da área contaminada com creosoto. Visando verificar se os isolados bacterianos em estudo apresentam perfis catabólicos semelhantes ou não, um agrupamento pela métrica de PCA foi realizado (Figura 20). A análise mostrou que 84,21% da variância total dos dados podem ser explicadas pelos dois componentes principais, sendo 61,02% descrita pela primeira componente principal (CP1) e 23,19% pela segunda componente principal (CP2). O gráfico de loadings, obtido durante a análise indica que em relação a CP1, todos os 12 compostos apresentaram valores positivos, com destaque para os compostos 2-metiltetracosano, dibenzofurano e fluoreno, com os maiores valores positivos. Dessa forma, os isolados posicionados na parte mais positiva do eixo X (círculo verde) são os principais degradadores quando consideramos todos os compostos analisados. A CP2 representou 11 compostos com valores positivos, com destaque para os compostos pireno (0,26), acenafteno (0,28), dibenzofurano (0,44) e antraceno (0,27), enquanto o composto 2-metiltetracosano foi representado com valor

negativo de -0,54. Com isso, os isolados posicionados na parte mais alta do eixo Y (círculo azul) são aqueles que mais degradaram os compostos quando o efeito da degradação do composto 2-metiltetracosano foi retirado. Esta análise indica que além dos isolados já observados como maiores degradadores dos 12 compostos, os isolados 63 (*Pseudomonas putida* grupo T9P6/1) e 69 (*Bacillus cereus* grupo T9P9/1) também devem ser considerados para a formação dos inoculantes nos experimentos posteriores.

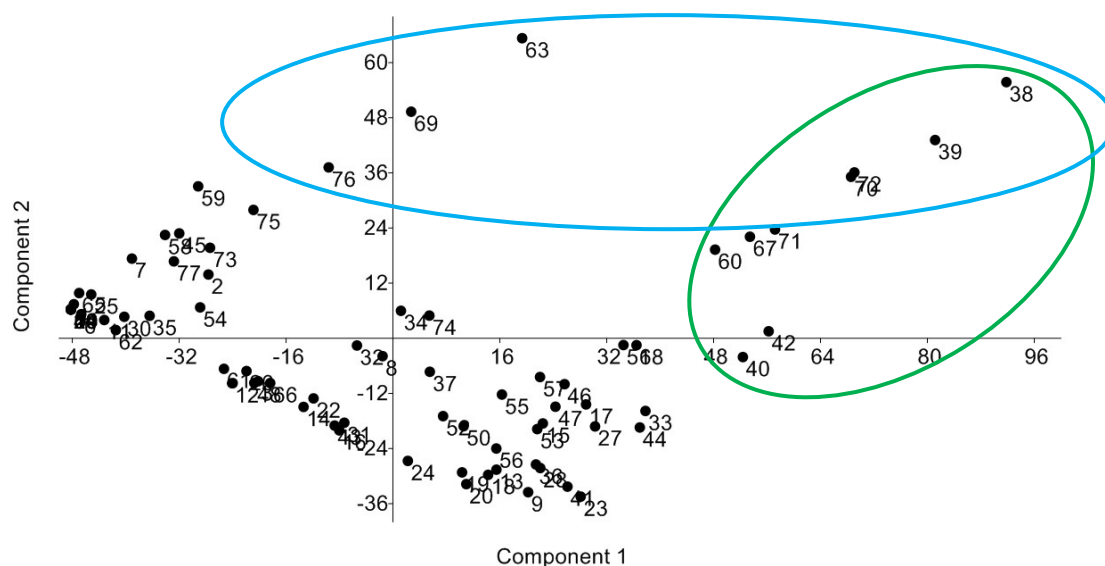


Figura 20 – Análise por PCA dos 77 isolados pela capacidade de degradação dos 12 principais compostos presentes no creosoto analisado. Componente 1 (61,02%) e Componente 2 (23,19%). A numeração dos isolados é a mesma utilizada na tabela 2. O círculo verde representa os maiores degradadores quando considerada a componente principal 1 e o círculo azul representa os maiores degradadores quando considerada a componente principal 2.

Os isolados bacterianos do aquífero diferiram estatisticamente em relação ao crescimento durante o experimento de degradação do creosoto ($p < 0,05$) (Anexo 9). O teste de médias Scott Knott mostrou que o isolado *Pseudomonas* sp. M6P3/1 apresentou o maior crescimento com densidade ótica de 1,68, seguido pelos isolados M3P4/1 e M3P6/1 de *Comamonas*, com médias estatisticamente iguais e correspondentes a 1,19 e 1,18, respectivamente. Os isolados *Enterobacter* sp. M3P1/2, *Alcaligenes* sp. B/4 e *Comamonas* sp. B/5 apresentaram densidade ótica de 0,88, 0,78 e 0,78,

respectivamente (Figura 21). Entre esses seis isolados, que se destacaram na avaliação do crescimento durante a degradação de creosoto, somente o isolado *Alcaligenes* sp. B/4 está entre os isolados que degradaram o creosoto em maior percentual (Figura 16). Entre os outros 10 isolados que apresentaram maior percentual de degradação de creosoto, *Pseudomonas putida* grupo T9P6/1 está entre os 10 isolados que cresceram entre 0,58 e 0,66, outros 6 estão entre os 36 isolados que cresceram entre 0,30 e 0,57 e 3 entre os 25 isolados que cresceram entre 0,0 e 0,27, indicando não haver uma relação clara entre crescimento e degradação de creosoto.

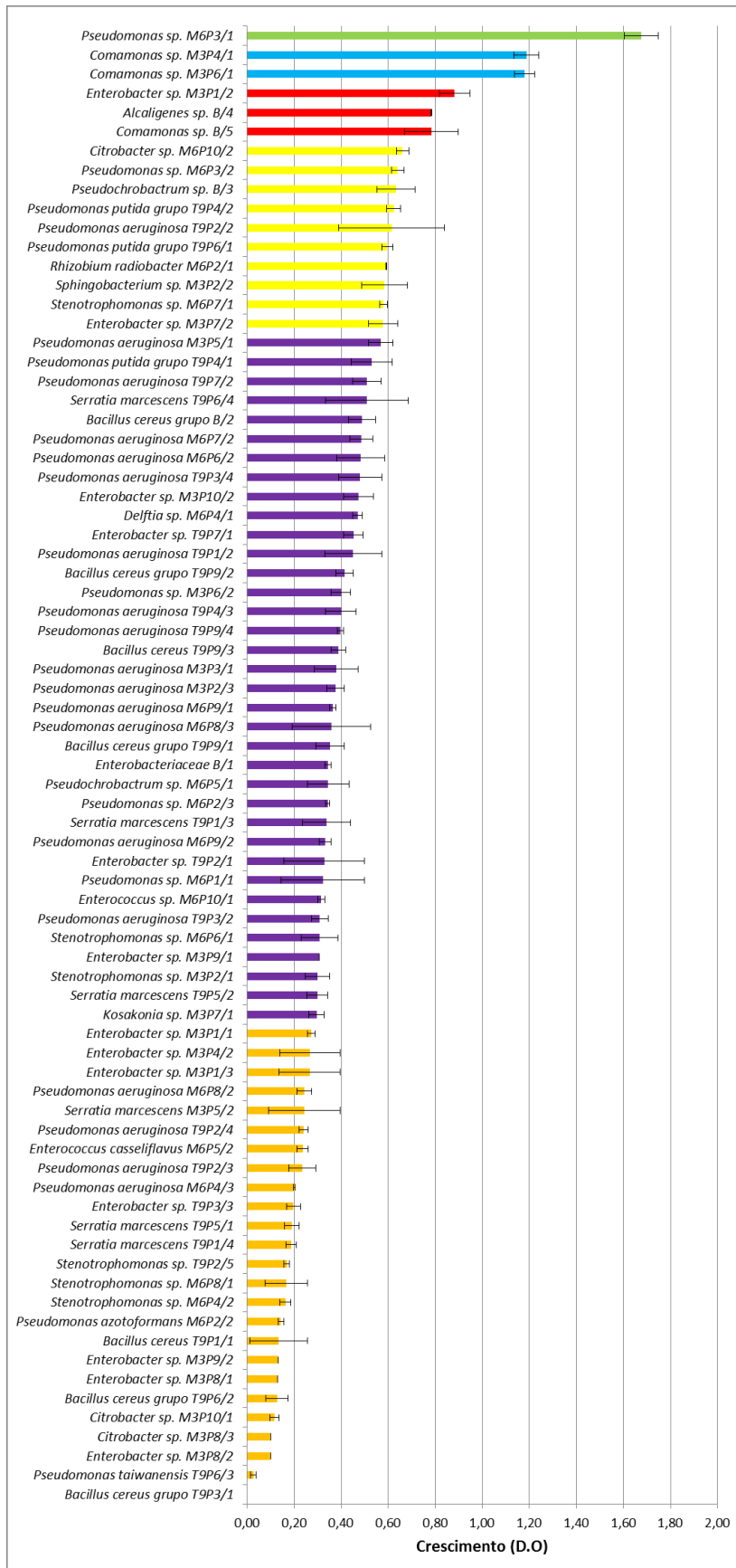


Figura 21 – Crescimento dos isolados durante o teste de degradação por meio de medidas de densidade ótica a 600 nm. Os valores de crescimento com a mesma cor não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade.

5.7. Avaliação da produção de compostos tensoativos pelas bactérias isoladas crescendo em meio de cultura com creosoto como fonte de carbono

5.7.1. Medida da atividade surfactante pela redução da tensão superficial

Os surfactantes brutos (sobrenadantes das culturas) produzidos pelos isolados diferiram significativamente em relação à redução da tensão superficial ($p < 0,05$) (Anexo 10). Os 24 isolados que mais reduziram a tensão superficial, segundo o teste de médias Scott Knott com 5% de probabilidade, alcançaram valores abaixo de 45 mN/m (Figura 22). Desses isolados, 54,2% são do gênero *Pseudomonas*, 12,5% do gênero *Enterobacter*, 8,3% dos gêneros *Serratia*, *Stenotrophomonas*, e *Bacillus* e 4,2% dos gêneros *Enterococcus* e *Sphingobacterium*. Somente quatro dos isolados que mais reduziram a tensão superficial do meio estão também entre os isolados que mais degradaram creosoto: *Enterobacter* sp. T9P7/1, *P. putida* grupo T9P6/1, *S. marcescens* T9P1/3 e *P. aeruginosa* T9P1/2, com valores de 40,04 mN/m, 41,58 mN/m, 41,86 mN/m e 42,99 mN/m, respectivamente.

O isolado que apresentou maior redução da tensão superficial foi o isolado *P. aeruginosa* T9P3/4, com valor de 37,15 mN/m. Um surfactante é considerado bom quando reduz a tensão superficial da água a valores próximos de 35 mN/m (Desai & Banat, 1997; Mulligan, 2005), próximo ao que alguns isolados alcançaram. O surfactante sintético Tween, por exemplo, na concentração de 20% (p/v) reduz a tensão superficial da água até 40 mN/m (Susilaningih et al., 2013), valor obtido por sete desses isolados. A produção de biossurfactantes foi avaliada em meio adicionado de creosoto para testar a capacidade de redução da tensão superficial em contato direto com o contaminante. Porém, Varjani e Upasani (2016) observaram variação na produção de um biossurfactante bruto pelo mesmo isolado de *P. aeruginosa* NCIM 5514, dependendo da fonte de carbono e temperatura utilizados para o crescimento da bactéria. Em glicose, a redução da tensão superficial chegou a 29,42 mN/m, maior redução do que a observada em outras fontes, como petróleo bruto (36,70 mN/m) e dodecano (48,31 mN/m). Pelo fato de a maioria dos isolados deste trabalho pertencer também ao gênero *Pseudomonas*, podendo apresentar produção de moléculas semelhantes, talvez seja possível

alcançar maior redução da tensão superficial crescendo os isolados em meio com glicose como fonte de carbono.

5.7.2. Método da atividade emulsificante

Os surfactantes brutos produzidos pelos isolados bacterianos testados diferiram estatisticamente em relação à atividade emulsificante ($p < 0,05$) (Anexo 11). Para comparar esses valores, foi utilizado o teste de médias Scott Knott com 5% de probabilidade. Na análise, o surfactante bruto de 14 isolados apresentaram as maiores atividades emulsificantes, entre 55,34% e 72,51% (Figura 23). Esses valores estão próximos aos encontrados em outros trabalhos (Bento et al., 2005; Vaz et al., 2012; Mahjoubi et al., 2013). Desses isolados, somente dois estão também entre os isolados que tiveram as maiores taxas de degradação de creosoto: *P. aeruginosa* T9P1/2 e *P. putida* grupo T9P6/1, com atividade emulsificante de 67,95% e 62,48%, respectivamente. Os dois isolados também estão entre os isolados com surfactantes brutos que mais reduziram a tensão superficial do meio de cultura, fator que deve ser considerado na escolha dos isolados para formação do consórcio para degradação de creosoto. A produção desses biossurfactantes aumenta a biodisponibilidade dos compostos hidrofóbicos, o que pode facilitar a sua degradação.

O isolado que apresentou maior atividade emulsificante foi o *Bacillus cereus* grupo T9P6/2, com o valor de 72,51%. Estudos com surfactantes brutos produzidos por isolados do gênero *Pseudomonas*, o mesmo da maioria dos nossos isolados, alcançaram valores de 50% (Sousa & Bhosle, 2012), 57% (Pornsunthorntawe et al., 2008), 86,1% (Varjani & Upasani, 2016) e 86,4% (Monteiro et al., 2007) de atividade emulsificante usando o tolueno para formação da camada emulsificante. Esses resultados indicam grande variação nos valores encontrados mesmo por surfactantes produzidos por bactérias do mesmo gênero, que tendem a produzir moléculas semelhantes. A maioria desses trabalhos obteve os melhores resultados de emulsificação crescendo os micro-organismos em glicose ou meio de cultura rico para produção do biossurfactante. A intenção do nosso trabalho foi testar a capacidade de

produção de biossurfactantes pelos micro-organismos durante o crescimento em meio adicionado do contaminante (creosoto) como fonte de carbono e dessa forma, avaliar o potencial de produção de biossurfactantes “*in situ*”, de forma que possa favorecer o processo de biorremediação e por isso, os resultados são considerados positivos. Caso seja de interesse a otimização da produção desses biossurfactantes para aplicação diretamente na área durante a remediação, esses micro-organismos podem ser crescidos em meios de cultura mais ricos e chegar a maiores valores de atividade emulsificante.

5.7.3. Precipitação do extrato bruto

A produção de compostos ativos de superfície em meio BHB adicionado de 0,5% de creosoto variou bastante entre os isolados avaliados, sendo a produção de 13,57 mg/L por *Pseudomonas putida* grupo T9P4/2 a maior produção obtida (Tabela 4). Essa produção é baixa quando comparada a produção por isolados de outros trabalhos crescendo em variadas fontes de carbono. Moussa e colaboradores (2014) encontraram os seguintes valores de produção de ramnolipídeos pelo isolado *Pseudomonas aeruginosa* TMN: 5,07 g/L (azeite), 5,00 g/L (ácido oleico), 2,90 g/L (glicose), 1,35 g/L (glicerol), 0,91 g/L (sacarose) e 0,20 g/L (hexano). Já Pacwa-Płociniczak e colaboradores (2014) determinaram a produção de ramnolipídeos pelo isolado *Pseudomonas* sp. P-1 em uma cultura com melaço de cana, que alcançou o valor de 30,23 g/L. Ibrahim e colaboradores (2013) observaram produção de lipoptídeo por *Serratia marscescens* de até 9 g/L em óleo bruto, enquanto Peng e colaboradores (2008b) encontraram produção de 0,2 g/L por *Rhodococcus* sp. TW53 crescendo em hexadecano. Porém, trabalhos avaliando a produção de compostos ativos de superfícies crescendo diretamente em creosoto não foram encontrados. O creosoto é formado principalmente por HPAs como já citado, esses compostos são conhecidos por serem resistentes à degradação ambiental devido à sua hidrofobicidade que resulta em baixa solubilidade em água. Portanto, os HPAs são tipicamente menos biodisponíveis do que outros compostos não aromáticos na mesma faixa de peso molecular (Lutsinge & Chirwa, 2018). Obayori e colaboradores (2009) observaram que o isolado

Pseudomonas sp. LP1 produziu biossurfactante em óleo de motor, alcançando E24 de até 80%, mas falhou em produzir biossurfactantes em pireno e óleo bruto. Essa biodisponibilidade menor de substrato pode explicar a produção baixa de compostos ativos de superfície. Porém, apesar da produção baixa, o resultado de atividade emulsificante de alguns isolados foi alto, principalmente dos isolados *Pseudomonas putida* grupo T9P4/2 e *Pseudomonas putida* grupo T9P6/1, que foi de 69,84% e 69,47%, respectivamente (Tabela 4). Valores mais altos do que de alguns dos trabalhos citados no tópico anterior: 50% (Sousa & Bhosle, 2012) e 57% (Pornsunthorntawee et al., 2008). Esses resultados são positivos e formas de melhorar essa produção devem ser avaliadas. Wei e colaboradores (2007) quase dobraram a produção de surfactina por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 de 1,74 g/L para 3,34 g/L somente otimizando a composição dos elementos traços adicionados ao meio de cultura (Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , e Fe^{2+}), um delineamento experimental semelhante, visando a otimização dos compostos presentes no meio de cultura utilizado para crescimento das bactérias pode ser adotado para aumentar a quantidade das moléculas produzidas pelos isolados deste trabalho.

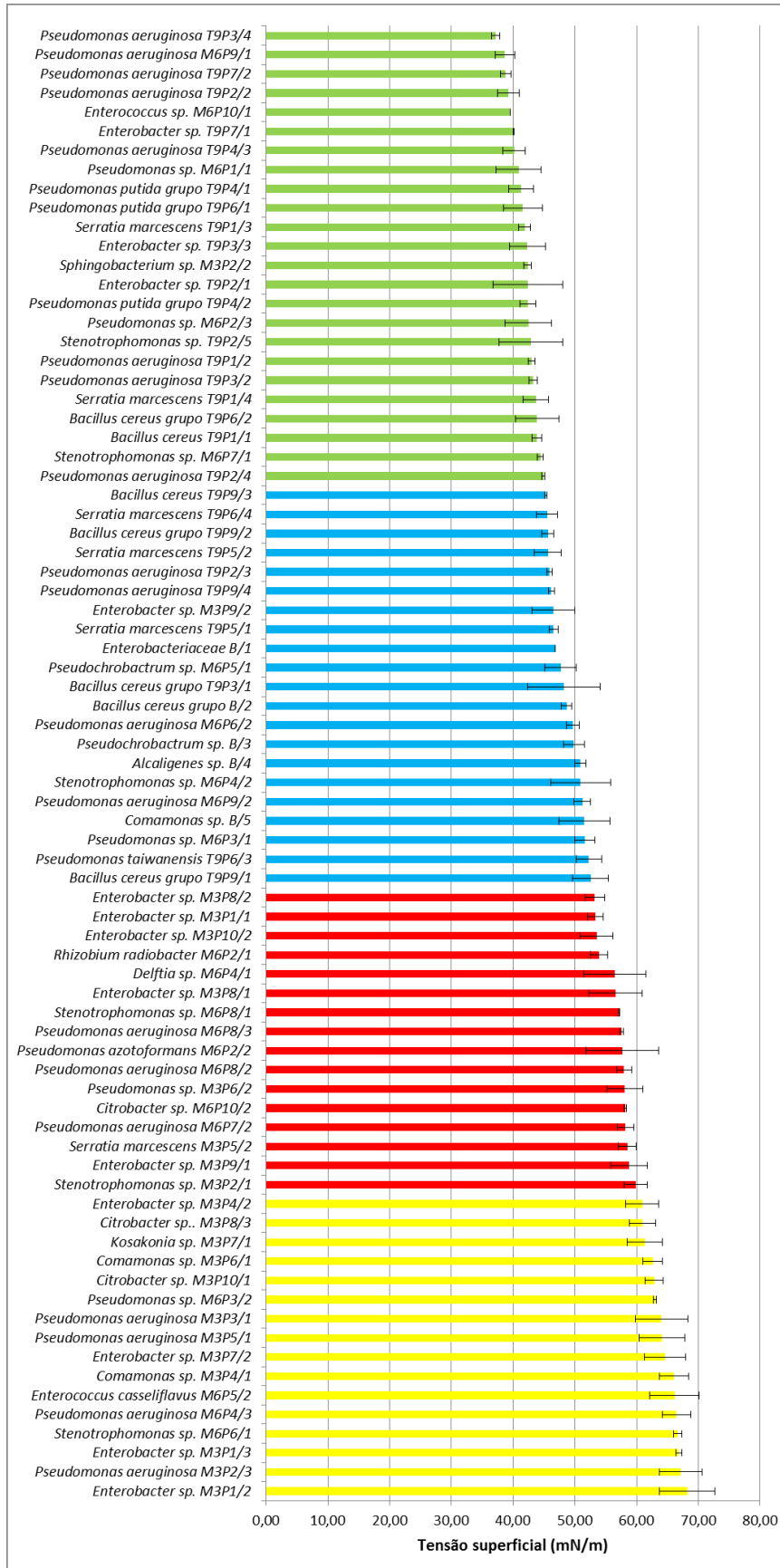


Figura 22 – Redução da tensão superficial pelos surfactantes brutos produzidos pelos isolados analisados. Os valores com a mesma cor não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade.

