

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Aline Daniela Lopes Júlio

**Prospecção e diversidade taxonômica e funcional de comunidades
microbianas associadas a ambientes contaminados com creosoto visando a
formulação de consórcio bacteriano degradador desse composto**

BELO HORIZONTE

2019

Aline Daniela Lopes Júlio

Prospecção e diversidade taxonômica e funcional de comunidades microbianas associadas a ambientes contaminados com creosoto visando a formulação de consórcio bacteriano degradador desse composto

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Vera Lúcia dos Santos

BELO HORIZONTE

2019

043

Júlio, Aline Daniela Lopes.

Prospecção e diversidade taxonômica e funcional de comunidades microbianas associadas a ambientes contaminados com creosoto visando a formulação de consórcio bacteriano degradador desse composto [manuscrito] / Aline Daniela Lopes Júlio. – 2019. 266 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: 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. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos. 4. Biodegradação Ambiental. 5. Consórcios Microbianos. I. Santos, Vera Lúcia dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



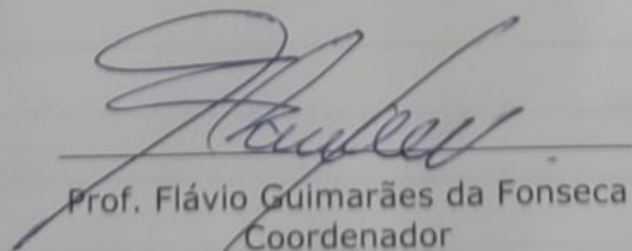
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE ALINE DANIELA LOPES JÚLIO
Nº REGISTRO: 2014767682

Às 13 horas do dia 26 de fevereiro de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta por: Dr.(a) Miriam Cristina Santos Amaral (Dept ENG Sanitária e ambiental/UFMG), Dr.(a) Marcelo de Paula Ávila (Dept de Genética/UFMG), Dr.(a) Mariana de Paula Reis Guimarães (Pesquisadora Cbeih), Dr.(a) Aline Bruna Martins Vaz (Faminas) e a Prof. Vera Lúcia dos Santos (Orientadora) para julgar o trabalho final "**Prospecção e diversidade taxonômica e funcional de comunidades microbianas associadas a ambientes contaminados com creosoto visando a formulação de consórcio bacteriano degradador desse composto**" da aluna Aline Daniela Lopes Júlio requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2019.

Prof(a). Dr(a). Miriam Cristina Santos Amaral Miriam C.S. Amaral
Prof(a). Dr(a). Marcelo de Paula Ávila Marcelo de Paula Ávila
Prof(a). Dr(a). Mariana de Paula Reis Guimarães Mariana de Paula Reis Guimarães
Prof(a). Dr(a). Aline Bruna Martins Vaz Aline Bruna Martins Vaz
Prof(a). Dr(a). Vera Lúcia dos Santos (Orientadora) Vera Lúcia dos Santos


Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu
marido Júlio, os grandes amores da minha
vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Em primeiro lugar e sempre à Deus, por ter me guiado ao longo dessa jornada e ter me dado força e coragem para enfrentar e vencer todas as dificuldades.

À professora Dra. Vera Lucia dos Santos, não só pela orientação, ensinamentos e paciência, mas também pelo carinho, amizade, por estar sempre disposta a me ajudar e apoiar e, principalmente, pela confiança depositada em mim ao longo de todos esses anos me permitindo ser parte da equipe do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA).

Ao Jamil, técnico do Departamento de Bioquímica, mas que na verdade sempre socorre todos nós, nos ajudando e aconselhando de todas as formas possíveis.

Ao Dr. Ubiraci Gomes de Paula Lana, por nos possibilitar analisar o gel de DGGE em seu laboratório na Embrapa Milho e Sorgo.

À Dra Anna Gabriela e Dra Mariana Reis, pelas dicas na realização dos ensaios de qPCR.

À Dra Julliane Dutra Medeiros, Dr. Daniel Kumazawa Moraes e toda equipe de pesquisadores e técnicos do grupo Informática de Biosistemas e Genômica do Centro de Pesquisa René Rachou, pela ajuda tanto na montagem das bibliotecas de amplicons, quanto nas análises metataxonômicas.

À Natália Alves, por ter isolado a maioria dos microrganismos utilizados nesse trabalho e ao Francisco, ambos meus amigos do grupo creosoto com quem compartilhei dúvidas, discussões e que sempre me ajudaram a tomar decisões importantes no desenvolvimento desse projeto.

À minha amiga da metagenômica Ubiana, que eu considero um verdadeiro anjo da guarda, sempre me ajudando nos momentos difíceis, dando força, apoio e me inspirando a ser uma pessoa melhor.

Aos meus alunos de iniciação científica Gustavo, Aline e Henrique, que me ajudaram em diferentes etapas dos experimentos, muitas vezes sacrificando seus próprios planos e projetos para me acompanhar. Sem vocês eu não teria conseguido realizar esse trabalho.

A todos os amigos que fazem parte do LMA por trazerem muita alegria, sorrisos e felicidade para a rotina diária de experimentos, especialmente minhas grandes amigas Débora, Mayara e Daliane. É muito bom poder trabalhar em um ambiente amoroso e rodeado de pessoas tão especiais.

Aos antigos membros do LMA, especialmente Andrea, as Maris, Vítor e Nat. Amigos que o LMA me deu a muitos anos atrás e que mesmo que não estejam mais nele atualmente, ainda fazem parte da minha história, sempre preocupados comigo e dispostos a ajudar e incentivar quando preciso.

A todos os amigos, professores e funcionários do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, que de diferentes formas compartilharam comigo seus

conhecimentos e amizade, fornecendo o ambiente e as condições necessárias para a realização desse trabalho.

Aos meus pais e irmão sempre tão amorosos, sem vocês nenhuma conquista faria sentido. Obrigada por sempre acreditarem, torcerem e muitas vezes se sacrificarem por mim, para me ajudar a realizar todos os meus sonhos.

Ao meu marido Júlio, por ser também o meu melhor amigo e que mesmo diante de suas próprias dificuldades nunca deixou de me apoiar e ajudar em cada minuto e em todas as áreas da minha vida. Obrigado por simplesmente existir.

A todos os meus demais amigos e parentes por sempre me incentivarem, acreditarem e torcerem por mim.

À VALE e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para que esse trabalho pudesse ser realizado.

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

RESUMO

O óleo de creosoto é um líquido oleoso espesso formado a partir do alcatrão de hulha e foi amplamente utilizado como o principal preservante de estruturas de madeira na indústria ao longo de muitas décadas. Devido ao uso indiscriminado, ele foi responsável por contaminações de solos superficiais e águas subterrâneas. Essas áreas contaminadas com creosoto são prioritárias a remediação, porque esse contaminante é constituído por compostos tóxicos, genotóxicos e cancerígenos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos heterocíclicos (hetero-HPAs), compostos fenólicos e benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEXs). Dentre as opções de tratamento de áreas contaminadas, a biorremediação é considerada uma escolha ecologicamente mais sustentável e com melhor custo-benefício. O sucesso do uso da biorremediação é dependente de fatores que bioestimulem a degradação do contaminante pela microbiota local ou da bioaugmentação com inoculantes que possuam mecanismos de tolerância aos contaminantes e altos potenciais catabólicos. As técnicas moleculares vêm se mostrando poderosas ferramentas para conhecer a estrutura das comunidades bacterianas nesses ambientes contaminados, orientando a implementação dos projetos de biorremediação. O objetivo desse trabalho foi estudar o perfil da comunidade bacteriana de amostras de fração líquida de aquífero e sedimentos contaminados com diferentes concentrações de creosoto, quantificar a população de bactérias e arqueas presentes nas mesmas e avaliar bactérias isoladas a partir dos sedimentos quanto à degradação de creosoto para formular um consórcio composto pelos isolados com maior potencial catabólico, além de delinear os fatores e condições necessárias para otimizar a degradação do contaminante em microcosmos com amostras da área. Para o estudo, foram coletadas 8 amostras da fração líquida do aquífero e 5 amostras de sedimentos em uma área na qual funcionava uma antiga estação de tratamento e manutenção de dormentes (ETD) da ferrovia Vitória/Minas, localizada no município de João Neiva/ES. O perfil da comunidade de bactérias das amostras da fração líquida do aquífero foi analisado por Reação em Cadeia de polimerase-Eletroforese em gel com Gradiente Desnaturante (PCR-DGGE) e por meio da construção de bibliotecas de amplicons de rRNA 16S e seqüenciamento na plataforma IlluminaMiseq (metataxonômica). Em ambas, os perfis da comunidade se mostraram distintos entre as amostras e influenciados pela presença dos contaminantes, sendo possível observar uma diferenciação mais profunda entre o perfil das amostras sem contaminação e duas das amostras com concentrações mais altas dos contaminantes. A partir das análises metataxonômicas foi observado também a correlação negativa entre a alfa diversidade das amostras e a concentração dos contaminantes e o enriquecimento de alguns táxons nas amostras com altos níveis de contaminação, com destaque para as famílias Porphyromonadaceae, Gemmataceae e Comamonadaceae e os gêneros *Treponema*, *Geobacter*, *Bdellovibrio*, *Hydrocarboniphaga*, *Anaerolinea*, *Paulidibacter*, *Comamonas* e *Desulfomonille*. A quantificação das bactérias e arqueas nessas amostras, por PCR quantitativo em tempo real (qPCR), mostrou que as bactérias são numericamente dominantes em relação às arqueas e que duas amostras com altos níveis de contaminação possuem uma densidade significativamente menor que as demais. Os perfis das amostras de sedimentos também foram distintos de acordo com a técnica de PCR-DGGE e foi possível observar a influência dos metadados no agrupamento delas, com a separação da estrutura das 2 amostras com os maiores níveis de contaminação em relação à demais. Por meio das análises metataxonômicas também foi possível observar a influência negativa dos contaminantes em relação à riqueza e diversidade de bactérias, assim como alteração do perfil da comunidade bacteriana devido ao enriquecimento de táxons específicos na amostra com alta contaminação. Dentre esses táxons enriquecidos destaca-se representantes da classe

Gammaproteobacteria, do filo Acidobacteria, principalmente as famílias Koribacteraceae, Thermodesulfobacteriaceae, e o gênero *Candidatus Koribacter*. O uso da ferramenta PICRUSt permitiu prever a presença de genes e vias relacionados direta ou indiretamente à degradação de hidrocarbonetos, além de genes relacionados a vias que favorecem a sobrevivência desses microrganismos em condições de campo. A quantificação por qPCR demonstrou que não houve variação estatística na densidade de células bacterianas entre as amostras de sedimentos e não foi detectada a presença de arqueas. Um total de 51 bactérias, a maioria isolada a partir das amostras de sedimentos, foram identificadas e avaliadas quanto à degradação do creosoto em MMM suplementado com esse composto a 0,25% (v/v). De modo geral, todos os isolados foram capazes de degradar em alguma extensão pelo menos 1 constituinte do creosoto e 27 foram capazes de degradar em alguma extensão os 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto em estudo. Os melhores resultados de degradação foram obtidos para os isolados *Comamonas terrigena* (3FM6, 3FM8, 3FM9), *Springobacterium sp.* (1FM2, 5FM2), *Bacillus sp.* (2FM2, LAPM39), *Pseudomonas sp.* 3C10M3, *Acinetobacter junii* LAPM30, *Pseudomonas plecoglossicida* 3FM5, *Bacillus subtilis* LAPER93, *Stenotrophomonas maltophilia* LAPER27 e *Enterobacter sp.* 4FM2. Esses melhores isolados foram avaliados quanto à remoção do contaminante em amostras de sedimento provenientes da área de estudo e contaminados com 1% de creosoto (v/v). Através dessa etapa determinou-se que o consórcio seria composto por *S. maltophilia* LAPER27, *C. terrigena* 3FM8, *Springobacterium sp.* 5FM2, *Pseudomonas sp.* 3C10M3, *Bacillus sp.* (2FM2, LAPM39), *B. subtilis* LAPER93 e *Enterobacter sp.* 4FM2. Após essa seleção, procedeu-se a remediação de amostras de 300 g dos sedimentos contaminados com 0,25% (v/v) de creosoto em condições de bioestimulação, com variação dos fatores aeração, nutrientes e presença da microbiota autóctone, bioaugmentação ou não com o consórcio e atenuação natural em ensaios de microcosmo por um período de 60 dias. Através das análises estatísticas foi possível confirmar que a adição do consórcio e a presença de microrganismos autóctones na amostra (não esterilização) afetaram de forma positiva e significativa a degradação de creosoto. Entretanto, a única interação significativa foi entre os fatores esterilização + consórcio + aeração, ou seja, apesar de individualmente a aeração não influenciar significativamente a biorremediação ela se mostrou significativa na presença desses outros dois fatores. Os melhores tratamentos, predominantemente aqueles nos quais haviam essas condições, promoveram os maiores valores médios de degradação do contaminante, acima de 90%. Os resultados obtidos demonstram que a área em estudo é candidata a remediação baseada em microrganismos por meio de bioestimulação, uma vez que apresenta bactérias com alto potencial catabólico tanto na fração líquida de aquífero quanto no sedimento da lagoa. Porém destaca-se a significância e o aumento na degradação média de creosoto em todos os tratamentos nos quais houve a bioaugmentação com o consórcio desenvolvido, inclusive naqueles onde havia a presença dos microrganismos autóctones, o que sugere que o inoculante é capaz de otimizar ainda mais o processo de biorremediação. Assim, sugerimos o uso dessas condições para a biorremediação *in situ* da área da ETD contaminada com creosoto.

Palavras-chave: creosoto; biodegradação; consórcio microbiano; metataxonômica.

ABSTRACT

Creosote oil is a thick oily liquid formed from coal tar and has been widely used as the main preservative of wood structures in the industry for many decades. Due to the indiscriminate use, it was responsible for contaminations of surface soils and groundwater. These contaminated areas are a priority for remediation, because this contaminant consists of toxic, genotoxic and carcinogenic compounds such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons (hetero-PAHs), phenolic compounds and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEXs). Among the treatment options for contaminated areas, bioremediation is considered to be an ecologically more sustainable and cost-effective choice. The success of the use of bioremediation is dependent on factors that bioestimate contaminant degradation by the local microbiota or bioaugmentation with inoculants that have mechanisms of tolerance to contaminants and high catabolic potentials. Molecular techniques have been shown to be powerful tools to know the structure of bacterial communities in these contaminated environments, guiding the implementation of bioremediation projects. The objective of this work was to study the bacterial community profile of aquifer liquid fraction and sediment samples contaminated with different creosote concentrations, to quantify the population of bacteria and archaea present in them and to evaluate bacteria isolated from the sediments for degradation of creosote to formulate a consortium composed of the isolates with greater catabolic potential, besides delineating the factors and conditions necessary to optimize the contaminant degradation in microcosmos with samples of the area. For the study, 8 samples of the aquifer liquid fraction and 5 sediment samples were collected in an area where an old old sleeper's treatment and maintenance station (STS) of the Vitória/Minas railway it worked, located in the municipality of João Neiva/ES. The bacterial community profile of the aquifer liquid fraction samples was analyzed by Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR - DGGE) and by the construction of 16S rRNA amplicon libraries and sequencing on the IlluminaMiseq platform (metataxonomic analyzes). In both, the profiles of the community were different between the samples and influenced by the presence of the contaminants, being possible to observe a deeper differentiation between the profiles of the samples without contamination and two of the samples with higher concentrations of the contaminants. From the metataxonomic analyzes it was also observed the negative correlation between the alpha diversity of the samples and the concentration of the contaminants and the enrichment of some taxa in the samples with high levels of contamination were also observed, especially the families Porphyromonadaceae, Gemmataceae and Comamonadaceae, and the genera *Treponema*, *Geobacter*, *Bdellovibrio*, *Hydrocarboniphaga*, *Anaerolinea*, *Paulidibacter*, *Comamonas* and *Desulfomonille*. The quantification of bacteria and archaea in these samples by Quantitative Real-Time PCR (qPCR) showed that the bacteria are numerically dominant in relation to archaea, and that two samples with high levels of contamination have a density significantly lower than the others. The profiles of the sediment samples were also different according to the PCR-DGGE technique and it was possible to observe the influence of the metadata in the grouping of them, with the separation of the structure of the 2 samples with the highest levels of contamination in relation to the others. Through the metataxonomic analyzes, it was also possible to observe the negative influence of the contaminants in relation to the richness and diversity of bacteria, as well as alteration of the profile of the bacterial community due to the enrichment of specific taxa in the sample with high contamination. Among these enriched taxa stands out representatives of the Gammaproteobacteria class, of the Acidobacteria phylum, mainly the families Koribacteraceae, Thermodesulfobacteriaceae, and the genus *Candidatus Koribacter*. The use of the PICRUST tool allowed to predict the

presence of enzymes and pathways related directly or indirectly to the degradation of hydrocarbons, as well as enzymes related to pathways that favor the survival of these microorganisms under field conditions. The quantification by qPCR showed that there was no statistical variation in bacterial cell density between the sediment samples and the presence of archaea was not detected. A total of 51 bacteria, most isolated from the sediment samples, were identified and evaluated for creosote degradation in MMM supplemented with this compound at 0.25% (v/v). In general, all isolates were able to degrade to some extent at least 1 creosote constituent and 27 isolates were able to degrade to some extent the 12 compounds present at the highest concentration in the creosote under study. The best degradation results were obtained for the isolates *Comamonas terrigena* (3FM6; 3FM8, 3FM9), *Springobacterium sp.* (1FM2; 5FM2), *Bacillus sp.* (2FM2, LAPM39), *Pseudomonas sp.* 3C10M3, *Acinetobacter junii* LAPM30, *Pseudomonas plecoglossicida* 3FM5, *Bacillus subtilis* LAPER93, *Stenotrophomonas maltophila* LAPER 27 and *Enterobacter sp.* 4FM2. These best isolates were evaluated for contaminant removal in sediment samples from the study area and contaminated with 1% creosote (v/v). Through this step it was determined that the consortium would be composed of *S. maltophilla* LAPER27, *C. terrigena* 3FM8, *Springobacterium sp.* 5FM2, *Pseudomonas sp.* 3C10M3, *Bacillus sp.* (2FM2, LAPM39), *B. subtilis* LAPER93 and *Enterobacter sp.* 4FM2. After this selection, 300 g of the creosote contaminated sediments samples 0.25% (v/v) were biostimulated under different conditions of aeration, nutrients and presence of the autochthonous microbiota, bioaugmentation or not with the consortium and natural attenuation in microcosm assays for a period of 60 days. Through the statistical analyzes it was possible to confirm that the addition of the consortium and the presence of autochthonous microorganisms in the sample (non-sterilization) positively and significantly affected creosote degradation. However, the only significant interaction was between the factors sterilization + consortium + aeration, so although the aeration alone did not significantly influence the bioremediation, it was significant in the presence of these other two factors. The best treatments, predominantly those in which they had these conditions, promoted the highest average values of contaminant degradation, above 90%. The results obtained demonstrate that the study area is a candidate for remediation based on microorganisms by biostimulation, since it presents bacteria with high catabolic potential both in the liquid fraction of aquifer and in the sediment of the lagoon. However, the significance and increase in the mean creosote degradation in all the treatments in which there was a bioaugmentation with the consortium developed, including those where the autochthonous microorganisms was present, suggests that the inoculant is able to optimize even more the bioremediation process. Thus, we suggest the use of these conditions for *in situ* bioremediation of the creosote-contaminated STS area.

Keywords: creosote; biodegradation; microbial consortium; metataxonomics.

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1:** Gráfico demonstrando a porcentagens dos HPAS predominantemente encontrados na composição do creosoto (Adaptado de Jurys et al., 2013).....29
- Figura 2:** Estruturas dos 16 HPAS definidos como poluentes prioritários pela EPA (United States Environmental Protection Agency).....31
- Figura 3:** Conversão de compostos aromáticos oxidados ao A) catecol e B) protocatecoato, um dos intermediários centrais da via aeróbica de degradação desses compostos (adaptado de Harwood & Parales)38
- Figura 4:** Vias de orto e meta clivagem de degradação aeróbia de compostos aromáticos (adaptado de Fritsche & Hofrichter, 2000).....39
- Figura 5:** Estruturas químicas dos compostos BTEXS: Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos.....39
- Figura 6:** Etapas iniciais da degradação de HPAS (adaptado de Bamforth & Singleton, 2005).....41
- Figura 7:** (A) via de degradação do naftaleno; (B) via de degradação do fenantreno; (C) Via de degradação do antraceno (adaptado de Habe & Omori, 2003; Moody et al., 2001; Peng et al., 2008)..... 43
- Figura 8:** Vias de degradação do pireno (adaptado de Habe & Omori, 2003).....44
- Figura 9:** Estrutura química do Carbazol, Dibenzotiofenos (DBT) e Dibenzofuranos (DBF) (Apaptado de Nojiri et al., 2001).....45
- Figura 10:** Via geral de degradação do carbazol (Adaptado de Xu et al., 2006).....46
- Figura 11:** Vias de degradação de Dibenzofuranos (DBF) a) Dioxigenação angular, b) Dioxigenação lateral (Adaptado de Xu et al., 2006).....48
- Figura 12:** Via Kodama de degradação de DBT (Adaptado de Gupta et al., 2005).....49
- Figura 13:** Relação entre a concentração de CAS, tensão superficial e formação de micelas. Adaptado de Pacwa-Plóciniczak et al., 2011.....51
- Figura 14:** Imagem de satélite da Estação de Tratamento e Manutenção dos Dormentes (ETD) da ferrovia Vitória/Minas e um diagrama da localização dos poços nos quais as amostras foram coletadas e que estão circulados em vermelho. PP203 (H1); PP206 (H2); PM 211 (H3); PP20 (H4); PP29 (H5); PP207 (H6); PP223 (H7) e PM208 (H8).....68
- Figura 15:** Frascos tipo Schott utilizados para o acondicionamento das amostras de sedimentos nos experimentos de biorremediação A) sem aeração; B) com aeração.....85
- Figura 16:** Estrutura montada para a aeração dos frascos utilizados para o experimento de biorremediação do sedimento por meio de um compressor de ar.....85

Figura 17: Agrupamento dos 8 pontos da fração líquida do aquífero amostrados considerando os dados físico-químicos de concentração de COV e COSV por meio de ACP usando o software Past.....	91
Figura 18: Dendrograma representativo das comunidades bacterianas presentes em amostras das frações líquidas do aquífero, construído a partir da matriz de similaridade do perfil de bandas das amostras observada na DGGE gerada utilizando coeficiente de Jaccard.....	93
Figura 19: Análise de NMDS da matriz de presença e ausência gerada a partir do perfil de bandas de cada amostra no DGGE em função dos metadados.....	94
Figura 20: Padrão de bandas obtidos pela técnica de DGGE a partir das amostras de frações líquidas do aquífero. As letras M, nas extremidades, correspondem aos marcadores, cada amostra avaliada está identificada pelo seu código e as bandas excisadas e identificadas estão numeradas.....	96
Figura 21: Curvas de rarefação geradas a partir do número de OTUs observados em função dos reads seqüenciados para cada amostra da fração líquida do aquífero usando o programa Sigma Plot. B) Cobertura de seqüenciamento de cada amostra de fração líquida do aquífero usando o programa Sigma Plot.....	98
Figura 22: Gráfico Biplot da análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades bacterianas das amostras das frações líquidas do aquífero. A) similaridade da comunidade de bactérias usando métrica unifrac ponderada, B) similaridade da comunidade de bactérias usando métrica unifrac não ponderada. Os círculos claros correspondem às OTUs que mais contribuíram para o padrão de agrupamento.....	102
Figura 23: Abundância relativa de (A) Filos; (B) Classes; e (C) Famílias de bactérias nas oito amostras de fração líquida do aquífero. Os táxons presentes em pelo menos uma amostra com abundância relativa maior que 2% foram considerados.....	105
Figura 24: <i>Network</i> comparando os gêneros de bactérias dominantes (>0.5%) detectados nas amostras da fração líquida do aquífero. As amostras do aquífero estão representadas por códigos: (PP203=NC1), (PP207=NC2), (PM208=NC3) que correspondem aos círculos verdes; (PP29=LC1), (PP223=LC2) que correspondem aos círculos amarelos e (PP20=HC1), (PP206=HC2), (PM211=HC3) que correspondem aos círculos vermelhos. Os <i>taxa</i> estão representados pelos círculos laranja. O tamanho dos nós é proporcional a abundância relativa acumulada de cada <i>taxon</i> considerando todas as amostras e, ao contrário, a espessura da aresta conectando as amostras e os <i>taxa</i> é proporcional à abundância relativa desse <i>taxa</i> em cada amostra especificamente.....	106
Figura 25: Gráfico Volcano apresentando as OTUs das comunidades bacterianas do grupo de amostras sem contaminação dos compostos de interesse comparadas com as amostras com alta contaminação desses compostos. Os <i>taxa</i> diferentes entre esses grupos de amostras são mostrados acima da linha, que corresponde a um p-valor <0,05 no eixo Y e o eixo X exibe as mudanças nas abundâncias das OTUs entre as condições. A análise de significância da abundância relativa dos <i>taxa</i> foi realizada usando o pacote EdgeR no programa R.....	108

Figura 26: Análise de NMDS da composição da comunidade bacteriana das amostras da fração líquida do aquífero em função dos metadados.....	109
Figura 27: Análise de Redundância (RDA) da comunidade de bactérias nas amostras no nível de A) Filo, B) Classe, C) Família e D) Gêneros em função dos metadados. Os táxons presentes são representados pelas cruzes e apenas aqueles que apresentaram forte correlação com os metadados foram plotados.....	111
Figura 28: A) Proporção de vias metabólicas previstas nos poços, categorizadas em grupos de acordo com suas funções; B) Proporção de vias de biodegradação xenobiótica e outras vias de degradação dentro da categoria de metabolismo nos poços; e C) Proporção de genes relacionados à degradação de compostos aromáticos nos poços.....	115
Figura 29: Curvas padrões, gráficos de amplificação e curvas de melting gerados em ensaios de PCR quantitativo em tempo real para quantificação do número de cópias de rRNA 16S de A) bactérias e B) arqueas, nas amostras de fração líquida do aquífero.....	122
Figura 30: Agrupamento obtido das 5 amostras de sedimentos coletadas considerando os dados físico-químicos mensurados, por meio de ACP usando o software Past.....	129
Figura 31: A) Curvas de rarefação geradas a partir do número de OTUs observados em função dos reads seqüenciados para cada amostra de sedimento usando o programa Sigma Plot. B) Cobertura de seqüenciamento de cada amostra de sedimento usando o programa Sigma Plot.....	130
Figura 32: Análise de Coordenadas principais (PCoA) das comunidades bacterianas das amostras de sedimento usando a métrica unifrac ponderada.....	114
Figura 33: Abundância relativa de (A) Filos; (B) Classes; e (C) Famílias de bactérias nas três amostras de sedimento. Os táxons presentes em pelo menos uma amostra com abundância relativa maior que 1% foram considerados.....	132
Figura 34: A) Proporção de vias metabólicas preditas nas amostras de sedimentos, categorizadas em grupos de acordo com suas funções; B) Proporção de vias de biodegradação xenobiótica e outras vias de degradação dentro da categoria de metabolismo nos poços; e C) Proporção de genes relacionados à degradação de compostos aromáticos nos poços.....	134
Figura 35: Dendrograma representativo das comunidades bacterianas presentes em amostras de sedimentos, construído a partir da matriz de similaridade do perfil de bandas das amostras no DGGE gerada pelo coeficiente de Jaccard.....	136
Figura 36: Análise de NMDS da matriz de presença e ausência gerada a partir do perfil de bandas das amostras do sedimento no DGGE em função dos metadados.....	141
Figura 37: Padrão de bandas obtidos pela técnica de DGGE a partir dos fragmentos rRNA 16S das amostras de sedimentos. As letras M, nas extremidades, correspondem aos marcadores, cada amostra avaliada está identificada pelo seu código e as bandas excisadas e identificadas estão numeradas.....	143

- Figura 38:** Valores médios de degradação do creosoto suplementado em meio mineral a 0,25% (v/v), obtidos pelos isolados avaliados e agrupados em grupos estatisticamente distintos utilizando o teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$). Grupo 1 (vermelho), Grupo 2 (verde), Grupo 3 (azul).....155
- Figura 39:** Valores médios de degradação conjunta dos 12 principais hidrocarbonetos presentes na nossa amostra de creosoto, agrupados em grupos estatisticamente distintos utilizando o teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$). Grupo 1 (vermelho), Grupo 2 (verde), Grupo 3 (azul) e Grupo 4 (amarelo).....158
- Figura 40:** Porcentagem média de degradação dos 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto, independente do isolado, e o número de isolados que conseguiram degradar o composto.....160
- Figura 41:** Quantidade de isolados de cada gênero que degradaram cada um dos 12 presentes em maior concentração no creosoto analisados.....161
- Figura 42:** Perfil de degradação dos 12 principais compostos presentes no creosoto por todos os isolados, obtido por ACP.....162
- Figura 43:** Perfil de degradação dos isolados em relação aos 12 principais compostos presentes no creosoto obtido por ACP. Os isolados marcados são os que representam os melhores valores de degradação considerando as duas componentes.....163
- Figura 44:** Valores médios do crescimento dos isolados em meio mineral suplementado com creosoto 0,25% (v/v) determinados por leituras de densidade ótica a 600nm e agrupados em grupos estatisticamente distintos utilizando o teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$). Grupo 1 (vermelho), Grupo 2 (verde), Grupo 3 (azul) e Grupo 4 (amarelo).....165
- Figura 45:** Valores médios de degradação do creosoto total adicionado na matriz do sedimento a 1%, obtidos pelos isolados avaliados.....167
- Figura 46:** Densidade da comunidade de bactérias (UFC g^{-1}) nos diferentes tratamentos de biorremediação de sedimento contaminado com creosoto (0,5%) ao longo dos tempos de incubação (0, 20, 40 e 60 dias).....172
- Figura 47:** A) Variação do crescimento das bactérias em função dos fatores esterilidade e adição de nutrientes e B) esterilidade e adição do consórcio. Mesma letra maiúscula indica igualdade de médias em função da esterilização e mesma letra minúscula indica igualdade de médias em função da adição de nutrientes ou consórcio.....173
- Figura 48:** Variação na remoção do creosoto em função dos fatores esterilização, aeração e adição de consórcio fixando o fator adição do consórcio. A) variação da esterilização em função da aeração na presença do consórcio e em B) variação da esterilização em função da aeração na ausência do consórcio. Mesma letra maiúscula indica igualdade de médias em função da aeração e mesma letra minúscula indica igualdade de médias em função da esterilização.....174
- Figura 49:** Porcentagem de remoção de creosoto nos diferentes tratamentos de biorremediação de sedimento contaminado (0,5%) ao longo dos tempos de incubação (10, 20, 30, 40 e 60 dias).....175

Figura 50: Densidade da comunidade de bactérias heterotróficas totais e degradadora de creosoto, na amostra de sedimento original e nos tratamentos de biorremediação após os 60 dias de incubação, determinadas pela técnica de NMP.....178

Figura 51: Padrão de utilização de carboidratos, polímeros, compostos fenólicos, aminas/amidas, aminoácidos e ácidos acéticos carboxílicos, avaliado pela medida do crescimento celular (densidade ótica 590 nm) de amostras coletadas nos tempos 0 e 60 dias dos microscomos. A) Trat 5: Consórcio + nutrientes + microbiota autóctone + aeração; B) Trat 6: Consórcio + nutrientes + microbiota autóctone; C) Trat 9: Consórcio + microbiota autóctone + aeração e D) Trat 10: Consórcio + microbiota autóctone.....182

Figura 52: A) Curvas de rarefação geradas a partir do número de OTUs observados em função dos reads seqüenciados para cada amostra. Amostras com código C correspondem aos tratamentos antes da incubação (t=0) e amostras com o código T correspondem aos tratamentos de biorremediação após a incubação (t=60).....183

Figura 53: Gráfico Biplot da análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades bacterianas dos tratamentos de biorremediação usando métrica unifrac ponderada.....186

Figura 54: Gráfico Biplot da análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades bacterianas dos tratamentos de biorremediação usando métrica unifrac não ponderada.....186.

Figura 55: Abundância relativa de (A) Filos; (B) Classes, (C) Famílias e (D) Gêneros presentes nas amostras dos tratamentos de biorremediação. Os táxons presentes em pelo menos uma amostra com abundância relativa maior que 0,5% foram considerados.190

LISTAS DE TABELAS

- Tabela 1:** Relação dos poços selecionados para coleta das amostras utilizadas no estudo, agrupados em função da concentração de COSV.....67
- Tabela 2:** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar o gene rDNA 16S para uso na técnica de PCR-Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE).....69
- Tabela 3:** Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar o gene rRNA 16S de bactérias e arqueas na técnica de qPCR.....74
- Tabela 4:** Descrição dos 16 diferentes tratamentos utilizados para estudar a biorremediação de creosoto no sedimento em função da combinação dos parâmetros: esterilização, aeração, bioaumentação e bioestimulação, com o código que será utilizado para descrevê-los ao longo do trabalho.....83
- Tabela 5:** Resultados das análises físico químicas dos oito pontos da fração líquida do aquífero amostrados.....90
- Tabela 6:** Identificação molecular das bandas excisadas do gel de DGGE das amostras da fração líquida do aquífero, quando comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank.....96
- Tabela 7:** Número de reads que puderam ser atribuídos a alguma OTU, número de OTUs observados, estimadores de riqueza e índices de diversidade calculados para a comunidade de bactérias das amostras da fração líquida do aquífero.....100
- Tabela 8:** P-valor e coeficientes de correlação de Spearman obtidos nas análises de correlação entre índices de diversidade e concentração de HPAs.....101
- Tabela 9:** Seleção e abundância relativa de algumas enzimas preditas envolvidas na degradação de compostos aromáticos que foram enriquecidos no metagenoma dos poços contaminados.....118
- Tabela 10:** Equações das curvas-padrão, valores de “slope”, coeficiente de determinação (r^2) e eficiência das reações de quantificação de bactérias e arqueas nas amostras de fração líquida do aquífero, por meio de qPCR.....121
- Tabela 11:** Número de Cópias do gene rRNA 16S e de células bactérias e arqueas por mL das amostras de fração líquida do aquífero, quantificados por meio de qPCR.....124
- Tabela 12:** Resultados das análises físico-químicas das cinco amostras de sedimentos em estudo.....127
- Tabela 13:** Número de reads que puderam ser atribuídos a alguma OTU, número de OTUs observados, estimadores de riqueza e índices de diversidade calculados para a comunidade de bactéria das amostras da fração líquida do aquífero.....133
- Tabela 14:** Seleção e abundância relativa de algumas proteínas preditas envolvidas na degradação de compostos aromáticos que foram enriquecidos no metagenoma dos poços contaminados.....135

Tabela 15: Identificação molecular das bandas excisadas do gel de DGGE das amostras de sedimentos, quando comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank.....	148
Tabela 16: Número de Cópias do gene rRNA 16S e de células bactérias e archaeas por grama das amostras de sedimentos, quantificados por meio de qPCR.....	149
Tabela 17: Identificação das bactérias isoladas a partir das amostras de sedimentos por meio da técnica de enriquecimento.....	151
Tabela 18: Crescimento dos isolados (UFC/g ⁻¹) no tempo 0 e após 30 dias de incubação em amostras de sedimento contaminado com creosoto (1%).....	166
Tabela 19: Resultados das análises físico-químicas da amostra de sedimento original e após a adição de nutrientes e contaminante, utilizadas nos ensaios de biorremediação em microcosmo.....	170
Tabela 20: Densidade bacteriana (UFCg ⁻¹) nos diferentes tratamentos de biorremediação de sedimento contaminado com creosoto (0,5%) nos tempos 0, 20, 40 e 60 dias.....	170
Tabela 21: Reduções de ordem de grandeza e proporção de bactérias degradadoras de creosoto (0,5%) em relação às bactérias heterotróficas totais na amostra de sedimento original (t=0) e nos diferentes tratamentos de biorremediação após 60 dias de incubação.....	179
Tabela 22: Coeficientes angulares das equações das retas obtidas pelas plotagens dos valores de densidade ótica a 590 nm de cada um dos grupos de compostos em função do tempo nos tratamentos de biorremediação 5,6, 9, e 10 a 0 e 60 dias de incubação.....	181
Tabela 23: Número de reads que puderam ser atribuídos a alguma OTU, número de OTUs observados, estimadores de riqueza e índices de diversidade calculados para a comunidade de bactéria das amostras dos tratamentos de biorremediação.....	184

LISTAS DE ANEXOS

- Anexo 1:** CP loadings, evidenciando A) a contribuição (coeficientes) e B) correlação de cada um dos contaminantes para com as componentes principais 1 e 2, na ACP realizada para agrupar as amostras da fração líquida do aquífero em função da concentração desses contaminantes.....233
- Anexo 2:** Agrupamento obtido dos 8 pontos da fração líquida do aquífero amostrados, após os dados de COV e COSV mensurados para as amostras terem sido agrupados em função do número de anéis, por meio de ACP.....234
- Anexo 3:** Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman obtidos na análise de correlação entre os parâmetros, abundância, riqueza e diversidade de OTUS calculados para as amostras de fração líquida do aquífero, a partir dos resultados das análises metataxonômicas, e os metadados.....234
- Anexo 4:** Curvas de amplificação das amostras de fração líquida do aquífero para quantificação de A) bactérias e B) arqueas.....235
- Anexo 5:** Análise de variância (ANOVA) para a densidade de bactérias nas amostras de fração líquida de aquífero determinadas pela técnica de PCR quantitativo em tempo real.....235
- Anexo 6:** CP loadings, evidenciando A) a contribuição (coeficientes) e B) correlação de cada um dos parâmetros físico-químicos para com as componentes principais 1 e 2, na ACP realizada para agrupar as amostras dos sedimentos em função desses metadados.....235
- Anexo 7** Seleção e abundância relativa de algumas enzimas preditas no metagenoma das amostras de sedimento envolvidos.....237
- Anexo 8:** Curvas de amplificação para quantificação de bactérias nas amostras de sedimentos.....241
- Anexo 9:** Análise de variância (ANOVA) para a degradação média total do creosoto pelos isolados selecionados.....241
- Anexo 10:** Análise de variância (ANOVA) para a degradação conjunta dos 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto usado nos ensaios pelos isolados selecionados.....241
- Anexo 11-** Perfil de degradação dos 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto usado nos ensaios pelas bactérias isoladas das amostras de sedimento.....242
- Anexo 12:** Análise de variância (ANOVA) para a degradação individual dos 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto usado nos ensaios pelos isolados selecionados.....243
- Anexo 13:** CP loadings, evidenciando a contribuição (coeficientes) dos isolados para com as componentes principais 1 e 2, na ACP realizada para agrupar os 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto em função de sua degradação média pelo isolados selecionados.....246

Anexo 14: CP loadings, evidenciando a A) contribuição (coeficientes) e B) correlação dos os 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto para com as componentes principais 1 e 2, na ACP realizada para agrupar os isolados selecionados em função da degradação média desses 12 compostos.....	247
Anexo 15: Análise de variância (ANOVA) para o crescimento dos isolados em meio mineral suplementado com creosoto 0,25% (v/v), avaliado por meio de leituras de Densidade ótica a 600 nm.....	247
Anexo 16: Análise de variância (ANOVA) para a degradação de creosoto usado na matriz de sedimento pelos isolados selecionados.....	248
Anexo 17: Análise de variância (ANOVA) por meio de modelos lineares generalizados (GLM) utilizando o teste F em nível de significância de 5% para avaliar se os fatores presença de microrganismos autóctones na amostra (sedimento não esterilizado), adição de consórcio, nutrientes e aeração afetaram significativamente o crescimento dos isolados em ensaios de biorremediação em microcosmo na matriz de sedimento avaliado por meio de contagens e cálculo de UFC g ⁻¹	248
Anexo 18: Análise de variância (ANOVA) por meio de modelos lineares generalizados (GLM) utilizando o teste F em nível de significância de 5% para avaliar se os fatores presença de microrganismos autóctones na amostra (sedimento não esterilizado), adição de consórcio, nutrientes e aeração afetaram significativamente a degradação de creosoto (%) em ensaios de biorremediação em microcosmo na matriz de sedimento avaliado por meio de cromatografia gasosa.....	250

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

MMB - Meio Mineral para Bactérias

μL - microlitro

CAS - Compostos Ativos de Superfície

nm - nanômetro

DO₆₀₀ - densidade ótica a 600 nm

rpm- rotações por minuto

g - gravidade

HPA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

h - hora

min - minuto

seg - segundo

mg - miligrama

mg mL⁻¹ - miligrama por mililitro

°C - grau Celsius

pH - potencial hidrogeniônico

v/v - volume por volume

g/v- grama por volume

pmol - picomol

p - p valor

hetero-HPAS - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos Heterocíclicos

BTEXs - Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos

EPA - United States Environmental Protection Agency

DGGE - Eletroforese em gel com gradiente desnaturante

CETESB - Companhia Ambiental Do Estado De São Paulo

NAPLs - Líquidos de fase não aquosa

DNAPLs - Líquidos densos não-aquosos

LNAPL - Líquidos leves de fase não aquosa

VRQ - Valor de referência de qualidade

VP - Valor de prevenção

VI - Valor de intervenção

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

NDO - Naftaleno Dioxigenase

DBF- Dibenzofuranos

DBT - Dibenzotiofenos

CMC - Concentração micelar critica

qPCR - PCR quantitativo em tempo real

COSV - Compostos orgânicos semi-voláteis

ETD - Estação de tratamento de dormentes
COV - Componentes orgânicos voláteis
RDA - Análise de redundância
OTUS - Unidades Taxonomicas Operacionais
ACP- Análise de componentes principais
CP- Componentes principais
PCoA - Análise de Coordenadas Principais
nMDS - Escalonamento multidimensional não métrico
CG-EM - Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa
UFC – Unidades Formadoras de Colônias
NMP – Número Mais Provável
rRNA 16S – RNA ribossomal 16S
NGS – Sequenciamento de Nova Geração
ACP - Análise Multivariada de Componentes Principais
KO - KEGG Orthology
PICRUSt - Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States
NSTI - Nearest Sequenced Taxon Index
COT - Carbono Orgânico Total
EDTA - Ácido Etilenodiaminotetracético
TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA
ANOVA - Análise de Variância
GLM – Modelos Lineares Generalizados
TTC - 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio
INT - Iodo Nitro Tetrazólio
HTP - Hidrocarbonetos Totais de Petróleo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1) Utilização de creosoto e a contaminação ambiental	27
2.2) Biorremediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos	32
2.3) Vias de degradação microbiana de hidrocarbonetos aromáticos em geral	37
2.4) Vias de degradação de HPAs	40
2.4.1) Via de degradação do naftaleno, fenantreno e antraceno.....	42
2.4.2) Via de degradação do pireno.....	44
2.5) Vias de degradação microbiana de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos heterocíclicos (hetero-HPAS)	44
2.6) Compostos ativos de superfície (CAS).....	49
2.7) Prospecção bacteriana de enzimas degradativas e vias de degradação de HPAs ...	53
2.8) Estudo de comunidades microbianas de ambientes contaminados através de técnicas moleculares.....	54
2.8.1) Utilização de abordagens genômicas para o estudo e predição de vias de degradação de HPAs	55
2.8.2) PCR-DGGE- Eletroforese em gel com gradiente desnaturante, importante abordagem para monitoramento de estruturas de comunidades microbianas	57
2.8.3) Abordagens metagenômicas	58
2.8.3.1) Análises metataxonômicas	60
3. JUSTIFICATIVA	62
4. OBJETIVOS.....	64
4.1) Geral.....	64
4.2) Específicos	64
Parte 1. Estudo da diversidade de bactérias presentes em amostras de fração líquida de aquífero contaminadas com diferentes concentrações de creosoto, utilizando abordagens independentes de cultivo.	64
Parte 2. Estudo da diversidade e prospecção de bactérias presentes em sedimentos contaminados com diferentes concentrações de creosoto utilizando abordagens dependentes e independentes de cultivo	65
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
Parte 1. Estudo da diversidade de bactérias presentes em amostras de fração líquida de aquífero contaminadas com diferentes concentrações de creosoto, utilizando abordagens independentes de cultivo.	66
5.1) Área de coleta e amostragem	66
5.2) Pontos amostrados e análises físico-químicas das amostras.....	67
5.3) Extração de DNA metagenômico das amostras.....	68
5.4) Análises de PCR-Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR DGGE)..	68
5.5) Análises metataxonômicas das amostras.....	69
5.5.1) Montagem da biblioteca de “amplicons” e sequenciamento.....	69
5.5.2) Análise das sequências	71
5.5.3) Análises estatísticas.....	71
5.6) Quantificação da comunidade de bactérias e arqueas por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	72

Parte 2. Estudo da diversidade e prospecção de bactérias presentes em sedimentos contaminados com diferentes concentrações de creosoto utilizando abordagens dependentes e independentes de cultivo	75
5.1) Área de coleta e amostragem	75
5.2) Análises físico-químicas das amostras.....	75
5.3) Extração de DNA metagenômico das amostras.....	76
5.4) Análises de PCR-Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE).....	76
5.5) Análises metataxonômicas das amostras	76
5.6) Quantificação da comunidade de bactérias e arqueas por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	77
5.7) Caracterização do potencial catabólico de bactérias isoladas do sedimento	77
5.8) Identificação dos isolados bacterianos por métodos moleculares.....	77
5.8.1) Extração de DNA	78
5.8.2) Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) de regiões do gene do rRNA 16S ...	78
5.8.3) Purificação dos “amplicons”	79
5.8.4) Reação de sequenciamento	79
5.9) Caracterização dos isolados bacterianos quanto a degradação de creosoto.....	80
5.9.1) Ensaio de degradação	80
5.9.2) Análises estatísticas.....	81
5.10) Avaliação de crescimento e degradação de creosoto presente matriz de sedimento individualmente pelos isolados com maior potencial de degradação	81
5.10.1) Ensaio de degradação	82
5.10.2) Análises estatísticas.....	82
5.11) Avaliação de crescimento bacteriano e biorremediação <i>ex situ</i> de amostras de sedimento contaminadas com creosoto por meio de técnicas de bioestimulação e bioaumentação.....	83
5.11.1) Ensaio de degradação	84
5.11.2) Análises estatísticas.....	85
5.11.3) Determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de creosoto	86
5.11.4) Determinação da diversidade metabólica da comunidade microbiana total de alguns tratamentos de biorremediação.....	87
5.11.4) Determinação da diversidade metabólica da comunidade microbiana total de alguns tratamentos de biorremediação.....	87
5.11.5) Análises metataxonômicas das amostras correspondentes aos tratamentos de biorremediação.....	87
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
Parte 1. Estudo da diversidade de bactérias presentes em amostras de fração líquida de aquífero contaminadas com diferentes concentrações de creosoto, utilizando abordagens independentes de cultivo.	89
6.1) Análises físico-químicas das amostras.....	89
6.2) Análise da comunidade bacteriana das amostras da fração líquida do aquífero pela técnica de PCR-DGGE.....	92
6.2.1) Estrutura da comunidade bacteriana das amostras.....	92
6.2.2) Identificação molecular de algumas bandas excisadas do gel de DGGE.....	95
6.3) Análises metataxonômicas da comunidade bacteriana presente nas amostras	97
6.3.1) Sequenciamento dos amplicons de bactérias	97

6.3.2) Beta diversidade e perfis das comunidades de bactérias presentes nas amostras da fração líquida do aquífero	101
6.3.3) Efeitos dos metadados na estrutura da comunidade bacteriana das amostras da fração líquida do aquífero	108
6.3.4) Predição de funções relacionadas à degradação de hidrocarbonetos aromáticos do metagenoma das amostras de fração líquida do aquífero.....	113
6.4) Quantificação da população de arqueas e bactérias nas amostras por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real	120
6.4.1) Construção da curva padrão	120
6.4.2) Quantificação das bactérias e arqueas presentes nas amostras	123
Parte 2. Estudo da diversidade e prospecção de bactérias degradadoras de HPAs presentes em sedimentos contaminados com diferentes concentrações de creosoto utilizando abordagens dependentes e independentes de cultivo.	127
6.1) Análises físico-químicas das amostras.....	127
6.2) Análise da comunidade bacteriana das amostras de sedimentos pela técnica de PCR-DGGE.....	130
6.2.1) Estrutura da comunidade bacteriana das amostras.....	130
6.2.2) Identificação molecular de algumas bandas excisadas do gel de DGGE.....	132
6.3) Análises metataxonômicas da comunidade bacteriana presente nas amostras	133
6.3.1) Sequenciamento do gene de rRNA 16S bacteriano	133
6.3.2) Beta diversidade e perfis das comunidades de bactérias presentes nas amostras da fração líquida do aquífero	135
6.3.4) Predição de funções relacionadas à degradação de hidrocarbonetos aromáticos do metagenoma das amostras de sedimentos	142
6.4) Quantificação da população de arqueas e bactérias nas amostras por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real	148
6.5) Isolamento e identificação molecular de bactérias obtidas a partir das amostras de sedimentos.....	149
6.6) Avaliação do crescimento e capacidade de degradação de creosoto pelos isolados.....	153
6.7) Avaliação de crescimento e biorremediação de creosoto na matriz de sedimento individualmente pelos isolados com maior potencial de degradação	165
6.8) Avaliação de crescimento, diversidade metabólica e biorremediação <i>ex situ</i> de amostras de sedimento contaminadas com creosoto a partir de consórcio bacteriano formado pelos isolados com maior potencial de degradação por meio de técnicas de bioestimulação e bioaugmentação.....	168
6.8.1) Crescimento da comunidade bacteriana e degradação de creosoto nos diferentes tratamentos de biorremediação	169
6.8.2) Densidade de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de creosoto pela técnica de número mais provável (NMP).....	176
6.8.3) Diversidade metabólica da comunidade microbiana total de alguns tratamentos de biorremediação	180
6.9) Análises metataxonômicas das comunidades bacterianas presente nas amostras dos tratamentos de biorremediação	183
6.9.1) Sequenciamento dos amplicons de bactérias e alfa diversidade das amostras.....	183
6.9.2) Beta diversidade e perfis das comunidades de bactérias presentes nas amostras dos tratamentos de biorremediação	185
7) CONCLUSÕES.....	183

Parte 1. Diversidade de bactérias presentes em amostras de fração líquida de aquífero contaminadas com diferentes concentrações de creosoto, utilizando abordagens independentes de cultivo.....	193
Parte 2. Diversidade e prospecção de bactérias presentes em sedimentos contaminados com diferentes concentrações de creosoto utilizando abordagens dependentes e independentes de cultivo.	194
8) REFERÊNCIAS	196
ANEXOS	233

1. INTRODUÇÃO

As atividades industriais são de extrema importância para o desenvolvimento da sociedade. Entretanto, ao longo dos anos, um grande número de subprodutos tóxicos dessas atividades foi liberado para o meio ambiente. Um desses produtos é o óleo de creosoto que tem sido utilizado a mais de um século como o principal preservante de diversas estruturas de madeira, incluindo os dormentes de ferrovias.

A alta industrialização e uso do creosoto associada à práticas de manipulação inadequadas foram responsáveis por graves contaminações ambientais, principalmente de solos e águas subterrâneas. Isso é preocupante principalmente devido à composição química desse composto, que contém predominantemente hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (85%), compostos fenólicos (10%), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos heterocíclicos (hetero-HPAs) de enxofre, nitrogênio e/ou oxigênio (5%) e uma fração dos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEXs). Sendo que dentre os HPAs, entre 20 a 40% correspondem aos 16 HPAs definidos como poluentes prioritários pela EPA (United States Environmental Protection Agency) e EU (European Union), devido suas propriedades tóxicas, genotóxicas, imunotóxicas e cancerígenas.

Por conta dessa toxicidade, áreas contaminadas com esses compostos representam uma grande preocupação ambiental e são consideradas prioritárias à remediação. Dentre as alternativas viáveis para tal, destaca-se o tratamento biológico, denominado de biorremediação, que faz uso de microrganismos para promoção da degradação ou transformação dos contaminantes em formas menos tóxicas. Esses tratamentos apresentam uma série de vantagens quando comparados aos físico-químicos como baixo custo, baixo impacto ao meio ambiente e a possibilidade de uma eliminação total do contaminante, já que a maioria dos hidrocarbonetos, mesmo possuindo características recalcitrantes, são susceptíveis à degradação microbiana. Há duas técnicas principais para acelerar a degradação de contaminantes nesses ambientes poluídos, a bioestimulação da microbiota autóctone por meio da otimização de fatores físico-químicos e nutricionais que favoreçam o crescimento desses microrganismos e/ou sua bioaugmentação com inoculantes microbianos, geralmente formado a partir de bactérias inicialmente isoladas de ambientes contaminados, triadas quanto à degradação dos contaminantes de interesse e selecionadas de acordo com seu potencial catabólico. Antes de se iniciar um processo de biorremediação em escala real é de extrema importância testar e delinear as melhores condições, por meio de ensaios em microcosmos que representem o mais próximo possível o ambiente real.

Para determinar a melhor estratégia para biorremediação de uma área contaminada por hidrocarbonetos é necessário também conhecer de forma profunda a composição da microbiota local, a influência da presença dos contaminantes em seu perfil taxonômico e funcional, o papel desses microrganismos na degradação dos mesmos, além de condições que possam otimizar o processo. O maior problema é que por meio de abordagens tradicionais, dependentes de cultivo, somente 1 a 10% dos microrganismos presentes nos ambientes são cultivados em laboratório, o que limita o número de espécies avaliadas e impossibilita uma perspectiva real da variedade taxonômica, ecológica e funcional de microrganismos no ambiente.