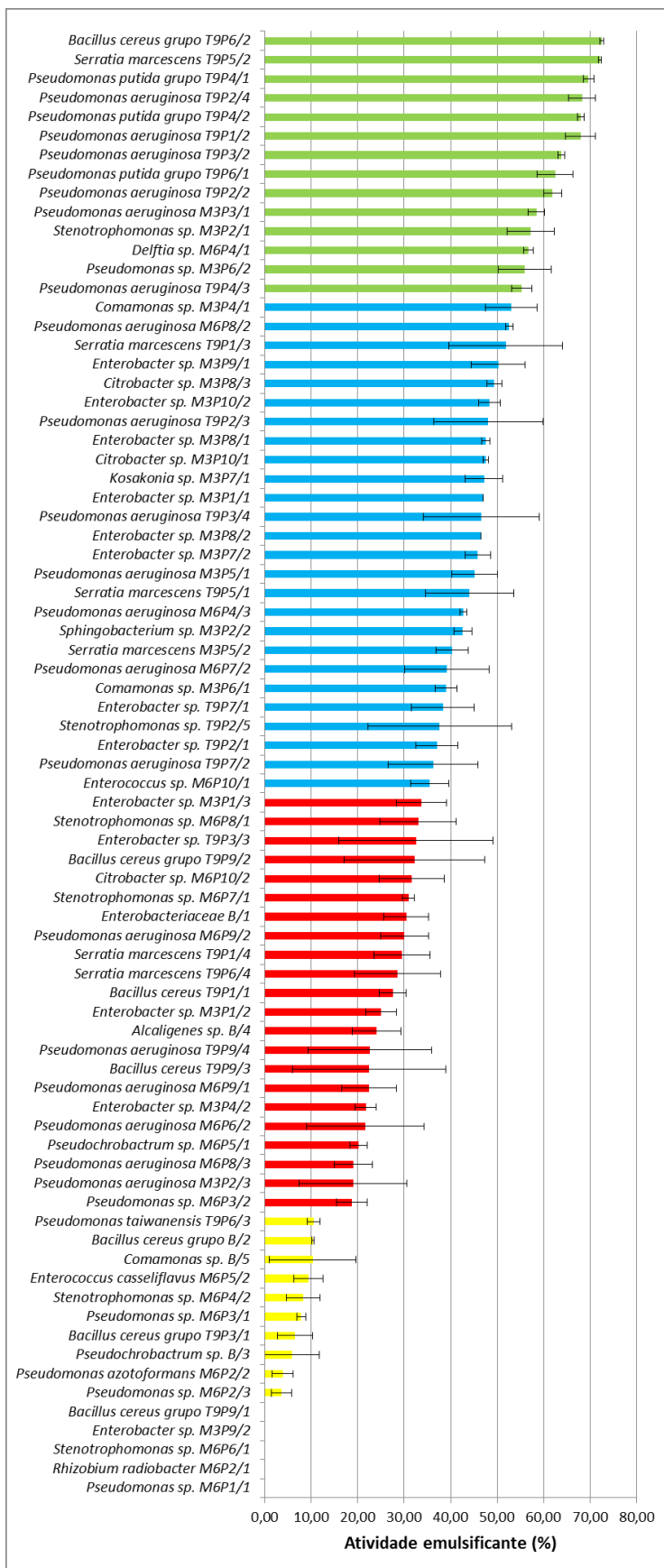


Figura 23 – Atividade emulsificante dos surfactantes brutos produzidos pelos isolados analisados. Os valores com a mesma cor não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4 – Produção de precipitado em miligramas por litro de extrato bruto e atividade emulsificante das amostras precipitadas.

Isolados	Produção (mg/L)	E24 (%)
<i>Pseudomonas putida</i> grupo T9P4/2	13,57	69,84
<i>Serratia marcescens</i> T9P1/3	6,43	61,02
<i>Enterococcus</i> sp. M6P10/1	4,29	53,02
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T9P2/4	3,93	65,15
<i>Serratia marcescens</i> T9P5/2	3,21	48,07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T9P4/3	2,14	59,75
<i>Enterobacter</i> sp. T9P7/1	1,79	59,34
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T9P3/4	1,43	52,69
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T9P7/2	1,07	32,71
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T9P1/2	0,36	29,81
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T9P3/2	0,36	40,09
<i>Pseudomonas putida</i> grupo T9P4/1	0,36	0,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T9P2/2	<0,36	0,00
<i>Pseudomonas putida</i> grupo T9P6/1	<0,36	69,47
<i>Bacillus cereus</i> grupo T9P6/2	<0,36	31,67
<i>Alcaligenes</i> sp. B/4	<0,36	0,00

5.8. Caracterização do bioemulsificante produzido pelo isolado *Pseudomonas putida* grupo T9P4/2 em meio de cultura com creosoto como fonte de carbono

5.8.1. Análise de cromatografia de camada delgada

A análise de cromatografia de camada delgada mostrou ausência de manchas relacionadas à presença de carboidratos na amostra do bioemulsificante produzido pelo isolado *Pseudomonas putida* grupo T9P4/2 (Figura 24A), enquanto a coloração rosa intensa após adição de ninidrina indicou presença de peptídeos (Figura 24B).

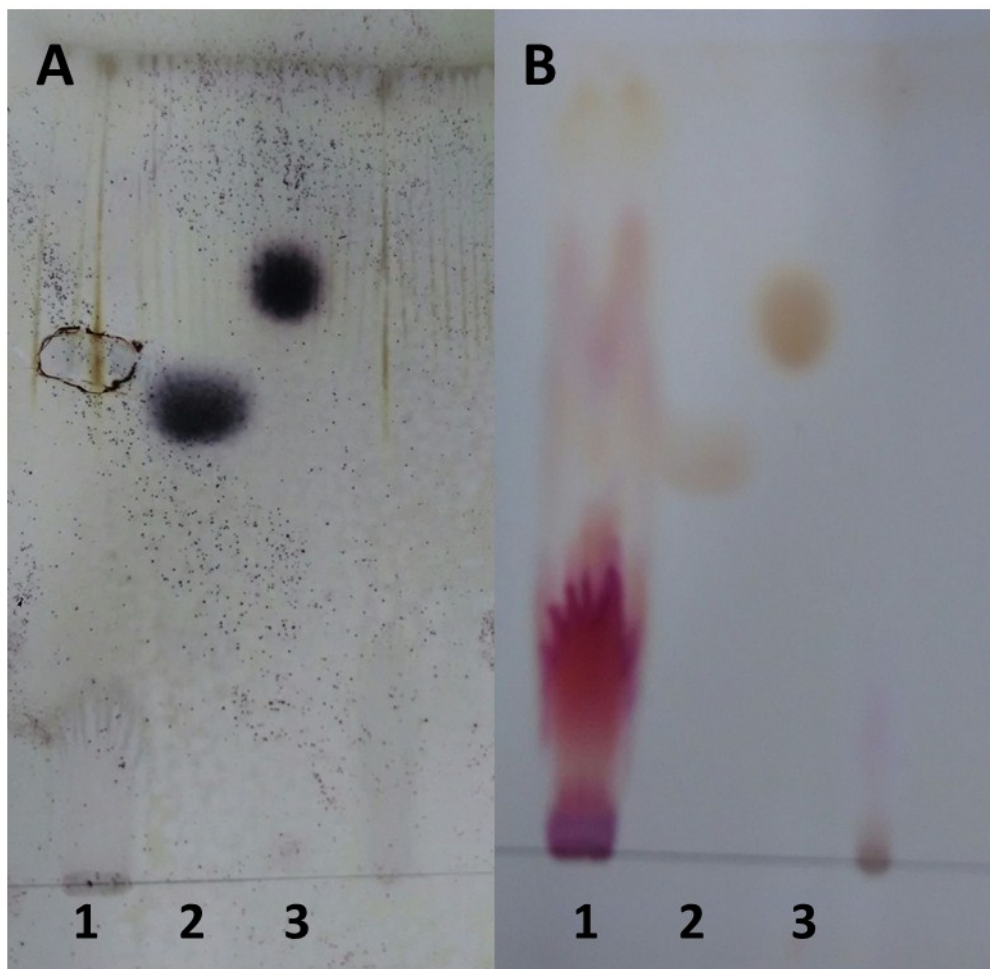


Figura 24 – Análise de cromatografia de camada delgada do bioemulsificante produzido pelo isolado *Pseudomonas putida* grupo T9P4/2. A – análise da presença de carboidratos utilizando solução reveladora ocinol; B – análise da presença de peptídeos utilizando solução reveladora ninidrina. 1 – amostra do bioemulsificante; 2 – padrão de xilose; 3 – padrão de glicose.

5.8.2. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro FTIR do bioemulsificante mostrou bandas de absorção no infravermelho em 3281 cm^{-1} (estiramento N-H), 2928 cm^{-1} (estiramento C-H em carbono sp^3), 1632 cm^{-1} (estiramento C=O de amida, banda I), 1526 cm^{-1} (deformação angular de NH de amida, banda II), 1453 cm^{-1} (deformação angular assimétrica de C-H em carbono sp^3), 1215 cm^{-1} (estiramento C-O) e 1055 cm^{-1} (estiramento C-O) (Figura 25). A banda de absorção em 3281 cm^{-1} é característica de compostos contendo carbono com ligações de grupos amino e

em 1632 cm^{-1} indica a presença de ligações peptídicas na molécula. O espectro FTIR obtido mostrou similaridades com os de lipopeptídeos cíclicos, como a surfactina, fengicina e liquenisina (Das et al., 2008b; Sivapathasekaran et al., 2009; Jha et al., 2016; Joshi et al., 2016) e padrão praticamente idêntico ao espectro obtido para um lipopeptídeo produzido por *Pseudomonas putida* MTCC 2467 (Kanna et al., 2014), espécie pertencente ao mesmo grupo do isolado analisado, o que reforça a ideia de que a molécula bioemulsificante analisada é um lipopeptídeo.



Figura 25 – Espectro no infravermelho do bioemulsificante produzido pelo isolado *Pseudomonas putida* grupo T9P4/2.

5.8.3. Cromatografia gasosa e espectrometria de massa para avaliar as moléculas presentes no bioemulsificante

O cromatograma do bioemulsificante indica a presença em maior quantidade dos ácidos hexadecanóico e octadecanóico, que são ácidos graxos (Figura 26). O ácido palmítico (ácido hexadecanóico) foi descrito como ácido graxo presente em dois lipopeptídeos biosurfactantes, descritos como pseudofactina I e II, produzidos por *Pseudomonas fluorescens* BD5 (Janek et al., 2010). Ácidos graxos de 16 e 18 carbonos, como o ácido hexadecanóico e

o ácido octadecanóico, também foram descritos como parte da molécula de dois biosurfactantes, fengicina A e liquenisina A, produzidos pelo isolado *Pseudomonas* sp. WJ6 em n-alcanos (n-dodecano) e HPAs (fluoreno e pireno), respectivamente, como fontes de carbono (Xia et al., 2014). Esses ácidos graxos também foram encontrados nos lipopeptídeos biosurfactantes produzidos por *Serratia marcescens* (Ibrahim et al., 2013) e *Rhodococcus* sp. TW53 (Peng et al., 2008b), com maior predominância do ácido octadecanóico na molécula do primeiro citado e do ácido hexadecanóico na molécula do segundo. A terceira molécula presente em maior quantidade no bioemulsificante não foi identificada por essa técnica, pois a biblioteca do equipamento não tinha a molécula em seu banco de dados.

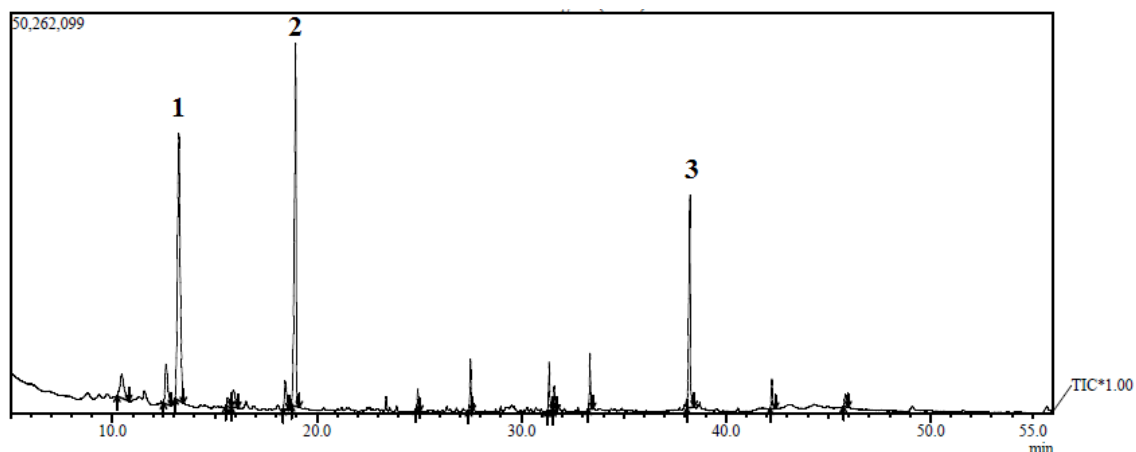


Figura 26 – Cromatograma dos ácidos graxos presentes no bioemulsificante produzido pelo isolado *Pseudomonas putida* grupo T9P4/2. 1- ácido hexadecanóico, 2- ácido octadecanóico, 3- molécula não identificada.

5.9. Biorremediação de creosoto em amostras de aquífero pelos isolados com maior potencial de degradação

Em relação a todos os isolados testados, a aeração aumentou em 12% o valor médio de degradação de creosoto, sendo considerado um fator significativo segundo o teste de médias Scott Knott com 5% de probabilidade (Anexo 12). Esse efeito foi considerado significativo nos ensaios com *Pseudomonas putida* grupo T9P6/1, em que a aeração aumentou o percentual de degradação de 15,52% para 47,66%, *Alcaligenes* sp. B/4, que aumentou de 11,10% para 33,09% e com os isolados *Pseudomonas putida* grupo R206-6 e

Achromobacter sp. R108(10-5), que não degradaram na condição não aerada, mas degradaram 20,20% e 20,11%, respectivamente, na condição aerada (Figura 27 e Anexo 13).

Na condição aerada, 7 dos 10 isolados apresentaram degradação do creosoto acima de 20%, apresentando degradação significativa comparada aos demais isolados ($p < 0,05$), segundo o teste de médias Scott Knott com 5% de probabilidade (Anexo 14) e foram essas bactérias as escolhidas para formar o consórcio degradador no experimento seguinte. Destaque para os isolados *Pseudomonas putida* grupo T9P6/1, *Stenotrophomonas* sp. R301-5 e *Alcaligenes* sp. B/4 com degradações de 47,66%, 34,24% e 33,09%, respectivamente. Já na condição não aerada, somente 3 dos 10 isolados apresentaram degradação significativa comparada aos demais isolados ($p < 0,05$), segundo o teste de médias Scott Knott com 5% de probabilidade: *Stenotrophomonas* sp. R301-5, *Pseudomonas* sp. R106-4 e *Pseudomonas putida* grupo T9P6/1 (30,33%, 22,76% e 15,52%, respectivamente) (Anexo 14).

Em relação ao crescimento na condição aerada, a densidade média dos isolados no tempo inicial foi de $1,82 \times 10^8$ UFC/mL, aumentou para $6,89 \times 10^8$ UFC/mL com 10 dias de experimento e a partir desse ponto, reduziu até o final do experimento, com 30 dias, para densidade média de $1,45 \times 10^8$ UFC/mL (Figura 28A). Na condição não aerada, a densidade média dos isolados no tempo inicial foi de $1,52 \times 10^8$ UFC/mL e reduziu até o final do experimento com valores de $4,14 \times 10^7$ UFC/mL (10 dias), $1,65 \times 10^7$ UFC/mL (20 dias) e $9,68 \times 10^6$ UFC/mL (30 dias) (Figura 28B). A média das densidades dos isolados na condição aerada foi considerada significativa comparada à condição não aerada nos dias 10, 20 e 30 ($p < 0,05$), segundo o teste de médias Scott Knott com 5% de probabilidade (Anexo 15), indicando uma influência da aeração no crescimento dos isolados.

Este resultado pode estar associado ao fato de que a biodegradação de HPAs seja favorecida pela presença de oxigênio. De fato, a etapa limitante da degradação destas moléculas é a quebra do anel benzeno, que ocorre de forma mais eficiente na presença de oxigênio pela ação de enzimas dioxigenases para formar cis-dihidrodióis. Estes di-hidrodióis são

desidrogenados para formar intermediários di-hidroxiados, que podem depois ser metabolizados através de catecóis em dióxido de carbono e água (Bamforth & Singleton, 2005). Uma grande diversidade de bactérias são capazes de oxidar HPAs usando enzimas dioxigenases, inclusive organismos dos gêneros *Pseudomonas* e *Alcaligenes*, já bem descritos (Cerniglia, 1992; Mueller et al., 1996). Acredita-se que o metabolismo anaeróbico dos HPAs ocorra por meio da hidrogenação do anel aromático. Detalhes sobre a eficiência e a escala da degradação de HPAs em ambientes anaeróbios ainda são limitados. Alguns trabalhos mostram o potencial de degradação de HPAs, principalmente naftaleno, por micro-organismos em ambientes redutores com a presença de nitrato (Bregnard et al., 1996; Moussavi & Ghorbanian, 2015; Ribeiro et al., 2018), semelhante a condição encontrada nos tratamentos sem aeração desse experimento. A utilização de nitrato como aceptor de elétrons já foi reportada para linhagens de *Pseudomonas putida* (Eberl et al., 2000; Wunsch et al., 2003), assim como a presença da enzima nitrato redutase ou dos genes que codificam essa enzima em espécies de *Alcaligenes* (Siddiqui et al., 1993; Bru et al., 2007), *Achromobacter* (Bru et al., 2007) e *Stenotrophomonas* (Crossman et al., 2008), que torna possível a degradação de compostos orgânicos e crescimento na ausência de oxigênio. Do ponto de vista aplicado, o estímulo a degradação anaeróbia de contaminantes por meio da injeção de nitrato é mais barato quando comparado a injeção de ar comprimido. Assim, esta prática não deve ser negligenciada e mais estudos sobre essas vias devem ser realizados (Haritash et al., 2009).

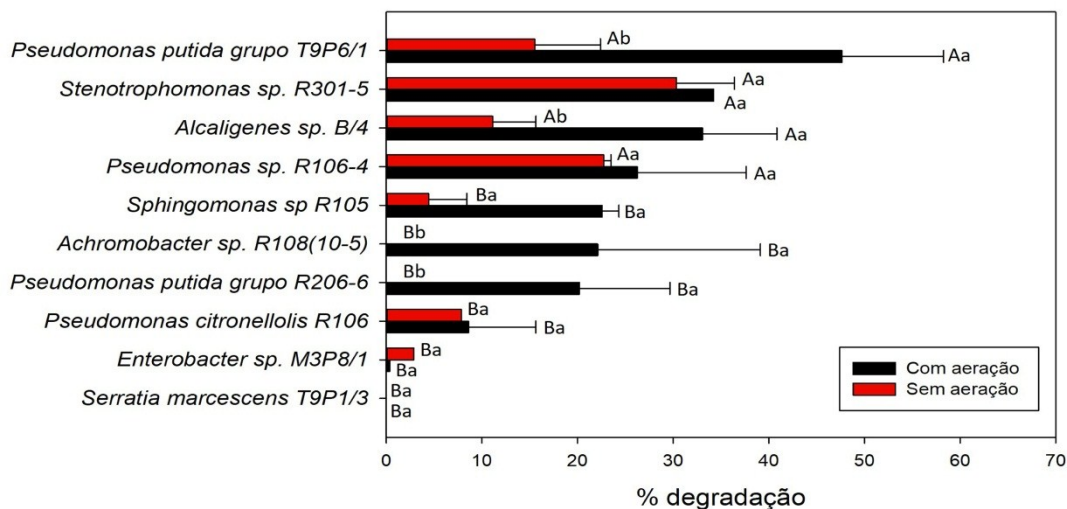


Figura 27 – Degradação de creosoto pelos 10 isolados testados nas condições com e sem aeração. Letras maiúsculas – comparação da degradação entre os isolados e letras minúsculas - comparação da degradação de cada isolado na condição aerada e não aerada.

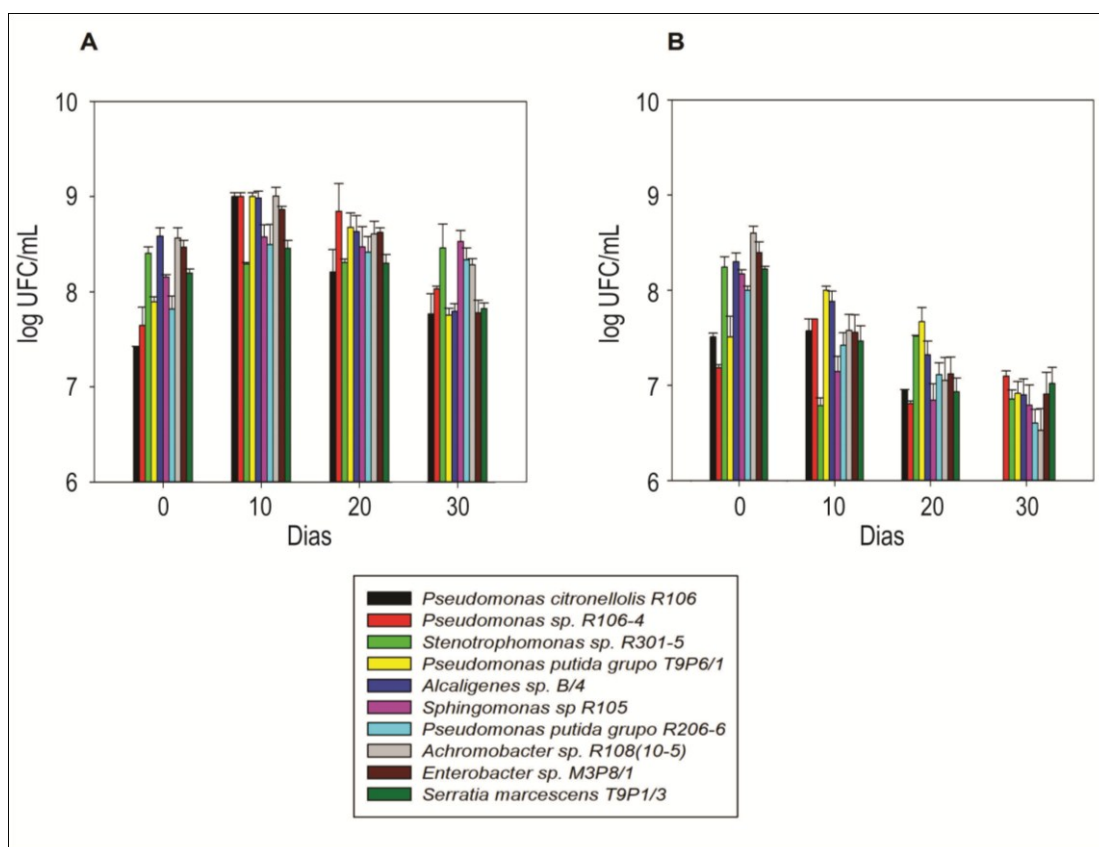


Figura 28 – Densidade dos isolados após 10, 20 e 30 dias de experimento na condição aerada (A) e não aerada (B).

5.10. Biorremediação de amostras de aquífero contaminado com creosoto por meio das técnicas de bioestimulação e bioaumentação com consórcio das bactérias isoladas com maior potencial de degradação

Foi realizado um delineamento fatorial completo 2^4 para mostrar a importância dos fatores: presença de micro-organismos autóctones, aeração, adição de nutrientes e presença do consórcio na degradação de creosoto em frascos com amostras do aquífero raso saturado da UTD. A densidade de bactérias em cada tratamento foi avaliada ao longo dos 30 dias de experimento (Figura 29). Os tratamentos com adição do consórcio estavam com média de densidade de $3,07 \times 10^8$ UFC/mL no início do experimento, mesmo nos tratamentos com presença de micro-organismos autóctones, as densidades foram próximas. Já nos tratamentos somente com a presença de micro-organismos autóctones sem adição do consórcio, a densidade média foi de $3,18 \times 10^3$ UFC/mL no início do experimento. Porém, após 10 dias de experimento, a densidade de bactérias dos tratamentos somente com micro-organismos autóctones alcançou densidade semelhante aos tratamentos com adição do consórcio, com exceção do tratamento sem aeração e nutrientes, que pouco aumentou a densidade de bactérias nesse período. Esse crescimento ocorreu, provavelmente, porque as condições nos microcosmos do experimento (matéria orgânica, aeração e nutrientes) eram mais favoráveis que aquelas presentes na amostra antes do experimento. Após 20 dias de experimento, a densidade média de bactérias desses tratamentos teve uma redução, alcançando valores médios de $6,75 \times 10^6$ UFC/mL ao final dos 30 dias de experimento.

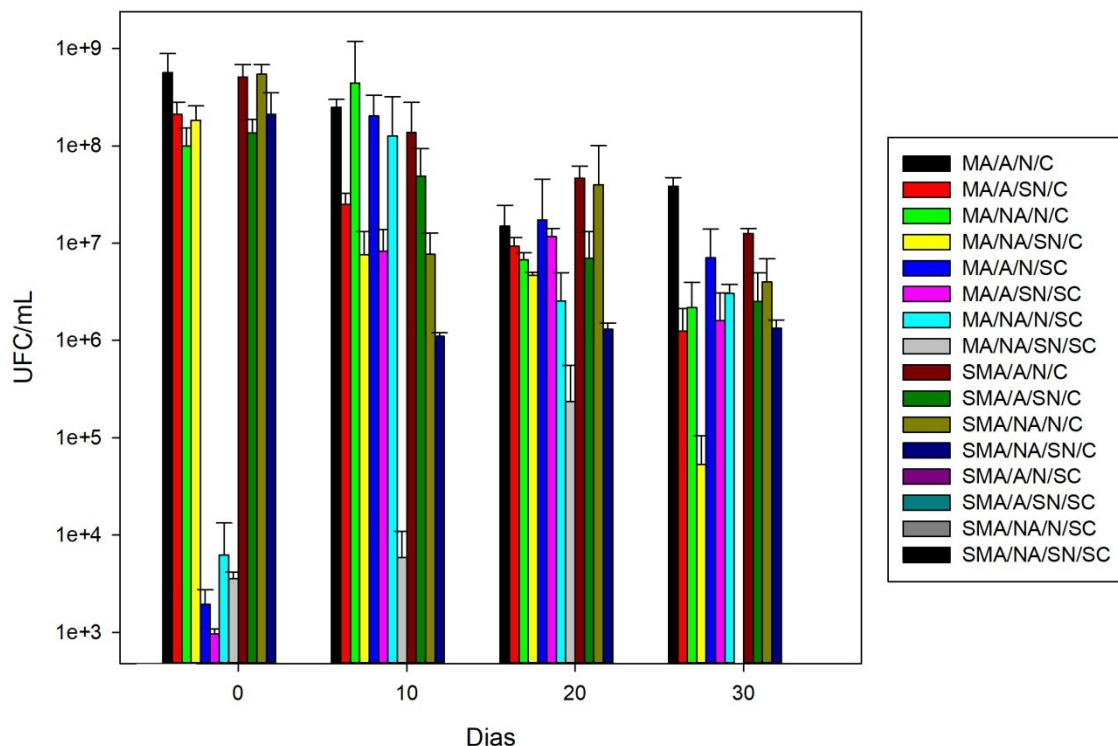


Figura 29 – Densidade de bactérias em cada tratamento realizado ao longo dos 30 dias. MA – micro-organismos autóctones ou SMA – sem micro-organismos autóctones; A – aerado ou NA – não aerado; N – nutrientes ou SN – sem nutrientes; C – consórcio ou SC – sem consórcio.

Para avaliar o efeito das variáveis testadas e de suas interações na degradação do creosoto, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) por meio do modelo linear generalizado (MLG), com teste F (significância de 5%), utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System (SAS). O modelo mais ajustado foi o observado no Anexo 16 e de modo geral, foi observado efeito das variáveis micro-organismos autóctones, aeração e consórcio ($p < 0,05$) (Anexo 16). As presenças de micro-organismos autóctones e do consórcio mostraram relação positiva com o aumento da degradação de creosoto e a ausência de aeração mostrou relação negativa com o aumento da degradação, ou seja, a presença de aeração também favoreceu a degradação de creosoto.

Os valores de degradação em função dos tratamentos podem ser visualizados na Figura 30. As médias gerais foram maiores na presença de

aeração (gráficos A e B), quando comparados aos tratamentos em ausência de aeração (gráficos C e D). Assim como a degradação na presença de micro-organismos autóctones (colunas 2 e 4 escritas presente) é maior comparada aos tratamentos sem micro-organismos autóctones (colunas 1 e 3 escritas ausente). Da mesma forma, podemos observar maior degradação nos tratamentos com a presença do consórcio (gráficos B e D) comparados aos tratamentos sem a presença do consórcio (gráficos A e C), principalmente nos tratamentos com aeração, em que os valores de degradação de creosoto foram altos mesmo na ausência micro-organismos autóctones.

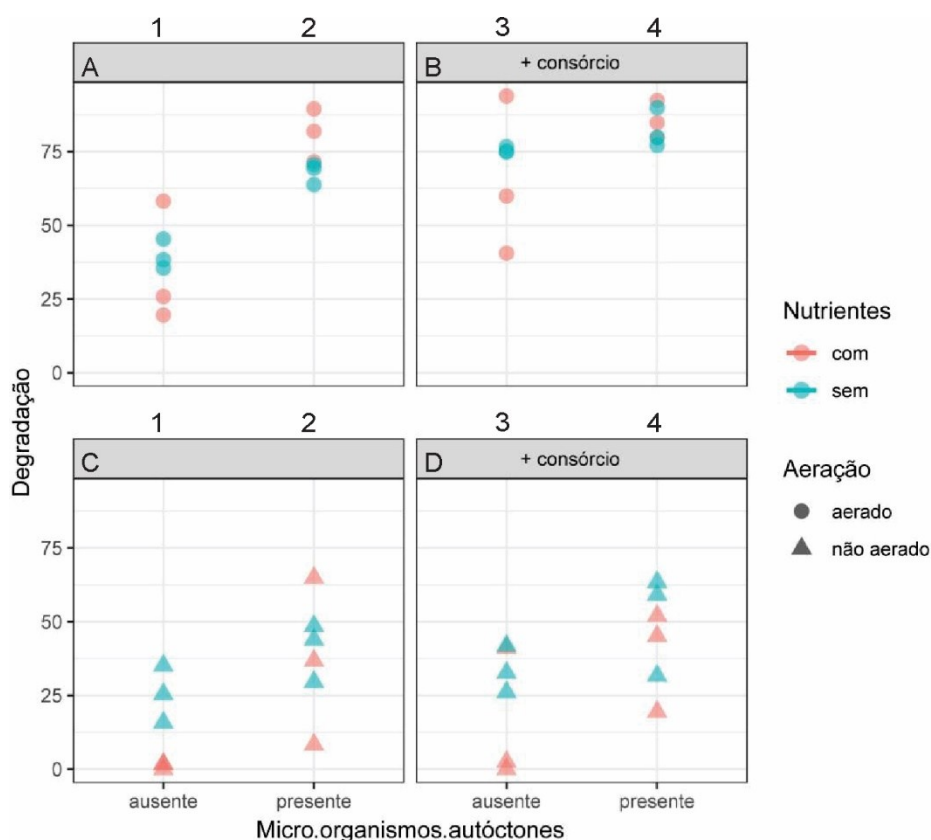


Figura 30 – Degradação de creosoto após 30 dias considerando as diferentes variáveis combinadas nos tratamentos.

As condições de cada tratamento e a variável resposta para cada um deles estão ilustradas na Tabela 5. A degradação de creosoto na condição com a presença de micro-organismos autóctones, aerada, com nutrientes e na presença do consórcio (bioestimulação + bioaugmentação – Tratamento 1) alcançou 85,64% de média, a maior entre todos os tratamentos testados

(Figura 31). No entanto, a combinação de somente algumas variáveis também resultaram em altas taxas de degradação, correspondendo a 80,98% naquele com bioestimulação (micro-organismos autóctones + aeração + nutrientes – Tratamento 2) e 75,55% naquele com bioaumentação (consórcio) e aeração (Tratamento 11). Esses valores são maiores do que o encontrado em outros trabalhos de degradação de creosoto ou HPAs utilizando consórcios de bactérias. Mao e colaboradores (2012) observaram taxas de degradação correspondentes a 13,1% e 28,7% do solo contaminado com HPAs quando os mesmos foram adicionados de 10% e 20% de inóculo do consórcio, respectivamente. Bezza & Chirwa (2016) observaram remoção máxima de 79% dos HPAs depois de 25 dias no tratamento em que utilizaram a adição do inóculo do consórcio de bactérias degradadoras e biosurfactantes. Esses trabalhos avaliaram a degradação em amostras de solo, experimentos de degradação de creosoto em amostras de um aquífero não foram encontrados.

Em relação aos HPAs, a amostra original de creosoto adicionada aos frascos do experimento possuía 9 dos 16 HPAs considerados prioritários pela US-EPA em grande concentração: fenantreno (1759,05 µg/mL), naftaleno (1133,39 µg/mL), fluoranteno (832,59 µg/mL), acenafteno (740,66 µg/mL), fluoreno (626,35 µg/mL), pireno (491,17 µg/mL), antraceno (170,57 µg/mL), benz[a]antraceno (145,20 µg/mL) e criseno (91,49 µg/mL). A degradação dos 3 últimos não pôde ser analisada pelo limite de detecção do aparelho. O tratamento 1, que uniu as técnicas de bioestimulação e bioaumentação reduziu a concentração desses HPAs para: 472,05 µg/mL de fenantreno (degradação de 73,2%), 339,03 µg/mL de fluoranteno (degradação de 59,3%), 91,95 µg/mL de acenafteno (degradação de 87,6%), 113,38 µg/mL de fluoreno (degradação de 81,9%) e 213,13 µg/mL de pireno (degradação de 56,6%). A quantidade de naftaleno não foi detectada pelo aparelho nas condições utilizadas, provavelmente sua degradação foi próxima de 100%. A porcentagem de degradação dos HPAs foi inversamente proporcional a complexidade do composto, sendo o naftaleno (composto de 2 anéis aromáticos) o composto mais degradado, seguido pelo acenafteno (composto de 2 anéis aromáticos), fluoreno (composto de 2 anéis aromáticos) e fenantreno (composto de 3 anéis

aromáticos), enquanto os compostos menos degradados foram o fluoranteno e o pireno (compostos de 4 anéis aromáticos).

Tabela 5 – Degradação de creosoto após 30 dias por diferentes tratamentos em um delineamento 2⁴.

Tratamentos	Fatores				Variável resposta	
	Micro-organismos autóctones (MA)	Aeração (A)	Nutrientes (N)	Consórcio (C)	Média	Desvio padrão
1	+	+	+	+	85,64	6,31
2	+	+	+	-	80,98	8,99
3	+	+	-	+	82,27	6,72
4	+	+	-	-	67,90	3,63
5	+	-	+	+	38,87	17,16
6	+	-	+	-	36,68	28,28
7	+	-	-	+	51,40	17,24
8	+	-	-	-	40,67	9,87
9	-	+	+	+	64,77	26,97
10	-	+	+	-	34,54	20,72
11	-	+	-	+	75,55	0,97
12	-	+	-	-	39,74	5,07
13	-	-	+	+	14,54	13,64
14	-	-	+	-	1,08	1,01
15	-	-	-	+	33,52	7,92
16	-	-	-	-	25,45	13,66

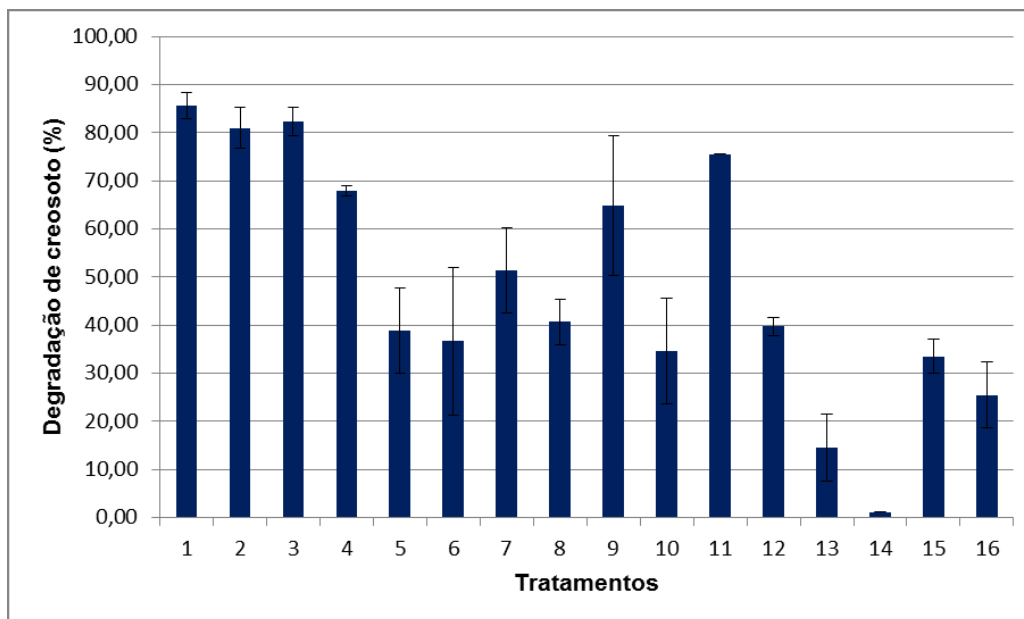


Figura 31 – Porcentagem média de degradação de creosoto para cada tratamento de biorremediação após 30 dias.

Estes resultados reforçam a possibilidade de bioestimulação utilizando os micro-organismos autóctones presentes na área em estudo e indicam a aeração como fator mais relevante para essa bioestimulação *in situ*, ao invés da adição de nutrientes. Os resultados também mostram que o consórcio pode ser usado para incrementar o processo de biorremediação *in situ*, já que a presença deste elevou as porcentagens de degradação de creosoto, assim como indicam um caminho para a utilização desse consórcio em processos de biorremediação *in situ* deste tipo, pois sugerem uma importância da aeração para os micro-organismos presentes no consórcio, assim como a relevância deste consórcio para tratar locais contaminados com pouca quantidade de micro-organismos autóctones presentes. O que foi observado indica que não existe uma recomendação única, e que mais de uma combinação de fatores pode ser utilizada na biorremediação *in situ*, dependendo da viabilidade financeira e da estrutura presente na área.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou como a diferença de quantidade de COV e COSV presentes em cada poço amostrado afeta a estrutura da comunidade bacteriana e também como o processo de enriquecimento foi eficaz em modificar essa estrutura inicial, provavelmente favorecendo as bactérias degradadoras de creosoto, análises pouco encontradas na literatura para amostras de aquífero. Algumas das bactérias isoladas apresentaram um bom potencial de degradação individual desse composto, alcançando até 33% de degradação.

Além disso, alguns desses isolados apresentaram potencial de produção de compostos ativos de superfície crescendo em creosoto como única fonte de carbono. A molécula produzida pelo isolado *Pseudomonas putida* grupo T9P4/2 mostrou grande potencial bioemulsificante e foi caracterizada como um lipopeptídeo, esse potencial também pode ser explorado em experimentos de biorremediação futuros.

A utilização em conjunto das técnicas de bioestimulação, com aeração e adição de nutrientes, e de bioaugmentação, utilizando um consórcio formado pelos isolados que mais degradaram creosoto individualmente, foi o tratamento mais eficaz na degradação de creosoto em amostras de aquífero reduzindo em 86% a quantidade desse composto, um resultado relevante para a biorremediação de uma área contaminada com creosoto.