Por causa dessa limitação, esses métodos vêm sendo reforçados por abordagens independentes de cultivo, que se baseiam no estudo do DNA para a análise da estrutura e função microbiana. Os rápidos avanços nesta área resultaram no desenvolvimento de técnicas e softwares eficientes para a compreensão da diversidade de microrganismos ativamente envolvidos na biorremediação. Dentre elas, destaca-se as metagenômicas que, por meio da extração do DNA microbiano diretamente das amostras ambientais, permitem o acesso ao material genético coletivo de todos os microrganismos presentes no ambiente estudado, sejam eles cultiváveis ou não. As abordagens metagenômicas mais comumente utilizadas para investigar a diversidade microbiana em amostras ambientais são as análises metataxonômicas. Elas também envolvem a extração do DNA diretamente da amostra, mas é seguida da amplificação de regiões consideradas marcadores filogenéticos, principalmente o gene do rRNA 16S, permitindo a identificação de todos os microrganismos ali presentes. Essas técnicas vêm sendo extensivamente utilizadas em pesquisas científicas voltadas para a remediação de ambientes contaminados e o enorme volume de dados resultantes prometem revolucionar o entendimento acerca da diversidade e função microbiana em ambientes complexos, como sedimentos e aquífero, orientando o desenvolvimento de processos baseados em microrganismos para remediá-los.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1) Utilização de creosoto e a contaminação ambiental

As atividades industriais são extremamente importantes para o desenvolvimento da sociedade, pois são responsáveis pela geração de bens de consumo considerados essenciais (Castro, 2009). Entretanto, nas últimas décadas, um grande número de subprodutos tóxicos vem sendo liberados para o meio ambiente, principalmente devido a rápida evolução desses processos industriais e expansão das atividades agrícolas e da indústria química (Semple et al., 2000). Estes poluentes afetam o equilíbrio ambiental e apresentam risco para os seres humanos e outros seres que dependem desses ambientes contaminados (Scullion, 2006).

O óleo de creosoto é um líquido oleoso espesso, de cor âmbar a preta, formado a partir da destilação fracionada do alcatrão de hulha, que é um suproduto oleoso obtido da pirólise de carvão vegetal (Rasmussen et al., 2002; Mateus et al., 2008). Esse óleo tem sido utilizado como o principal preservante de estruturas de madeira a mais de um século, atuando como um agente de impermeabilização (Becker et al., 2001; Rasmussen et al., 2002; Winqvist et al., 2014). Madeiras tratadas com creosoto são usadas quase que exclusivamente em estruturas que se encontram ao ar livre, como dormentes de linhas ferroviárias, postes de transmissão de energia elétrica e de linhas telefônicas, construção de cercas, estacas para produção agrícola e equipamentos de parques infantis e de recreação, móveis de jardim, fundações e materiais de construção (Grant et al., 2006; Moret et al., 2007; Ghaly et al., 2011). Acredita-se que mais de 54% dos dormentes de ferrovias existentes tenham sido tratados predominantemente com creosoto (Kim et al., 2011).

Essa alta industrialização do creosoto foi responsável por derramamentos acidentais, que associados ao uso indevido e práticas de eliminação inadequada desse produto, levaram a graves contaminações principalmente de solos superficiais e águas subterrâneas no mundo inteiro (ATSDR, 2002; Kulik et al., 2006; Blum et al., 2011). Adicionalmente, por volta de 2% do creosoto utilizado para preservação de madeiras é volatilizado e acaba como contaminante no ar (ATSDR, 2002). A extensão dessas contaminações varia em cada local de acordo com as condições ambientais, presença de microrganismos e propriedades físico-químicas dos componentes do creosoto (Moret et al., 2007). Pelo fato de as áreas de instalações de tratamento de madeira serem comumente afetadas por vazamento nos tanques, gotejamento da madeira tratada, derramamentos, e pelos lixiviados provenientes das lagoas sem impermeabilização adequada, acredita-se que o número de sítios contaminados com creosoto pode se aproximar do número total dessas instalações em funcionamento ou desativadas (Mueller et

al., 1989). Isso fez com que a partir dos anos 90, a União Européia e outras organizações adotassem uma série de restrições à utilização do creosoto para o tratamento de madeira (Commission of the European Communities, 2001). Adicionalmente, o uso de madeira tratada com creosoto passou a ser restrito a aplicações comerciais e industriais e todo uso amador desse composto foi proibido (Moreti et al., 2007).

O creosoto é uma mistura complexa de mais de 200 compostos orgânicos persistentes (Kulik et al., 2006; Simarro et al., 2013). Dentre esses compostos, apenas alguns atingem concentrações iguais ou superiores a 1%, assim poucos compostos podem chegar a representar 40-45% de uma determinada mistura de creosoto (Mueller et al., 1989). Essa composição pode variar de acordo com a origem do carvão e dos processos de fabricação. Mas em geral, contém predominantemente hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que são poluentes hidrofóbicos orgânicos que contém dois ou mais anéis de benzeno fundidos em arranjos lineares, angulares ou em cluster (Cerniglia, 1992; Ghaly et al., 2011). O creosoto contém ainda hidrocarbonetos policíclicos aromáticos heterocíclicos (hetero-HPAs), que são compostos aromáticos policíclicos que contém um ou mais átomos de Enxofre (S), Nitrogênio (N) e/ou Oxigênio (O) nos anéis aromáticos, compostos fenólicos e uma pequena mais importante fração dos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (coletivamente chamados de BTEXs) (Arvin & Flyvbjerg, 1991; Xu et al., 2006).

O creosoto pode conter mais de 30 diferentes HPAs e, geralmente, 50% dessa composição corresponde a HPAs com dois anéis aromáticos, 39% com três anéis, 9% com quatro anéis e 2% com cinco ou mais anéis (Moret et al., 2007; Jurys et al., 2013). O fenatreno é geralmente o HPA predominante, juntamente com o naftaleno e antraceno (Moret et al., 2007; Jurys et al., 2013). Outros HPAs predominantes no creosoto podem ser vistos na Figura 1. Por conta dessa composição, nos locais já mencionados, onde ocorre contaminação pelo uso do creosoto, é comum a presença de HPAs que podem representar até 85-90% dos contaminantes. Outro agravante é que esta contaminação pode persistir por muitos anos, já que altas concentrações dessas moléculas podem permanecer na madeira mesmo após décadas de uso (Breedveld & Sparrevik, 2000; Moret et al., 2007; Fernandez-Luqueno et al., 2011).

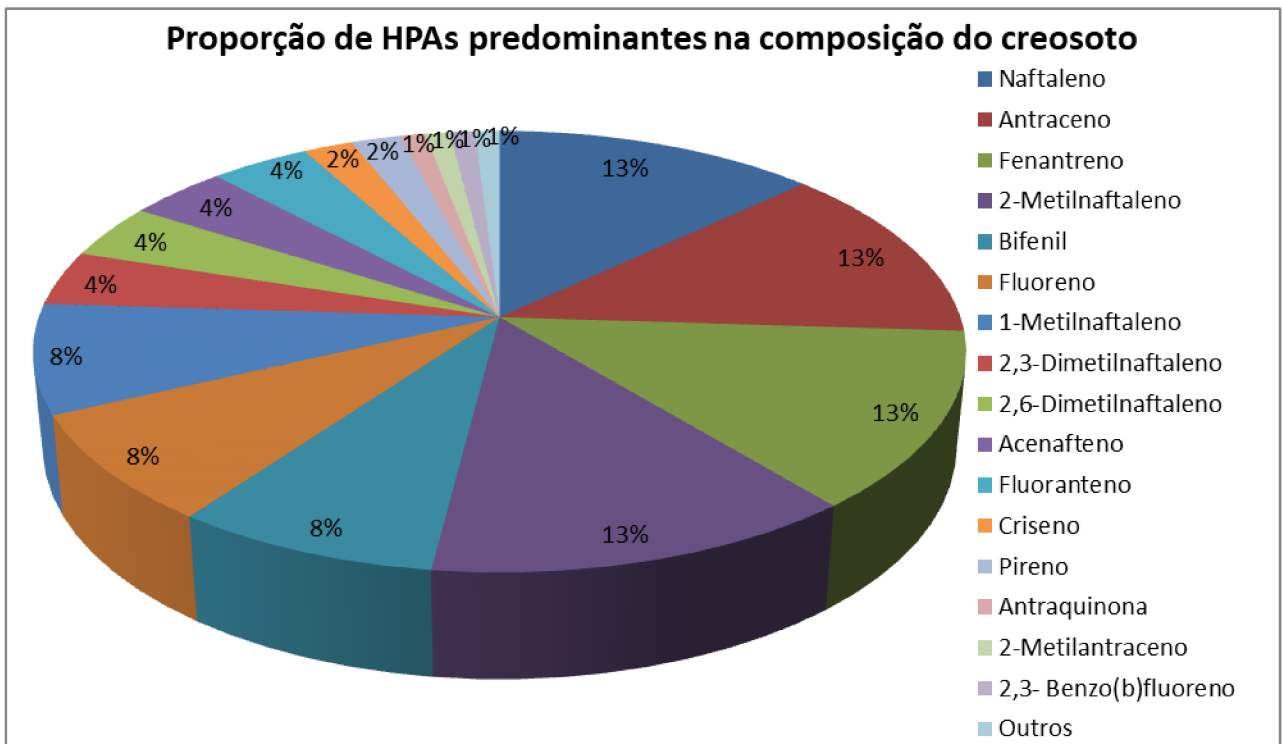


Figura 1: Gráfico demonstrando a porcentagens dos HPAs predominantemente encontrados na composição do creosoto (Adaptado de Jurys et al., 2013).

Predominantemente as frações mais leves desses HPAs são lentamente liberadas da madeira tratada pela exudação do óleo, seguida da lixiviação pela água de chuva ou irrigação e volatilização (Moret et al., 2007). Inclusive, o transporte desses poluentes no ambiente se dá principalmente por via atmosférica associado ao material particulado fino, o que permite uma ampla distribuição desses compostos no ambiente (Masih & Taneja, 2006). Uma vez emitidos na atmosfera, os HPAs podem ser depositados sob a forma seca (vapor ou particulada) ou úmida (precipitação sob a forma dissolvida ou particulada) sobre sistemas aquáticos e terrestres (Garban et al., 2002).

Quando os HPAs atingem o solo, sua partição nos diferentes componentes desse sistema depende de sua solubilidade na água e da evaporação no ar, de modo que eles podem ser adsorvidos às partículas do solo, evaporar ou migrar para as águas subterrâneas (Edwards, 1983; Manoli & Samara, 1999; Nadim et al., 2000). Os componentes que não se dissolvem na água são chamados líquidos de fase não aquosa (NAPLs) e esses líquidos são subdivididos em duas classes de acordo com a densidade: aqueles mais densos que a água, líquidos densos não-aquosos (DNAPLs) e aqueles menos densos que a água, líquidos leves de fase não aquosa (LNAPL) (Carcione et al., 2003). Embora os NAPLs existam na subsuperfície como uma fase líquida separada, eles lentamente se dissolvem em águas subterrâneas fluidas, dando origem a plumas de fase aquosa que podem migrar para outros pontos (Lowe et al., 1999). Considerando a grande quantidade de contaminantes que entram no solo e nas águas

subterrâneas em escala regional, deve-se presumir que, se medidas de restauração não forem realizadas, esses locais emitirão poluentes por um longo tempo, representando um reservatório e fonte contínua de distribuição desses contaminantes (Wycisk et al., 2003).

Concentrações de mais de mil miligramas de HPAs por quilograma de massa seca do solo já foram encontrados em solos de áreas de armazenamento de dormentes de trem em desuso em diferentes localidades do Canadá (Canadian Environmental Protection Act, 1993). Em 2003, Robinson e colaboradores avaliaram a concentração de seis HPAs no solo de uma área no estado do Tennessee (EUA), onde funcionou um sistema de tratamento de dormentes e de manutenção de ferrovias da década de 50 a 70. Mesmo a contaminação sendo bem antiga, foi detectada no solo do local concentrações médias relativamente altas de acenafteno, fluoreno, fenantreno, fluoranteno, pireno e criseno, correspondentes a 8, 8, 27, 58, 61 e 31 mg Kg⁻¹ de massa seca do solo, respectivamente.

Em águas subterrâneas contaminadas com creosoto, a porcentagem de HPAs é um pouco menor, havendo a predominância de fenóis (45%), hetero-HPAs (38%) e também concentrações significativas dos BTEXs. (Rasmussen et al., 2002). A maior polaridade e solubilidade em água dos hetero-HPAs é baseada na substituição de um átomo de carbono por O, N e S, o que leva a um aumento da biodisponibilidade e mobilidade dessas moléculas em comparação com os HPAs homólogos (Peddinghaus et al., 2012). Os compostos fenólicos e BTEXs também são compostos mais solúveis que os HPAs, e como resultado, eles são altamente móveis e prevalentes nessas águas subterrâneas contaminadas (Lovley et al., 1999; Hartnik et al., 2007; Silva et al., 2009).

O maior problema é que entre 20 a 40% dos HPAs presentes no creosoto correspondem aos 16 HPAs definidos como poluentes prioritários pela EPA (United States Environmental Protection Agency) e EU (European Union) (Jurys et al., 2013). Eles são o acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(ghi)perileno, benzo(k)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno(1,2,3-cd)pireno, naftaleno e pireno, compostos que apresentam de 2 a 6 anéis aromáticos fundidos entre si e peso molecular variando entre 128 e 278 g/mol (Bojes & Pope, 2007) (Figura 2). Esses HPAs são comumente estudados por serem recalcitrantes, bioacumulativos e possuem propriedades tóxicas, genotóxicas, imunotóxicas e cancerígenas, com destaque para o benzopireno, que tem o maior potencial carcinogênico, dentre eles (Moret et al., 2007; Fernandez-Luqueno et al., 2011; Jurys et al., 2013; Simarro et al., 2013).

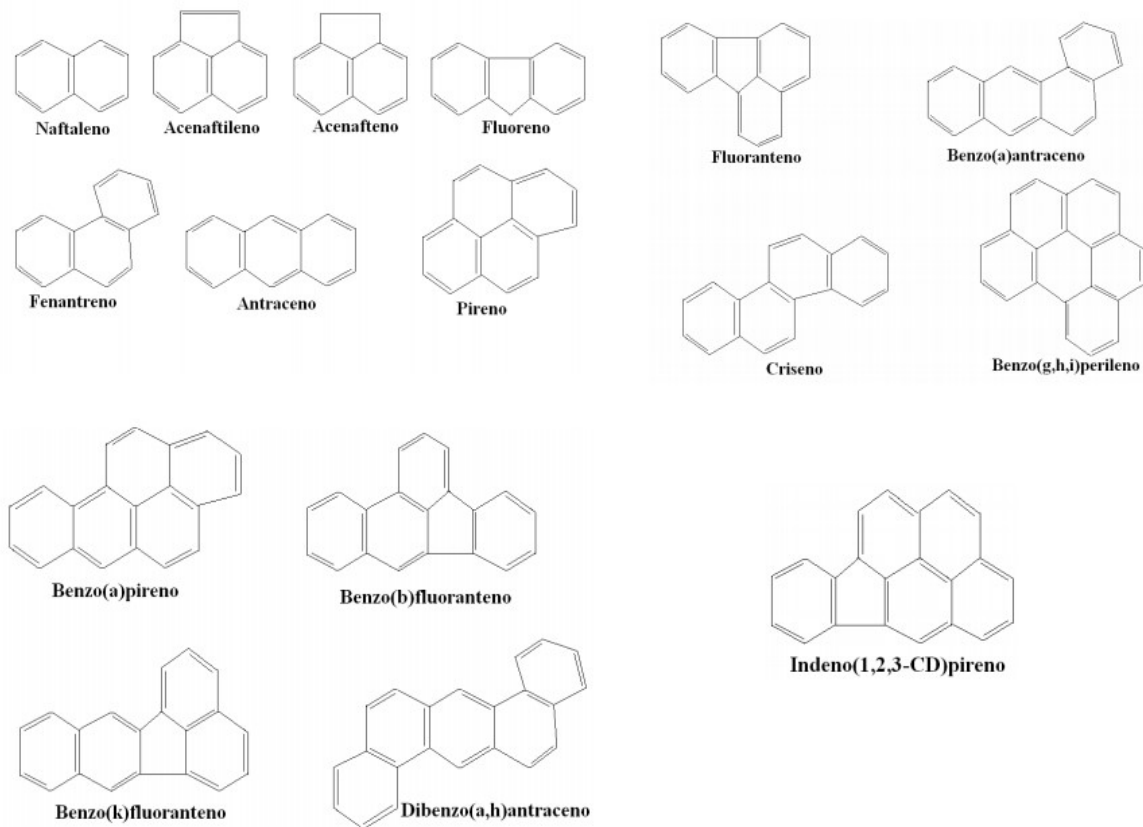


Figura 2: Estruturas dos 16 HPAS definidos como poluentes prioritários pela EPA (United States Environmental Protection Agency).

Qualquer planta ou animal que esteja próximo desses compostos, seja na água, ar ou solo, podem absorver-los e posteriormente passá-los para os seres humanos (Jurys et al., 2013). A exposição humana a HPAs pode ocorrer por três rotas: trato respiratório, gastrointestinal e contato com a pele (U.S. Department of Health and Human Services, 2002). Esses compostos são altamente lipossolúveis e, portanto, facilmente absorvidos e distribuídos para uma grande variedade de tecidos, com tendência de acumulação na gordura corporal (Samanta et al., 2002; Moret et al., 2007). Os efeitos dessa exposição à saúde humana dependem da rota de entrada e concentração dos compostos absorvidos (U.S. Department of Health and Human Services, 2002). Os danos podem incluir perda de consciência, câncer, convulsões, retardo mental, problemas nos rins e fígados e várias outras lesões internas (World Health Organization, 2004).

Os hetero-HPAs também são compostos tóxicos que contribuem significativamente para o risco ecotoxicológico da água, mesmo quando presentes em baixas concentrações (Meyer & Steinhart, 2000; ATSDR, 2002; Peddinghaus et al., 2012). Já os BTEXs além de serem tóxicos e cancerígenos são depressores do sistema nervoso central (Ann, 2004; Silva et al., 2009). Adicionalmente, os compostos fenólicos também são carcinogênicos e tóxicos aos seres vivos aquáticos (Ghaly et al., 2011). Por conta da toxicidade e propriedades cancerígenas, os resíduos de creosoto são uma ameaça ao solo, recursos hídricos e para o

meio ambiente em geral. Assim, as áreas contaminadas com esse composto são consideradas prioritárias à remediação (Rasmussen et al., 2002; Kulik et al., 2006; Larsson et al., 2013; Winqvist et al., 2014).

No Brasil, a resolução nº 420 publicada em 28 de dezembro de 2009 pelo CONAMA adotou valores orientadores das concentrações ideais para alguns compostos no solo e água subterrânea que haviam sido estipulados anteriormente pela CETESB em 2005. Estes valores 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. Esta Resolução estabeleceu também 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). Dentre os compostos orientados nessa resolução estavam incluídos todos os BTEXs e os HPAs naftaleno, 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.

2.2) Biorremediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos

Há várias maneiras de se remediar áreas contaminadas com hidrocarbonetos e demais poluentes orgânicos, seja por métodos físicos, químicos ou biológicos. Solos contaminados geralmente são tratados fisicamente por escavação e imobilização do material em aterro, porém com a redução do número de aterros esse método tem se tornado menos viável (Asquith et al., 2012). Outra possibilidade é a incineração do solo removido, entretanto possui um custo muito alto (Ting et al., 1999). Métodos químicos para o tratamento de solos e águas contaminadas incluem a injeção direta de oxidantes químicos ou extração com solventes, entretanto, podem causar problemas de toxicidade e alterar a composição química natural do ambiente, causando desequilíbrios (Riser-Roberts, 1998; Alamri, 2009; Liu et al., 2010).

Pelo fato de a maioria dos métodos físicos e químicos serem caros, trabalhosos e não sustentáveis do ponto de vista ambiental, os tratamentos biológicos vêm ganhando cada vez mais aceitação como uma tecnologia viável para a remediação de áreas contaminadas (Khan et al., 2004). O tratamento biológico envolve a utilização de seres vivos para acelerar a remoção dos poluentes, seja via degradação e preferencialmente, mineralização, conversão

dos mesmos em formas menos tóxicas, inativação ou por adsorção; e o processo é denominado biorremediação (Cunha & Leite, 2000; Fernandez-Luqueno et al., 2011). A biorremediação é um tratamento considerado mais seguro, que pode apresentar um melhor custo-benefício, simplicidade e baixo impacto ambiental, se comparado às técnicas físico-químicas (Lovley, 2003; Grant et al., 2006; Lors et al., 2012). Mas a maior vantagem é a possibilidade de promoção da total mineralização dos contaminantes (Baker & Herson, 1994; Andrade et al., 2010). Processos físico-químicos, na maioria das vezes, promovem somente a diluição dos contaminantes ou sua transferência de um compartimento ambiental para outro e não sua degradação efetiva, persistindo o problema do ponto de vista ambiental (Freire, 2000; Semple et al., 2001).

Ao longo do tempo, de forma natural, os hidrocarbonetos sofrem uma série de alterações, tais como volatilização, fotodecomposição, oxidação química, dispersão, difusão, lixiviação e a degradação catalisada por microrganismos autóctones do ambiente (Semple et al., 2001; Mahmoudi et al., 2013). Esses processos em conjunto são denominados de atenuação natural (Kulik et al., 2006; Grant et al., 2006; Simarro et al., 2013). Ao longo do processo evolutivo, os microrganismos mantiveram as vias de degradação de hidrocarbonetos como forma de obtenção de fontes de carbono e outros macronutrientes ou energia ou ainda para a desintoxicação celular (Andreoni & Gianfreda, 2007). Essa capacidade de degradação possivelmente se deve ao fato de hidrocarbonetos, de origem natural ou sintética, estarem presentes em toda a biosfera, o que favorece a pressão seletiva no sentido de criação de vias metabólicas e mecanismos de tolerância pelas comunidades microbianas na maioria dos ecossistemas (Atlas, 1981; Wetler-Toninie et al., 2010).

Estudos têm revelado que a maioria dos hidrocarbonetos em determinadas condições, inclusive HPAs, é susceptível à degradação por algas, bactérias, arqueas e fungos, que são responsáveis por biotransformá-los em metabólitos menos complexos ou até mesmo mineralizá-los a CO_2 e H_2O ou CH_4 (Haritash & Kaushik, 2009; Juhasz et al., 2010; Mahmoudi et al., 2013). Dentre eles, as bactérias heterotróficas constituem a classe mais ativamente envolvida nesse processo e vários isolados já se mostraram capazes de degradar diferentes moléculas de hidrocarbonetos a uma extensão considerável em condições otimizadas, inclusive aqueles presentes no creosoto (Riser-Roberts, 1998; Haritash & Kaushik, 2009). A maioria desses isolados tem sido identificada como pertencente aos gêneros *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Sphingobacterium*, *Stenotrophomonas* e *Arthrobacter* (Kanally & Harayama, 2000; Lors et al., 2010; Jurys et al., 2013).

No entanto, dessa forma natural, o processo de biorremediação pode ser lento e limitado por uma série de fatores (Grant et al., 2006). Os principais são a presença de microrganismos aptos a degradar o contaminante; mecanismos que aumentam sua biodisponibilidade e que proporcionam tolerância dos microrganismos aos contaminantes; condições ambientais como pH, temperatura, oxigênio dissolvido e umidade; concentração, propriedades estruturais e “idade” do contaminante e características do sítio contaminado (Singh & Ward, 2004; Jurys et al., 2013; Mahmoudi et al., 2013).

No caso dos HPAs, a maioria desses contaminantes é altamente persistente no ecossistema quando comparados com componentes de petróleo de baixo peso molecular, como alcanos de cadeia curta e hidrocarbonetos monoaromáticos (Zhang et al., 2011a). Isso ocorre por causa de sua baixa solubilidade em água, estabilidade química intrínseca e alta resistência à degradação (Andreoni & Gianfreda, 2007). Para esses compostos, a biodegradação depende do tamanho e estrutura da molécula, ou seja, do número de anéis aromáticos e do padrão de ligação entre eles (Kanaly & Harayama, 2000). Geralmente, quanto maior o peso molecular do HPA, maior a toxicidade, hidrofobicidade e estabilidade eletroquímica da molécula, que são os principais fatores que contribuem para a recalcitrância e persistência de um HPA no ambiente (Kanaly & Harayama, 2000). Naftaleno, o HPA mais simples, com dois anéis aromáticos, tem recebido muita atenção e já foi caracterizado como única fonte de carbono por vários microrganismos, com destaque para isolados do gênero *Pseudomonas* (Manohar & Karegoudar, 1998; Rasmussen et al, 2002; Grant et al., 2006). Assim como naftaleno, outros hidrocarbonetos de baixo peso molecular, como os BTEXs também são mais susceptíveis à bioegração. De fato, a capacidade de certos microrganismos em degradar BTEXs já é conhecida desde 1908, quando se observou pela primeira vez o crescimento de uma bactéria do gênero *Bacillus* em meio contendo tolueno e xileno (Wilson & Bouwer, 1997). Desde então, vários estudos têm sido realizados e demonstram degradação eficiente desses compostos por uma ampla gama de gêneros bacterianos em diferentes ambientes como solos, efluentes industriais e águas subterrâneas (Marin-Morales et al., 2010).

Já em relação aos HPAs com mais anéis, nas últimas décadas, pesquisas têm demonstrado que àqueles com três anéis como acenafteno, fluoreno, fenantreno e antraceno e com quatro anéis como fluoranteno, pireno, benzo-antraceno e criseno são passíveis de serem degradados em processos de biorremediação, embora a uma taxa bem mais lenta (Samanta et al., 2002; Grant et al., 2006). Um número menor de estudos tem documentado a degradação bacteriana de HPAs com 5 ou mais anéis como benzo-fluoranteno, indeno, (1,2,3-cd) pireno e

coroneno, porque um número muito limitado de bactérias consegue crescer nesses compostos em cultura pura e o processo ocorre de forma bem menos significativa mesmo durante longos períodos de tempo (Samanta *et al.*, 2002; Bouchez *et al.*, 2005; Grant *et al.*, 2006). De modo geral, bactérias gram-negativo, tais como *Burkholderia* degradam principalmente HPAs com até três anéis, enquanto bactérias gram-positivo tais como *Mycobacterium* conseguem degradar HPAs com mais de três anéis de forma mais eficiente (Johnsen *et al.*, 2005).

Microrganismos com capacidade de degradar compostos tóxicos, em geral, apesar de ubíquos, representam menos de 10% da população total na maioria dos ambientes considerando métodos dependentes de cultivo (Yu *et al.*, 2005). Por causa disso, o processo de biorremediação pode ser favorecido por dois métodos principais, a bioaugmentação e a bioestimulação, que podem ser realizadas separadamente ou em conjunto, dependendo das condições locais e do material que será biodegradado (Sarkar *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2010). Vários estudos relacionados à biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos têm demonstrado um aumento significativo na degradação desses contaminantes com a utilização dessas técnicas (Vinas, *et al.*, 2005; Sabate' *et al.*, 2006; Lladó *et al.*, 2013).

A Bioestimulação consiste principalmente no ajuste de nutrientes orgânicos e inorgânicos no ambiente contaminado a valores que estimulem o crescimento e atividade catabólica de microrganismos autóctones (Asquith *et al.*, 2012). A utilização dessa técnica, com a adição de nutrientes como N, P, K, S e Cu tem aumentado a degradação dos mais variados poluentes em diferentes ambientes (Fernandez-Luqueno *et al.*, 2011). Adicionalmente, pode ser realizada também a otimização das condições de pH, temperatura, umidade e potencial redox e da biodisponibilidade dos contaminantes, tornando-as adequadas para o crescimento e atividade microbiana (Phillips *et al.*, 2000; Singh & Ward, 2004; Kriipsalu *et al.*, 2007). No estudo de Guerin (1999), por exemplo, foi observado sucesso na aplicação da bioestimulação *ex situ*, baseada na injeção de oxigênio e nutrientes para a remediação de um solo contaminado com creosoto, contendo fenol e HPAs. Ao longo do processo, foi observado um aumento da população de microrganismos degradadores desses compostos, e níveis de remoção de até 95% de fenóis, de 82-97% para HPAs com baixo peso molecular (até 3 anéis) e superior a 35% para HPAs com alto peso molecular (acima de 4 anéis) foi constatada.

Já a Bioaugmentação consiste na introdução no sítio contaminado de microrganismos exógenos com capacidade de degradar o contaminante, sejam eles culturas puras, consórcios pré-adaptados ou ainda, microrganismos geneticamente modificados (Simarro *et al.*, 2013). Entretanto, o bioaumento é uma técnica complexa, uma vez que um efeito positivo ou

negativo é dependente da interação entre o inoculante e a população autóctone devido à competição pelos recursos, principalmente nutrientes, além das condições físicas do ambiente (Yu et al., 2005; Asquith et al., 2012).

Quando há a necessidade de bioaugmentação, em geral, ela é realizada por meio da introdução de consórcios microbianos, compostos por cepas diversas. Vários estudos confirmam que mesmo os processos microbianos mais simples no ambiente operam através de uma hierarquia de interações complexas e uma rede de interdependências metabólicas e fisiológicas, que resultam em efeitos sinérgicos e/ ou antagônicos, que irão definir o sucesso da remediação (Mariano et al. 2008; Mukherjee & Chattopadhyay, 2017). Isso faz com que o uso desses consórcios microbianos como inóculo forneça vantagens durante a biodegradação de compostos recalcitrantes e seja mais eficiente em eliminar hidrocarbonetos de locais contaminados comparados ao uso de um único isolado (Fortin et al. 2001; Auffret et al. 2009).

Dessa forma, consórcios bacterianos vêm sendo utilizados como inoculantes para acelerar a biodegradação de HPAs em diversos trabalhos. Apesar de várias espécies bacterianas degradadoras de HPAs já terem sido identificadas, não se espera que um único isolado exiba a capacidade de degradar completamente todos os HPAs, moléculas tão quimicamente complexas (Lafortune et al., 2009). Consórcios compostos por diferentes microorganismos tem maior potencial para que se alcance bons resultados e diversos trabalhos têm feito uso dessa abordagem. Zein e colaboradores (2006), por exemplo, investigaram a biorremediação *ex situ* de água de lençol freático contaminada com HPAs e BTEXs em biorreator. Foi realizada uma junção das técnicas de bioaugmentação, por meio da adição de inóculos microbianos previamente selecionados quanto a capacidade de degradar hidrocarbonetos, e da bioestimulação, por meio de aeração e otimização das concentrações de nutrientes, pH e temperatura. Constatou-se uma redução de mais de 99% tanto dos BTEXs quanto dos HPAs investigados, que foram o naftaleno, metil-naftaleno, acenafteno e acenaftileno, após mais de 300 dias de operação. Já Jacques e colaboradores (2008) avaliaram a capacidade de um consórcio bacteriano formado por 5 microrganismos (*Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium sp.*, *Gordonia polyisoprenivorans*, uma bactéria não identificada da família Microbacteriaceae, e um fungo identificado como *Fusarium oxysporum*) isolados de um aterro contaminado com HPAs em degradar diferentes concentrações (0, 250, 500 e 1000 mg kg⁻¹) de antraceno, fenantreno e pireno. O consórcio foi capaz de degradar, em média, 99%, 99% e 96% das diferentes concentrações de antraceno, fenantreno e pireno no solo, respectivamente, após 70 dias de incubação. Esse resultado foi

diferente e melhor do obtido com o uso apenas da população microbiana autóctone do solo, que não proporcionou degradação substancial de HPAs.

Os resultados satisfatórios que vem sendo obtidos com o uso de consórcios microbianos tem estimulado, inclusive, o aumento de pesquisas visando a formulação de inoculantes aptos à degradar contaminantes, área que vem se mostrando interessante tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico. No Brasil atualmente, por exemplo, existem mais de 50 produtos biológicos comerciais registrados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2018) para uso em remediação, principalmente de efluentes hídricos, mas também de resíduos sólidos agroindustriais, lagoas, esgoto e locais contaminados com derivados de petróleo.

2.3) Vias de degradação microbiana de hidrocarbonetos aromáticos em geral

Na degradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos em geral, esses compostos frequentemente são convertidos enzimaticamente a intermediários dihidroxilados centrais, incluindo o catecol e o protocatecoato (Figura 3). Isso ocorre por meio da modificação dos grupos laterais do anel por processos de hidroxilação, desmetilação ou descarboxilação (Riser-Roberts, 1998; Chauan et al, 2008; Wetler-Tonini et al., 2010). Subsequentemente ocorre a fissão dos anéis aromáticos desses intermediários dihidroxilados por meio de um processo de oxidação que é catalisado por dioxigenases altamente seletivas (Van Beilen & Funhoff, 2007). Essas dioxigenases podem ser divididas em dois grupos de acordo com o local da clivagem no intermediário central. As enzimas intradiol abrem o anel aromático entre os dois átomos de carbono hidroxilados pela via de orto clivagem. A enzima catecol 1,2-dioxigenase é a enzima responsável pela clivagem do catecol, enquanto protocatecol 3,4 dioxigenase atua sobre o protocatecoato. As enzimas extradiol realizam a abertura do anel aromático adjacente aos átomos de carbono hidroxilados pela via de meta clivagem. Se o intermediário for o catecol, a enzima que realiza a clivagem é a catecol 2,3-dioxigenase, enquanto protocatecol 4,5-dioxigenase realiza a clivagem do protocatecoato (Figura 4) (Caldwell, 2000).

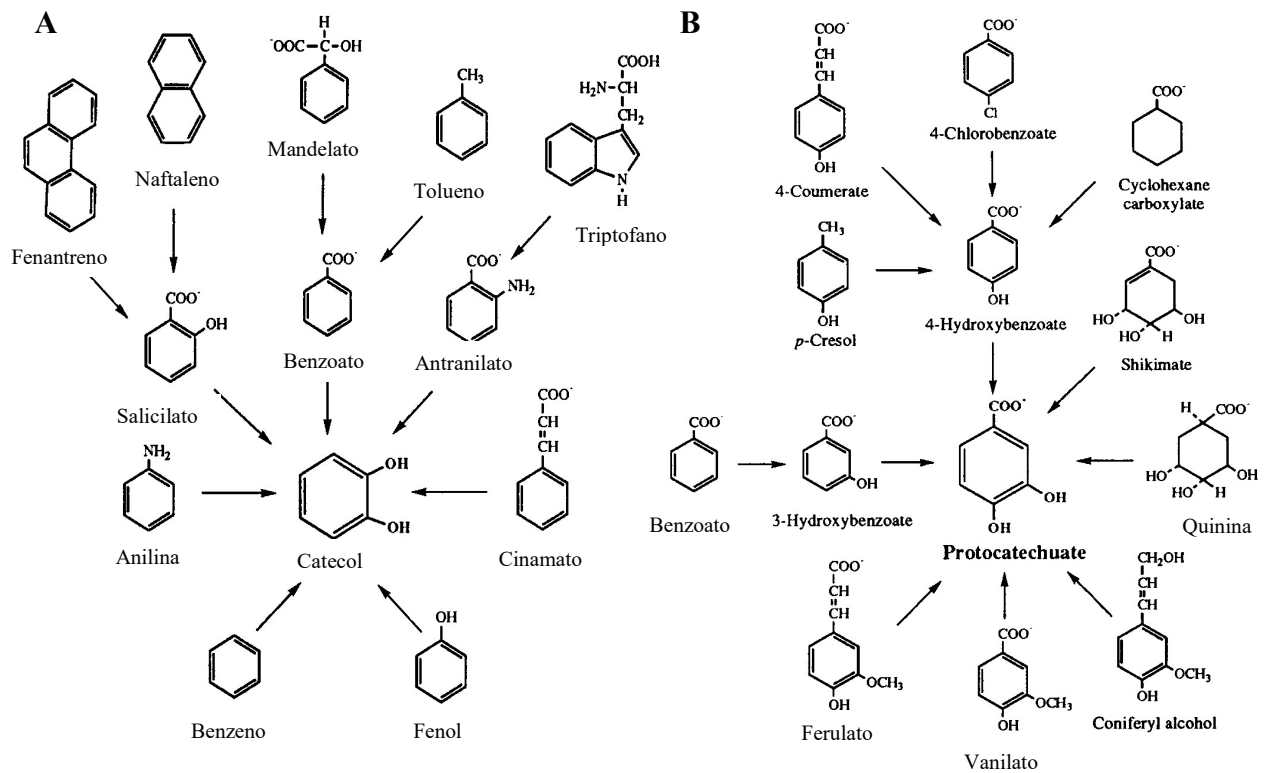


Figura 3: Conversão de compostos aromáticos oxidados ao A) catecol e B) protocatecoato, um dos intermediários centrais da via aeróbica de degradação desses compostos (adaptado de Harwood & Parales).

As enzimas catecol 1,2 e 2,3-dioxigenases possuem o Fe^{3+} como o cofator, mas a catecol 1-2 dioxigenase leva à produção do ácido cis,cis-mucônico ou um derivado e catecol 2,3-dioxigenase ao 2-hidroximucônico semialdeído ou um derivado (Díaz, 2004; Chuan et al., 2008; Wojcieszynska et al., 2011). Esses produtos são convertidos em compostos que entram no ciclo de Krebs. O ácido cis-cis-mucônico é convertido em succinato e acetil-coA e o 2-hidroximucônico semialdeído em piruvato e acetaldeído (Figura 4) (Wetler-Tonini et al., 2010).

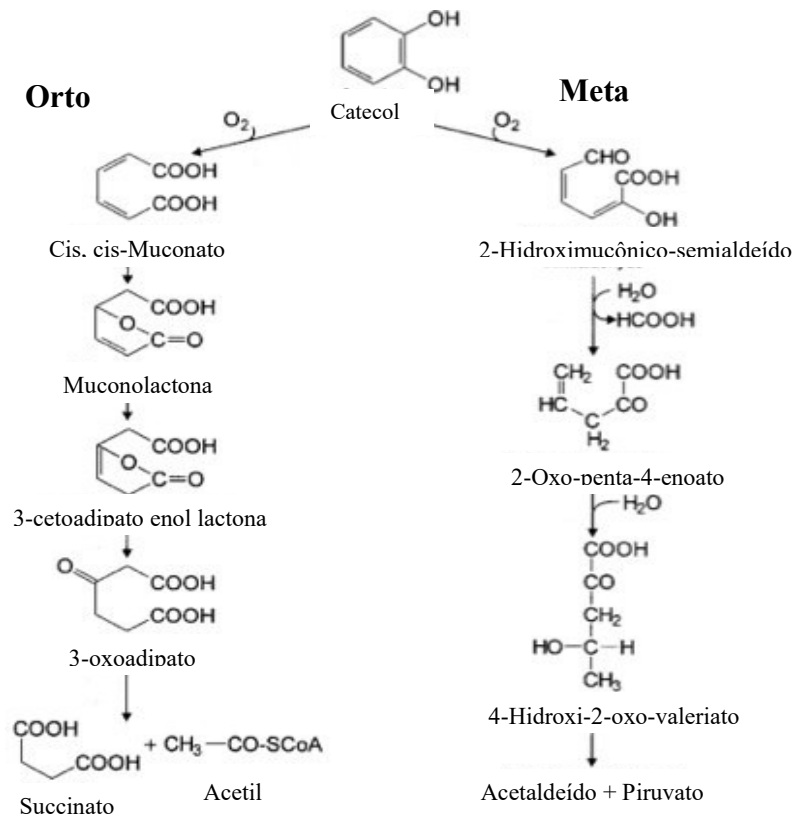


Figura 4: Vias de orto e meta clivagem de degradação aeróbia de compostos aromáticos (adaptado de Fritsche & Hofrichter, 2000).

No caso dos BTEXs, como esses compostos possuem estrutura mais simples, com apenas um anel aromático, o processo de degradação também é simplificado. O anel é hidroxilado por enzimas hidroxilases e convertido aos intermediários dihidroxilados em uma única etapa. A estrutura geral dos BTEXs pode ser visualizada na Figura 5.

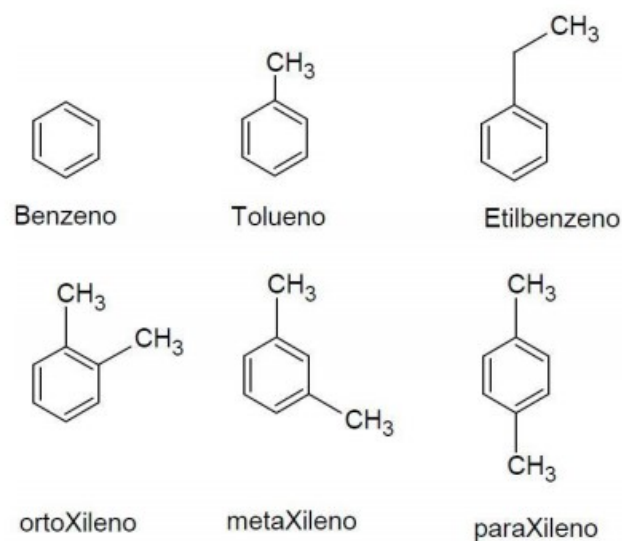


Figura 5: Estruturas químicas dos compostos BTEXS: Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos.

2.4) Vias de degradação de HPAs

Muitas bactérias degradam HPAs por meio de metabolismo ou co-metabolismo (Peng et al., 2008). Geralmente HPAs de baixo peso molecular são mais facilmente degradados por uma única espécie de microrganismo, enquanto HPAs mais complexos e de alto peso molecular são degradados principalmente por co-metabolismo, envolvendo mais de uma espécie (Rasmussen et al., 2002). Um número elevado de vias enzimáticas responsáveis pela degradação dessas moléculas vem sendo estudadas e elucidadas (Cebron et al., 2008). Um fato já confirmado é que a via de degradação de um mesmo composto pode variar de um microrganismo para o outro, principalmente entre bactérias gram-positivo e gram-negativo (Rodrigues, 2002; Cebron et al., 2008).

Além disso, as enzimas de degradação são altamente específicas, tanto para o substrato quanto para as reações catalisadas e por isso, para cada tipo de hidrocarboneto existe um grupo de enzimas envolvidas na degradação (Rodrigues, 2002). De forma geral, as enzimas envolvidas na biodegradação de HPAs são principalmente oxigenases e dehidrogenases (Haritash & Kaushik, 2009). No caso das oxigenases, existem uma ampla gama de enzimas que diferem em estruturas, mecanismos e requerimentos de co-fatores, sendo que a dioxigenase mais estudada é a naftaleno 1,2 dioxigenase (NDO) de *P. putida* NCIB9816-4 (PAH-RHD α), responsável por realizar a primeira reação da via catabólica de degradação desse HPA (Lu *et al.*, 2012). As NDO dioxigenases são enzimas multicomponentes que consistem numa ferredoxina-redutase, uma ferredoxina e uma proteína ferro-enxofre contendo duas subunidades não idênticas, α e β , e apesar de caracterizadas em relação à degradação do naftaleno esse é um complexo versátil que pode atuar em outros HPAs como antraceno e fenantreno (Johnsen et al., 2005; Haritash & Kaushik, 2009).

A biodegradação de HPAs é um processo que pode ser realizado tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, entretanto essas moléculas tendem a se acumular em áreas onde o nível de oxigênio é baixo ou inexistente (Fernandez-Luqueno et al., 2011). Isso ocorre porque a biodegradação anaeróbica é um processo significativamente lento quando comparado à degradação aeróbia (Fernandez-Luqueno et al., 2011). Além disso, estudos têm mostrado que HPAs com dois ou três anéis podem ser degradados anaerobicamente, mas há falta de evidências se o processo é possível para HPAs com mais de três anéis (Haritash & Kaushik, 2009).

O mecanismo bioquímico da degradação anaeróbia ainda não é totalmente elucidado, mas o passo inicial geralmente é a adição de uma molécula de CO₂ seguido de uma série de etapas redutivas (Andreoni & Gianfreda, 2007). O certo é que na ausência do oxigênio

molecular aceptores alternativos de elétrons tais como nitrato, ferro e sulfato são necessários para oxidar esses compostos aromáticos (Bamforth & Singleton, 2005). Nas vias aeróbias, já bem conhecidas, o oxigênio é utilizado tanto na etapa de ativação e clivagem inicial, quanto comoceptor de elétron na cadeia transportadora de elétrons, para a degradação completa (Andreoni & Gianfreda, 2007). O passo inicial da degradação de HPAs é a incorporação de ambos os átomos da molécula de oxigênio em dois átomos de carbono do núcleo aromático, oxidando o HPA a um cis-dihidrodiol (Kanaly & Harayama, 2000; Samanta et al., 2002; Haritash & Kaushik, 2009). Essas reações são catalisadas pelas enzimas dioxigenases intracelulares multicomponentes (Johnsen et al., 2005a). Em seguida, o cis-dihidrodiol formado é desidrogenado e forma os intermediários dihidroxilados, catecol e protocatecoato, mencionados no tópico anterior (Figura 6) (Winqvist *et al.*, 2014).

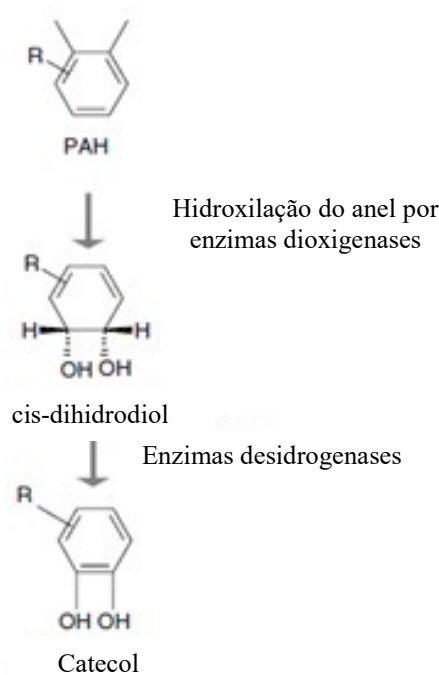


Figura 6: Etapas iniciais da degradação de HPAS (adaptado de Bamforth & Singleton, 2005)

Também há evidências de que algumas bactérias são capazes de oxidar HPAS pela ação de outras enzimas como citocromo p-450 monooxigenase, metano-monooxigenases, ligninas peroxidases e alceno-hidroxilases (Bamforth & Singleton, 2005; Van Beilen & Funhoff, 2007). Mas esse mecanismo é menos freqüente se comparado com aqueles envolvendo dioxigenases (Bamforth & Singleton, 2005).

2.4.1) Via de degradação do naftaleno, fenantreno e antraceno

O naftaleno geralmente é o composto usado como modelo de degradação de HPAs de baixo peso molecular. Apesar de haver várias vias de degradação, a mais conhecida pode ser dividida em via catabólica superior, na qual o naftaleno é convertido a salicilato e inferior na qual o salicilato é convertido aos intermediários do ciclo do ácido tri-carboxílico. Na primeira etapa da via superior, uma molécula de oxigênio é inserida na posição 1-2 do núcleo aromático com a produção de cis-naftaleno-dihidrodiol por meio da enzima NDO, que em seguida, é dehidrogenado a 1,2-dihidroxi-naftaleno por meio da enzima naftaleno cis-dihidrodiol dehidrogenase. Posteriormente o 1,2-dihidroxi-naftaleno é meta clivado por meio da enzima 1,2- dihidroxi-naftaleno dioxigenase e o produto resultante é espontaneamente recircularizado para formar o composto 2-hidroxi-2*H*-cromeno-2-carboxilase. Reações enzimáticas catalisadas por uma isomerase e uma hidratase-aldolase resultam na produção de salicitaldeído e, posteriormente, em salicilato que é finalmente metabolizado via catecol (Habe & Omori, 2003; Bamforth & Singleton, 2005) (Figura 7A).

As enzimas responsáveis pela conversão do naftaleno em salicilato podem também degradar o fenantreno e antraceno à ácido 1-hidroxi-2-naftoico e 2-hidroxi-3-naftoico, respectivamente, por meio de etapas semelhantes. Na via catabólica principal do fenantreno, inicialmente, ocorre uma dioxigenação na posição 3,4 com a formação de fenantreno cis-3,4-dihidrodiol, que é degradado ao ácido 1-hidroxi-2-naftoico. Esse composto pode então ser metabolizado por duas vias distintas. Em uma delas ocorre sua hidroxilação com a formação de 1,2-dihidroxi-naftaleno, que entra na via de degradação do naftaleno e é convertido a salicilato e por fim degradado via catecol. Na outra, esse composto é diretamente clivado pela enzima 1-hidroxi-2-naftoico dioxigenase e por meio de reações sequenciais é convertido à ftalato (via *o*-ftalato), que finalmente é metabolizado via protocatecoato (Figura 7B). Já o antraceno é inicialmente dioxigenado na posição 1,2, sendo convertido a 1,2-hidroxi-antraceno. Esse composto é meta clivado o que leva à formação do ácido 2-hidroxi-3-naftoico, que posteriormente é convertido a 2,3-hidroxi-naftaleno. Esse último composto entra na via de degradação do naftaleno e é metabolizado a salicilato e por fim via clivagem do catecol (Habe & Omori, 2003; Ouyang, 2004) (Figura 7C).

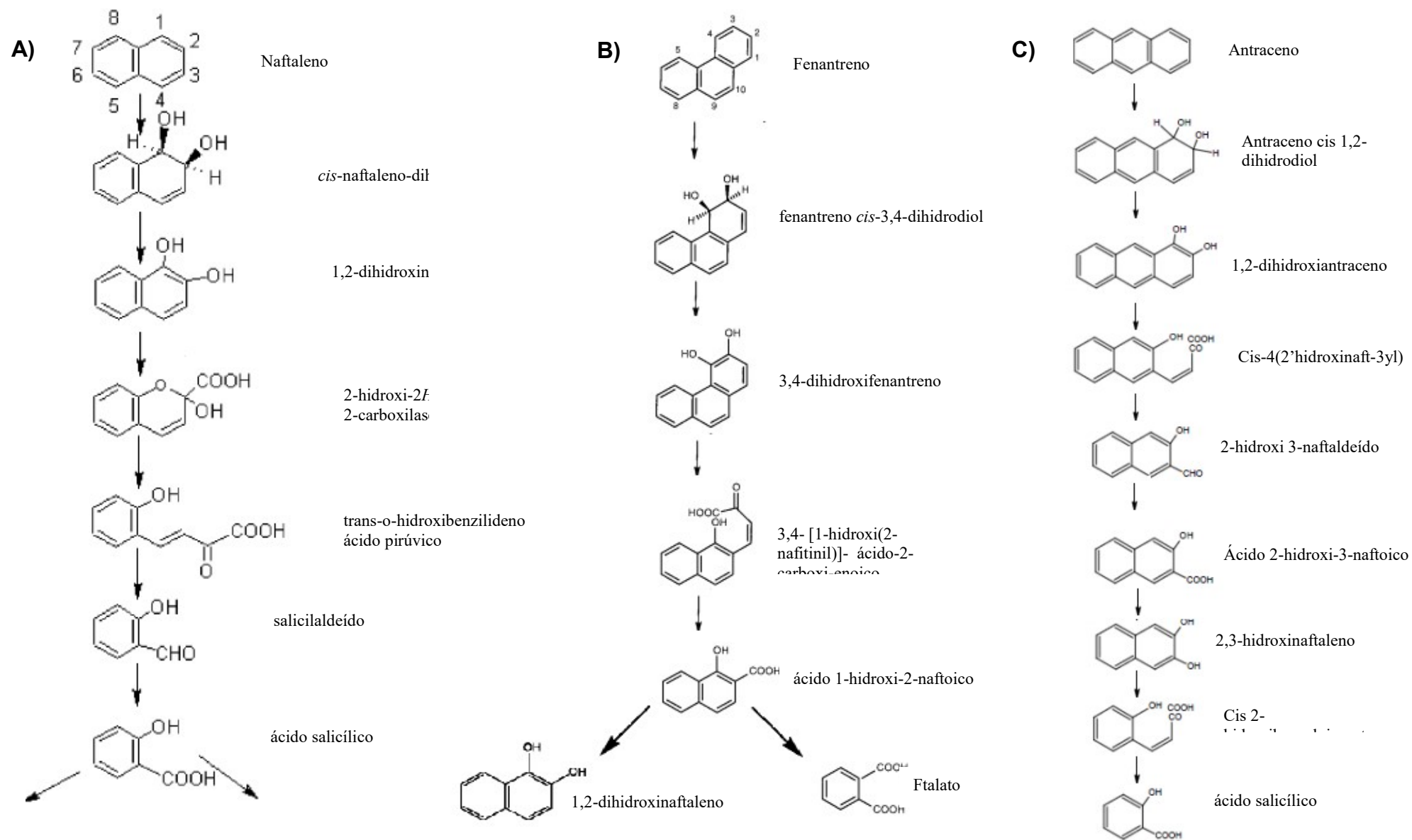


Figura 7: (A) via de degradação do naftaleno; (B) via de degradação do fenantreno; (C) Via de degradação do antraceno (adaptado de Habe & Omori, 2003; Moody *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2008).

2.4.2) Via de degradação do pireno

Em relação aos HPAs com alto peso molecular, o pireno é geralmente o composto usado como modelo de degradação. Na via mais conhecida, inicialmente, ocorre uma dioxigenação na posição 4,5 com a formação de *cis* ou *trans*-4,5-pirenodihidrodióis. Essas moléculas são, posteriormente, rearomatizadas e orto-clivadas, o que leva à formação de 4,5-fenantreno ácido dicarboxílico. Esse composto é descarboxilado a ácido 4-fenantroico, que sofre uma segunda dioxigenação formando *cis*-3,4-fenantrenodihidrodiol-4-ácido carboxílico. Uma rearomatização desse composto leva à formação de 3,4-dihidroxfenantreno, que é um intermediário da via de degradação do fenantreno (Figura 8) (Habe & Omori, 2003; Peng et al., 2008).