Apesar disso, o tratamento somente com bioestimulação e o tratamento somente com bioaugmentação em ambiente aerado também alcançaram resultados próximos de degradação de creosoto, o que indica que não há uma recomendação única na combinação desses fatores para biorremediação *in situ* do aquífero contaminado com creosoto da amostra utilizada no experimento e essa escolha deve ser realizada levando em conta a viabilidade financeira e a estrutura presente na área. As presenças do consórcio, dos micro-organismos autóctones e da aeração foram os fatores considerados significativos durante o processo e são aqueles que devem ser considerados num futuro experimento de biorremediação nessa área.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERCRON, M.V.; PACHECO, D.; BENITO-SANTANO, P.; MARÍN, P.; MARQUÉS, S. Polycyclic aromatic hydrocarbon-induced changes in bacterial community structure under anoxic nitrate reducing conditions. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1775, 2016.
- AKBAR, S.; SULTAN, S.; KERTESZ, M. Bacterial community analysis in chlorpyrifos enrichment cultures via DGGE and use of bacterial consortium for CP biodegradation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, p. 2755–2766, 2014.
- ALEXANDER, M. How toxic are toxic chemicals in soil? *Environmental Science & Technology*, v. 29, p. 2713–2717, 1995.
- ALEXANDER, M. *Introduction to soil microbiology*. John Wiley and Sons, New York, 1977.
- ALFREIDER, A.; VOGT, C. Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 183, n. 1-4, p. 415-426, 2007
- ALTSCHUL, S.F. GAPPED BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuclei Acids Research*, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDERSON, R.T.; LOVLEY, D.R. Ecology and biogeochemistry of in situ groundwater remediation. *Advances in Microbial Ecology*, v. 15, p. 289–350, 1997.
- ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M.A.; NOCERINO, G.; BERNASCONI, S.; DELL_AMICO, E.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere*, v. 57, p. 401–412, 2004.
- ANHALT, J.P.; FENSELAU, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 47, n. 2, p. 219-225, 1975.
- ANNESER, B.; PILLONI, G.; BAYER, A.; LUEDERS, T.; GRIEBLER, C.; EINSIEDL, F.; RICHTERS, L. High resolution analysis of contaminated aquifer sediments and groundwater • What can be learned in terms of natural attenuation? *Geomicrobiology Journal*, v. 27, p. 130–142, 2010.
- ANNWEILER, E.; RICHNOW, H.H.; ANTRANIKIAN, G.; HEBENBROCK, S.; GARMS, C.; FRANKE, S.; FRANCKE, W.; MICHAELIS, W. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 518–523, 2000.

- ANVISA. O15 - Óleo Creosoto. Disponível em:
<<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/i>>. Acesso em: 10 de dezembro de 2013.
- ANVISA, AGROTÓXICOS - GUIA nº12, versão 1, de 19 de janeiro de 2018. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/4016300/GUIA++Elabora%C3%A7%C3%A3o+de+R%C3%B3tulo+e+Bula+-+vers%C3%A3o+28-9-2017+DIARE.pdf/85a0fb5f-a18b-478c-b6ea-e6ae58d9202a?version=1.0>. Acesso em: 31 de outubro de 2018.
- ATAGANA, H.I. Biodegradation of phenol, o-cresol, m-cresol and p-cresol by indigenous soil fungi in soil contaminated with creosote. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 20, p. 851–858, 2004.
- ATAGANA, H. I.; HAYNES, R. J.; WALLIS, F. M. Fungal bioremediation of creosote contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 172, p. 201-219, 2006.
- BACOSA, H.P.; INOUE, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation potential and diversity of microbial consortia enriched from tsunami sediments in Miyagi, Japan. *Journal of Hazardous Materials*, v. 283, p. 689–697, 2015.
- BAKERMANS, C.; HOHNSTOCK-ASHE, A.M.; PADMANABHAN, S.; PADMANABHAN, P.; MADSEN, E.L. Geochemical and physiological evidence for mixed aerobic and anaerobic field biodegradation of coal tar waste by subsurface microbial communities. *Microbial Ecology*, v. 44, p. 107–117, 2002.
- 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.
- BAMFORTH, S.M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 80, p. 723–736, 2005.
- BASHA, K.M.; RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Recent advances in the Biodegradation of Phenol: A review. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, v. 1, n. 2, p. 219-234, 2010.
- BAUER, R.D.; MALOSZEWSKI, P.; ZHANG, Y.C.; MECKENSTOCK, R.U.; GRIEBLER, C. Mixing-controlled biodegradation in a toluene plume - Results from two-dimensional laboratory experiments. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 96, p. 150–168, 2008.
- BAUTISTA, L.F.; SANZ, R.; MOLINA, M.C.; GONZÁLEZ, N.; SÁNCHEZ D. Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 63, p. 913–922, 2009.

BECHER, D.; SPECHT, M.; HAMMER, E.; FRANCKE, W.; SCHAUER, F. Cometabolic degradation of dibenzofuran by biphenyl-cultivated *Ralstonia* sp. strain SBUG 290. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 4528–4531, 2000.

BENAGLI, C.; ROSSI, V.; DOLINA, M.; TONOLLA, M.; PETRINI, O. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Clinically Relevant Bacteria. *PLoS ONE*, v. 6, n.1, e16424, 2011.

BENEDIK, M.J.; GIBBS, P.R.; RIDDLE, R.R.; WILLSON, R.C. Microbial denitrogenation of fossil fuels. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 390–395, 1998.

BENNETT, J. W.; CONNICK, W. J.; DAIGLE, JR. D.; WUNCH, K. Fungi in bioremediation. Formulation of fungi for in situ bioremediation. Cambridge University Press, 935 p., 2001.

BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O.; OKEKEB, B.C.; FRANKENBERGER JR, W.T. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological Research*, v. 160, p. 249-255, 2005.

BERGERON, M.G.; BOISSINOT, M.; HULETSKY, A.; MENARD, C.; OUELLETTE, M.; PICARD, F.J.; ROY, P.H. Highly conserved tuf genes and their use to generate probes and primers for detection of coagulase-negative *Staphylococcus*. U.S. Patent n. 10,047,404, 14 ago. 2018.

BETANCUR-GALVIS, L.A.; ALVAREZ-BERNAL, D.; RAMOS-VALDIVIA, A.C.; DENDOOVEN, L. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline–alkaline soils of the former Lake Texcoco. *Chemosphere*, v. 62, p. 1749–1760, 2006.

BEZZA, F.A.; CHIRWA, E.M.N. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere*, v. 144, p. 635–644, 2016.

BEZZA, F.A.; CHIRWA, E.M.N. The role of lipopeptide biosurfactant on microbial remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil. *Chemical Engineering Journal*, v. 309, p. 563-576, 2017.

BINET, P.; PORTAL, J.M.; LEYVAL, C. Dissipation of 3–6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 32, p. 2011–2017, 2000.

BISOGNIN, R. P. Análise do potencial microbiano de uma biopilha na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos. 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2012.

BOGAN, B.W.; SCHOENIKE, B.; LAMAR, R.T.; CULLEN, D. Expression of lip genes during growth in soil and oxidation of anthracene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 3697–3703, 1996.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, v. 74 p. 63-67, 2000.

BORGHETTI, N.R.B.; BORGHETTI, J.R.; DA ROSA FILHO, E.F. Aquífero Guarani: a verdadeira integração dos países do Mercosul. Ed. dos Autores, 2004.

BRACK, W.; KLAMER, H.J.; LOPEZ DE ALDA, M.; BARCELO, D. Effect-directed analysis of key toxicants in European river basins a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 14, p. 30–38, 2007.

BRANDT, J.; NIELSEN, P.H.; ALBERTSEN, M. A need for standardization in drinking water analysis—an investigation of DNA extraction procedure, primer choice and detection limit of 16S rRNA amplicon sequencing. In: 11th Annual meeting in Danish Water Forum. 2017.

BREEDVELD, G.D.; SPARREVIK, M. Nutrient-limited biodegradation of PAH in various soil strata at a creosote contaminated site. *Biodegradation*, v. 11, p. 391–399, 2000.

BREGNARD, T.P.A.; HÖHENER, P.; HÄNER, A.; ZEYER, J. Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 15, n. 3, p. 299-307, 1996.

BREZNA, B.; KWEON, O.; STINGLEY, R.L.; FREEMAN, J.P.; KHAN, A.A.; POLEK, B.; JONES, R.C.; CERNIGLIA, C.E. Molecular characterization of cytochrome P450 genes in the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 11, p. 1–11, 2005.

BRIONES, A. Estimating microbial population counts by “most probable number” using Microsoft Excell. *Journal of Microbiological Methods*, v. 32, p. 272-280, 1999.

BRU, D.; SARR, A.; PHILIPPOT, L. Relative abundances of proteobacterial membrane-bound and periplasmic nitrate reductases in selected environments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, n. 18, p. 5971-5974, 2007.

CAJTHAML, T.; PACAKOVA, V.; SASEK, V. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemicke Listy*, v. 95, p. 404, 2001.

CAMERON, D.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Applied Environmental Microbiology*, v. 54, p. 1420-1422, 1988.

CASTALDI, F.J.; FORD, D.L. Slurry bioremediation of petrochemical waste sludges. *Water Science and Technology*, v. 25, n.3, p. 207-212, 1992.

CÉBRON, A.; BEGUIRISTAIN, T.; BONGOUA-DEVISME, J.; DENONFOUX, J.; FAURE, P.; LORGEUX, C.; ... LEYVAL, C. Impact of clay mineral, wood sawdust or root organic matter on the bacterial and fungal community structures in two aged PAH-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 18, p. 13724-13738, 2015.

CÉBRON, A.; NORINI, M.P.; BEGUIRISTAIN, T.; LEYVAL, C. Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD *alpha*) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, v. 73, p. 148-159, 2008.

CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, v. 3, p. 351-368, 1992.

CERNIGLIA, C.E. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in Applied Microbiology*, v. 30, p. 31-71, 1984.

CETESB. Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. Relatório de estabelecimento de valores orientados para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo, 2001. Disponível em: < <http://www.ambientenet.eng.br/TEXTOS/ORIENTADOR.PDF> >. Acesso em: 18 nov. 2014.

CHAKRABARTY, A.M. Dissociation of a Degradative Plasmid Aggregate in *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology*, v. 118, n. 3, p. 815-820, 1974.

CHANG, B.V.; CHANG, I.T.; YUAN, S.Y. Anaerobic degradation of phenanthrene and pyrene in mangrove sediment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 80, p. 145-149, 2008.

CHAUDHARY, P.; SAHAY, H.; SHARMA, R.; PANDEY, A.K.; SINGH, S.B.; SAXENA, A.K.; NAIN, L. Identification and analysis of polyaromatic hydrocarbons (PAHs)—biodegrading bacterial strains from refinery soil of India. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 187: 391, 2015.

CHEN, M.; XU, P.; ZENG, G.; YANG, C.; HUANG, D.; ZHANG, J. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 6, p. 745-755, 2015.

CHIKERE, C.B.; CHIKERE, B.O.; OKPOKWASILI, G.C. Bioreactor-based bioremediation of hydrocarbon-polluted Niger Delta marine sediment, Nigeria. 3 Biotech, v. 2, p. 53–66, 2012.

CHRISTENSEN, T.H.; BJERG, P.L.; BANWART, S.A.; JAKOBSEN, R.; HERON, G.; ALBRECHTSEN, H.J. Characterization of redox conditions in groundwater contaminant plumes. Journal of Contaminant Hydrology, v. 45, p. 165–241, 2000.

COLE, J.R.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; WANG, Q.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; ... TIEDJE, J.M. The ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality controlled public data. Nucleic Acids Research, v. 35, n. suppl_1, p. D169-D172, 2007.

CROSSMAN, L.C.; GOULD, V.C.; DOW, J.M.; VERNIKOS, G.S.; OKAZAKI, A.; SEBAIHIA, M.; ... ADLEM, E. (2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. Genome Biology, v. 9, n. 4, p. R74, 2008.

DAGLEY, S. Catabolism of aromatic compounds by micro-organisms. Advances in Microbial Physiology, v. 6, p. 1-46, 1971.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. Chemosphere, v. 72, p. 1229–1234, 2008a.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. Journal of Applied Microbiology, v. 104, n. 6, p. 1675-1684, 2008b.

DEAN-ROSS, D.; MOODY, J.D.; FREEMAN, J.P.; DOERGE, D.R.; CERNIGLIA, C.E. Metabolism of anthracene by a *Rhodococcus* species. FEMS Microbiology Letters, v. 204, p. 205–211, 2001.

DENEF, V.J. Biodegradation of organic anthropogenic pollutants by *Burkholderia* species. In *Burkholderia: Molecular Microbiology and Genomics*. COENYE, T.; VANDAMME, P. (eds). Wymondham, Norfolk: Horizon Bioscience, p. 177–201, 2007.

DESAI, J.D., BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 61, p. 47–64, 1997.

DESANTIS, T.Z.; HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E.L.; KELLER, K.; ... ANDERSEN, G.L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA

gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 7, p. 5069-5072, 2006.

DEVERYSHETTY, J.; PHALE, P.S. Biodegradation of phenanthrene by *Alcaligenes* sp. strain PPH: partial purification and characterization of 1-hydroxy-2-naphthoic acid hydroxylase. *FEMS Microbiology Letters*, v. 311, p. 93–101, 2010.

DIXIT, R.; MALAVIYA, D.; PANDIYAN, K.; SINGH, U.; SAHU, A.; SHUKLA, R.; ... PAUL, D. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: an overview of principles and criteria of fundamental processes. *Sustainability*, v. 7, n. 2, p. 2189-2212, 2015.

EBERL, L.; AMMENDOLA, A.; ROTHBALLER, M.H.; GIVSKOV, M.; STERNBERG, C.; KILSTRUP, M.; ... MOLIN, S. Inactivation of *gltB* abolishes expression of the assimilatory nitrate reductase gene (*nasB*) in *Pseudomonas putida* KT2442. *Journal of Bacteriology*, v. 182, n. 12, p. 3368-3376, 2000.

ELOMARI, M.; COROLER, L.; VERHILLE, S.; IZARD, D.; LECLERC, H. *Pseudomonas monteilii* sp. nov., Isolated from Clinical Specimens. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, v. 47, n.3, p. 846-852, 1997.

ERIKSSON, M.; SODERSTEN, E.; YU, Z.; DALHAMMAR, G.; MOHN, W.W. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 1, p. 275–284, 2003.

EVANS, W.C.; FERNLEY, H.N.; GRIFFITHS, E. Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism. *Biochemical Journal*, v. 95, p. 819-831, 1965.

FAVA, F.; BERSELLI, S.; CONTE, P.; PICCOLO, A.; MARCHETTI, L. Effects of humic substances and soya lecithin on the aerobic bioremediation of a soil historically contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Biotechnology and Bioengineering*, v. 88, n. 2, p. 214-223, 2004.

FAVA, F.; DI GIOIA, D.; MARCHETTI, L. Role of the reactor configuration in the biological detoxification of a dump site-polychlorobiphenyl-contaminated soil in lab slurry phase conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, n. 2, p. 243-248, 2000.

FORTNAGEL, P.; HARMS, H.; WITTICH, R.M.; KROHN, S.; MEYER, H.; SINNWELL, V.; WILKES, H.; FRANCKE, W. Metabolism of Dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. Strain HH69 and the Mixed Culture HH27. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, n. 4, p. 1148–1156, 1990.

FUENMAYOR, S.L.; WILD, M.; BOYES, A.L.; WILLIAMS, P.A. A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. *Journal of Bacteriology*, v. 180, p. 2522-2530, 1998.

FUKS, G.; ELGART, M.; AMIR, A.; ZEISEL, A.; TURNBAUGH, P.J.; SOEN, Y.; SHENTAL, N. Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome*, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2018.

FULLER, M.E.; MANNING, J.F. Microbiological changes during bioremediation of explosives-contaminated soils in laboratory and pilot-scale bioslurry reactors. *Bioresource Technology*, v. 91, n. 2, p. 123-133, 2004.

FUSE, H.; TAKIMURA, O.; MURAKAMI, K.; INOUE, H.; YAMAOKA, Y. Degradation of chlorinated biphenyl, dibenzofuran, and dibenzo-*p*-dioxin by marine bacteria that degrade biphenyl, carbazole, or dibenzofuran. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 67, p. 1121–1125, 2003.

GAO, D.; TAO, Y. Current molecular biologic techniques for characterizing environmental microbial community. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, v. 6, n. 1, p. 82–97, 2012.

GENTHNER, B.R.S.; TOWNSEND, G.T.; LANTZ, S.E.; MUELLER, J.G. Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote under anaerobic enrichment conditions. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 32, p. 99–105, 1997.

GHALY, A. E.; ZHANG, B.; DAVE, D. Degradation of phenolic compounds in creosote treated wood waste by a mixed microbial culture augmented with cellulolytic-thermophilic actinomycetes *Thermobifida fusca*. *Journal of Environmental Protection*, v. 3, p. 83-96, 2012.

GIBSON, D.T.; SUBRAMANIAN, V. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Gibson, D.T. (Ed.). *Microbial degradation of organic compounds*. New York: Marcel Dekker, 1984, p. 181–252.

GIRVAN, M.S.; BULLIMORE, J.; PRETTY, J.N.; OSBORN, A.M.; BALL, A.S. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 1800-1809, 2003.

GOMILA, M.; PEÑA, A.; MULET, M.; LALUCAT, J.; GARCÍA-VALDÉS, E. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 214, 2015.

GONZÁLEZ, N.; SIMARRO, R.; MOLINA, M.C.; BAUTISTA, L.F.; DELGADO, L.; VILLA, J.A. Effect of surfactants on PAH biodegradation by a bacterial consortium and on the dynamics of the bacterial community during the process. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 20, p. 9438-9446, 2011.

GOYAL, A.K.; ZYLSTRA, G.J. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GE39. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 230–236, 1996.

GUERIN, T. F. Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ landtreatment. *Journal of Hazardous Materials* v. 65, p. 305–315, 1999.

GUETING, N.; KLOTZSCHE, A.; VAN DER KRUK, J.; VANDERBORGHT, J.; VEREECKEN, H.; ENGLERT, A. Imaging and characterization of facies heterogeneity in an alluvial aquifer using GPR full-waveform inversion and cone penetration tests. *Journal of Hydrology*, v. 524, p. 680-695, 2015.

GUPTA, N.; ROYCHOUDHURY, P.K.; DEB, J.K. Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, p. 356–366, 2005.

HABE, H.; OMORI, T. Genetic of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 67, p. 225–243, 2003.

HAMMER, E.; KROWAS, D.; SCHÄFER, A.; SPECHT, M.; FRANCKE, W.; SCHAUER, F. Isolation and characterization of a dibenzofuran-degrading yeast: identification of oxidation and ring cleavage products. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 2215–2219, 1998.

HARITASH, A.K.; KAUSHIK, C.P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, v. 169, p. 1–15, 2009.

HARTNIK, T.; NORLI, H. R.; EGGEN, T.; BREEDVELD, G. D. Bioassay-directed identification of toxic organic compounds in creosote-contaminated groundwater. *Chemosphere*, v. 66, n.3, p. 435-443, 2007.

HATZINGER, P.B.; ALEXANDER, M. Effect of aging on chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science & Technology*, v. 29, p. 537–545, 1995.

HEITKAMP, M.A.; CERNIGLIA, C.E. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, p. 1612–1614, 1988.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. p. 353-373, 1997.

HILLENKAMP, F.; KARAS, M. [12] Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. In: *Methods in enzymology*. Academic Press, 1990. p. 280-295.

HILYARD, E.J.; JONES-MEEHAN, J.M.; SPARGO, B.J.; HILL, R.T. Enrichment, Isolation, and Phylogenetic Identification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-

Degrading Bacteria from Elizabeth River Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 4, p. 1176–1182, 2008.

HOFRICHTER, M.; SCHNEIBNER, K.; SCHNEEGAB, I.; FRITZCHE, W. Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 399–404, 1998.

HONG, H.B.; NAM, I.H.; MURUGESAN, K.; KIM, Y.M.; CHANG, Y.S. Biodegradation of dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran, and chlorodibenzo-p-dioxins by *Pseudomonas veronii* PH-03. *Biodegradation*, v. 15, p. 303–313, 2004.

HOTE, S. V.; BHOYAR, S. P. Heterocyclic compound – a review. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, p. 43-46, 2014.

HOUGHTON, J.E.; SHANLEY, M.S. Catabolic potential of pseudomonads: A regulatory perspective. In: CHAUDHRY, G.R. (Ed.). *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals*. London: Chapman & Hall, 1994, p.11-32.

HUANG, X.; SHI, J.; CUI, C.; YIN, H.; ZHANG, R.; MA, X.; ZHANG, X. Biodegradation of Phenanthrene by *Rhizobium petrolearium* SL-1. *Journal of Applied Microbiology*, v. 121, n. 6, p. 1616–1626, 2016.

HUNTER, R.D.; EKUNWE, S.I.; DODOR, D.E.; HWANG, H.M.; EKUNWE, L. *Bacillus subtilis* is a potential degrader of pyrene and benzo[a]pyrene. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 2, n. 2, p. 267-271, 2005.

HULING, S.G.; WEAVER, J.W. Dense nonaqueous phase liquids. Superfund Technology Support Center for Ground Water, Robert S. Kerr Environmental Research Laboratory, 1991.

IBRAHIM, M.L.; IJAH, U.J.J., MANGA, S.B., BILBIS, L.S., UMAR, S. Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 81, p. 28-34, 2013.

IGUCHI, A.; NAGAYA, Y.; PRADEL, E.; OOKA, T.; OGURA, Y.; KATSURA, K.; KUROKAWA, K.; OSHIMA, K.; HATTORI, M.; PARKHILL, J.; SEBAIHIA, M.; COULTHURST, S.J.; GOTOH, N.; THOMSON, N.R.; EWBANK, J.J.; HAYASHI, T. Genome Evolution and Plasticity of *Serratia marcescens*, an Important Multidrug-Resistant Nosocomial Pathogen. *Genome Biology and Evolution*, v.6, p. 2096–2110, 2014.

JACQUES, R.J.S.; BENTO, F.M.; ANTONIOLLI, Z.I.; CAMARGO; F.A.O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, v. 37, p. 1192-1201, 2007.

JACQUES, R.J.S.; SANTOS, E.C.; BENTO, F.M.; PERALBA, M.C.R.; SELBACH, P.A.; SÁ, E.L.S.; CAMARGO, F.A.O. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 56, p. 143–150, 2005.

JAISWAL, P.K.; KOHLI, S.; GOPAL, M.; THAKUR, I.S. Isolation and characterization of alkalotolerant *Pseudomonas* sp. strain ISTDF1 for degradation of dibenzofuran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 38, p. 503–511, 2011.

JANBANDHU, A.; FULEKAR, M.H. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 187, p. 333–340, 2011.

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 9, p. 2761-2764, 2007.

JANEK, T.; ŁUKASZEWICZ, M.; KRASOWSKA, A. Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 110, p. 379-386, 2013.

JANEK, T.; ŁUKASZEWICZ, M.; REZANKA, T.; KRASOWSKA, A. Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 15, p. 6118-6123, 2010.

JANKOWSKY, I.P. Os creosotos na preservação de madeiras. *IPEF*, n. 34, p. 5-14, 1986

JEON, C.O.; PARK, W.; PADMANABHAN, P.; DERITO, C.; SNAPE, J.R.; MADSEN, E.L. Discovery of a bacterium, with distinctive dioxygenase, that is responsible for *in situ* biodegradation in contaminated sediment. *PNAS*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, p. 13591–13596, 2003.

JEFFREY, A.M.; YEH, H.J.; JERINA, D.M.; PATEL, T.R.; DAVEY, J.F.; GIBSON, D.T. Initial reactions in the oxidation of naphthalene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry*, v. 14, p. 575-584, 1975.

JERINA, D.M.; SELANDER, H.; YAGI, H.; WELLS, M.C.; DAVEY, J.F.; MAHADEVAN, V.; GIBSON, D.T. Dihydrodiols from anthracene and phenanthrene. *Journal of the American Chemical Society*, v. 98, n. 19, p. 5988–5996, 1976.

JEWELL, T.N.M.; KARAOZ, U.; BRODIE, E.L.; WILLIAMS, K.H.; BELLER, H.R. Metatranscriptomic evidence of pervasive and diverse chemolithoautotrophy

relevant to C, S, N and Fe cycling in a shallow alluvial aquifer. *The ISME Journal*, v. 10, n. 9, p. 2106-2117, 2016.

JHA, S.S.; JOSHI, S.J.; GEETHA, S.J. Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 4, p. 955-964, 2016.

JOHNSON, D.L.; JONES, K.C.; LANGDON, C.J.; PEARCE, T.G.; SEMPLE, K.T. Temporal changes in earthworm availability and extractability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 34, p. 1363–1370, 2002.

JOSHI, S.J.; AL-WAHAIBI, Y.M.; AL-BAHRY, S.N.; ELSHAFIE, A.E.; AL-BEMANI, A.S.; AL-BAHRI, A.; AL-MANDHARI, M.S. Production, characterization, and application of *Bacillus licheniformis* W16 biosurfactant in enhancing oil recovery. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 1853, 2016.

JUHASZ, A.L.; BRITZ, M.L.; STANLEY, G.A. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 83, p. 189-198, 1997.

KAKIRDE, K. S.; PARSLEY, L. C.; LILES, M. R. Size does matter: Application-driven approaches for soil metagenomics. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 42, p. 1911-1923, 2010.

KALF, D.F.; CROMMENTUIJN, T. Environment quality objectives for 10 polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 36, p. 89–97, 1997.

KALMBACH, S.; MANZ, W.; SZEWZYK, U. Isolation of new bacterial species from drinking water biofilms and proof of their in situ dominance with highly specific 16 S rRNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, p. 4164-4170, 1997.

KANALY, R.A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 182, p. 2059–2067, 2000.

KANNA, R.; GUMMADI, S.N.; KUMAR, G.S. Production and characterization of biosurfactant by *Pseudomonas putida* MTCC 2467. *Journal of Biological Sciences*, v. 14, n. 6, p. 436-445, 2014.

KEITER, S.; GRUND, S.; VAN BAVEL, B.; HAGBERG, J.; ENGWALL, M.; KAMMANN, U. et al. Activities and identification of aryl hydrocarbon receptor agonists in sediments from the Danube river. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 390, p. 2009–2019, 2008.

KENNA, D.T.; FULLER, A.; MARTIN, K.; PERRY, C.; PIKE, R.; BURNS, P.J.; ... LOGAN, J.M. *rpoB* gene sequencing highlights the prevalence of an *E. miricola* cluster over other *Elizabethkingia* species among UK cystic fibrosis patients. *Diagnostic microbiology and Infectious Disease*, v. 90, n. 2, p. 109-114, 2018.

KHAN, A.A.; WANG, R.-F.; CAO, W.-W.; DOERGE, D.R.; WENNERSTROM, D.; CERNIGLIA, C.E. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 8, p. 3577-3585, 2001.

KHAN, F.I.; HUSAIN, T.; HEJAZI, R. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*, v. 71, p. 95-122, 2004.

KILBANE, J.J. II; DARAM, A.; ABBASIAN, J.; KAYSER, K.J. Isolation and characterization of *Sphingomonas* sp. GTIN11 capable of carbazole metabolism in petroleum. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 297, p. 242-248, 2002.

KIM, M.; OH, H.S.; PARK, S.C.; CHUN, J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 64, n. 2, p. 346-351, 2014.

KIM, S.J.; KWEON, O.; JONES, R.C.; FREEMAN, J.P.; EDMONDSON, R.D.; CERNIGLIA, C.E. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. *Journal of Bacteriology*, v. 189, p. 464-472, 2007.

KIM, T.J.; LEE, E.Y.; KIM, Y.J.; CHO, K.S.; RYU, H.W. Degradation of polyaromatic hydrocarbons by *Burkholderia cepacia* 2A-12. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 19, p. 411-417, 2003b.

KIM, Y.H.; ENGESESSER, K.H.; CERNIGLIA, C.E. Two polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone reductases from a pyrene-degrading *Mycobacterium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 416, p. 209-217, 2003a.

KIMURA, N.; KITAGAWA, W.; MORI, T.; NAKASHIMA, N.; TAMURA, T.; KAMAGATA, Y. Genetic and biochemical characterization of the dioxygenase involved in lateral dioxygenation of dibenzofuran from *Rhodococcus opacus* strain SAO101. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 73, p. 474-484, 2006.

KIRK, J.L.; BEAUDETTE, L.A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J.N.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, v. 58, p. 169-188, 2004.

KIRK, T.K.; FARRELL, R.L. Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, v. 41, n. 1, p. 465-501, 1987.

KIYOHARA, H.; NAGAO, K.; NOMI, R. Degradation of phenanthrene through o-phthalate by an *Aeromonas* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 40, n. 6, p. 1075-1082, 1976.

KIYOHARA, H.; NAGAO, K. The catabolism of phenanthrene and naphthalene by Bacteria. *Journal of General Microbiology*, v. 105, p. 69-75, 1978.

KOHLER, M.; KUNNIGER, T.; SCHMID, P.; GUJER, E.; CROCKETT, R.; WOLFENBERGER, M. Inventory and emission factors of creosote, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), and phenols from railroad ties treated with creosote. *Environmental Science & Technology*, v. 34, p. 4766-4772, 2000.

KONSTANTINIDIS, K.T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J.M. The bacterial species definition in the genomic era. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 361, n. 1475, p. 1929-1940, 2006.

KULIK, N.; GOI, A.; TRAPIDO, M.; TUHKANEN, T. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, v. 78, p. 382-391, 2006.

KUMAR, A.; BISHT, B.S.; JOSHI, V.D.; DHEWA, T. Review on bioremediation of polluted environment: a management tool. *International Journal of Environmental Sciences*, v. 1, n. 6, p. 1079-1093, 2011.

KUSHMARO, A.; SIBONI, N.; SHAPIRO, O.H.; BEM-DOVI, E. Advantage of using inosine at the 3' termini of 16S rRNA gene universal primers for the study of microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, p. 6902-6906, 2006.

KUWATSUKA, S.; IGARASHI, M. Degradation of PCP in soils. *Soil Science & Plant Nutrition*, v. 21, p. 405-414, 1975.

LA DUC, M.T.; SATOMI, M.; AGATA, N.; VENKATESWARAN, K. *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. *Journal of Microbiological Methods*, v. 56, n. 3, p. 383-394, 2004.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. (Eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: John Wiley & Sons, 1991, p. 115-147.

LARSSON, M.; LAM, M. M.; VAN HEES, P.; GIESY, J.P.; ENGWALL, M. Occurrence and leachability of polycyclic aromatic compounds in contaminated

soils: Chemical and Bioanalytical Characterization. *Science of the Total Environment*, v. 622, p. 1476-1484, 2018.

LIANG, L.; SONG, X.; KONG, J.; SHEN, C.; HUANG, T.; HU, Z. Anaerobic biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a facultative anaerobe *Pseudomonas* sp. JP1. *Biodegradation*, v. 25, n. 6, p. 825-833, 2014.

LIEN, P.J.; YANG, Z.H.; CHANG, Y.M.; TU, Y.T.; KAO, C.M. Enhanced bioremediation of TCE-contaminated groundwater with coexistence of fuel oil: effectiveness and mechanism study. *Chemical Engineering Journal*, v. 289, p. 525-536, 2016.

LI, F.L.; XU, P.; FENG, J.; MENG, L.; ZHENG, Y.; LUO, L.; MA, C. Microbial desulfurization of gasoline in a *Mycobacterium goodii* X7B immobilized-cell system. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 1, p. 276-281, 2005.

LI, F.L.; XU, P.; MA, C.Q.; LUO, L.L.; WANG, X.S. Deep desulfurization of hydrodesulfurization-treated diesel oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium* sp. X7B. *FEMS Microbiology Letters*, v. 223, p. 301-307, 2003.

LI, L.; XU, P.; BLANKESPOOR, H. D. Degradation of carbazole in the presence of non-aqueous phase liquids by *Pseudomonas* sp. *Biotechnology letters*, v. 26, n. 7, p. 581-584, 2004.

LICHT, D.; JOHANSEN, S.S.; ARVIN, E.; AHRING, B.K. Transformation of indole and quinoline by *Desulfobacterium indolicum* (DSM 3383). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 47, p. 167-172, 1997.

LLOYD-JONES, G.; LAURIE, A.D.; HUNTER, D.W.F.; FRASER R. Analysis of catabolic genes for naphthalene and phenanthrene degradation in contaminated New Zealand soils. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 29, p. 69-79, 1999.

LORS, C.; RYNGAERT, A.; PÉRIÉ, F.; DIELS, L.; DAMIDOT, D. Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. *Chemosphere*, v. 81, p. 1263-1271, 2010.

LOZUPONE, C.A.; KNIGHT, R. Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 27, p. 11436-11440, 2007.

LUTSINGE, T.B.; CHIRWA, E.M.N. Biosurfactant-Assisted Biodegradation of Fluoranthene in a Two-Stage Continuous Stirred Tank Bio-Reactor System using Microorganism. *CHEMICAL ENGINEERING*, v. 64, 2018.

LU, X.Y.; ZHANG, T.; FANG, H.H.P. Bacteria-mediated PAH degradation in soil and sediment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 89, p. 1357–1371, 2011.

MACDONALD, R.; BRÖZEL, V. S. Community analysis of bacterial biofilms in a simulated recirculating cooling-water system by fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Water Research*, v. 34, n. 9, p. 2439-2446, 2000.

MAHJOUBI, M.; JAOUANI, A.; GUESMI, A.; AMOR, S.B.; JOUINI, A.; CHERIF, H.; NAJJARI, A. BOUDABOUS, A. KOUBAA, N.; CHERIF, A. Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *New Biotechnology*, v. 30, n. 6, p. 723-733, 2013.

MAJOLAGBE, A.O.; ADEYI, A. A.; OSIBANJO, O.; ADAMS, A. O.; OJURI, O. O. Pollution vulnerability and health risk assessment of groundwater around an engineering Landfill in Lagos, Nigeria. *Chemistry International*, v. 3, n. 1, p. 58-68, 2017.

MAKKAR, R.S.; ROCKNE, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 22, n. 10, p. 2280–2292, 2003.

MANGWANI, N.; SHUKLA, S.K.; KUMARI, S.; RAO, T.S.; DAS, S. Characterization of *Stenotrophomonas acidaminiphila* NCW-702 biofilm for implication in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Applied Microbiology*, v. 117, p. 1012-1024, 2014.

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

MATEUS, E.P.; SILVA, M.D.R.G.; RIBEIRO, A.B.; MARRIOTT, P.J. Qualitative mass spectrometric analysis of the volatile fraction of creosote-treated railway wood sleepers by using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1178, p. 215–222, 2008.

MA, Y.; WANG, L.; SHAO, Z. *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer. *Environmental Microbiology*, v. 8, n. 3, 455–465, 2006.

MCALLISTER, K.A.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Microbial degradation of pentachlorophenol. *Biodegradation*, v. 7, p. 1-40, 1996.

MCDONALD, I.R.; KÄMPFER, P.; TOPP, E.; WARNER, K.L.; COX, M.J.; HANCOCK, T.L.C.; ... HARPER, D.B. *Aminobacter ciceronei* sp. nov. and *Aminobacter lissarensis* sp. nov., isolated from various terrestrial environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 55, n. 5, p. 1827-1832, 2005.

MCKEW, B.A; COULON, F.; OSBOURN, A.M.; TIMMIS, K.N.; MCGENITY, T.J. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary. *Environmental Microbiology*, v. 9, n.1, p. 165-176, 2007.

MCNALLY, D.L.; MIHELICIC, J.R.; LUEKING, D.R. Biodegradation of three- and four- ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions. *Environmental Science & Technology*, v. 32, p. 2633–2639, 1998.

MECKENSTOCK, R.U.; ELSNER, M.; GRIEBLER, C.; LUEDERS, T.; STUMPP, C.; AAMAND, J.; ... BOON, N. Biodegradation: updating the concepts of control for microbial cleanup in contaminated aquifers. *Environmental Science & Technology*, v. 49, p. 7073-7081, 2015.

MÉNARD, A.; BUISSONNIÈRE, A.; PROUZET-MAULÉON, V.; SIFRÉ, E.; MÉGRAUD, F. The GyrA encoded gene: a pertinent marker for the phylogenetic revision of *Helicobacter* genus. *Systematic and applied microbiology*, v. 39, n. 2, p. 77-87, 2016.

MESQUITA, A.C. Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns componentes recalcitrantes. 2004. 171 f. Tese (Doutorado em Ciências e Engenharia Civil) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004.

MESTER, T.; TIEN, M. Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 46, p. 51-59, 2000.

MICHLOWICZ, E.; ZWOLIŃSKA, B. Reverse logistics systems in a steel mill a full production cycle. In: *Conference Proceedings of 19th International Metallurgical and Materials Conference METAL 2010*. Ostrava: TANGER, p. 1163-1168, 2011.

MOCALI, S.; BENEDETTI, A. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, v. 161, p. 497-505, 2010.

MOLINA, M.; ARAUJO, R.; HODSON, R.E. Cross-induction of pyrene and phenanthrene in a *Mycobacterium* sp. isolated from polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated river sediments. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 45, p. 520-529, 1999.

MOLINA, M.C.; GONZÁLEZ, N.; BAUTISTA, L.F.; SANZ, R. SIMARRO, R.; SÁNCHEZ, I.; SANZ, J.L. Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from a microbial consortium. *Biodegradation*, v. 20, p. 789–800, 2009.

MOLNÁR, M.; GRUIZ, K.; HALÁSZ, M. Integrated methodology to evaluate bioremediation potential of creosote-contaminated soils. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, v. 51, n. 1, p. 23-32, 2007.

MOODY, J.D.; FREEMAN, J.P.; DOERGE, D.R.; CERNIGLIA, C.E. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 1476-1483, 2001.

MONTEIRO, S.A.; SASSAKI, G.L.; SOUZA, L.M.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; RAMOS, L.P.; KRIEGER, N. Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 147, p. 1–13, 2007.

MONTICELLO, D.J. Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, p. 540–546, 2000.

MORET, S.; PURCARO, G.; CONTE, L.S. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) content of soil and olives collected in areas contaminated with creosote released from old railway ties. *Science of the Total Environment*, v. 386, p. 1–8, 2007.

MOUSSA, T.A.A.; MOHAMED, M.S.; SAMAK, N. Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 31, n. 4, p. 867-880, 2014.

MOUSSAVI, G.; GHORBANIAN, M. The biodegradation of petroleum hydrocarbons in an upflow sludge-blanket/fixed-film hybrid bioreactor under nitrate-reducing conditions: Performance evaluation and microbial identification. *Chemical Engineering Journal*, v. 280, p. 121-131, 2015.

MROZIK, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; LABUZEK, S. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*, v. 12, n. 1, p. 15-25, 2003.

MUELLER, J.G.; CERNIGLIA, C.E.; PRITCHARD, P.H. Bioremediation of environments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Crawford, R. L.; Crawford, D. L. (Eds.). *Bioremediation: Principles and Applications*. Cambridge: Cambridge University Press, 1996, p. 125–194.

MUELLER, J.G.; CHAPMAN, P.J.; PRITEHARD. P.H. Creosote-conminated sites: Their potential for bioremediation. *Environmental Science & Technology*, v. 23, n. 10, p. 1197-1201, 1989.

MÜLLER, F.K.Z.B.P.; SEDLÁČKOVÁ, M.K.I. Contamination of soils and groundwater by petroleum hydrocarbons and volatile organic compounds—Case study: ELSLAV BRNO. *Bulletin of Geosciences*, v. 78, n. 3, p. 225-239, 2003.

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, v. 133, p. 183–198, 2005.

MUKHERJEE, P.; ROY, P. Genomic Potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in Bioremediation with an Assessment of Its Multifaceted Role in Our Environment. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, art. 967, 2016.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; ULTTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16s rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, v. 2, p. 317–322, 1999.

MUYZER, G.; HOTTENTRAGER, S.; TESKE, A.; WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA—a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. In: AKKERMANS, A.D.L.; VAN ELSAS, J.D.; DE BRUIJN, F.J. (Eds.). *Molecular microbial ecology manual*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, p. 1–23.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 73, p. 127–141, 1998.

MUYZER, G.; WAAL, E. C. Determination of the genetic diversity of microbial communities using DGGE analysis of PCR amplified 16S rRNA. *NATO ASI Series*, v. G35, p. 207–214, 1994.

MYERS, R. M.; FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, v. 13, p. 3131-3145, 1985.

NAYAK, A.S.; VEERANAGOUDA, Y.; LEE, K.; KAREGOUDAR, T.B. Metabolism of acenaphthylene via 1,2-dihydroxynaphthalene and catechol by *Stenotrophomonas* sp. RMSK. *Biodegradation*, v. 20, p. 837-843, 2009.