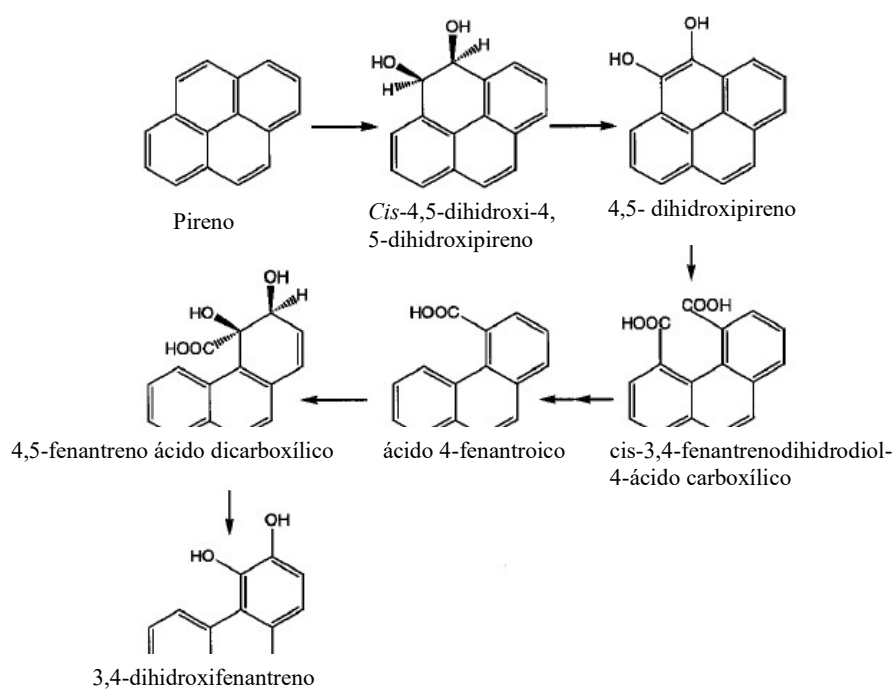


Figura 8: Vias de degradação do pireno (adaptado de Habe & Omori, 2003).

2.5) Vias de degradação microbiana de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos heterocíclicos (hetero-HPAS)

A biodegradação de HPAs é bem caracterizada, mas o conhecimento das vias de biodegradação de hetero-HPAS ainda é muito limitado, pois sempre foram menos estudadas (Meyer & Steinhart, 2000; Ahtiainen et al., 2002). Sabe-se que a degradação desses compostos é comumente aeróbia, sendo as vias de degradação anaeróbicas somente parcialmente conhecidas para alguns compostos (Safinowki et al., 2006).

Hetero-HPAS como carbazol, dibenzofuranos (DBF) e dibenzotiofenos (DBT) são componentes do creosoto. Esses compostos específicos são amplamente usados como compostos modelo para o estudo de biodegradação de hetero-HPAS contendo N, O e S, respectivamente. (Jensen, et al., 2003; Xu et al., 2006). A estrutura desses compostos pode ser visualizada na Figura 9.

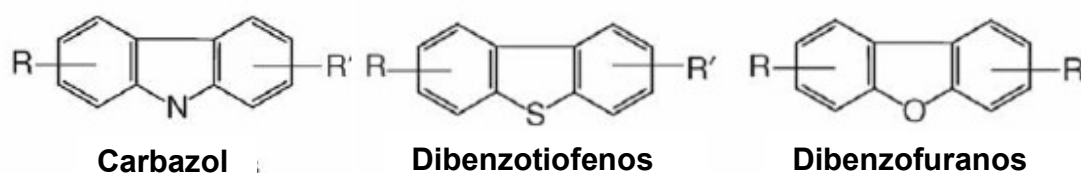


Figura 9: Estrutura química do Carbazol, Dibenzotiofenos (DBT) e Dibenzofuranos (DBF) (Apertado de Nojiri et al., 2001).

A maioria das espécies que degradam o carbazol o faz por meio de vias semelhantes nas quais, de modo geral, o hetero-HPA sofre uma clivagem no anel para produzir ácido antranílico como um intermediário que é, posteriormente, completamente mineralizado (Xu et al., 2006). As etapas iniciais de degradação de carbazol são geralmente realizadas por enzimas Car (CarA CarB e CarC). Entre as muitas dioxigenases de compostos aromáticos relatadas, Car são as únicas enzimas capazes de catalisar a cis-hidroxilação, monooxigenação e dioxigenação angular de diferentes compostos aromáticos (Nojiri et al., 1999).

O esquema de degradação do carbazol pode ser visualizado na Figura 10. O hetero-HPA é primeiramente dioxigenado a um composto intermediário dihidroxilado que é convertido espontaneamente em 2'-amino bifênil-2,3-diol pela ação da enzima carbazol 1,9 – dioxigenase (CarA), que atua na posição angular adjacente ao átomo de nitrogênio presente na molécula (Benedik et al., 1998; Riddle et al., 2003). Posteriormente, ocorre a abertura do anel hidroxilado do composto 2'-amino bifênil-2,3-diol na posição meta do anel, transformando esta molécula bifênica em outra denominada (HOADA). Essa clivagem é catalisada pela enzima 2'-amino bifênil-2,3-diol 1,2-dioxigenase (CarB) (Sato et al., 1997). Na etapa seguinte da rota de degradação ocorre a hidrólise do ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-(2'-aminofenil)-hexa-2,4-dienóico (HOADA) em ácido antranílico e ácido 2-hidroxipenta-2,4-dienóico (chamada de HOADA

hidrólise) pela ação da hidrolase CarC. O ácido antranílico formado é convertido em catecol pela enzima AntABC, identificada como antranilato 1,2-dioxigenase, que remove o nitrogênio heteroatômico (Nojiri et al., 2001a; Riddle et al., 2003). A partir disso, o catecol pode ser metabolizado por via de orto ou meta clivagem, como já mencionado anteriormente.

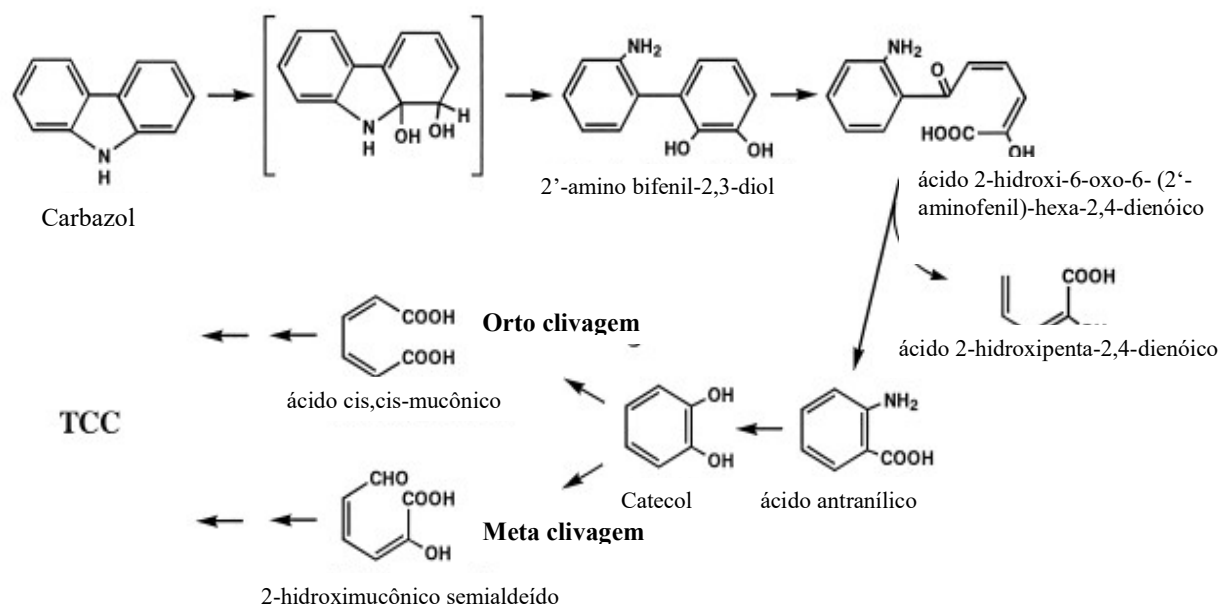


Figura 10: Via geral de degradação do carbazol (Adaptado de Xu et al., 2006)

Algumas pequenas diferenças na rota de degradação do carbazol podem ser observadas em outras cepas bacterianas, que são capazes de expressar enzimas dioxigenases que atuam diferentemente da dioxigenase angular na primeira etapa do processo, com formação de intermediários diferentes (Gieg et al., 1996). Há ainda aquelas que utilizam dioxigenases normalmente relacionadas com a degradação de outros hidrocarbonetos aromáticos nesse processo, como por exemplo, NDO de *Pseudomonas sp.* NCIB 9816-4 e bifênil dioxigenase de *Beijerinckia sp.* B8/36 (Resnick et al., 1993).

Como ocorre na degradação de HPAs não substituídos, o catabolismo bacteriano de dibenzofuranos (DBF) se inicia pela inserção de átomos de oxigênio à molécula, o que é catalisado por enzimas dioxigenases (Seo et al., 2009). Esse passo inicial pode ocorrer por três caminhos diferentes de acordo com o isolado: dioxigenação angular, dioxigenação lateral ou

oxigenação lateral e os dois primeiros podem ser visualizados na Figura 11 (Xu et al., 2006). Há apenas alguns relatos de bactérias que transformam os DBF por ambas as vias de dioxigenação, e a oxigenação lateral só é realizada por algumas espécies de fungos e ainda não está totalmente elucidada (Stope, et al., 2002; Xu *et al.*, 2006). Na via iniciada pela dioxigenação angular (Figura 11A), o oxigênio molecular é incorporado na posição angular do heteroátomo do DBF, levando à formação de hemiacetais instáveis que quebram espontaneamente gerando o composto 2,3,2'-trihidroxibifenil. Posteriormente, ocorre a clivagem do anel do 2,3,2'-trihidroxibifenil por enzimas dioxigenases extradiol, transformando essa molécula no ácido 2-hidroxi-6-(2-hidroxifenil)-6-oxo-2,4-hexadienóico que é então hidrolisado à 3-(chromen-4-en-2-yl)-piruvato e ácido salicíclico. O ácido salicíclico é convertido à catecol ou outros intermediários centrais. Na via iniciada pela dioxigenação lateral (Figura 11B), o oxigênio é incorporado nas posições 1,2; 2,3 ou 3,4 da molécula, levando à produção de dibenzofuranos-dihidrodióis. Posteriormente, ocorre a fissão do anel do dihidroxidibenzofurano formado. No caso do 1,2-dihidroxidibenzofurano, essa fissão resulta na produção de ácido 2-hidroxi-4-(3'-oxo-3'H-benzofurano-2'-ilideno)but-2-enóico que é degradado à ácido salicíclico, que por sua vez é também metabolizado à catecol (Xu et al., 2006).

Diferentes isolados microbianos já se mostraram capazes de realizar a degradação de Dibenzotiofenos (DBT) e demais compostos orgânicos sulfurados em geral. Esse processo pode ocorrer por meio de diferentes vias metabólicas como a Kodama, Van der Afferden e 4S (Gupta et al., 2005). Dentre elas, a Kodama é a via utilizada pela maioria das bactérias que degradam o DBT e estudos realizados sugerem que enzimas dioxigenases que atuam em vias de degradação de HPAs comuns podem também estar envolvidas nessa via (Kilbane & Jackowsky, 1992; Gupta et al., 2005).

A via Kodama de utilização de DTB foi proposta inicialmente para espécies de *Pseudomonas* sp. em 1970 e 1973 e nela esse composto é parcialmente degradado através de sucessivas oxidações por um mecanismo semelhante ao de degradação do naftaleno (Figura 12) (Kodama et al., 1970 e 1973; Denome et al., 1993a). Inicialmente, ocorre a dihidroxilação de um dos anéis aromáticos do DBT nas posições 2 e 3 do DBT, o que culmina na quebra desse anel aromático. Após sucessivas oxidações por diferentes enzimas dioxigenases, obtém-se como produto final o 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno, no qual persiste o núcleo tiofênico, ou seja,

nessa via de degradação o S ainda se mantém no produto final gerado (Gallagher et al., 1993 & Alves et al., 1999).

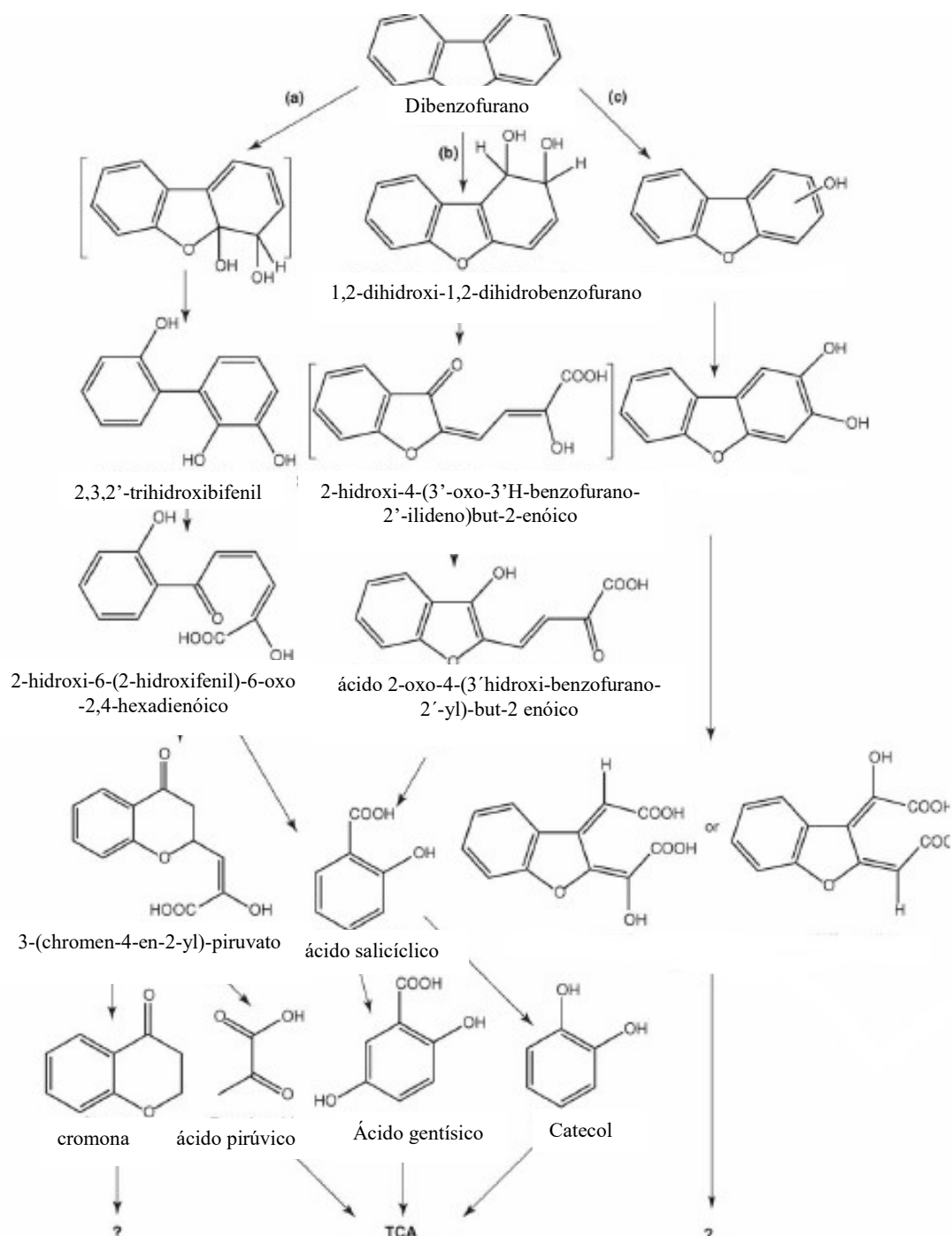


Figura 11: Vias de degradação de Dibenzofuranos (DBF) a) Dioxigenação angular, b) Dioxigenação lateral (Adaptado de Xu et al., 2006).

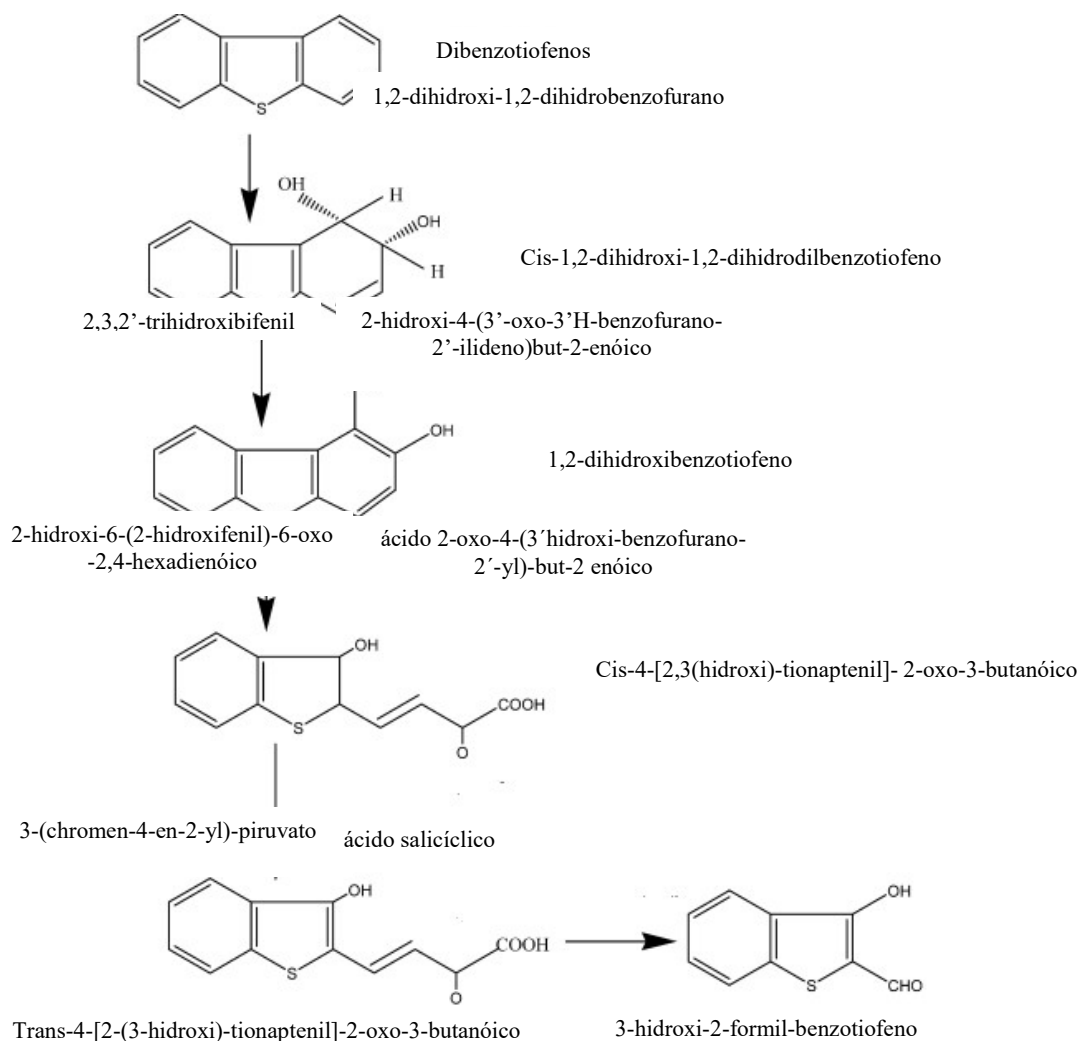


Figura 12: Via Kodama de degradação de DBT (Adaptado de Gupta et al., 2005).

2.6) Compostos ativos de superfície (CAS)

Como já mencionado anteriormente, uma boa parte dos hidrocarbonetos, com destaque para os HPAs, possuem uma solubilidade muito baixa em água. Isso limita a disponibilidade dessas moléculas, o que resulta na redução da eficiência de biodegradação desses contaminantes pelos microrganismos, uma vez que a maioria deles só degrada hidrocarbonetos quando eles se encontram dissolvidos na água (Kulik et al., 2006; Juhasz et al., 2010). Por conta disso, a baixa disponibilidade pode ser considerada como o principal fator responsável pela persistência de muitos hidrocarbonetos no ambiente e pelo fracasso de muitos projetos de biorremediação,

afetando-a mais que outros fatores relevantes do processo como pH, teor de umidade, nutrientes (Alamri, 2009; Mahmoudi et al., 2013). Acredita-se, inclusive, que a baixa biodisponibilidade de HPAs pode ter impedido a evolução de vias enzimáticas mais adequadas e eficientes para a degradação dessas moléculas (Johnsen et al., 2005b).

Assim, novas estratégias precisam ser utilizadas para aumentar a biodisponibilidade de hidrocarbonetos em locais contaminados (Kulik et al., 2006). Uma alternativa com eficiência já comprovada é a adição de compostos com atividade de superfície (CAS) (Mohan et al., 2006; Asquith et al., 2012). Os CAS correspondem a uma importante classe de compostos químicos que possuem moléculas anfipáticas, constituídas de uma cauda hidrofóbica e uma cabeça hidrofílica (Desai & Banat, 1997; Nitschke & Pastore, 2002). A parte apolar, hidrofóbica é constituída, geralmente, por uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a parte polar, hidrofílica, pode ser aniônica, não-iônica, catiônica ou anfotérica (Nitschke & Pastore, 2002; Vaz et al., 2012).

Essa composição anfipática confere aos CAS características tenso-ativas, permitindo que essas moléculas se distribuam e acumulem entre fases imiscíveis como óleo/água ou água/óleo com diferentes graus de polaridade, sendo que a porção hidrofóbica interage diretamente com a fase orgânica e a porção hidrofílica com a fase aquosa (Desai & Banat, 1997; Nitschke & Pastore, 2002). Isso promove a redução das tensões interfaciais entre elas até um nível crítico, a partir do qual ocorre a formação de grandes agregados moleculares, denominados micelas, que ao contrário dos monômeros, ficam dispersas em toda a fase aquosa (Desai & Banat, 1997; Banat et al., 2000; Singh et al., 2007). Como os compostos hidrofóbicos e orgânicos, como os HPAs, ficam retidos nos núcleos hidrofóbicos dessas micelas isso promove sua transferência e solubilização para a fase aquosa, facilitando sua subsequente biodegradação (Figura 13) (Laha et al., 2009; Asquith et al., 2012).

Devido a essas propriedades, os CAS possuem características de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, solubilização e dispersão de fases, dentre outras (Banat et al., 2000). Assim, essas moléculas possuem várias outras aplicações além da biorremediação de áreas contaminadas com hidrocarbonetos (Kennedy, 2011). Algumas dessas aplicações incluem a indústria de detergentes, herbicidas, pesticidas, tintas, cosméticos, têxtil, papel, como agentes antiestáticos e plastificantes, dentre outras (Vaz et al., 2012).

A eficiência de um CAS é medida por meio de um parâmetro denominado concentração micelar crítica (CMC). A CMC é definida como a concentração mínima do tensoativo necessária

para atingir os valores mais baixos de tensão superficial, a partir da qual se inicia a formação das micelas. Essa concentração é característica de cada CAS, mas para que um determinado composto seja considerado eficiente deve apresentar baixa CMC, ou seja, menores concentrações do mesmo devem ser necessárias para reduzir a tensão superficial (Figura 13) (Mulligan, 2005).

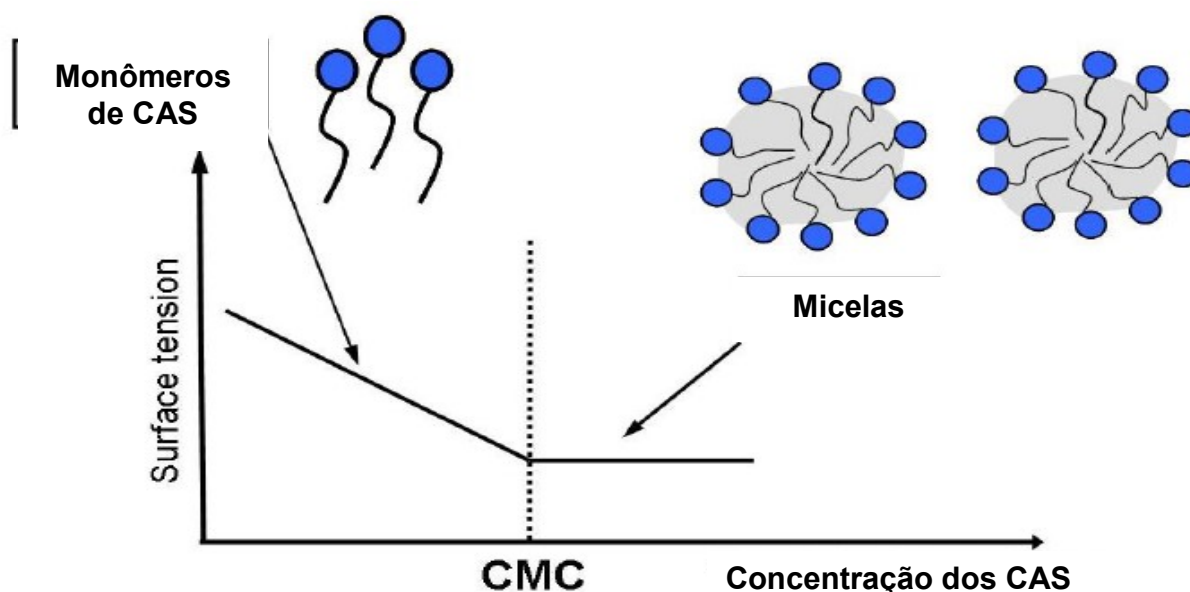


Figura 13: relação entre a concentração de CAS, tensão superficial e formação de micelas. Adaptado de Pacwa-Płociniczak et al., 2011.

Tradicionalmente, os CAS são produzidos por meio de reações químicas a partir de derivados de petróleo (Vaz et al., 2012). Entretanto, a crescente preocupação ambiental para o uso de produtos renováveis tem estimulado a busca de produtos naturais, como alternativa aos produtos sintéticos já existentes (Sarachat et al., 2010). Os microrganismos podem aumentar naturalmente a biodisponibilidade de hidrocarbonetos excretando CAS com atividade biosurfactante ou bioemulsificante (Fernandez-Luqueno et al., 2011). Os CAS de origem microbiana constituem um grupo diverso de moléculas com propriedades tenso-ativas e são subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras (Nitschke & Pastore, 2002). Esses compostos têm ganhado cada vez mais atenção científica por serem naturais e apresentarem uma série de vantagens em relação aos sintéticos, tais como biodegradabilidade superior, excelente atividade superficial, interfacial e de emulsão, alta especificidade, diversidade química, possibilidade de produção a partir de substratos renováveis, capacidade de modificação estrutural

através de engenharia genética ou bioquímica, menor toxicidade e eficácia superior em valores extremos de pH, concentração salina, e temperatura (Vaz et al., 2012; Sachdev & Cameotra, 2013; Szulc et al., 2014).