NEILSON, A.H.; ALLARD, A.S. Microbial metabolism of PAHs and heteroarenes. In: NEILSON, A.H. (Ed.). *The handbook of environmental chemistry*. Berlin: Springer-Verlag, 1998, p. 1-64.

NEVALAINEN, I.; KOSTYL, E.; NURMIAHO-LASSILA, E.L.; PUHAKKA, J.A.; SALKINOJA-SALONEN, M.S. Dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol by a nitrifying biofilm. *Water Research*, p. 27, p. 757-767, 1993.

NOCKER, A.; BURR, M.; CAMPER, A. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microbial Ecology*, v. 54, p. 276-289, 2007.

NOJIRI, H.; NAM, J.W.; KOSAKA, M.; MORII, K.I.; TAKEMURA, T.; FURIHATA, K.; YAMANE, H.; OMORI T. Diverse oxygenation catalyzed by carbazole 1,9a-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain CA10. *Journal of Bacteriology*, v. 181, p. 3105–3113, 1999.

NUNAN, N.; WU, K.; YOUNG, I.M.; CRAWFORD, J.W.; RITZ, K. In situ spatial patterns of soil bacterial populations, mapped at multiple scales, in an arable soil. *Microbial Ecology*, v. 44, p. 296-305, 2002.

OBAYORI, O.S.; ILORI, M.O.; ADEBUSOYE, S.A.; OYETIBO, G.O.; OMOTAYO, A.E.; AMUND, O.O. Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. strain LP1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 25, n. 9, p. 1615-1623, 2009.

OKADA, H.; NOMURA, N.; NAKAHARA, T.; MARUHASHI, K. Analysis of dibenzothiophene metabolic pathway in *Mycobacterium* strain G3. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 93, p. 491–497, 2002.

OKERE, U. V.; SEMPLE, K. T. Biodegradation of PAHs in 'pristine' soils from different climatic regions. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, v. 1, n. 2, 2012.

OLLIVIER, B., MAGOT, M. *Petroleum Microbiology*. Washington D.C., USA, ASM Press, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Coal tar creosote. Coincise International Chemical Assessment Document 62. Geneva; 2004.

O'SULLIVAN, L.A.; MAHENTHIRALINGAM, E. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 41, p. 8–11, 2005.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, p. 633-654, 2011.

PACWA-PŁOCINICZAK, M.; PŁAZA, G.A.; POLIWODA, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 15, p. 9385-9395, 2014.

PANDEY, A.K.; CHAUDHARY, P.; SINGH, S.B.; ARORA, A.; KUMAR, K.; CHAUDHARY, S.; NAIN, L. Deciphering the traits associated with PAH degradation by a novel *Serratia marcescens* L-11 strain. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 47, p. 755-765, 2012.

PASIKANTI, K.K.; HO, P.C.; CHAN, E.C.Y. Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry metabonomic platform for the global profiling of urinary metabolites. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, v. 22, n. 19, p. 2984-2992, 2008.

PATEL, J.B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*, v. 6, n. 4, p. 313-321, 2001.

PATEL, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry*, v. 61, n. 1, p. 100-111, 2015.

PATHAK, H.; KANTHARIA, D.; MALPANI, A.; MADAMWAR, D. Naphthalene degradation by *Pseudomonas* sp. HOB1: In vitro studies and assessment of naphthalene degradation efficiency in simulated microcosms. *Journal of Hazardous Materials*, v. 166, p. 1466–1473, 2009.

PAUL, D.; PANDEY, G.; PANDEY, J.; JAIN, R. K. Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. *TRENDS in Biotechnology*, v. 23, n.3, p. 135-142, 2005.

PENG, F.; WANG, Y.; SUN, F.; LIU, Z.; LAI, Q.; SHAO, Z. A novel lipopeptide produced by a Pacific Ocean deep-sea bacterium, *Rhodococcus* sp. TW53. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, n. 3, p. 698-705, 2008b.

PENG, R.H.; XIONG, A.S.; XUE, Y.; FU, X.Y.; GAO, F.; ZHAO, W.; TIAN, Y.S.; YAO, Q.H. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 32, p. 927–955, 2008a.

PERALTA-ZAMORA, P.; ESPOSITO, E.; REYES, J.; DURÁN, N. Remediação de efluentes derivados da indústria de papel e celulose. Tratamento biológico e fotocatalítico. *Química Nova*, v. 20, n. 2, p. 186-190, 1997.

PÉREZ-PALACIOS, T.; BARROSO, M. A.; RUIZ, J.; ANTEQUERA, T. A rapid and accurate extraction procedure for analysing free amino acids in Meat samples by GC-MS. *International Journal of Analytical Chemistry*, v. 2015, 2015.

PÉREZ-PANTOJA, D.; DONOSO, R.; AGULLÓ, L.; CÓRDOVA, M.; SEEGER, M.; PIEPER, D.H.; GONZÁLEZ, B. Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in *Burkholderiales*. *Environmental Microbiology*, v. 14, n. 5, p. 1091–1117, 2012.

PETERS, F.; HEINTZ, D.; JOHANNES, J. DORSSELAER, A. V.; BOLL, M. Genes, enzymes, and regulation of *para*-cresol metabolism in *Geobacter metallireducens*. *Journal of Bacteriology*, v. 189, n. 13, p. 4729–4738, 2007.

PIGNATELLO, J.J. Soil organic matter as a nanoporous sorbent of organic pollutants. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 76, p. 445-467, 1998.

PINYAKONG, O.; HABE, H.; SUPAKA, N.; PINPANICHKARN, P.; JUNTONGJIN, K.; YOSHIDA, T.; FURIHATA, K.; NOJIRI, H.; YAMANE, H.; OMORI, T. Identification of novel metabolites in the degradation of phenanthrene by *Sphingomonas* sp. strain P2. *FEMS Microbiology Letters*, v. 191, p. 115-121, 2000.

PITCHER, D.G.; SAUNDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, v. 8, p. 151-156, 1989.

PORETSKY, R.; RODRIGUEZ-R, L.M.; LUO, C.; TSEMENTZI, D.; KONSTANTINIDIS, K.T. Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PloS One*, v. 9, n. 4, 2014.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; CHAVADEJ, S.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 1589–1595, 2008.

PRUESSE, E.; QUAST, C.; KNITTEL, K.; FUCHS, B.M.; LUDWIG, W.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. 21, p. 7188-7196, 2007.

QIN, W.; ZHU, Y.; FAN, F.; WANG, Y.; LIU, X.; DING, A.; DOU, J. Biodegradation of benzo(a)pyrene by *Microbacterium* sp. strain under denitrification: degradation pathway and effects of limiting electron acceptors or carbon source. *Biochemical Engineering Journal*, v. 121, p. 131-138, 2017.

RANC, B.; FAURE, P.; CROZE, V.; SIMONNOT, M.O. Selection of oxidant doses for *in situ* chemical oxidation of soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, v. 312, p. 280-297, 2016.

RASKO, D.A.; ALTHERR, M.R.; HAN, C.S.; RAVEL, J. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, p. 303–329, 2005.

RASMUSSEN, G.; FREMMERSVIK, G.; OLSEN, R.A. Treatment of creosote-contaminated groundwater in a peat/sand permeable barrier—a column study. *Journal of Hazardous Materials*, v. 93, p. 285–306, 2002.

REHMANN, K.; HERTKORN, N.; KETTRUP, A.A. Fluoranthene metabolism in *Mycobacterium* sp. strain KR20: identity of pathway intermediates during degradation and growth. *Microbiology*, v. 147, n. 10, p. 2783-2794, 2001.

REID, B.J.; JONES, K.C.; SEMPLE, K.T. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments—a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution*, v. 108, p. 103–112, 2000.

REID, B.J.; SEMPLE, K.T.; MACLEOD, C.J.; WEITZ, H.; PATON, G.I. Feasibility of using prokaryote biosensors to assess acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Letters*, v.169, p. 227–233, 1998.

RELLER, L.B.; WEINSTEIN, M.P.; PETTI, C.A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical infectious diseases*, v. 44, n. 8, p. 1108-1114, 2007.

RIBEIRO, H.; DE SOUSA, T.; SANTOS, J. P.; SOUSA, A.G.; TEIXEIRA, C.; MONTEIRO, M.R.; ... MAGALHÃES, C. Potential of dissimilatory nitrate reduction pathways in polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Chemosphere*, v. 199, p. 54-67, 2018.

RICHARDSON, M.L.; GANGOLLI, S. The dictionary of substances and their effects. 1st Edition. England: Royal Society of Chemistry, 1992. 876p.

RIDDLE, R.R.; GIBBS, P.R.; WILLSON, R.C.; BENEDIK, M.J. Purification and properties of 2-hydroxy-6-oxo-6-(2'-aminophenyl)hexa-2,4-dienoic acid hydrolase involved in microbial degradation of carbazole. *Protein Expression and Purification*, v. 28, p. 182–189, 2003a.

RIDDLE, R.R.; GIBBS, P.R.; WILLSON, R.C.; BENEDIK, M.J. Recombinant carbazole-degrading strains for enhanced petroleum processing. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 30, p. 6–12, 2003b.

RISER-ROBERT, E. Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical process. Florida: CRC Press LLC, 1998. 576 p.

ROBERTS, S.J.; HEDRICK, H.G. Degradation of creosote phenolic compounds by selected bacterial isolates. *Developments in Industrial Microbiology*, v. 20, p. 471-478, 1979.

ROCHA, M.J.; ROCHA, E.; CRUZEIRO, C.; FERREIRA, P.C.; REIS, P.A. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Porto region (Portugal) by microwave-assisted extraction, followed by

SPME and GC-MS. *Journal of Chromatographic Science*, v. 49, n. 9, p. 695-701, 2011.

ROCKNE, K.J.; STRAND, S.E. Biodegradation of bicyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in anaerobic enrichments. *Environmental Science & Technology*, v. 32, p. 2962–2967, 1998.

RODRIGUES, A.C.; WUERTZ, S.; BRITO, A.G.; MELO, L.F. Fluorene and phenanthrene uptake by *Pseudomonas putida* ATCC 17514: kinetics and physiological aspects. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 90, n. 3, p. 281-289, 2005.

ROMERO, M.C.; CAZAU, M.C.; GIORGIERI, S.; ARAMBARRI, A.M. Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environmental Pollution*, v. 101, p. 355-359, 1998.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

RYAN, R.P.; MONCHY, S.; CARDINALE, M.; TAGHAVI, S.; CROSSMAN, L.; AVISON, M.B.; BERG, G.; VAN DER LELIE, D.; DOW, J.M. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews*, v. 7, p. 514-525, 2009.

SAITO, A.; IWABUCHI, T.; HARAYAMA, S. A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioides* sp strain KP7: expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 182, p. 2134-2141, 2000.

SAMANTA, S.K.; CHAKRABORTI, A.K.; JAIN, R.K. Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, p. 98-107, 1999.

SÁNCHEZ-HERRERA, K.; SANDOVAL, H.; MOUNIEE, D.; RAMÍREZ-DURÁN, N.; BERGERON, E.; BOIRON, P.; ... RODRÍGUEZ-NAVA, V. Molecular identification of *Nocardia* species using the *sodA* gene: Identificación molecular de especies de *Nocardia* utilizando el gen *sodA*. *New Microbes and New Infections*, v. 19, p. 96-116, 2017.

SANTOS, I.C.; HILDENBRAND, Z.L.; SCHUG, K.A. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst*, v. 141, n. 10, p. 2827-2837, 2016.

SAYARA, T.; SARRÀ, M.; SÁNCHEZ, A. Preliminary screening of co-substrates for bioremediation of pyrene-contaminated soil through composting. *Journal of Hazardous Materials*, v. 172, p. 1695-1698, 2009.

SAYARA, T.A.S. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil: process evaluation through composting and anaerobic

digestion approach. 2010. 181 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 2010.

SCHNEIDER, J.; GROSSER, R.J.; JAYASIMHULU, K.; XUE, W.; KINKLE, B.; WARSHAWSKY, D. Biodegradation of carbazole by *Ralstonia* sp. RJGII. 123 isolated from a hydrocarbon contaminated soil. Canadian Journal of Microbiology, v. 46, p. 269–277, 2000.

SEABRA, P.N.C. Aplicação de biopilha na biorremediação de solos argilosos contaminados com petróleo. 2006. 183 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SEMPLE, K.T.; MORRISS, W.J.; PATON, G.I. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. European Journal of Soil Science, v. 54, p. 809–818, 2003.

SEO, J.S.; KEUM, Y.S.; HARADA, R.M.; LI, Q.X. Isolation and characterization of bacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organophosphorus pesticides from pah-contaminated soil in Hilo, Hawaii. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 55, n. 14, p. 5383–5389, 2007.

SEO, J.S.; KEUM, Y.S.; LI, Q.X. Bacterial degradation of aromatic compounds. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 6, p. 278–309, 2009.

SHENG, X.; CHEN, X.; HE, L. Characteristics of an endophytic pyrene-degrading bacterium of *Enterobacter* sp. 12J1 from *Allium macrostemon* Bunge. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 62, p. 88–95, 2008.

SHUTTLEWORTH, K.L.; CERNIGLIA, C.E. Environmental aspects of PAH biodegradation. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 54, p. 291–302, 1995.

SIDDIQUI, R.A.; WARNECKE-EBERZ, U.; HENGESBERGER, A.; SCHNEIDER, B.; KOSTKA, S.; FRIEDRICH, B. Structure and function of a periplasmic nitrate reductase in *Alcaligenes eutrophus* H16. Journal of Bacteriology, v. 175, n. 18, p. 5867–5876, 1993.

SILVA, E.J.; SILVA, N.M.P.R.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SILVA, R.O.; SARUBBO, L.A. Characterization of a biosurfactant produced by *Pseudomonas cepacia* CCT6659 in the presence of industrial wastes and its application in the biodegradation of hydrophobic compounds in soil. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 117, p. 36–41, 2014.

SILVA, L.J. Processo de *Landfarming* para Tratamento de Resíduos Oleosos. 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

SIMARRO, R.; GONZÁLEZ, N.; BAUTISTA, L.F.; MOLINA, M.C. Assessment of the efficiency of in situ bioremediation techniques in a creosote polluted soil: Change in bacterial community. *Journal of Hazardous Materials*, v. 262, p. 158–167, 2013.

SIMPANEN, S.; MAKELA, R.; MIKOLA, J.; SILVENNOINEN, H.; ROMANTSCHUK, M. Bioremediation of creosote contaminated soil in both laboratory and field scale: Investigating the ability of methyl- β -cyclodextrin to enhance biostimulation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.106, p. 117-126, 2016.

SINGLETON, D.R.; POWELL, S.N.; SANGAIAH, R.; GOLD, A.; BALL, L.M.; AITKEN, M.D. Stable-isotope probing of bacteria capable of degrading salicylate, naphthalene, or phenanthrene in a bioreactor treating contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, p. 1202–1209, 2005.

SIVAPATHASEKARAN, C.; MUKHERJEE, S.; SAMANTA, R.; SEN, R. High-performance liquid chromatography purification of biosurfactant isoforms produced by a marine bacterium. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 395, n. 3, p. 845-854, 2009.

SMETS, W.; LEFF, J.W.; BRADFORD, M.A.; MCCULLEY, R.L.; LEBEER, S.; FIERER, N. A method for simultaneous measurement of soil bacterial abundances and community composition via 16S rRNA gene sequencing. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 96, p. 145-151, 2016.

SMITH, S.E.; READ, D.J. *Mycorrhizal Symbiosis*. 2.ed. Academic Press, p. 605, 1997.

SOGA, K.; PAGE, J.W.E.; ILLANGASEKARE, T.H. A review of NAPL source zone remediation efficiency and the mass flux approach. *Journal of Hazardous Materials*, v. 110, n. 1-3, p. 13-27, 2004.

SONAWDEKAR, S. Bioremediation: a boon to hydrocarbon degradation. *International Journal of Environmental Sciences*, v. 2, n. 4, p. 2408-2424, 2012.

SOUSA, T.; BHOSLE, S. Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10 isolated from a mangrove ecosystem. *Bioresource Technology*, v. 123, p. 256–262, 2012.

STACH, J.E.M.; BURNS, R.G. Enrichment versus biofilm culture: a functional and phylogenetic comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial communities. *Environmental Microbiology*, v. 4, p. 169-182, 2002.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 44, p. 846-849, 1994.

STOPE, M.B.; BECHER, D.; HAMMER, E.; SCHAUER, F. Cometabolic ring fission of dibenzofuran by Gram-negative and Gram-positive biphenyl-utilizing bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, p. 62–67, 2002.

SUMAN, S.; SINHA, A.; TARAFDAR, A. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) concentration levels, pattern, source identification and soil toxicity assessment in urban traffic soil of Dhanbad, India. *Science of the Total Environment*, v. 545, p. 353-360, 2016.

SUN, G.D.; JIN, J.H.; XU, Y.; ZHONG, Z.P.; LIU, Y. LIU, Z.P. Isolation of a high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbon degrading strain and its enhancing the removal of HMW-PAHs from heavily contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 90, p. 23-28, 2014.

SUN, L.; TERAMOTO, K.; SATO, H.; TORIMURA, M.; TAO, H.; SHINTANI, T. Characterization of ribosomal proteins as biomarkers for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectral identification of *Lactobacillus plantarum*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, v. 20, n. 24, p. 3789-3798, 2006.

SUSILANINGSIH, D.; OKAZAKI, F.; WIDYASTUTI, Y.; HARAYAMA, S. Isolation and screening of surfactant-producing bacteria from Indonesian marine environments and its application on bioremediation. *Annales Bogorienses*, v. 17, n. 2, 2013.

SUTHERLAND, J.B.; RAFII, F.; KHAN, A.A.; CERNIGLIA, C.E. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. In: YOUNG, L.Y.; CERNIGLIA, C.E. (Eds.) *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. New York: Wiley-Liss, 1995, p. 269–306.

TENG, Y.; LUO, Y.; SUN, M.; LIU, Z.; LI, Z.; CHRISTIE P. Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 3437-3443, 2010.

THORNTON, S.F.; MORGAN, P.; ROLFE, S.A. Bioremediation of hydrocarbons and chlorinated solvents in groundwater: characterisation, design and performance assessment. In: *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2016. p. 11-64.

TOLEDO, F.L.; CALVO, C.; RODELAS, B.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 29, n. 3, p. 244-252, 2006.

TOP, E.M.; SPRINGAEL, D.; BOON, N. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 42, p. 199-208, 2002.

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, p. 1025-1035, 2010.

TOURASSE, N.J.; HELGASON, E.; ØKSTAD, O.A.; HEGNA, I.K.; KOLSTØ, A.-B. The *Bacillus cereus* group: novel aspects of population structure and genome dynamics. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, p. 579–593, 2006.

TRINDADE, P.V.O.; SOBRAL, L.G.; RIZZO, A.C.L.; LEITE, S.G.F.; SORIANO, A.U. “Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study”. *Chemosphere*, v. 58, p. 515-522, 2005.

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, p. 231–241, 2011.

VACCA, D.J.; BLEAM, W.F.; HICKEY, W.J. Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 7, p. 3797–3805, 2005.

VAN HERWIJNEN, R.; WATTIAU, P.; BASTIAENS, L.; DAAL, L.; JONKER, L.; SPRINGAEL, D.; GOVERS, H.A.; PARSONS, J.R. Elucidation of the metabolic pathway of fluorene and cometabolic pathways of phenanthrene, fluoranthene, anthracene and dibenzothiophene by *Shingomonas* sp. LB126. *Research in Microbiology*, v.154, p. 199–206, 2003.

VANROOIJ, J.G.M.; BODELIERBADE, M.M.; JONGENEELLEN, F.J. Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic-hydrocarbons in 12 coke-oven workers. *British Journal of Industrial Medicine*, v. 50, p. 623–632, 1993.

VARGA, J.M.; NEUJAH, H.Y. Isolation from soil of phenol-utilizing organisms and metabolic studies on the pathways of phenol degradation. *Plant and Soil*, v. 33, p. 565-571, 1970.

VARJANI, S.J.; UPASANI, V.N. Carbon spectrum utilization by an indigenous strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: Production, characterization and surface active properties of biosurfactant. *Bioresource Technology*, v. 221, p. 510–516, 2016.

VAZ, D.A.; GUDINA, E.J.; ALAMEDA, E.J.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 89, p. 167– 174, 2012.

VAZ, M. Biodegradação *ex-situ* e avaliação da atividade biológica de solos contaminados por hidrocarbonetos. 2010. 106 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2010.

VELMURUGAN, A.M.; ARUNACHALAM, C. Bioremediation of phenol and naphthalene by *Bacillus* species and *Brachybacterium* species isolated from pharma soil sample. *Current World Environment*, v. 4, p. 299-306, 2009.

VĚTROVSKÝ, T.; BALDRIAN, P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PloS One*, v. 8, n. 2, 2013.

VIDALI, M. Bioremediation: An overview. *Pure and Applied Chemistry*, v. 73, n. 7, p. 1163–1172, 2001.

VILLASENOR, F.; LOERA, O.; CAMPERO, A.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Oxidation of dibenzothiophene by laccase or hydrogen peroxide and deep desulfurization of diesel fuel by the later. *Fuel Processing Technology*, v. 86, n. 1, p. 49-59, 2004.

VIÑAS, M.; SABATE, J.; ESPUNY, M.J.; SOLANAS, A.M. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 71, n. 11, p. 7008–7018, 2005.

VOJTKOVÁ, H.; KOSINA, M.; SEDLÁČEK, I.; MAŠLAŇOVÁ, I.; HARWOTOVÁ, M.; MOLINKOVÁ, V. Characterization of *Pseudomonas monteilii* CCM 3423 and its physiological potential for biodegradation of selected organic pollutants. *Folia Microbiologica*, v. 60, p. 411-416, 2015.

VYAS, B.R.M.; Bakowski, S.; Sasek, V.; Matucha, M. Degradation of anthracene by selected white rot fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 14, p. 65–70, 1994.

WAKASE, S.; SASAKI, H.; ITOH, K.; OTAWA, K.; KITAZUME, O.; NONAKA, J.; SATOH, M.; SASAKI, T.; NAKAI, Y. Investigation of the microbial community in a microbiological additive used in a manure composting process. *Bioresource Technology*, 99, p. 2687–2693, 2007.

WANG, R.F.; WENNERSTORM, D.; CAO, W.W.; KHAN, A.A.; CERNIGLIA, C.E. Cloning, expression, and characterization of the *katG* gene, encoding catalase-peroxidase, from the polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 4300–4304, 2000.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, p. 237–241, 2001.

WEI, Y.H.; LAI, C.C.; CHANG, J.S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochemistry*, v. 42, n. 1, p. 40-45, 2007.

WIESER, A.; SCHNEIDER, L.; JUNG, J.; SCHUBERT, S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, n. 3, p. 965-974, 2012.

WINDERL, C.; ANNESER, B.; GRIEBLER, C.; MECKENSTOCK, R. U.; LUEDERS, T. Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 74, n. 3, p. 792-801, 2008.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol*, v. 51, p. 221-271, 1987.

WOLZ, J.; ENGWALL, M.; MALETZ, S.; TAKNER, H.O.; VAN BAVEL B.; KAMMANN, U. et al. Changes in toxicity and Ah receptor agonist activity of suspended particulate matter during flood events at the rivers Neckar and Rhine – a mass balance approach using in vitro methods and chemical analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 15, p. 536–553, 2008.

WRENN, B.A.; VENOSA, A.D. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 252-258, 1996.

WUNSCH, P.; HERB, M.; WIELAND, H.; SCHIEK, U.M.; ZUMFT, W.G. Requirements for CuA and Cu-S center assembly of nitrous oxide reductase deduced from complete periplasmic enzyme maturation in the nondenitrifier *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, v. 185, n. 3, p. 887-896, 2003.

XIA, W.; DU, Z.; CUI, Q.; DONG, H.; WANG, F.; HE, P.; TANG, Y. Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas* sp. WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, v. 276, p. 489-498, 2014.

XU, P.; YU, B.; LI, F.L.; CAI, X.F.; MA, C.Q. Microbial degradation of sulfur, nitrogen and oxygen heterocycles. *TRENDS in Microbiology*, v.14, n. 9, p. 398-405, 2006.

YAMAZOE, A.; YAGI, O.; OYAIZU, H. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a newly isolated dibenzofuran-utilizing *Janibacter* sp. strain YY-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 65, p. 211–218, 2004.

YAN, Z.; ZHANG, Y.; WU, H.; YANG, M.; ZHANG, H.; HAO, Z.; JIANG, H. Isolation and characterization of a bacterial strain *Hydrogenophaga* sp. PYR1 for anaerobic pyrene and benzo[a]pyrene biodegradation. RSC Advances, v. 7, n. 74, p. 46690-46698, 2017.

YARZA, P.; YILMAZ, P.; PRUESSE, E.; GLÖCKNER, F.O.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H.; ... ROSSELLÓ-MÓRA, R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. Nature Reviews Microbiology, v. 12, n. 9, p. 635, 2014.

YOON, S.H.; HA, S.M.; KWON, S.; LIM, J.; KIM, Y.; SEO, H.; CHUN, J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. International Journal Of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 67, n. 5, p. 1613-1617, 2017.

YUAN, S.Y.; CHANG, J.S.; YEN, J.H.; CHANG, B.V. Biodegradation of phenanthrene in river sediment. Chemosphere, v. 43, p. 273–278, 2001.

YU, B.; MA, C.; ZHOU, W.; ZHU, S.; WANG, Y.; QU, J.; LI, F.; XU, P. Simultaneous biodegradation of S, N, and O pollutants by engineering of a carbazole-degrading gene cassette in a recombinant biocatalyst. Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 11, p. 7373–7376, 2006a.

YU, B.; XU, P.; SHI, Q.; MA, C. Deep desulfurization of diesel oil and crude oils by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain. Applied and Environmental Microbiology, v. 72, p. 54–58, 2006b.

ZAFRA, G.; TAYLOR, T.D.; ABSALÓN, A.E.; CORTÉS-ESPINOSA, D.V. Comparative metagenomic analysis of PAH degradation in soil by a mixed microbial consortium. Journal of Hazardous Materials, v. 318, p. 702-710, 2016.

ZHANG, Z.; HOU, Z.; YANG, C.; MA, C.; TAO, F.; XU, P. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. Bioresource Technology, v. 102, p. 4111–4116, 2011.

ZHOU, M.; YANG, Q.; KUDINHA, T.; ZHANG, L.; XIAO, M.; KONG, F.; ... XU, Y.C. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) complemented with selected 16S rRNA and *gyrB* genes sequencing to practically identify clinical important viridans group streptococci (VGS). Frontiers in Microbiology, v. 7, p. 1328, 2016.

ZHU, B.; BRADFORD, L.; HUANG, S.; SZALAY, A.; LEIX, C.; WEISSBACH, M.; ... LUEDERS, T. Unexpected diversity and high abundance of putative nitric oxide dismutase (*Nod*) genes in contaminated aquifers and wastewater treatment systems. Applied and Environmental Microbiology, p. AEM. 02750-16, 2016.

8. ANEXOS

Anexo 1 - Análise de variância (ANOVA) da densidade de bactérias degradadoras de compostos presentes no creosoto (naftaleno, antraceno e fenol), independente dos poços amostrados.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
COMPOSTOS	2	1.416005087E+0014	7.08002544E+0013	1.189	0.3241
erro	21	1.250001423E+0015	5.95238773E+0013		
Total corrigido	23	1.391601931E+0015			
CV (%) =	149.23				
Média geral:	5170054.1666667	Número de observações:		24	

Anexo 2 - Descrição das características das bactérias isoladas.

Código do isolado	Características	Densidade (UFC/mL)
M6P1/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$3,9 \times 10^9$
M6P2/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$1,4 \times 10^8$
M6P2/2	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$1,0 \times 10^7$
M6P2/3	branca/amarela, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$2,0 \times 10^8$
M6P3/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$6,0 \times 10^8$
M6P3/2	transparente, opaca, regular, lisa, plana, cremosa	incontável
M6P4/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$1,4 \times 10^8$
M6P4/2	amarela/branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$3,7 \times 10^9$
M6P4/3	marrom, opaca, regular, lisa, convexa, cremosa	$4,4 \times 10^9$
M6P5/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$>3,0 \times 10^{10}$
M6P5/2	amarela, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$3,2 \times 10^9$
M6P6/1	branca, opaca, regular, lisa, convexa, cremosa	$>3,0 \times 10^{10}$
M6P6/2	marrom, opaca, regular, lisa, convexa, cremosa	$>3,0 \times 10^{10}$
M6P7/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$>3,0 \times 10^{10}$
M6P7/2	marrom, opaca, regular, lisa, convexa, cremosa	$5,5 \times 10^9$
M6P8/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$8,3 \times 10^9$
M6P8/2	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	incontável
M6P8/3	marrom, opaca, regular, lisa, convexa, cremosa	$1,0 \times 10^9$
M6P9/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$5,0 \times 10^8$
M6P9/2	marrom, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$9,1 \times 10^9$
M6P10/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$2,8 \times 10^9$
M6P10/2	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, mucóide	$1,7 \times 10^7$
M3P1/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$2,0 \times 10^6$

M3P1/2	branca, opaca, regular, lisa, convexa, cremosa	$1,8 \times 10^7$
M3P1/3	branca, opaca, irregular, lisa, plana, cremosa	$4,0 \times 10^6$
M3P2/1	laranja, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$2,2 \times 10^3$
M3P2/2	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$6,0 \times 10^7$
M3P2/3	amarelo mostarda, brilhante, irregular, lisa, plana, cremosa	$1,0 \times 10^7$
M3P3/1	branca, opaca, regular, lisa, convexa, cremosa	$1,8 \times 10^7$
M3P4/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$4,5 \times 10^7$
M3P4/2	branca, opaca, irregular, lisa, plana, cremosa	$1,3 \times 10^7$
M3P5/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$>3,0 \times 10^{10}$
M3P5/2	rosa, brilhante, irregular, lisa, plana, cremosa	$1,1 \times 10^9$
M3P6/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$2,3 \times 10^7$
M3P6/2	amarela, brilhante, regular, lisa, convexa, seca	$8,0 \times 10^7$
M3P7/1	branca, brilhante, irregular, lisa, convexa, cremosa	incontável
M3P7/2	branca, opaca, irregular, lisa, plana, cremosa	incontável
M3P8/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$3,0 \times 10^8$
M3P8/2	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$>3,0 \times 10^{10}$
M3P8/3	marrom, opaca, regular, lisa, convexa, cremosa	incontável
M3P9/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$4,2 \times 10^6$
M3P9/2	transparente, opaca, irregular, lisa, plana, cremosa	incontável
M3P10/1	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$9,0 \times 10^6$
M3P10/2	branca, brilhante, regular, lisa, convexa, cremosa	$8,1 \times 10^7$
T9P1/1	Branca , brilhante,regular,lisa,plana,centro claro, cremosa	$1,0 \times 10^8$
T9P1/2	Branca, opaca,regular,lisa,plana,centro escuro, cremosa	$8,0 \times 10^6$
T9P1/3	Branca , brilhante,irregular,lisa,plana,centro claro, cremosa	incontável
T9P1/4	Rosa , brilhante,irregular,lisa,plana,centro claro, cremosa	incontável
T9P2/1	Branca, brilhante,regular,lisa,convexa,centro claro, cremosa	$6,0 \times 10^6$
T9P2/2	Branca, brilhante,regular,lisa,convexa,centro claro, cremosa	incontável
T9P2/3	Branca,opaca,regular,lisa, convexa,centro claro, cremosa	$8,0 \times 10^8$
T9P2/4	Branca,opaca,regular,lisa, plana,centro escuro, cremosa	$2,0 \times 10^6$
T9P2/5	Branca, brilhante,regular,lisa,convexa,centro claro, cremosa	$1,0 \times 10^5$
T9P3/1	Branca,opaca,regular,rugosa,convexa,centro escuro,mucoide	$1,0 \times 10^6$
T9P3/2	Branca,opaca,regular,lisa,convexa,centro escuro,mucoide	$8,0 \times 10^5$
T9P3/3	Branca, brilhante,regular,lisa,convexa,centro claro, cremosa	$>3,0 \times 10^7$
T9P3/4	Branca,opaca,regular,lisa,convexa,centro claro, cremosa	$1,4 \times 10^6$
T9P4/1	Branca,opaca,regular,lisa,convexa,cremosa	$>3,0 \times 10^4$
T9P4/2	Branca,opaca,irregular,rugosa,plana,cremosa	incontável
T9P4/3	Transpartente, opaca,regular, lisa,plana,cremosa	$2,9 \times 10^7$
T9P5/1	transparente/branca, opaca, irregular, lisa, plana, cremosa	incontável

T9P5/2	Rosa,brilhante,irregular,lisa,plana,centro escuro, cremosa	incontável
T9P6/1	Branca,brilhante,regular,lisa,convexa,centro claro,cremosa	incontável
T9P6/2	Branca,opaca,irregular,rugosa,convexa,centro claro,seca	$1,0 \times 10^6$
T9P6/3	Branca,brilhante,irregular,lisa,convexa,centro claro,cremosa	incontável
T9P6/4	Branca,opaca,regular,lisa,convexa,centro escuro,convexa	$5,7 \times 10^6$
T9P7/1	Branca,brilhante,regular,lisa,convexa,centro claro, cremosa	$4,1 \times 10^6$
T9P7/2	branca,opaca,regular,lisa,convexa,centro escuro,cremosa	$4,2 \times 10^7$
T9P9/1	Branca,opaca,regular,rugosa,convexa,centro claro,mucoide	$4,0 \times 10^7$
T9P9/2	Branca,opaca,regular,lisa,plana,centro claro,cremosa	$1,3 \times 10^{10}$
T9P9/3	Branca,opaca,regular,rugosa,convexa,centro claro,seca	$1,5 \times 10^7$
T9P9/4	Bege,brilhante,regular,lisa,convexa,centro claro,cremosa	$2,0 \times 10^6$
B/1	Branca,brilhante,regular,lisa,convexa,centro claro,cremosa	$2,0 \times 10^8$
B/2	Amarela,brilhante,regular,lisa,convexa,centro escuro,cremosa	$3,0 \times 10^8$
B/3	Rosa/branca,brilhante,regular,lisa,convexa,centro escuro,cremosa	$1,1 \times 10^9$
B/4	Rosa/branca,brilhante,regular,lisa,convexa,centro escuro,cremosa	$2,0 \times 10^8$
B/5	Branca,brilhante,irregular,rugosa,convexa,cremosa	$1,0 \times 10^7$

Anexo 3 - Análise de variância (ANOVA) para a degradação total de creosoto pelos isolados selecionados.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ISOLADOS_erro	76 160	25351.453105 7069.808708	333.571751 44.186304	7.549	0.0000
Total corrigido	236	32421.261812			
CV (%) =	75.52				
Média geral:	8.8014303	Número de observações:	237		

Anexo 4 - Degradação dos 12 principais compostos presentes no creosoto analisado.

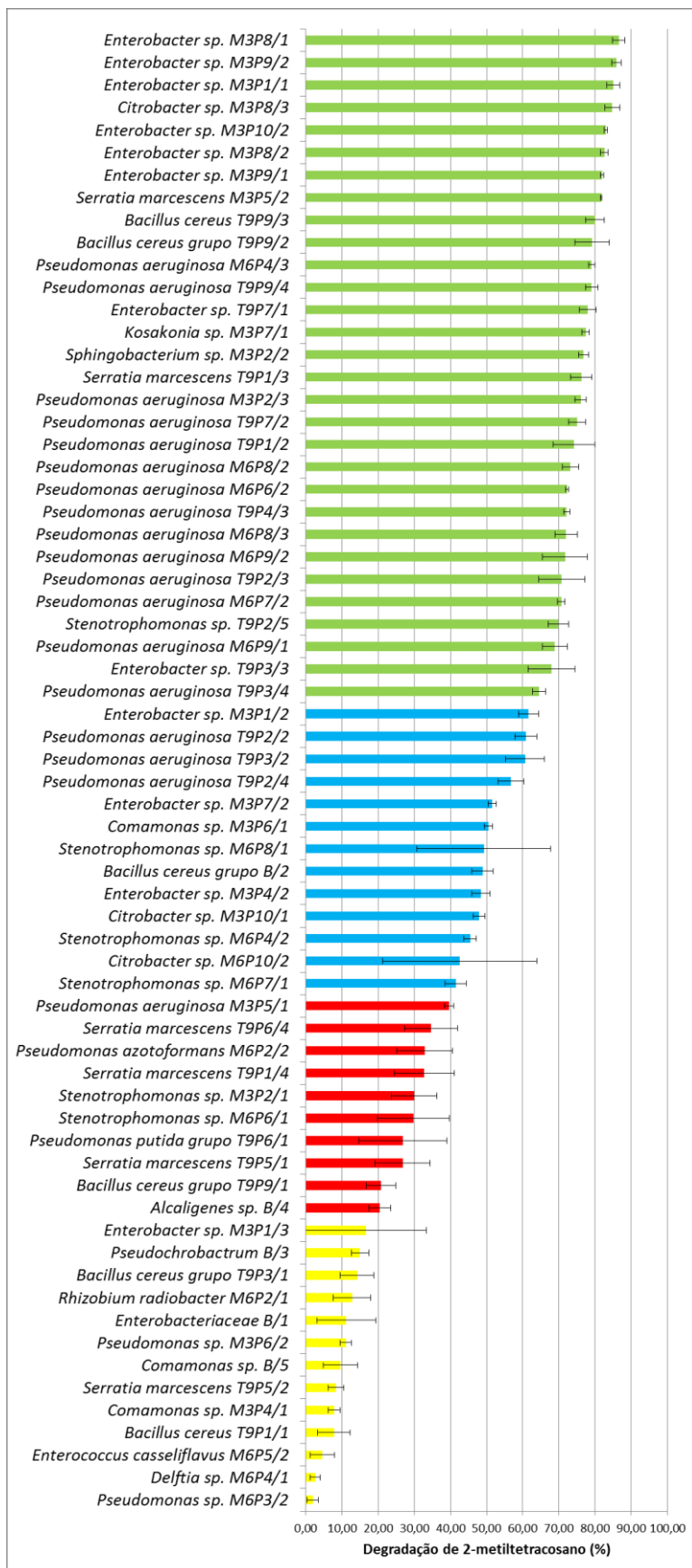
	Degradação dos compostos (%)											
	Fen	Flt	Pir	Flu	Acn	4H-Cf	2-Mtc	Dbf	Dbt	Ant	Bza	Tfl
<i>Pseudomonas sp. M6P1/1</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Rhizobium radiobacter M6P2/1</i>	3,0	3,5	4,6	8,3	14,3	0,5	12,8	8,6	0,9	4,5	0,6	0,0
<i>Pseudomonas azotoformans M6P2/2</i>	6,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	32,9	0,0	4,4	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas sp. M6P2/3</i>	5,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas sp. M6P3/1</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas sp. M6P3/2</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Delftia sp. M6P4/1</i>	12,2	1,9	0,0	5,3	3,9	6,4	2,6	2,4	6,4	12,7	0,0	0,0
<i>Stenotrophomonas sp. M6P4/2</i>	3,8	3,8	3,7	5,7	2,9	0,9	45,4	2,9	18,2	10,8	3,4	7,3
<i>Pseudomonas aeruginosa M6P4/3</i>	0,0	0,0	0,0	11,6	0,0	0,0	79,1	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudochrobactrum sp. M6P5/1</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Enterococcus casseliflavus M6P5/2</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,2	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0
<i>Stenotrophomonas sp. M6P6/1</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	29,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa M6P6/2</i>	0,0	0,0	0,0	9,6	0,0	0,0	72,4	0,0	7,2	0,0	1,9	2,3
<i>Stenotrophomonas sp. M6P7/1</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	41,4	0,0	6,5	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa M6P7/2</i>	0,0	0,4	0,0	21,0	0,0	0,0	70,7	3,6	16,7	0,0	8,2	10,4
<i>Stenotrophomonas sp. M6P8/1</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	49,2	0,0	1,3	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa M6P8/2</i>	0,0	0,0	0,0	25,4	0,0	0,0	73,2	9,9	15,5	0,0	14,7	13,3
<i>Pseudomonas aeruginosa M6P8/3</i>	0,0	0,0	0,0	9,7	0,0	0,0	72,0	0,0	4,5	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa M6P9/1</i>	0,0	0,0	0,0	8,1	0,0	0,0	68,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa M6P9/2</i>	0,0	0,0	0,0	2,9	0,0	0,0	71,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Enterococcus sp. M6P10/1</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Citrobacter sp. M6P10/2</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,6	0,0	0,0	0,0	7,9	7,9
<i>Enterobacter sp. M3P1/1</i>	0,0	0,0	0,0	16,9	0,0	0,0	85,1	0,0	9,4	0,0	0,0	0,0
<i>Enterobacter sp. M3P1/2</i>	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	61,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