Existem diferentes tipos de CAS microbianos, classificados com base em suas propriedades físico-químicas, tais como glicolipídeos, lipossacarídeos, lipopéptídeos, lípidos neutros, fosfolipídeos, ácidos graxos, poliméricos, dentre outros (Mesquita, 2004; Sachdev & Cameotra, 2013). O tipo de microrganismo, substrato de crescimento e condições de cultivo geralmente influenciam essa composição (Puntus et al., 2005). Um grande número de microrganismos produtores vem sendo isolado de diversos ambientes como solo, sedimentos, lodos, ambientes marinhos, água doce e de áreas contaminadas com derivados de petróleo, o que tem culminado com a emissão de várias patentes relacionadas à produção de CAS por isolados (Shete et al., 2006; Tabatabaee et al., 2005). Dentre os gêneros mais estudados com relação à produção dessas moléculas, destaca-se *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Halomonas*, *Nocardia*, *Serratia*, *Enterobacter* e espécies como *Saccharomyces cerevisiae* e *Thiobacillus thiooxidans* (Lima, 2008; Satpute et al., 2010a; Kennedy, 2011). No campo da biorremediação, a aplicação de CAS para aumentar a eficiência de biodegradação de HPAs tem sido objeto de estudos e alguns autores já relataram um aumento da capacidade de biorremediação de ambientes e resíduos contaminados pela presença de microrganismos produtores de CAS ou pela adição dessas moléculas (Providenti, 2005; Sachdev & Cameotra, 2013; Szulc et al., 2014).

Das & Mukherjee (2007) inicialmente avaliaram a capacidade de 2 isolados bacterianos da espécie *Pseudomonas aeruginosa* e 1 isolado da espécie *Bacillus subtilis*, obtidos de um solo contaminado com hidrocarbonetos de petróleo, em produzir CAS e o efeito dos mesmos na solubilização de 3 HPAs: pireno, fenantreno e antraceno. Constatou-se que os CAS produzidos por todos os 3 isolados foram capazes de aumentar a solubilidade do pireno, fenantreno e antraceno para valores 7, 2 e 2,5 maiores do que os observados sem a adição dos compostos, característica favorável à biodegradação. Posteriormente, avaliou-se a capacidade do consórcio formado por esses isolados em degradar hidrocarbonetos presentes em amostras de solo contaminadas com óleo cru ao longo de 120 dias de tratamento. Corroborando com os resultados da solubilização dos HPAs pelos CAS produzidos por eles foi observado que o consórcio se mostrou capaz de degradar aproximadamente 65% da fração aromática dos contaminantes.

2.7) Prospecção bacteriana de enzimas degradativas e vias de degradação de HPAs

Embora a biosfera seja dominada por microrganismos e eles sejam considerados essenciais para o meio ambiente, o conhecimento de sua diversidade, distribuição e função no ecossistema permanece ainda bastante incompleto (Staley, 1998; Oliveira et al., 2006). Os benefícios científicos de um maior conhecimento sobre essa diversidade microbiana são muitos, em termos ambientais possibilitam a melhor compreensão das funções exercidas pela comunidade microbiana e em termos econômicos possibilitam a descoberta de microrganismos e seus produtos, potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos (Colwell, 1997; Oliveira et al., 2006).

Na indústria, a exploração de produtos microbianos, como enzimas, antibióticos, pigmentos, dentre outros, gera bilhões de dólares a cada ano e o sucesso de suas aplicações está relacionado com a diversidade de moléculas com diferentes funções que eles produzem como resultado de seu metabolismo primário e secundário (Hunter-Cevera, 1998; Kurtboke et al., 2004; Oliveira et al., 2006). Assim, o aumento da quantidade e diversidade de compostos químicos disponíveis às aplicações industriais é dependente da exploração da diversidade microbiana em diferentes ambientes (Colwell, 1997).

É possível encontrar microrganismos que possuem genes relevantes, como os catabólicos e a presença de vias degradativas de HPAs em todos os tipos de ambientes, contaminados ou não. No entanto, a abundância relativa dos mesmos pode ser muito baixa em condições normais, porque nesses ambientes microrganismos degradadores de hidrocarbonetos correspondem a menos de 0,1% do total de cultiváveis dentro da comunidade (Andreoni & Gianfreda, 2007; Szulc et al., 2014). Já os ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo possuem uma microbiota modificada na qual os microrganismos degradadores podem corresponder a até 100% da microbiota viável (Deziel et al., 1996; Andreoni & Gianfreda, 2007; Cravo-leurau et al., 2011).

Isso ocorre porque a exposição frequente da microbiota a contaminantes resulta na seleção de espécies tolerantes aos mesmos e que contém o aparato enzimático e demais adaptações necessárias para seu acesso e utilização como fonte de carbono e energia (Saikia et al., 2012; Sachdev & Cameotra, 2013). Como consequência, essas comunidades microbianas tem uma proporção maior de bactérias capazes de responder a presença dos contaminantes (Okerentugba & Ezeronye, 2003). Assim, os trabalhos de bioprospecção visando a obtenção de microrganismos

degradadores de HPAs e suas biomoléculas envolvem o isolamento e/ou estudo de microrganismos preferencialmente de ambientes contaminados com esse hidrocarbonetos (Martins et al., 2003).

2.8) Estudo de comunidades microbianas de ambientes contaminados através de técnicas moleculares

Pelo fato de a biorremediação ser um processo complexo e que demanda grande planejamento, antes de se iniciar qualquer intervenção em áreas contaminadas por HPAs é preciso definir a melhor estratégia de biorremediação (Chandran et al., 2011). Além disso, é imprescindível conhecer de forma profunda e abrangente a composição da microbiota local e o papel desses microrganismos na degradação dos contaminantes, além de condições que possam otimizar o processo (Yang et al., 2016).

Até recentemente, a maioria dos estudos de diversidade da microbiota relacionada à degradação de hidrocarbonetos envolvia métodos dependentes de cultivo, que se baseiam no isolamento e posterior estudo dos microrganismos (Schneider et al., 1998; Cravo-leurau et al., 2011). O maior problema da utilização desses métodos é a impossibilidade de se obter uma informação completa de todos os microrganismos presentes em uma amostra ambiental devido à impossibilidade de crescimento de alguns deles a partir das técnicas de recuperação, isolamento e cultivo utilizadas atualmente (Amann et al., 1995; Sierra-García *et al.*, 2014). Isto está diretamente associado ao não conhecimento dos requerimentos nutricionais e fisiológicos de todos os microrganismos ou ainda ao estado em que se encontram no ambiente e que impede a sua ativação/crescimento no laboratório (Amann et al., 1995). Esses microrganismos são metabolicamente ativos no ambiente em que se encontram e são chamados de “viáveis, mas não ‘cultiváveis’”, entretanto ainda não formam colônias viáveis sob condições laboratoriais, o que faz com que somente 10% ou menos dos microrganismos do ambiente seja passível de ser cultivado (Ogunseitan, 2005; Amann et al., 1995; Mocali & Benedetti, 2010; Sierra-García et al., 2014).

Em ambientes contaminados, foi observado que organismos de crescimento rápido ou cepas melhor adaptadas a condições particulares crescem preferencialmente em relação àquelas que não são e, portanto, não representam com precisão a composição real da comunidade microbiana de ambientes contaminados (Rappe & Giovannoni, 2003; Gilbride et al., 2006). A consequência dessa pequena fração da diversidade microbiana que consegue ser avaliada é a dificuldade de se conhecer a real estrutura e potencialidade dos microrganismos presentes nesses

ambientes e diretamente envolvidos nos processos de biodegradação, além de uma taxa extremamente baixa de descoberta de novas biomoléculas e capacidades metabólicas (Rappe & Giovannoni, 2003; Simon & Daniel, 2011; Nacke et al, 2011).

Devido a essa limitação, esses métodos têm sido complementados ou até mesmo substituídos por técnicas independentes de cultivo, levando ao desenvolvimento de um grande número de metodologias baseadas no estudo do DNA para a análise da diversidade e função microbiana (Amann et. al., 1995; Torsvik et. al., 1998). Os rápidos avanços dessas técnicas moleculares têm se tornado também uma ferramenta para a compreensão da dinâmica da comunidade microbiana e sua abundância relativa, além da distribuição e diversidade de microrganismos ativamente envolvidos na biorremediação (Torsvik et al., 2002). Elas também permitem a utilização das comunidades microbianas como um parâmetro ecológico no monitoramento de sítios contaminados durante a biorremediação, tanto pelas alterações na comunidade em resposta à contaminação e sua restauração ao fim do processo quanto por sua resiliência aos distúrbios antropogênicos (Desai et al., 2010). Esse conhecimento é útil para a compreensão do processo e desenvolvimento de estratégias que otimizem a biorremediação (Iwamamoto & Nasu, 2001).

Todo esse conhecimento tem possibilitado, inclusive, acessar o potencial de obtenção de microrganismos degradadores e produtores de biomoléculas de interesse em um determinado ambiente, orientando os trabalhos de prospecção. A detecção de sequências de ácidos nucleicos correspondentes a esses genes de interesse com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos ou sondas de hibridização é uma ferramenta indispensável atualmente para esse fim (Andreoni & Gianfreda, 2007). Há várias técnicas que utilizam essa abordagem genômica, incluindo o PCR quantitativo em tempo real (qPCR), que permite a quantificação do número de cópias de determinados genes de interesse por meio do monitoramento dos amplicons gerados em cada ciclo do PCR e pode ser realizado diretamente a partir do DNA metagenômico de amostras ambientais (Higuchi et al., 1992; Urich et al., 2008). Além da qPCR, destaca-se diversas outras técnicas moleculares que vem sendo comumente utilizadas para o estudo de comunidades microbianas ambientais, tais como a Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) e as diversas abordagens metagenômicas.

2.8.1) Utilização de abordagens genômicas para o estudo e predição de vias de degradação de HPAs

Nos últimos anos, o estudo crescente do genoma dos microrganismos tem fornecido informações valiosas para uma compreensão ainda mais profunda dos genes que codificam vias de degradação de HPAs, incluindo a sua organização e regulação (Hertweck & Scherlach, 2009; Sierra-García et al., 2014). Estudos das principais enzimas de degradação dessas moléculas mostram que elas possuem muitas homologias de sequências, o que tem sido significativo e facilitado abordagens moleculares (Andreoni & Gianfreda, 2007).

Em bactérias gram negativo, vários grupos de genes relacionados com a síntese de oxigenases responsáveis pela etapa inicial de degradação do naftaleno e fenantreno, mas que também podem atuar em outros HPAs são conhecidos (Van Hamme, et al., 2003). Os principais são os genes do operon *ndo* de *P. putida* NCIB9816 (Ensley et al., 1982), genes do operon *nah* de *P. putida* G7 e NCIB9816-4 (Simon et al., 1993), genes do operon *dox* derivados de *Pseudomonas sp.* C18 (Denome et al., 1993) e genes do operon *pah* de *P. putida* OUS82 e *P. aeruginosa* PaK1 (Takizawa et al., 1999). Esse grupo de genes são conhecidos como genes *nah* clássicos, devido à sua homologia de sequências superior a 90% (Van Hamme, et al., 2003; Andreoni & Gianfreda, 2007). Outros genes relacionados com a degradação desses compostos, mas evolutivamente diferentes dos genes *nah*, já foram obtidos tanto de outras bactérias gram-negativo não pertencentes ao gênero *Pseudomonas sp.* quanto de bactérias gram-positivo (Andreoni & Gianfreda, 2007). Alguns exemplos são os genes do operon *phd* de *Comamonas testosteroni* GZ39 (Goyal & Zylstra, 1997), genes do operon *nag* de *Ralstonia sp.* U2 (Fuenmayor et al., 1998), genes do operon *phn* de *Burkholderia sp.* RP007, *Alcaligenes faecalis* AFK2, *Sphingomonas aromaticovorans* 177 e suas espécies relacionadas (Lloyde-Jones & Laurie, 1999; Habe & Omori 2003). Especificamente em bactérias gram-positivo já foram descritos também os genes dos operons *nar* e *phd* identificados, respectivamente, em *Rhodococcus sp.* NCIMB12038 (Larkin et al., 1999) e em *Nocardioides sp.* KP7 (Saito et al., 1999). Além dos genes do operon *nid* descritos nos isolados PYR-1 e 6PY de *Mycobacterium sp.* (Khan et al., 2001), que codificam uma dioxigenase responsável por catalizar a degradação de pireno, 1-nitropireno, fenantreno, antraceno, fluoranteno e benzo (α) pireno.

A observação de alta homologia nas sequências dos genes que codificam essas enzimas e a baixa especificidade por substratos apresentada por algumas dioxigenases presentes em diferentes espécies de bactérias levaram a conclusão de que mecanismos de transferência e rearranjos gênicos desempenharam um importante papel na evolução e disseminação das regiões

gênicas relacionadas à degradação de HPAs nesses organismos (Peng et al., 2008). Isto explica a ocorrência destes genes, sejam eles cromossômicos ou plasmidiano, em ilhas genômicas, mais especificamente as ilhas catabólicas (Zhang & Anderson, 2012).

2.8.2) PCR-DGGE- Eletroforese em gel com gradiente desnaturante, importante abordagem para monitoramento de estruturas de comunidades microbianas

A Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE) é uma técnica de avaliação do perfil eletroforético de comunidades microbianas obtido por meio da amplificação de regiões do gene de 16S rRNA a partir do DNA extraído diretamente de amostras ambientais. O diferencial da técnica em relação a PCR convencional é o uso de oligonucleotídeos iniciadores ('primers') universais adicionados de grampo G-C, correspondente a uma região rica em guanina e citosina com alto valor de temperatura de "melting" (T_m) e a eletroforese usada na análise dos "amplicons" (Nocker et al., 2007). Esse marcador é o preferido pelo fato de ter sequências conservadas, mas com algumas porções variáveis, estar presente em todas as bactérias, com ausência de transferência lateral, grande tamanho (aproximadamente 1500 pb) e que infere relações filogenéticas entre os microrganismos (Woese, 1987; Atlas, 1997). Adicionalmente, o alto número de sequências desse gene depositados em diferentes bancos de dados também facilita seu uso (Kirk et al., 2004; Logares et al., 2014).

Os produtos gerados pela técnica de PCR possuem o mesmo tamanho, porém sequências de bases nucleotídicas diferentes, que permitem sua separação em bandas durante eletroforese em um gel de poliacrilamida com um gradiente linearmente crescente de agentes desnaturantes (mistura de uréia e formamida) (Muyzer, 1999). Essa separação é baseada na diminuição da mobilidade eletroforética da molécula de DNA parcialmente desnaturada (Muyzer & Smalla, 1998). A desnaturação parcial da molécula faz com que a migração do amplicom seja interrompida em uma posição única, determinada também por sua sequência nucleotídica, formando bandas no gel. Cada uma dessas bandas formadas no gel representa, em teoria, uma espécie ou um grupo de espécies de bactérias (Muyzer & Smalla, 1998) e, conseqüentemente, o perfil da comunidade bacteriana pode ser visualizado em função do seu padrão de bandas no DGGE (Iwamoto & Nasú, 2001).

Muitos estudos têm reportado o uso da técnica de PCR-DGGE no monitoramento da comunidade microbiana e seus genes funcionais em ambientes contaminados com poluentes de origem antropogênica, como os hidrocarbonetos de petróleo (Wakase et al., 2007). Ela é indicada

em estudos de microbiologia ambiental e ecologia microbiana, por ser adequada para análises a longo prazo, que envolvam coletas em diferentes intervalos de tempo e que avaliem a distribuição temporal e espacial das populações bacterianas (Muyzer, 1999). A técnica é efetiva, permitindo a análise de muitas amostras simultaneamente de forma rápida (Evans et al., 2004).

Contudo, a técnica apresenta algumas limitações, tais como tendência em apresentar somente bandas correspondentes aos amplicons provenientes de espécies predominantes na comunidade microbiana amostrada, pelo fato de não haver resolução suficiente para discriminar todos os amplicons obtidos da grande variedade de microrganismos (Muyzer & Smalla, 1998). Também, existe a possibilidade de co-migração de fragmentos de DNA com seqüências diferentes, criando bandas em posições idênticas no gel, mas que não são derivadas necessariamente das mesmas espécies (Muyzer et al., 1993; Muyzer, 1999). Outra importante limitação é o fato de o padrão da comunidade microbiana gerado não poder ser diretamente traduzido em informações taxonômicas. Apesar de que essa análise comparativa das seqüências pode ser realizada a partir da excisão de bandas de interesse do gel, re-amplificação e seqüenciamento (Giraffa & Neviani, 2001). Assim, os perfis eletroforéticos representativos da estrutura genética da comunidade microbiana são utilizados principalmente quando o objetivo é a comparação entre diferentes comunidades amostradas e a abundância de indivíduos nas populações dessas comunidades (Kent & Triplet, 2002; Ranjard et al., 2000).

No trabalho de Labbé e colaboradores (2007), esta técnica permitiu verificar influência da presença dos contaminantes na comunidade microbiana em 9 amostras de solos contaminados por derivados de petróleo e de 5 solos não contaminados, coletados em diferentes localidades da Áustria e que apresentavam características bem distintas de acordo com sua origem geográfica. Foi possível observar perfis eletroforéticos semelhantes entre a maioria dos solos contaminados que no dendograma resultante se agruparam, mesmo que com diferentes níveis de similaridades. Isso ocorreu, inclusive, para solos coletados em áreas relativamente distantes, indicando a influência da presença dos contaminantes na comunidade microbiana das amostras e que isso foi mais relevante na determinação da diversidade de espécies das mesmas do que sua própria origem geográfica e demais características físico-químicas.

2.8.3) Abordagens metagenômicas

Abordagens metagenômicas são a análise genômica da comunidade de microrganismos de um determinado ambiente, independente do seu isolamento e cultivo (Nacke et al., 2011; Simon & Daniel, 2011). O termo é derivado do conceito estatístico de meta-análise (processo de combinar estatisticamente análises separadas) e genômica (análise ampla do material genético de um organismo) (Schloss & Handelsman, 2003). Esses métodos baseiam-se na extração direta de DNA a partir de amostras ambientais, seguido do sequenciamento de alto desempenho ou de nova geração (NGS), a partir da qual milhares de sequências de DNA podem ser analisadas paralelamente com o intuito de elucidar a composição da comunidade microbiana de sistemas complexos (Amann et al., 1995; Greene & Voordouw, 2003; Goodwin et al., 2016).

Assim, essa abordagem permite o acesso ao material genético coletivo de todos os microrganismos autóctones presentes no ambiente estudado, sejam eles cultiváveis ou não e preservar suas funções metabólicas *in situ* (Handelsman, 2004; Nacke *et al.*, 2011). Isso permite que a metagenômica seja uma ferramenta molecular que ultrapassa as limitações impostas por abordagens clássicas, possibilitando uma perspectiva mais ampla da variedade taxonômica, ecológica e funcional de microrganismos no ambiente e acesso a esse reservatório inexplorado de novas biomoléculas (Sierra-García et al., 2014).

Inicialmente, a metagenômica era utilizada basicamente para a obtenção de novas moléculas, compreendendo o isolamento do DNA diretamente de amostras ambientais, a fragmentação desse DNA por enzimas de restrição, construção de bibliotecas com o uso de vetores adequados e armazenamento dos mesmos em hospedeiros heterólogos, para posterior triagens dos clones gerados em busca de um gene de interesse (Kennedy et al., 2011; Sachdev & Cameotra, 2013). Entretanto, os recentes avanços na tecnologia de sequenciamento de DNA de nova geração, como as plataformas Íon Torrent e Illumina, têm criado oportunidades de sequenciamento em uma profundidade sem precedentes e estudos com o uso dessa técnica têm sido realizados em solos, oceanos, águas subterrâneas, assim com vários outros ambientes (Berry, et al., 2011; Whiteley et al., 2012). O DNA metagenômico pode ser submetido ao sequenciamento de alto rendimento “shotgun” e a anotação automática dos dados sequenciados (Venter et al., 2004). O sequenciamento multiplex tem emergido como uma estratégia para o sequenciamento paralelo de muitas amostras diferentes ao mesmo tempo (Berry, et al., 2011). Nesse tipo de sequenciamento, uma sequência identificadora individual ou barcode é adicionada a diferentes amostras de DNA que poderão ser sequenciadas juntas, já que após o sequenciamento os reads

são classificados e atribuídos a cada amostra com base na detecção do barcode único (Hamady et al., 2008; Berry, et al., 2011).

Isso tem tornado possível a obtenção de conjuntos de dados proporcionais à complexidade dessas comunidades microbianas, resultado em novas aplicações como análises comparativas do perfil metagenômico e também metatranscriptômico, metaproteômico e metamobilômico de comunidades microbianas de diferentes ambientes (Simon & Daniel, 2011, Carvalhais et al., 2012).

2.8.3.1) Análises metataxonômicas

Outra abordagem metagenômica é a triagem baseada em sequências, que vem recebendo diferentes vocabulários desde que foi proposta, tais como seqüenciamento baseado em amplicons, metagenonômica alvo, e que mais recentemente, no trabalho de Marchesi & Ravel (2015), foi proposta como metataxonômica. Essa abordagem também envolve a extração do DNA diretamente da amostra, mas é seguida da amplificação de regiões específicas desse DNA por PCR, permitindo o estudo e identificação de microrganismos ali presente, a determinação da abundância de cada táxon e, dessa maneira, uma estimativa da diversidade taxonômica da amostra (Handelsman, 2004). O gene comumente utilizado para o estudo de comunidades de bactérias e arqueas também é o que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico, pois como já mencionado anteriormente, agrupa características ideais a um bom marcador filogenético.

O pool de DNA ambiental é altamente complexo, abrangendo milhares de genomas diferentes, muitos dos quais desconhecidos e normalmente presentes em abundâncias muito baixas (Pedrós-Alió, 2006). Assim, o seqüenciamento de regiões marcadoras tem um grande potencial de revelar a vasta diversidade filogenética das comunidades microbianas e permite inferir informações sobre os estilos de vida e contribuição individual de cada taxon, além das capacidades metabólicas individuais e da comunidade como um todo (Tringe et al., 2004). Adicionalmente, durante o processo, ainda é possível descobrir novos organismos e inferir genes e proteínas (Uhlik et al., 2013). No trabalho de Hemme e colaboradores (2015), por exemplo, seqüenciamento de nova geração usando a plataforma Illumina Hiseq foi usado para conhecer e comparar o perfil taxonômico e metabólico de amostras de águas subterrâneas naturais e contaminadas com diversas substâncias de origem antropogênica. Nas amostras naturais, foi observada uma proporção significativa de proteobactérias (> 55%) e uma abundância menor de

várias outras OTUs individuais (<1%). Além disso, a comunidade dessa amostra apresentou uma diversidade mais ampla de redes metabólicas. Em contraste, na amostra contaminada, muitos ciclos biogeoquímicos apareceram truncados ou minimizados, devido à diminuição da biodiversidade e dominância por populações do gênero *Rhodanobacter*.

Atualmente, essas análises taxonômicas a partir do rRNA 16S, apesar de possuírem alguns vieses introduzidos durante a PCR, são as mais comumente utilizadas para investigar a diversidade procariótica em amostras ambientais (Logares et al., 2014). Isso ocorre, inclusive, em pesquisas científicas para otimizar a biorremediação de ambientes contaminados por HPAs, que tem se inclinado mais ao uso dessas abordagens em comparação com as abordagens tradicionais de biorremediação (Devarapalli & Kumavath, 2015; Zafra et al., 2016). Um efeito imediato desses estudos é a descoberta de milhares de novos genes e famílias de genes, juntamente com centenas de novos microrganismos (Mukherjee et al., 2017). Os novos estudos que vêm sendo desenvolvidos e o enorme volume de dados resultantes, que são analisados por meio de análises de bioinformática, têm revolucionado o entendimento acerca de muitos genes, regiões genômicas, vias bioquímicas desses microrganismos não cultiváveis, com consequente compreensão da diversidade e função microbiana nesses ambientes complexos (Zhang et al., 2011b; Whiteley et al., 2012).

3. JUSTIFICATIVA

O creosoto é um contaminante que representa uma grande ameaça ao meio ambiente e a saúde humana, pois é constituído por uma mistura complexa de vários hidrocarbonetos com potenciais tóxicos, imunotóxicos, genotóxicos e cancerígenos, predominantemente os HPAs. Assim, ambientes contaminados com esses compostos são prioritários à remediação, de acordo com as legislações ambientais vigentes. A biorremediação é uma técnica que vem ganhando cada vez mais interesse e destaque para esse fim, por ser um processo natural, de baixo impacto ambiental, com melhor custo benefício e que pode levar à mineralização dos contaminantes. Entretanto, uma série de fatores deve ser considerado para a implementação de projetos de biorremediação em ambientes contaminados com hidrocarbonetos, sendo os principais a presença de microrganismos capazes de tolerar e com vias para a degradação desses compostos e condições que favoreçam seu crescimento.

Dentre as ferramentas usadas para atender esta demanda, as técnicas moleculares vêm complementando técnicas tradicionais de isolamento, cultivo e caracterização quanto o potencial degradativo, constituindo uma poderosa ferramenta para compreender de forma profunda as características das comunidades bacterianas nesses ambientes contaminados. Essas técnicas podem ser aplicadas ao estudo de todos os genomas microbianos nos mais variados ambientes e, conseqüentemente, no desenvolvimento de estratégias otimizadas para a biorremediação de ambientes contaminados, além da obtenção de novas moléculas microbianas potencialmente exploráveis em diversas outras atividades.

Outro fator a ser considerado e avaliado em projetos de biorremediação é a eficiência da introdução de consórcios bacterianos com alto potencial catabólico de degradação dos contaminantes. A formulação desses consórcios envolve geralmente o isolamento de microrganismos em áreas com histórico prévio de contaminação, posterior seleção daqueles com maiores potenciais catabólicos e definição das condições ótimas de biodegração em ensaios de microcosmos.

Nesse contexto, o conjunto de técnicas dependentes e independentes utilizadas nesse trabalho permitiram evidenciar o efeito dos HPAs na alteração da estrutura da comunidade bacteriana de amostras contaminadas com creosoto, conhecer os potenciais representados pelos grupos ali presentes em relação à degradação dos hidrocarbonetos, obter amostras dos

microrganismos bons degradadores que poderão ser prospectados em relação à presença de moléculas de interesse e utilizados como inoculantes para otimizar a degradação do contaminante na área de interesse e em outras áreas com condições semelhantes, seja individualmente ou na forma do consórcio elaborado, e ainda, forneceu informações para orientar e favorecer o planejamento do projeto de biorremediação como um todo.

4. OBJETIVOS

4.1) Geral

Acessar a diversidade taxonômica e funcional da comunidade microbiana de amostras de fração líquida de aquífero e sedimentos contaminados com creosoto por meio de técnicas independentes de cultivo e avaliar bactérias isoladas a partir dos sedimentos coletados quanto o potencial de degradação dos contaminantes para formulação de um consórcio capaz de promover a biorremediação da área, delineando também as condições ótimas para esse processo.

4.2) Específicos

Parte 1. Estudo da diversidade de bactérias presentes em amostras de fração líquida de aquífero contaminadas com diferentes concentrações de creosoto, utilizando abordagens independentes de cultivo.

- Conhecer o perfil da comunidade de bactérias presentes nas amostras da fração líquida do aquífero por meio da técnica de PCR-Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE);

- Avaliar a diversidade de bactérias de amostras de fração líquida de aquífero contaminadas com creosoto por meio de análises metataxonômicas usando como marcadores taxonômicos os genes do rRNA 16S, bem como o efeito dos contaminantes na estrutura da comunidade bacteriana dessas amostras e o seu potencial quanto à biorremediação da área;

- Quantificar a população de bactérias e arqueas presentes nas amostras da fração líquida do aquífero por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

Parte 2. Estudo da diversidade e prospecção de bactérias presentes em sedimentos contaminados com diferentes concentrações de creosoto utilizando abordagens dependentes e independentes de cultivo

- Conhecer o perfil da comunidade de bactérias presentes nas amostras de sedimentos por meio da técnica de PCR-Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE);
- Avaliar a diversidade de bactérias de amostras de sedimentos de lagoa contaminados com creosoto, por meio de análises metataxonômicas usando como marcadores taxonômicos os genes do rRNA 16S, bem como o efeito dos contaminantes na estrutura da comunidade bacteriana dessas amostras e o seu potencial quanto à biorremediação da área;
- Quantificar a população de bactérias e arqueas presentes nas amostras de sedimentos por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR);
- Identificar molecularmente bactérias com potencial de degradação do creosoto, previamente isoladas a partir dos sedimentos coletados na área de estudo pelo método de enriquecimento.
- Avaliar as bactérias isoladas em relação ao potencial de degradação de creosoto e seus componentes em meio líquido e na matriz de estudo.
- Formar um consórcio com as bactérias de maior potencial catabólico e testar a eficácia de seu uso em protocolos de bioaugmentação em combinação com os fatores aeração, adição de nutrientes e presença da microbiota autóctone em ensaios de microcosmo por um período de 60 dias para planejar e delinear as melhores condições para posterior biorremediação *in situ* da área contaminada.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Parte 1. Estudo da diversidade de bactérias presentes em amostras de fração líquida de aquífero contaminadas com diferentes concentrações de creosoto, utilizando abordagens independentes de cultivo.

5.1) Área de coleta e amostragem

As amostras foram coletadas em julho de 2015 em uma área contaminada com creosoto localizada no município de João Neiva, no estado do Espírito Santo, sob as coordenadas de latitude e longitude, respectivamente, 19°44'03''S e 40°21'50''W. Nessa área, funcionava uma antiga estação de tratamento e manutenção dos dormentes (ETD) da ferrovia Vitória/Minas, na qual o creosoto era usado como impermeabilizante. Por conta das aplicações sucessivas ao longo de mais de 20 anos, esse composto infiltrou no solo e acabou contaminando o aquífero. Foram coletadas oito amostras da fração líquida do aquífero a partir de poços de monitoramento instalados na área.

Para a coleta foram utilizados amostradores tipo bailers descartáveis de primeiro uso que foram trocados a cada mudança do ponto de amostragem de forma a evitar a contaminação das amostras. Foram coletados 5 litros de amostras por poço, os quais foram armazenados em galões plásticos de primeiro uso, previamente tratados com álcool 70% e ambientados por três vezes com a água dos poços a serem amostrados. Após a coleta, as amostras foram inicialmente pré-filtradas em membranas de policarbonato com poros de 20 µm de diâmetro, com a utilização de bomba de filtração à vácuo acoplada a kitsatos, para a remoção de partículas e sujeira. Após essa 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. Após a filtração, as membranas foram armazenadas em tubos tipo Falcon de 15 mL vazios, que foram acondicionados e mantidos em recipiente térmico adicionado de gelo durante a coleta e transporte até o Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) do Departamento de Microbiologia (ICB/UFMG), onde ficaram armazenadas em freezer -20° C até o processamento.

5.2) Pontos amostrados e análises físico-químicas das amostras

Os poços de coleta foram selecionados após análise de parâmetros físico-químicos caracterizados usando metodologias US EPA 8260B, US EPA 8270C e US EPA 3125B, relacionados em relatórios da área fornecidos pela empresa responsável. As análises foram realizadas pelo laboratório Bioagri Ambiental. O critério para a escolha dos poços foi a concentração média de 31 diferentes compostos orgânicos voláteis (COV) e semi-voláteis (COSV). Foram definidos três grupos de poços em função da concentração desses contaminantes de interesse: 3 poços sem contaminação (PP203, PP207 e PM208), 3 poços com contaminações altas da maioria dos compostos de interesse (PP20, PP206, PM211) e 2 poços com concentrações baixas da maioria dos compostos de interesse (PP29 e PP223). Esses poços amostrados foram agrupados em relação às concentrações dos contaminantes por meio da análise multivariada de componentes principais (ACP), utilizando o software PAST versão 3.04 (Hammer *et al.*, 2001). Os poços selecionados para cada grupo estão listados na Tabela 1 e suas localizações na área de amostragem podem ser visualizadas na Figura 14.

Tabela 1: Relação dos poços selecionados para coleta das amostras utilizadas no estudo, agrupados em função da concentração de COSV.

PP20 (poço profundo)	Poços com contaminação mais elevada pelos compostos de interesse: Acenafeno (acima de $80,0 \mu\text{g L}^{-1}$), Antraceno (acima de $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$), Dibenzofurano ($>111,0 \mu\text{g L}^{-1}$), Fluoreno (acima de $71,0 \mu\text{g L}^{-1}$), Naftaleno (acima de $1500 \mu\text{g L}^{-1}$).
PP206 (poço de monitoramento profundo instalado)	
PM211 (poço de monitoramento raso instalado)	
PP29 (poço profundo)	Poços com contaminação baixa pelos compostos de interesse: Acenafeno (0 a $80 \mu\text{g L}^{-1}$), Antraceno (0 a $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$), Dibenzofurano (0,58 a $74,0 \mu\text{g L}^{-1}$), Fluoreno (0 a $95,5 \mu\text{g L}^{-1}$), Naftaleno (0 a $2500 \mu\text{g L}^{-1}$).
PP223 (poço de monitoramento profundo instalado)	
PP207 (poço de monitoramento profundo instalado)	Poços sem contaminação pelos compostos de interesse
PM208 (poço de monitoramento raso instalado)	
PP203 (poço de monitoramento profundo instalado)	



Figura 14: Imagem de satélite da Estação de Tratamento e Manutenção dos Dormentes (ETD) da ferrovia Vitória/Minas e um diagrama da localização dos poços nos quais as amostras foram coletadas e que são circulado em vermelho. PP203 (H1); PP206 (H2); PM 211 (H3); PP20 (H4); PP29 (H5); PP207 (H6); PP223 (H7) e PM208 (H8).

5.3) Extração de DNA metagenômico das amostras

Inicialmente, as membranas filtrantes contendo o material celular das amostras da fração líquida do aquífero foram picotadas com o auxílio de uma tesoura estéril e, em seguida, submetidas à extração de DNA metagenômico com o uso do PowerWater DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA), de acordo com instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada em eletroforese de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e a quantificação realizada por meio da leitura da absorvância a 280 e 260 nm em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

5.4) Análises de PCR-Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE)

Para se conhecer o perfil geral da comunidade de bactérias presentes nas amostras da fração líquida do aquífero foi utilizada a técnica de PCR-DGGE. A amplificação do gene rRNA 16S do DNA metagenômico das amostras foi realizada com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores universais para eubactérias propostos por Muyzer e colaboradores (1993): F341GC (com adição do grampo G-C) e 907r (Tabela 2). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em termociclador sob as seguintes condições: 5 min de desnaturação 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, como proposto por Molina e colaboradores (2009). A verificação dos produtos da PCR foi realizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A eletroforese com gradiente desnaturante foi realizada com a utilização do equipamento “Hoefer SE600 Vertical Dual Cooler System” (Hoefer Scientific, San Francisco, CA), de acordo com metodologia proposta por Tankeré e colaboradores (2002), com algumas modificações. Os produtos da PCR foram aplicados em um volume de 20 µL diretamente no gel de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 37,5:1) a 8% (p/v), que foi preparado com gradiente desnaturante de 40 a 60%. Essas soluções desnaturantes foram preparadas pela mistura de uma solução de poliacrilamida com 80% de agentes desnaturantes (formamida 32% e uréia 5,6 molL⁻¹) 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 uma solução de brometo de etídeo em tampão TAE 1X (0,5 µg ml⁻¹), por 20 minutos e sua imagem, sob luz UV, foi capturada e digitalizada pelo equipamento ProteinSimple (Alphamager HP System). As imagens dos géis obtidas 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. Uma matriz de presença e ausência gerada a partir do perfil de bandas das amostras foi utilizada para a clusterização das mesmas, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard no programa Past versão 3.04 (Hammer et al., 2001).

Tabela 2- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar o gene rRNA 16S para uso na técnica de PCR-Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE)

Oligonucleotídeos iniciadores	Seqüência 5'→ 3'	Referência
F341	CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer et al., (1993)
R907	CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	Muyzer et al., 1998
GC-clamp	CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGG GCGGGGGCACGGGGG-(ligado à F341)	Muyzer et al., (1993)

5.5) Análises metataxonômicas das amostras

5.5.1) Montagem da biblioteca de “amplicons” e sequenciamento

A partir do DNA metagenômico das amostras da fração líquida do aquífero, foi realizada a reação de PCR para amplificar as regiões V3 e V4 do gene da subunidade 16S do rRNA das bactérias, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores 341F e 806R (Klindworth, et al 2013). Foi acrescido à parte anterior dos iniciadores a sequência “overhang forward”-5’TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG 3’ e “reverse”- 5’GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA G3’, compatíveis com os “index” e adaptadores da plataforma Miseq da Illumina, utilizando as condições descritas no protocolo proposto pela Illumina. Inicialmente, a reação da PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix, 5 µL de cada primer (1 pmol µL⁻¹) e 2,5 µL do DNA (15 ng µL⁻¹). A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguida de 30 ciclos a 95 °C por 30 seg., anelamento a 60 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 30 seg. A extensão final foi conduzida a 72 °C por 5 min. Os “amplicons” foram purificados com kit de purificação baseado em “beads” magnéticas (AMPure XP DNA, Beckman Coulter, Danvers, MA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, os “amplicons” foram ligados a um par de index (N7 e S5) específico para cada amostra durante uma segunda PCR: para um volume final de 25 µL, adicionou-se 12,5 µL de 2x KAPA HiFi HotStart ReadyMix, 3 µL de cada Nextera XT index, 2,5 µL do produto purificado da primeira PCR e 4 µL de água ultrapura. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 95 °C por 3 min., seguida de 8 ciclos a 95 °C por 30 seg., anelamento a 55 °C por 30 seg., extensão a 72 °C por 30 seg. e extensão final a 72 °C por 5 min. O produto da segunda PCR foi purificado com kit de purificação baseado em “beads” magnéticas (AMPure XP DNA, Beckman Coulter, Danvers, MA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Após a purificação da segunda PCR, os “amplicons” foram avaliados quanto a qualidade e tamanho das bandas utilizando Bioanalyzer DNA 1000 chip. Em seguida, as amostras foram quantificadas por qPCR utilizando o kit KK4824-Kappa Biosystems (Biosciences, Woburn, MA, Estados Unidos) no equipamento Step One Real Time PCR (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. A concentração de DNA expressa em nM foi calculada com base no tamanho dos fragmentos de DNA de acordo com a seguinte equação: (concentração em ng/µl) / (660g/mol x tamanho médio da biblioteca) x 10⁶. As bibliotecas resultantes foram diluídas utilizando tampão de ressuspensão para uma concentração de 4 nM. Então, alíquotas de 5 µl de cada biblioteca foram misturadas para formar as bibliotecas de pesquisa. Finalmente, estas bibliotecas reunidas foram desnaturadas com NaOH 0,2 N, diluídas

com tampão de hibridização HTI, e depois desnaturadas pelo calor antes do sequenciamento na plataforma Illumina MiSeq usando o kit V3, 2 × 300 bp paired-end. A corrida também incluiu 5% de PhiX como controle interno.

5.5.2) Análise das sequências

As sequências obtidas foram demultiplexadas para agrupar as amostras de acordo com o conjunto de index utilizado. Em seguida, avaliou-se a qualidade das sequências com base no filtro de qualidade do sequenciador MiSeq Illumina, excluindo-se sequências com valores de qualidade baixos. Após esta triagem inicial, as sequências foram convertidas para o formato FASTq. As análises seguintes foram baseadas no pipeline desenvolvido pelo Brazilian Microbiome Project (Pylro *et al.*, 2013), com modificações. Inicialmente, as sequências no formato FASTq foram trimadas quanto a qualidade, utilizando o parâmetro phred (score ≥ 20) e truncadas para o tamanho de 400 pb. Em seguida, foi feita a remoção das sequências únicas (“singletons”) e filtragem de sequências quiméricas utilizando o USEARCH (Edgar, 2010). A classificação taxonômica das OTUS foi realizada utilizando o banco de dados Greengenes para uma similaridade mínima de 97%, por meio do pacote QIIME (Caporaso *et al.*, 2010). Os dados brutos de sequenciamento foram submetidos para depósito no banco de dados do GenBank sob o número de acesso PRJNA429484.

5.5.3) Análises estatísticas

A classificação taxonômica, avaliação da cobertura do sequenciamento das amostras e de alfa e beta diversidade foram realizadas utilizando o pipeline core_diversity do pacote QIIME (Caporaso *et al.*, 2010). A curva de rarefação foi construída com base no número de OTUS observados para as amostras, com o intuito de avaliar a cobertura do sequenciamento. O índice Chao1 foi calculado para determinar a riqueza das amostras, os índices de Shannon e Simpson para determinar a alfa diversidade das mesmas e foi avaliada ainda a correlação desses parâmetros com a concentração dos contaminantes, utilizando o coeficiente de Spearman, no programa Minitab 17. A comparação da diversidade entre as amostras (beta diversidade) foi realizada por meio da análise de coordenadas principais, utilizando a matriz de distância do Unifrac ponderada e não ponderada (Lozupone & Knight, 2005). Os pacotes igraph e qgraph do programa R foram usados para construir uma figura de rede neural onde é possível visualizar os

perfis de gêneros compartilhados ou não pelas amostras. A análise de significância da abundância dos táxons bacterianos da comunidade entre o grupo com alta contaminação e sem contaminação ($p < 0.05$) foi realizada utilizando o pacote EdgeR no programa R. Para avaliar o efeito dos contaminantes na estrutura geral e distribuição das comunidades bacterianas das amostras foi realizada a análise multivariada de Non-metric multidimensional scaling – NMDS- utilizando a métrica de Jaccard no programa Past versão 3.04 (Hammer et al., 2001). Já para avaliar o efeito dos contaminantes na distribuição da comunidade bacteriana nos níveis de Filo, Classe, Família e Gênero, foi realizada uma Análise de redundância (RDA), utilizando o pacote vegan no programa R após os dados serem normalizados pela transformação de Hellinger, que minimiza o efeito de zeros nos dados da comunidade (Legendre & Gallagher, 2001). Para inferir potenciais funções nas comunidades bacterianas das amostras, foi utilizado o programa PICRUSt (“Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States”) (Langille et al., 2013). Este programa usa um algoritmo de reconstrução ancestral para estimar o número de genes de cada família de genes em cada microrganismo, com base em sua filogenia e genomas disponíveis, em um processo de duas etapas. Na etapa inicial, o programa prevê quais genes estão presentes em organismos que ainda não foram seqüenciados com base nos genes observados em seus parentes evolutivos já seqüenciados, o que reconstrói uma tabela de abundância de famílias de genes previstos para cada organismo. O esquema de classificação funcional utilizado neste trabalho foi o KEGG Orthology (Kos). O passo subsequente realiza uma inferência do metagenoma, combinando as previsões de conteúdo gênico realizadas para todos os táxons microbianos com a abundância relativa dos genes rRNA 16S e corrigidos para o número esperado de cópias do gene 16S rRNA. Assim, são geradas as abundâncias esperadas de famílias de genes em toda a comunidade. Para validar a acurácia das predições realizadas com a ferramenta foram calculadas para as amostras o “Nearest Sequenced Taxon Index” (NSTI), cujo valor depende do quão intimamente relacionados os microrganismos em uma dada amostra são em relação aos representantes genômicos seqüenciados, sendo que valores mais baixos indicam uma relação mais próxima.

5.6) Quantificação da comunidade de bactérias e arqueas por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A quantificação do número de cópias do rRNA 16S no DNA metagenômico das amostras da fração líquida do aquífero e posteriormente do número de células de bactérias e arqueas por mL⁻¹ das amostras foi realizada por meio de ensaios de qPCR. As reações foram realizadas em placas de polipropileno de 96 poços no equipamento StepOnePlus® (Applied Biosystems) versão 2.2.2, utilizando o sistema SYBR Green, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores Eub338/Eub518 (Fierer et al., 2005) para quantificar as bactérias totais e A517F/UA1204R (Baker et al., 2003) para arqueas (Tabela 3). As reações para ambos os grupos foram realizadas em triplicata em um volume de 10 µL contendo 5 µL do Kit SYBR Green Rox qPCR (Invitrogen, Life Technologies, Brasil), 5 µM de cada um dos oligonucleotídeos definidos para cada grupo (Síntese Biotecnologia, Brasil) e 1 µL do DNA metagenômico e 3 µL de água. As reações de amplificação foram realizadas com um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 60 °C. Ao final da reação foi realizada uma curva de desnaturação (“melting”) nas seguintes condições: 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min e a temperatura será aumentada até 95 °C por 15 s, com leitura de dados a cada 0,3 °C. O controle positivo utilizado para a construção das curvas padrão consistiu em um pool do DNA de todas as amostras que foram amplificadas com os primers selecionados pra cada grupo e purificados (Reis et al., 2014). Esse controle positivo foi quantificado por meio da leitura da absorvância a 280 e 260 nm em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) e o número de cópias do gene do rRNA 16S usado como “template” para as curvas padrão de cada grupo foi calculado utilizando a calculadora online <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html> (Staroscik, 2004). Reações de controle negativo sem DNA molde foram incluídas nos ensaios. Uma estimativa da quantificação absoluta do número de células de cada grupo por ml de amostra foi realizada considerando o valor médio de 4 cópias do gene do rRNA 16S por célula de bactéria e 2,5 por célula de arqueas (Klamppenbach et al., 2001). Para determinar se havia variação estatística significativa nas densidades de células entre as amostras, foi realizado o teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$) no Sisvar.

Tabela 3- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar o gene rRNA 16S de bactérias e arqueas na técnica de qPCR

Grupo de Microorganismos	Oligonucleotídeos iniciadores (Seqüência 5' →3')	Referências
Bactéria	Eub 338 (ACTCCTACGGGAGGCAGCAG Eub518 (ATTACCGCGGCTGCTGG)	Fierer et al., 2005
Archaea	A571F (GCYTAAAGSRICCGTAGC) UA1204R (TTMGGGGCATRCIKACCT)	Baker et al., 2003

Parte 2. Estudo da diversidade e prospecção de bactérias presentes em sedimentos contaminados com diferentes concentrações de creosoto utilizando abordagens dependentes e independentes de cultivo

5.1) Área de coleta e amostragem

As amostras foram coletadas em fevereiro de 2015 em uma lagoa contaminada também localizada na antiga estação de tratamento e manutenção dos dormentes da ferrovia Vitória/Minas, no município de João Neiva/ES (Figura 14). Foram coletadas amostras de 5 pontos dessa lagoa definidos aleatoriamente, sendo 2 de bordas opostas da lagoa: S102 e S129 e 3 de pontos da região central: S109, S138 e S144. A coleta foi realizada com a utilização de amostradores tipo bailers, descartáveis e de primeiro uso que foram trocados a cada mudança do ponto de amostragem de forma a evitar a contaminação das amostras. Foi coletado em média 1 Kg de sedimento para cada amostra em triplicata que foram armazenados em sacos plásticos novos e identificados em relação ao ponto da amostragem e repetição. Os sacos foram acondicionados em recipiente térmico (“cooler”) resfriado com gelo e transportados até o LMA, onde foram processadas. As três repetições de cada amostra foram homogeneizadas de forma a se obter amostras compostas, 30 g das mesmas foram separadas e estocadas a -20 °C para extração de DNA e uma porção de 100 g foram utilizadas para a caracterização de parâmetros físico-químicos.

Adicionalmente, foram coletadas amostras de creosoto a partir do aquífero contaminado, as quais foram utilizadas nos testes de degradação. A coleta dessas amostras foi realizada através do método de micropurga que segue a norma CETESB 6410 (1988), atualizada em Nov/1999, que substitui a norma internacional EPA ASTM D6771-02. Esta técnica consiste na instalação de uma bomba de baixa vazão, (0,1 a 0,4 L min⁻¹) posicionada na seção filtrante do poço. Para se obter o creosoto bruto, livre de água e solo, foi realizado um procedimento de extração. Inicialmente, 300 ml da amostra coletada foram misturadas com 300 ml de diclorometano e 400 ml de acetona. Essa mistura foi agitada, colocada na geladeira para decantar e centrifugada por 25 min a 1000 x g. O sobrenadante foi recolhido, colocado no rotavapor em 80 °C a 180 rpm e deixado por 2 horas para retirada dos solventes.

5.2) Análises físico-químicas das amostras

As amostras de sedimento da lagoa foram enviadas ao laboratório Bioagri Ambiental para a realização de análises físico-químicas e determinação da concentração dos HPAs considerados prioritários pela EPA - Environment Protection Agency. Foram analisados os parâmetros: Carbono orgânico total (COT), Nitrogênio total, Fósforo total e pH e os HPAs: Naftaleno, Acenaftileno, Acenafteno, Fluoreno, Fluoranteno, Pireno, Benzo(a)antraceno, Fenantreno, Antraceno, Criseno, Benzo(g,h,i)perileno, Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluoranteno, Dibenzo(a,h)antraceno, Benzo(k)fluoranteno e Indeno(1,2,3-cd)pireno. As cinco amostras coletadas foram agrupadas em relação aos parâmetros físico-químicos mensurados por meio da análise multivariada de componentes principais (ACP), utilizando o software PAST versão 3.04.

5.3) Extração de DNA metagenômico das amostras

O DNA metagenômico das amostras de sedimento foram extraídas com o uso do kit Power Max soil DNA (MoBIO Laboratories, Inc.), seguindo instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada em eletroforese de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e a quantificação realizada por meio da leitura da absorvância a 280 e 260 nm em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

5.4) Análises de PCR-Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE)

Para se conhecer o perfil da comunidade de bactérias presentes nas amostras de sedimentos foi utilizada a técnica de DGGE. A metodologia é a mesma descrita no tópico 5.4 do capítulo anterior.

5.5) Análises metataxonômicas das amostras

Com o intuito de se conhecer a composição taxonômica das amostras de sedimentos, o DNA metagenômico extraído de três delas, selecionadas de acordo com o perfil obtido pela técnica de PCR-DGGE, foi utilizado para a realização de análises metataxonômicas, com o uso de seqüenciamento de Nova Geração (NGS) por meio da plataforma Illumina/MiSeq, conforme descrito no tópico 5.5 do capítulo anterior. Entretanto, apenas a classificação taxonômica e as análises de alfa e beta diversidade além da predição gênica utilizando a ferramenta PICRUSt foram realizadas.

5.6) Quantificação da comunidade de bactérias e arqueas por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A quantificação do número de cópias do gene do 16S rRNA no DNA metagenômico das amostras de sedimentos e posteriormente do número de células de bactérias e arqueas por mL⁻¹ das amostras foi realizada por meio de ensaios de qPCR. A metodologia é a mesma descrita no tópico 5.6 do capítulo anterior.

5.7) Caracterização do potencial catabólico de bactérias isoladas do sedimento

Nesta etapa foram usadas bactérias isoladas a partir de 5 amostras de sedimento e 1 amostra aquosa contendo creosoto bruto extraído da área contaminada por meio da técnica de enriquecimento em meio contendo como fonte de carbono creosoto ou fenol por Alves (2016). Brevemente, as amostras foram inoculadas em frascos schott contendo 100 mL de Meio Mineral Mínimo (MMM), extrato de levedura 0,2% (p/v) e fenol a uma concentração de 100mg L⁻¹ ou creosoto bruto esterilizado a 10% v/v, como fontes de carbono. Para a amostra aquosa, não foi adicionada outra fonte de carbono, uma vez que já havia creosoto na mesma. Os frascos foram incubados à temperatura ambiente, sob agitação de 150rpm por 7 dias. Após esse período, 10 mL das culturas foram transferidas para um novo meio, contendo os mesmos compostos, e submetidos a mais um período de incubação de 7 dias nas mesmas condições. Esse procedimento foi realizado mais uma vez e após essas três passagens, a cultura foi diluída em solução salina estéril (NaCl a 0,85%) e alíquotas de 100 µL das diluições 10⁻¹ a 10⁻⁷ plaqueadas em MMM como base para uma sobrecamada composta de MMM semissólido adicionado dos respectivos compostos utilizados nas culturas de enriquecimento. As placas inoculadas foram incubadas à temperatura de 30 °C até a observação de crescimento dos microrganismos. As colônias que apresentaram diferenças morfológicas visuais foram quantificadas e purificadas em MMM sólido suplementado com os mesmos compostos descritos acima. Para a manutenção das culturas estoques, as bactérias são mantidas em meio Lignieri (inoculação por picada) a 4 °C, que serão utilizados nos ensaios subsequentes e a -80 °C em criotubos contendo 20% de glicerol

5.8) Identificação dos isolados bacterianos por métodos moleculares

Para a identificação, os isolados obtidos segundo metodologia do tópico anterior tiveram seu DNA extraído e regiões do gene do rRNA 16S amplificados por PCR.

5.8.1) Extração de DNA

Células dos isolados bacterianos foram utilizadas na extração do DNA genômico pelo método descrito por Pitcher e colaboradores (1989). Inicialmente, as células foram ressuspensas em 300 μL de tampão TE (Tris-HCl 10 mmol L^{-1} , EDTA 1 mmol L^{-1} , pH 8) e os tubos foram adicionados de uma porção de esferas de vidro e vortexados por 2 min. Após o período de incubação, as células foram lisadas com a adição de 600 μL de uma solução contendo tiocinato de guanidina 5 mol L^{-1} (Sigma), EDTA (100 mmol L^{-1} , pH 8,0) 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 pela incubação em banho de gelo por 2 min e, a seguir, adicionados de 300 μL de solução de acetato de amônio gelada (7,5 mol L^{-1}) e 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 23500 x 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 2 h e, a seguir, centrifugados a 6000 x g por 20 min para precipitação do DNA. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” lavado duas vezes com etanol 70%. Após estarem totalmente secos, os “pellets” foram ressuspensos em 50 μL de água livre de nucleases e estocados a 4°C . A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1%, e a concentração determinada por meio da leitura da absorvância a 280 e 260 nm em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

5.8.2) 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 PCR foi realizada para um volume final de 50 μL , contendo 5 μL de tampão PCR Buffer 10x (Sinapse Inc), 3 μL de MgCl_2 (25 mmol L^{-1}), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Sinapse Inc), 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada um dos desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada iniciador, aproximadamente 150 ng de DNA e para completar o volume, água deionizada estéril. A reação foi realizada utilizando termociclador (Applied Biosystems) sob as seguintes

condições: desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 21 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 57 °C por 1 min nos primeiros três ciclos com queda de 1 °C a cada dois ciclos até uma temperatura de 49 °C, e extensão a 72 °C por 3 min. A reação foi finalizada com uma extensão final a 72 °C por 10 min (Marchesi et al., 1998). O produto da PCR foi quantificado por meio da leitura da absorvância a 280 e 260 nm em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) e a integridade do fragmento, de aproximadamente 900 pares de bases, analisada por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando um padrão de DNA ladder 1Kb.