<i>Enterobacter sp. M3P1/3</i>	0,0	0,0	0,0	5,0	5,0	0,0	16,6	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Stenotrophomonas sp. M3P2/1</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	30,0	0,0	5,6	0,0	3,9	4,0
<i>Sphingobacterium sp. M3P2/2</i>	0,0	0,8	0,0	25,0	13,7	0,0	76,8	11,3	10,2	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa M3P2/3</i>	0,0	0,7	0,0	19,6	0,0	0,0	76,0	0,0	10,3	0,0	1,8	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa M3P3/1</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Comamonas sp. M3P4/1</i>	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	7,8	0,0	4,0	0,0	2,3	5,6
<i>Enterobacter sp. M3P4/2</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	48,5	0,0	8,7	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa M3P5/1</i>	0,0	0,0	0,0	4,1	0,0	0,0	39,7	22,8	1,5	0,0	4,0	6,0
<i>Serratia marcescens M3P5/2</i>	0,0	0,0	0,0	16,2	7,2	0,0	81,7	34,4	7,5	0,0	0,0	0,0
<i>Comamonas sp. M3P6/1</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	40,5	46,6	0,0	0,0	0,5	3,2
<i>Pseudomonas sp. M3P6/2</i>	0,0	0,3	1,8	0,0	0,0	0,0	11,1	0,0	6,7	0,0	6,8	6,3
<i>Kosakonia sp. M3P7/1</i>	0,0	0,0	0,0	6,1	0,0	0,0	77,4	0,0	15,4	0,0	10,3	7,5
<i>Enterobacter sp. M3P7/2</i>	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	51,6	27,8	8,8	0,0	0,0	0,0
<i>Enterobacter sp. M3P8/1</i>	19,1	13,5	16,1	48,8	48,3	11,3	86,6	78,0	32,9	21,2	30,3	28,7
<i>Enterobacter sp. M3P8/2</i>	15,0	5,7	7,4	46,3	46,6	2,5	82,6	76,9	26,1	15,6	21,5	18,6
<i>Enterobacter sp. M3P8/3</i>	0,0	0,0	0,0	28,3	14,8	0,0	84,8	51,9	11,6	0,0	1,0	0,0
<i>Enterobacter sp. M3P9/1</i>	0,0	0,0	0,0	17,4	0,0	0,0	82,0	0,0	11,6	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa M3P9/2</i>	3,6	0,5	1,9	33,2	23,5	0,0	86,0	37,6	19,3	7,2	11,8	8,9
<i>Citrobacter sp. M3P10/1</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	47,9	0,0	3,3	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa M3P10/2</i>	0,0	0,0	0,0	25,6	7,0	0,0	83,0	6,9	19,8	5,6	9,3	6,7
<i>Bacillus cereus T9P1/1</i>	7,9	11,3	13,1	0,0	0,0	5,1	7,6	0,0	10,6	0,6	20,7	21,5
<i>Pseudomonas aeruginosa T9P1/2</i>	7,1	11,3	16,1	4,8	0,0	0,0	74,2	0,0	18,6	0,0	25,9	25,1
<i>Serratia marcescens T9P1/3</i>	3,3	10,1	13,2	0,0	0,0	0,0	76,2	0,0	16,5	0,0	25,1	23,5
<i>Serratia marcescens T9P1/4</i>	0,0	1,1	4,4	0,0	0,0	0,0	32,8	0,0	2,0	0,0	0,7	0,0
<i>Enterobacter sp. T9P2/1</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa T9P2/2</i>	2,9	0,0	0,0	24,1	0,0	0,0	60,8	3,7	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa T9P2/3</i>	16,6	5,1	10,4	37,3	8,1	0,0	70,8	20,2	4,9	11,8	0,0	0,0

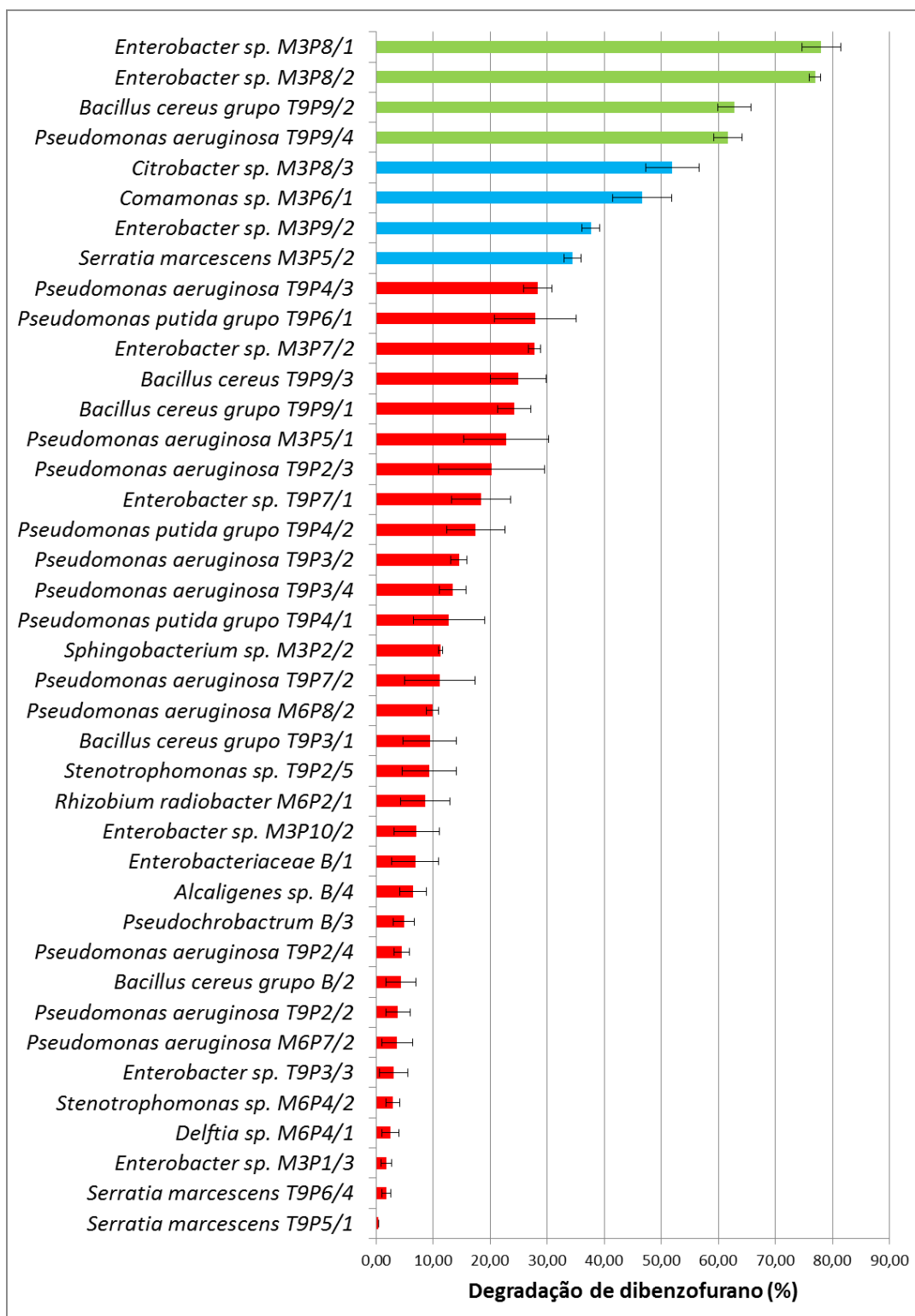
<i>Serratia marcescens</i> T9P2/4	0,6	0,0	0,0	24,9	0,0	0,0	56,7	4,5	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> T9P2/5	6,9	0,0	0,0	28,6	0,0	0,0	69,9	9,1	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Bacillus cereus</i> grupo T9P3/1	3,5	0,0	0,0	12,1	1,7	0,0	14,2	9,4	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> T9P3/2	5,6	0,0	0,0	29,6	1,0	0,0	60,6	14,5	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Enterobacter</i> sp. T9P3/3	1,7	0,0	0,0	22,4	0,0	0,0	68,0	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> T9P3/4	11,6	0,0	6,2	30,6	0,0	0,0	64,5	13,4	3,0	11,6	0,0	0,0
<i>Pseudomonas putida</i> grupo T9P4/1	10,3	0,0	0,0	21,9	5,7	0,0	0,0	12,8	0,0	7,9	0,0	0,0
<i>Pseudomonas putida</i> grupo T9P4/2	15,2	3,9	7,7	22,3	11,6	6,5	0,0	17,4	0,0	14,5	0,0	0,0
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> T9P4/3	22,1	15,7	20,6	41,1	15,9	11,4	72,1	28,3	20,9	20,2	8,3	1,0
<i>Serratia marcescens</i> T9P5/1	3,8	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	26,8	0,4	0,0	1,0	0,0	0,0
<i>Serratia marcescens</i> T9P5/2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas putida</i> grupo T9P6/1	27,2	24,0	29,2	36,6	25,3	29,6	26,9	27,8	22,1	31,8	24,0	22,4
T9P6/2	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Pseudomonas</i> <i>taiwanensis</i> T9P6/3	2,7	1,4	5,2	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0	3,7	0,0	0,0
<i>Serratia marcescens</i> T9P6/4	1,6	0,0	3,8	1,2	0,0	0,0	34,6	1,6	1,1	0,1	0,0	0,0
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> T9P7/1	17,9	22,5	27,4	35,5	5,1	17,7	78,0	18,4	32,1	24,5	22,7	22,3
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> T9P7/2	16,5	10,8	16,9	28,6	0,4	4,9	75,0	11,1	19,5	14,6	8,0	8,0
<i>Bacillus cereus</i> grupo T9P9/1	16,2	18,3	24,6	25,8	18,9	20,4	20,8	24,2	16,3	21,6	15,4	15,8
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> T9P9/2	16,7	12,7	19,0	39,5	26,0	6,3	79,2	62,8	21,7	17,7	17,9	15,5
<i>Bacillus cereus</i> T9P9/3	14,8	19,7	26,1	34,4	8,0	16,2	80,0	24,9	30,5	22,7	27,3	25,0
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> T9P9/4	16,7	12,5	20,0	41,2	21,5	8,8	79,1	61,6	23,8	17,0	21,9	17,6
Enterobacteriaceae B/1	4,8	5,2	13,0	7,0	2,9	4,6	11,1	6,9	8,2	8,3	9,6	8,4
<i>Bacillus cereus</i> grupo B/2	5,7	7,3	17,1	3,7	5,6	2,4	48,9	4,3	16,6	11,7	17,6	14,4
<i>Pseudochochromabrum</i> B/3	6,3	10,2	19,4	5,2	3,4	15,5	15,0	4,9	10,8	13,2	19,4	19,6
<i>Alcaligenes</i> sp. B/4	9,1	15,3	23,6	7,9	4,9	20,6	20,5	6,5	17,5	16,9	29,5	30,6
<i>Comamonas</i> sp. B/5	1,5	4,6	11,3	0,0	0,0	6,1	9,5	0,0	10,8	4,4	15,6	15,9

Anexo 5 - Análise de variância (ANOVA) para a degradação dos 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto utilizado.

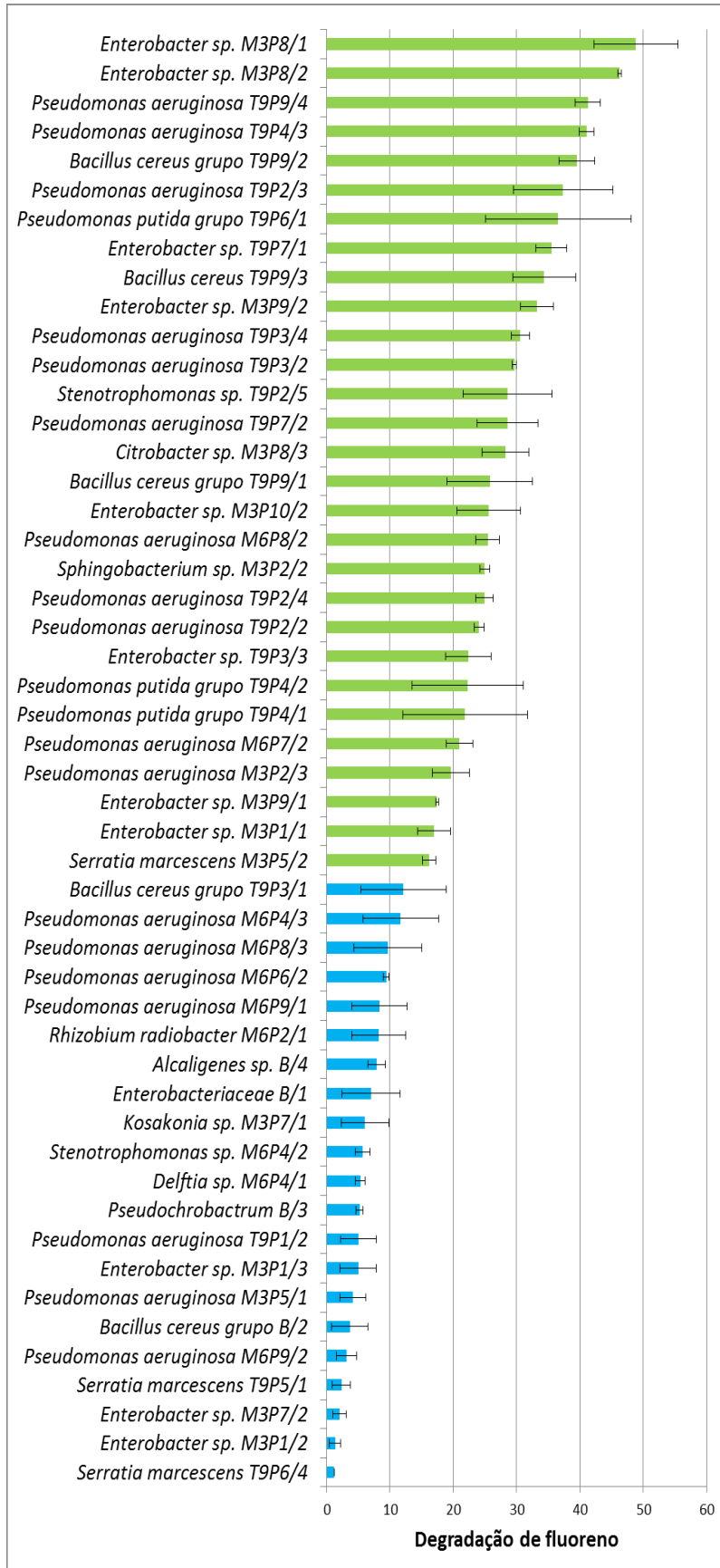
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
COMPOSTOS	11	323832.569351	29439.324486	154.055	0.0000
erro	2760	527425.917572	191.096347		
Total corrigido	2771	851258.486924			
CV (%) =	148.90				
Média geral:	9.2838932	Número de observações:	2772		



Anexo 6 - Porcentagem de degradação do composto 2-metiltetracosano pelos isolados selecionados. Os valores com a mesma cor não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade. Os isolados que não degradaram o composto não foram representados na figura.



Anexo 7 - Porcentagem de degradação do composto dibenzofurano pelos isolados selecionados. Os valores com a mesma cor não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade. Os isolados que não degradaram o composto não foram representados na figura.



Anexo 8 - Porcentagem de degradação do composto fluoreno pelos isolados selecionados. Os valores com a mesma cor não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade. Os isolados que não degradaram o composto não foram representados na figura.

Anexo 9 - Análise de variância (ANOVA) para o crescimento dos isolados durante o experimento de degradação, avaliado pelo parâmetro densidade ótica a 600 nm.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ISOLADOS	76	16.427983	0.216158	13.032	0.0000
erro	154	2.554376	0.016587		
Total corrigido	230	18.982359			
CV (%) =	31.90				
Média geral:	0.4036896	Número de observações:	231		

Anexo 10 - Análise de variância (ANOVA) para a atividade surfactante dos isolados, avaliado pelo parâmetro redução de tensão superficial em meio com creosoto como fonte de carbono.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ISOLADOS	76	12034.372873	158.347011	11.913	0.0000
erro	77	1023.469200	13.291808		
Total corrigido	153	13057.842073			
CV (%) =	7.09				
Média geral:	51.4409091	Número de observações:	154		

Anexo 11 - Análise de variância (ANOVA) para a atividade emulsificante (E24) em tolueno dos sobrenadantes produzidos pelos isolados selecionados.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ISOLADOS	76	123752.658858	1628.324459	9.921	0.0000
erro	231	37913.649325	164.128352		
Total corrigido	307	161666.308183			
CV (%) =	36.49				
Média geral:	35.1065260	Número de observações:	308		

Anexo 12 - Análise de variância (ANOVA) para a diferença de degradação entre as condições aerada e não aerada entre todos os isolados.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONDIÇÃO	1	2169.730935	2169.730935	8.423	0.0052
erro	58	14939.973390	257.585748		
Total corrigido	59	17109.704325			
CV (%) =	103.66				
Média geral:	15.4825000	Número de observações:	60		

Anexo 13 - Análise de variância (ANOVA) para a diferença entre as condições aerada e não aerada na degradação para cada isolado.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONDIÇÃO	/1 1	733.941600	733.941600	6.158	0.0187
CONDIÇÃO	/2 1	725.120267	725.120267	6.084	0.0194
CONDIÇÃO	/3 1	9.601350	9.601350	0.081	0.7784
CONDIÇÃO	/4 1	0.858817	0.858817	0.007	0.9329
CONDIÇÃO	/5 1	615.701400	615.701400	5.166	0.0301
CONDIÇÃO	/6 1	1550.112267	1550.112267	13.005	0.0011
CONDIÇÃO	/7 1	18.235267	18.235267	0.153	0.6984
CONDIÇÃO	/8 1	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
CONDIÇÃO	/9 1	493.952267	493.952267	4.144	0.0504
CONDIÇÃO	/10 1	22.776017	22.776017	0.191	0.6650
Erro	31	3694.935552	119.191469		

Codificação usada para o desdobramento

cod. ISOLADOS

- 1 = Achromobacter sp. R108(10-5)
- 2 = Alcaligenes sp. B/4
- 3 = Enterobacter sp. M3P8/1
- 4 = Pseudomonas citronellolis R106
- 5 = Pseudomonas putida grupo R206-
- 6 = Pseudomonas putida grupo T9P6/
- 7 = Pseudomonas sp. R106-4
- 8 = Serratia marcescens T9P1/3
- 9 = Sphingomonas sp R105
- 10 = Stenotrophomonas sp. R301-5

Anexo 14 - Análise de variância (ANOVA) para a diferença de degradação entre os isolados nas condições aerada e não aerada.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ISOLADOS	/1 9	6264.404987	696.044999	5.840	0.0001
ISOLADOS	/2 9	2980.064537	331.118282	2.778	0.0164
Erro	31	3694.935552	119.191469		

Codificação usada para o desdobramento

cod. CONDIÇÃO

- 1 = Aerada
- 2 = Não aerada

Anexo 15 - Análise de variância (ANOVA) para a diferença na média de densidade dos isolados nas condições aerada e não aerada nos dias 0, 10, 20 e 30 do experimento.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
CONDIÇÃO	/1 1	0.173450	0.173450	0.992	0.3208
CONDIÇÃO	/2 1	24.260802	24.260802	138.754	0.0000
CONDIÇÃO	/3 1	27.334198	27.334198	156.332	0.0000
CONDIÇÃO	/4 1	28.867401	28.867401	165.101	0.0000
Erro	160	27.975530	0.174847		

Codificação usada para o desdobramento

cod. DIAS

- 1 = 0
- 2 = 10
- 3 = 20
- 4 = 30

Anexo 16 – Modelo Linear Generalizado mais ajustado com as variáveis utilizadas no processo de biorremediação.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	39.652	5.784	6.856	2.98e-08 ***
Micro.organismos.autóctones - presente	38.731	7.083	5.468	2.64e-06 ***
Aeração - não aerado	-43.667	5.784	-7.550	3.25e-09 ***
Nutrientes - sem	7.278	7.083	1.027	0.31039
Consórcio - presente	21.873	5.784	3.782	0.00051 ***
Micro.organismos.autóctonespresente:Nutrientessem	-14.792	8.179	-1.809	0.07805 .
Aerãonão aerado:Nutrientessem	15.063	8.179	1.842	0.07295 .
Micro.organismos.autóctonespresente:Consórciopresente	-13.885	8.179	-1.698	0.09736 .

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 14.17 on 40 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.7775,

Adjusted R-squared: 0.7386

F-statistic: 19.97 on 7 and 40 DF, p-value: 3.221e-11