5.8.3) Purificação dos “amplicons”

Para purificação dos produtos de PCR, foi adicionado aos tubos contendo a reação 11,25 µL de EDTA (125 mmol L⁻¹) e 135 µL de etanol absoluto. A mistura foi incubada por 15 min à temperatura ambiente e em seguida centrifugada a 20215 x g por 25 min para precipitação dos “amplicons”. O sobrenadante foi descartado e aos tubos de microcentrífuga foram adicionados 120 µL de etanol 70% (v/v). Os mesmos foram homogeneizados por inversão, centrifugados a 20215 x g por 10 min e o sobrenadante novamente descartado. Após total evaporação do etanol residual, o produto foi ressuspendido em 10 µL de água livre de nuclease. O produto obtido foi quantificado por meio da leitura da absorvância a 280 e 260 nm em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

5.8.4) Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento, em um volume final foi de 10 µL, foram adicionados 20 ng do produto de amplificação purificado, o tampão de reação, BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix e os iniciadores 8F e 907R nas concentrações de 5 µmol L⁻¹. As reações de amplificação foram realizadas com um ciclo de desnaturação a 96 °C por 1 min, seguido de 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 30 µL 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 30 µL de etanol (70% v/v) adicionados a cada poço. Foi realizada uma nova centrifugação a

2.500 g por 15 min, o sobrenadante foi descartado e a placa permaneceu na temperatura ambiente até completa secagem do etanol. O produto de purificação foi seqüenciado no sequenciador 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). As seqüências de nucleotídeos obtidas foram editadas e comparadas com seqüências depositadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), usando o programa Blast N (Altschul et al., 1997). Para ser considerado pertencente a uma determinada espécie, o isolado tinha que apresentar similaridade de 97% a outra já depositada no GenBank (Stackebrandt & Goebel., 1994).

5.9) Caracterização dos isolados bacterianos quanto a degradação de creosoto

Os 43 isolados obtidos a partir da metodologia descrita no item 5.7 juntamente com 8 bactérias pertencentes ao estoque de microrganismos do LMA e que haviam apresentado em ensaios anteriores capacidade de degradação de diferentes hidrocarbonetos foram avaliados quanto à capacidade de degradação do creosoto obtido da ETD.

5.9.1) Ensaios de degradação

Inicialmente, os isolados foram ativados em placas de TSA. Após incubação, 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 (DO_{600}) 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 ETD estéril, em volume definido de forma a obter uma DO_{600} nm inicial de 0,1. Esses frascos foram incubados em agitador orbital tipo shaker durante 21 dias, à temperatura de 30 °C e rotação de 150 rpm. O experimento foi realizado em triplicata. Após esse período, o crescimento dos isolados foi medido por leituras de densidade ótica a 600 nm. Posteriormente, o creosoto da fase aquosa foi extraído com acetato de etila, em duas etapas, nas quais houve adições sucessivas de 1,5 mL do solvente seguido de agitação a 1000 rpm em termobloco à temperatura ambiente. Esses extratos foram então injetados em um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM), para avaliação da 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 de arraste 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. Para quantificar a degradação de creosoto e seus componentes por cada isolado, os valores obtidos dos frascos inoculados foram inicialmente comparados a controles sem inóculo, incubados pelo mesmo período e nas mesmas condições, para estimar a porcentagem de degradação de creosoto desconsiderando as perdas abióticas. Para quantificar a degradação de creosoto, todos os compostos identificados no mesmo foram analisados. Adicionalmente, foi quantificada também, especificamente, a degradação dos 12 compostos presentes em maior concentração nos controles: 2-metiltetracosano, 4H-ciclopenta[def]fenantreno, acenafteno, antraceno, benz[a]antraceno, dibenzofurano, dibenzotiofeno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, trifenileno 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).

5.9.2) Análises estatísticas

O teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$) no programa Sisvar foi utilizado para avaliar se os isolados selecionados diferiram estatisticamente em relação ao crescimento no MMM adicionado de creosoto (0,25%) como fonte de carbono, quanto à degradação total do creosoto e quanto à degradação dos 12 compostos mencionados no ítem anterior, Para avaliar o padrão de degradação geral dos 12 compostos pelos isolados e também os perfis catabólicos dos isolados considerando os 12 compostos selecionados, foi realizada uma ACP para tentar agrupá-los de acordo com os padrões, utilizando o software PAST versão 3.04 (Hammer et al., 2001).

5.10) Avaliação de crescimento e degradação de creosoto presente na matriz de sedimento individualmente pelos isolados com maior potencial de degradação

Para esse experimento, foram selecionados 15 isolados que apresentaram os maiores percentuais de degradação de creosoto no ensaio in-vitro com meio mineral descrito no tópico anterior.

5.10.1) Ensaios de degradação

Para a montagem do experimento, primeiramente amostras de sedimentos da área de estudo não contaminados com creosoto foram secas e peneiradas em malha de 2,5 mm aproximadamente. Posteriormente a relação C:N:P do sedimento foi corrigida para 100:15:1 com a adição de sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) . A seguir, 25g dos sedimentos foram acondicionados em frascos Erlenmeyer de 125 mL e submetidos à tinalização que consistiu na repetição por 3 vezes da manutenção das amostras em autoclave a 100 °C por 40 minutos seguido de 24 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, a umidade dos sedimentos em cada frasco foi corrigida para 20% (v/p) e os mesmos foram inoculados com uma concentração aproximada de 10^8 células dos isolados testados por grama de solo, o que corresponde a 0,2 unidades de DO. a 620nm. Estas células foram obtidas a partir do cultivo dos isolados por 12 h em meio TSA (Himedia) e em seguida foram lavadas em solução salina e ressuspendidas em 3 mL de meio TSB (Himedia). Posteriormente, o sedimento foi homegeinizado com o auxílio de um bastão de vidro e 1 grama separado para ser feito diluição seriada, seguido de plaqueamento e cálculo de UFC g^{-1} de sedimento. Por fim, os frascos foram contaminados com 1% de creosoto e novamente homegeinizados com bastão de vidro. Os erlenmeyers foram fechados com rolhas de algodão e incubados em temperatura de 30 C° e a cada 5 dias a umidade foi corrigida para se manter à aproximadamente 20%. Os ensaios foram realizados em triplicatas em um tempo final de 30 dias. O controle negativo foi montado da mesma forma descrita, porém sem a adição do inóculo. Ao final do período de incubação, 1 g da amostra foi separada para ser feito novamente diluição seriada, seguido de plaqueamento e cálculo de UFC g^{-1} de sedimento. O creosoto residual presente na amostra foi extraído por 2 x com 20 mL de tolueno em agitação a 250 rpm por 30 min. Após a agitação a amostra foi acondicionada em frascos tipo Falcon de 50 mL, centrifugadas, e os extratos separados. Esses extratos foram diluídos em tolueno e injetados no cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM), para avaliação da quantidade de creosoto degradada por cada isolado, com a mesma metodologia e programação descrita no tópico 5.9.1.

5.10.2) Análises estatísticas

O teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$) no programa Sisvar foi utilizado para avaliar se os 15 isolados selecionados diferiram estatisticamente em relação à degradação total do creosoto adicionado na matriz de sedimento como fonte de carbono, na concentração de 1% (v/p).

5.11) Avaliação de crescimento bacteriano e biorremediação *ex situ* de amostras de sedimento contaminadas com creosoto por meio de técnicas de bioestimulação e bioaumentação.

Para a realização do experimento, foi utilizado como substrato sedimento não contaminado com creosoto coletado da área de estudo. O sedimento foi caracterizado quanto aos parâmetros físico-químicos porcentagem de sólidos, carbono orgânico total, fósforo e nitrogênio, pela empresa ALS Corplab. Para confirmar a ausência de HPAs, foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa, como já descrito. A partir de sedimentos da área de estudo não contaminados com creosoto e após esterilização ou não, foram avaliados os efeitos da adição ou não de um consórcio microbiano formado pelos isolados que se destacaram no experimento de degradação desse contaminante na matriz do sedimento, além de outras condições como a promoção ou não de aeração e adição ou não de nutrientes. Foram montados um total de 16 tratamentos com 2 repetições cada. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial. Os tratamentos estão descritos na Tabela 4 e os mesmos foram numerados de 1 a 16, código que será usado ao longo do texto para facilitar a discussão.

Tabela 4 – Descrição dos 16 diferentes tratamentos utilizados para estudar a biorremediação de creosoto no sedimento em função da combinação dos parâmetros: esterilização, aeração, bioaumentação e bioestimulação, com o código que será utilizado para descrevê-los ao longo do trabalho:

Sedimento Estéril (SE)	Nutriente (N)	Consórcio (bioestimulação + bioaumentação) + aeração	Tratamento 1	SE/N/C/A
		Consórcio (bioestimulação + bioaumentação) sem aeração	Tratamento 2	SE/N/C/SA
		Não inoculado + aeração (Controle)	Tratamento 13	SE/N/SC/A
		Não inoculado sem aeração (Controle)	Tratamento 15	SE/N/SC/SA
	Sem Nutriente (SN)	Consórcio (bioaumentação) + aeração	Tratamento 3	SE/SN/C/A
		Consórcio (bioaumentação) sem aeração	Tratamento 4	SE/SN/C/SA
		Não inoculado + aeração (Controle)	Tratamento 14	SE/SC/SN/A
		Não inoculado sem aeração (Controle)	Tratamento 16	SE/SC/SN/SA
Sedimento não estéril (SNE)	Nutriente (N)	Consórcio (bioestimulação + bioaumentação + microbiota) + aeração	Tratamento 5	SNE/N/C/A
		Consórcio (bioestimulação + bioaumentação + microbiota) Sem aeração	Tratamento 6	SNE/N/C/SA
		Não inoculado (bioestimulação) + aeração	Tratamento 7	SNE/N/SC/A
		Não inoculado (bioestimulação) sem aeração	Tratamento 8	SNE/N/SC/SA
	Sem Nutriente (SN)	Consórcio (bioaumentação + Microbiota) + aeração	Tratamento 9	SNE/SN/C/A
		Consórcio (bioaumentação + Microbiota) sem aeração	Tratamento 10	SNE/SN/C/SA

	Não inoculado (Atenuação natural) com aeração	Tratamento 11	SNE/SN/SC/A
	Não inoculado (Atenuação natural) sem aeração	Tratamento 12	SNE/SN/SC/S

5.11.1) Ensaios de degradação

Para a montagem do experimento, as amostras de sedimentos da área de estudo foram homogeneizadas e peneiradas em malha de 2,5 mm aproximadamente. A seguir, 300 g dos sedimentos foram acondicionados em frascos tipo schott de 500 ml com tampa (Figura 15A). Os frascos dos tratamentos com aeração receberam antes do acondicionamento do sedimento 10 gramas de pedras de jardinagem previamente limpas e uma cânula de mangueira central com poros, como uma forma de otimizar a distribuição do ar que seria injetado a partir de uma entrada na tampa desses frascos ao longo do experimento (Figura 15B). Para os grupos de amostras estéreis, após acondicionamento do sedimento, os frascos foram esterilizados por tindalização nas condições já descritas no tópico anterior. Já para o grupo de amostras não estéreis, apenas os frascos foram esterilizados e em seguida adicionados das amostras do sedimento. As amostras correspondentes aos tratamentos com adição de nutriente receberam sulfato de magnésio (0,20 g L⁻¹), cloreto de cálcio (0,02 g L⁻¹), fosfato de potássio monobásico (1,0 g L⁻¹), fosfato de potássio dibásico (1,0 g L⁻¹), nitrato de amônio (1,0 g L⁻¹) e cloreto de ferro (0,05 g L⁻¹). Por sua vez, às amostras correspondentes aos tratamentos com bioaugmentação foram inoculadas de forma a obter a concentração entre 10⁸ e 10⁹ células de cada um dos isolados, componentes do consórcio pré-definido, por grama de sedimento. Para padronização dos inóculos, alçadas das células foram crescidas por 48 h em frascos contendo meio TSA (Himedia) adicionado de 0,25% de creosoto. Após crescimento, foi realizada a leitura de densidade ótica e calculado o volume de inóculo necessário para se obter a concentração de células desejadas nos frascos do ensaio. Os volumes definidos foram centrifugados e as células lavadas e ressuspensas em solução salina (NaCl 0,85%) e adicionadas aos frascos. Posteriormente, as amostras foram contaminadas com 0,5% de creosoto e a umidade corrigida para 20% (m/v). Por fim, as amostras foram homogeneizadas com bastão de vidro estéril. Após a montagem do experimento foram pesadas e separadas amostras de cada frasco ao tempo 0 para cálculo de UFC g⁻¹ de solo (1 grama) e dosagem de creosoto residual (4 g), a qual foi realizada por meio de 2 extrações consecutivas com 4 mL de tolueno e agitação a 1000 rpm por 10 min. Após a extração, os extratos foram diluídos em tolueno e as análises cromatográficas realizadas como descrito no item anterior. Em intervalos de 10 dias, estas

análises foram repetidas e a umidade corrigida. Os frascos de todos os tratamentos ficaram incubados a 30 °C por até 60 dias, sendo que àqueles correspondentes aos tratamentos sem aeração permaneceram fechados ao longo do tempo, sendo abertos apenas a cada 10 dias para a coleta das amostras e correção da umidade. Os frascos dos tratamentos com aeração foram conectados por meio de mangueiras a um compressor de ar (Figura 16) e aerados diariamente com ar ambiente estéril a uma vazão de 10 litros por minuto por 30 min.

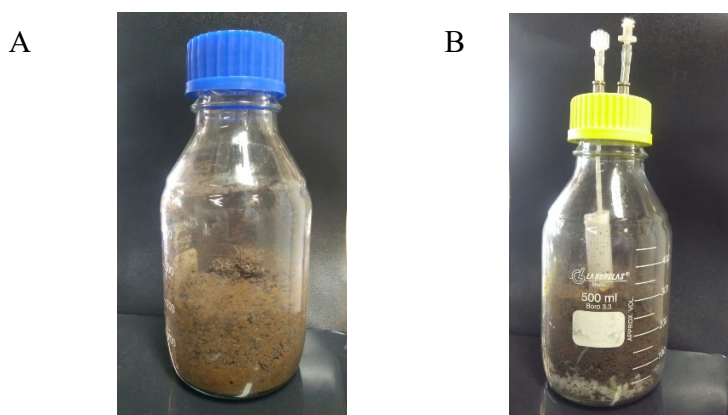


Figura 15 – Frascos tipo Schott utilizados para o acondicionamento das amostras de sedimentos nos experimentos de biorremediação A) sem aeração; B) com aeração.



Figura 16 – Estrutura montada para a aeração dos frascos utilizados para o experimento de biorremediação do sedimento por meio de um compressor de ar.

5.11.2) Análises estatísticas

As análises de variância (ANOVA) foram realizadas por meio de modelos lineares generalizados (MLG) utilizando o teste F em nível de significância de 5% no programa Statistical Analysis System (SAS), com o objetivo de avaliar se as variáveis esterilização (presença ou não de microrganismos autóctones), adição de nutrientes, adição de consórcio e aeração, além de suas

interações, foram significativos em relação ao crescimento microbiano e degradação total de creosoto na matriz de sedimento ao longo da incubação.

5.11.3) Determinação da densidade de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de creosoto

A determinação da comunidade de bactérias heterotróficas totais presentes nos tratamentos de biorremediação pelo método do NMP foi realizada em microplacas de 96 poços, seguindo a metodologia de Binet e colaboradores (2000), com modificações. Para tal, alíquotas de 25 μL das diluições 10^{-1} a 10^{-7} foram inoculadas nos poços da microplaca contendo 200 μL de meio TSB (Himédia), sendo realizadas seis repetições para cada diluição. As placas ficaram incubadas por 1 semana a 28 °C. Para o cálculo do NMP mL^{-1} de bactérias degradadoras de creosoto, foi utilizado o meio mineral de cultura Bushnell Haas (0,2 g L^{-1} de sulfato de magnésio, 0,02 g L^{-1} de cloreto de cálcio, 1 g L^{-1} de fosfato de potássio monobásico, 1 g L^{-1} de fosfato de potássio dibásico, 1 g L^{-1} de nitrato de amônio e 0,05 g L^{-1} de cloreto férrico), suplementado com 0,02% de extrato de levedura e contaminado com creosoto na concentração de 0,5% (v/p). A metodologia utilizada foi a descrita por Wrenn & Venosa (1996), com modificações. Primeiramente, foram adicionados aos poços da microplaca 180 μL do meio mineral, 2 μL de creosoto e 20 μL de cada diluição, sendo realizadas seis repetições para cada diluição. As placas foram vedadas com selante e incubadas por duas semanas a 28 °C. Após os respectivos períodos de incubação, foi adicionado aos poços das microplacas 50 μL da solução aquosa do indicador redox 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio (TTC) na concentração de 3 g L^{-1} . Durante a oxidação das fontes de carbono pelos micro-organismos, os elétrons são transferidos para o TTC, que tem sua coloração alterada de incolor para rosa. Após 24 h, o crescimento foi avaliado por meio de observação visual da coloração rosa nos poços. Após a determinação do número de poços positivos e negativos para cada diluição, em ambos os ensaios, o cálculo do NMP mL^{-1} foi realizado com a utilização do software da Microsoft Excel, associado a uma equação descrita em Brionnes 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.

5.11.4) Determinação da diversidade metabólica da comunidade microbiana total de alguns tratamentos de biorremediação

A diversidade metabólica geral da comunidade microbiana presente nas amostras correspondentes aos tratamentos 5, 6, 9 e 10 foi avaliada no tempo 0 e após os 60 dias de incubação com a utilização do sistema Biolog EcoPlate (Biolog, Inc., Hayward, CA, EUA), que mede a capacidade metabólica da comunidade em utilizar 31 diferentes fontes de carbono, gerando um padrão metabólico da mesma e sua potencial funcionalidade. Cada poço contém um tipo de fonte de carbono e o corante INT (iodo nitro tetrazolio), sendo que há três poços para cada fonte. Durante oxidação das fontes de carbono, os elétrons são transferidos para o INT reduzindo-o e formando o composto insolúvel formazan, que possui coloração arroxeadada. Assim, o crescimento e utilização de cada uma das fontes é evidenciado pelo aparecimento dessa coloração nos poços e pode ser quantificado espectrofotometricamente pela leitura da densidade ótica a 590 nm, permitindo que o consumo de cada substrato seja acompanhado ao longo do tempo (Garland & Mills, 1991). Inicialmente, 5 gramas das amostras foram ressuspensas e agitadas em solução salina (0,85% NaCl) estéril, em volume suficiente para que as mesmas atingissem um valor de DO_{600} igual a 0,2. Após esses procedimentos, alíquotas de 150 μ L da suspensão foram adicionadas em cada poço do sistema Biolog EcoPlate, com o auxílio de uma pipeta multicanal. Uma placa foi utilizada para cada uma das três amostras coletadas. As placas foram incubadas a 28 °C e avaliadas quanto à alteração dos valores de densidade ótica das culturas dos poços a 590 nm, utilizando leitor de microplaca Thermo Scientific Multiskan Spectrun, após 0, 1, 2, 4 e 6 dias da inoculação. Para a determinação da diversidade metabólica da comunidade foram utilizados os dados de densidade ótica de cada uma das 31 fontes de carbono dos poços das placas ao longo do tempo.

5.11.5) Análises metataxonômicas das amostras correspondentes aos tratamentos de biorremediação

O DNA metagenômico das amostras correspondentes aos 16 tratamentos de biorremediação antes e após o período de incubação de 60 dias foi extraído com o uso do kit PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBIO Laboratories, Inc.), seguindo instruções do fabricante. A qualidade do DNA foi avaliada em eletroforese de gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e a quantificação realizada por meio da leitura da absorvância a 280 e 260 nm em espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Com o intuito de se conhecer a composição taxonômica das amostras antes dos ensaios de biorremediação e como ela foi afetada pelos

mesmos, os DNAs metagenômicos extraídos foram utilizados para a realização de análises metataxonômicas, com o uso de seqüenciamento de Nova Geração (NGS) por meio da plataforma Illumina/MiSeq, conforme descrito no tópico 5.5 do capítulo anterior. Entretanto, apenas a classificação taxonômica e as análises de alfa e beta diversidade foram realizadas.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte 1. Estudo da diversidade de bactérias presentes em amostras de fração líquida de aquífero contaminadas com diferentes concentrações de creosoto, utilizando abordagens independentes de cultivo.

6.1) Análises físico-químicas das amostras

As amostras foram caracterizadas físico-quimicamente em relação à concentração de COV (Compostos Orgânicos Voláteis) e COSV (Compostos Orgânicos Semi-Voláteis), totalizando 31 contaminantes. Não foi detectada a presença de COV e COSV em três pontos amostrados, o PP203, PP207 e PM208. Os pontos PP20, PP206 e PM211 apresentaram concentrações mais elevadas da maioria dos compostos quando comparados aos pontos PP29 e PP223 (Tabela 5).

Os valores de concentrações de alguns dos contaminantes estavam acima dos valores de investigação industrial, de acordo com a Resolução número 420 do Conama, na maioria dos cinco pontos contaminados. Algumas exceções foram o Pentaclorofenol, Indeno (1,2,3,cd)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno, Di(2-etilhexil)ftalato, Benzo(g,h,i)perileno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(a)pireno e 2,3,4,6-Tetraclorofenol. Dentre os contaminantes que estão acima desse limite, os mais preocupantes e que reforçam a necessidade de se promover a remediação da área de estudo são o Naftaleno e Benzeno. O limite de intervenção do Naftaleno é de $140 \mu\text{g L}^{-1}$ e em todos os pontos ele apresentou concentração acima de $1620.00 \mu\text{g L}^{-1}$, chegando a uma concentração máxima de $4820.00 \mu\text{g L}^{-1}$ no ponto PP20. No caso do benzeno o limite de intervenção é $5 \mu\text{g L}^{-1}$ e a menor concentração detectada foi de $15.10 \mu\text{g L}^{-1}$ no ponto PM211, chegando a $4820.00 \mu\text{g L}^{-1}$ no ponto PP20.

O Naftaleno faz parte da lista dos 16 HPAs considerados prioritários à remediação de acordo com a EPA e EU, e como mencionado ao longo do trabalho, possui propriedades tóxicas, genotóxicas, imunotóxicas e cancerígenas. Além disso, é um composto mais solúvel e com maior mobilidade no aquífero que os demais HPAs com cadeia acima de 3 anéis, incluindo fluoranteno, antraceno e criseno. Esses últimos, inclusive, apesar de não estarem presentes em concentrações tão altas continuam sendo uma preocupação na área de estudo, porque muitas vezes os mesmos têm sua concentração subestimada em amostras aquosas em função da baixa solubilidade em água (Silva et al., 2007). Já o benzeno, por ser um hidrocarboneto monoaromático, é ainda mais

solúvel que o Naftaleno e é considerado o mais tóxico dos BTEXs, sendo que em exposições crônicas pode causar leucopenia, câncer, vertigens, tremores e afetar o sistema nervoso central (Penner, 2000; Vasudevan & Rajaram, 2001). Esses hidrocarbonetos mais solúveis são os contaminantes comuns em um grande número de aquíferos e, conseqüentemente, o principal problema associado à contaminação subterrânea (Lovley, 1997; Da Silva et al., 2002; Aburto et al., 2009). Eles tendem a bioacumular em diferentes compartimentos do ecossistema e sua baixa adsorção a matrizes de solo favorece sua mobilização em locais contaminados (Clark, 1995).

Tabela 5: Resultados das análises físico químicas dos oito pontos da fração líquida do aquífero amostrados

	PP20	PP206	PM211	PP29	PP223	PP203	PP207	PM208	Limite de investigação industrial CONAMA 420 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
VOC (Compostos Orgânicos Voláteis)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	-
1,2,4-Trimetilbenzeno	148.00	71.90	135.00	42.20	1.80	-	-	-	15
1,3,5-Trimetilbenzeno	82.00	44.60	126.00	1.80	1.30	-	-	-	8.7
Benzeno	4820.00	1170.00	15.10	746.00	450.00	-	-	-	5
Estireno	< 1,0	52.90	28.60	<1,00	<1,00	-	-	-	20
Etilbenzeno	216.00	9.60	11.10	358.00	<1,00	-	-	-	300
Tolueno	105.00	380.00	40.00	5.40	3.60	-	-	-	-
Xilenos totais	1256.00	552.00	192.10	126.70	110.10	-	-	-	500
SVOC (Compostos Orgânicos Semi-Voláteis)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/L}$)	-
2,3,4,6-Tetraclorofenol	< 1,0	2.36	1.10	< 0,10	< 0,10	-	-	-	10.5
2,4-Dimetilfenol	12.60	<1,00	<1,00	169.00	<1,00	-	-	-	27
2-Metilfenol (o-cresol)	< 1,0	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	-	-	-	-
2-Metilnaftaleno	93.90	51.70	339.00	92.50	19.30	-	-	-	36
Acenafteno	71.60	24.00	557.00	68.70	78.00	-	-	-	40
Acenaftileno	0.83	1.35	6.11	1.21	<0,05	-	-	-	-
Antraceno	3.80	2.12	12.00	0.85	<0,05	-	-	-	5
Benzo(a)antraceno	0.53	0.34	3.40	<0,05	<0,05	-	-	-	1.75
Benzo(a)pireno	0.28	<0,05	1.27	<0,05	<0,05	-	-	-	0.7
Benzo(b)fluoranteno	0.38	<0,05	2.38	<0,05	<0,05	-	-	-	0.034
Benzo(k)fluoranteno	0.20	<0,05	0.84	<0,05	<0,05	-	-	-	0.05
Benzo(g,h,i)perileno	< 0,05	<0,05	0.55	<0,05	<0,05	-	-	-	0.05
Carbazol	243.00	55.10	245.00	119.00	<1,00	-	-	-	-

Criseno	0.42	0.24	2.79	<0,05	<0,05	-	-	-	0.2
Di(2-etilhexil)ftalato	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	-	-	-	8
Dibenzo(a,h)antraceno	<0,20	<0,20	0.103	<0,50	<0,01	-	-	-	0.18
Dibenzofurano	83.60	84.00	202.00	45.10	<1,00	-	-	-	7.9
Fenantreno	29.90	28.60	85.70	4.46	0.73	-	-	-	-
Fluoranteno	2.40	2.92	7.44	<0,50	0.20	-	-	-	1
Fluoreno	56.40	32.00	223.00	31.90	0.50	-	-	-	22
Indeno(1,2,3,cd)pireno	< 0,05	<0,05	0.86	<0,05	<0,05	-	-	-	0.17
Naftaleno	8800.00	5030.00	1960.00	1970.00	1620.00	-	-	-	140
Pentaclorofenol	< 0,00001	0.00486	< 0,00001	< 0,00005	< 0,00001	-	-	-	9
Pireno	3.18	3.21	18.40	<0,05	<0,50	-	-	-	-

Por análise multivariada de componentes principais (ACP), foi possível determinar os COV e COSV que mais contribuíram para o padrão de agrupamento dos poços. A CP1 explica 60,7% da variância total dos dados e a CP2 explica 19%, totalizando 79,7% da variação total (Figura 17).

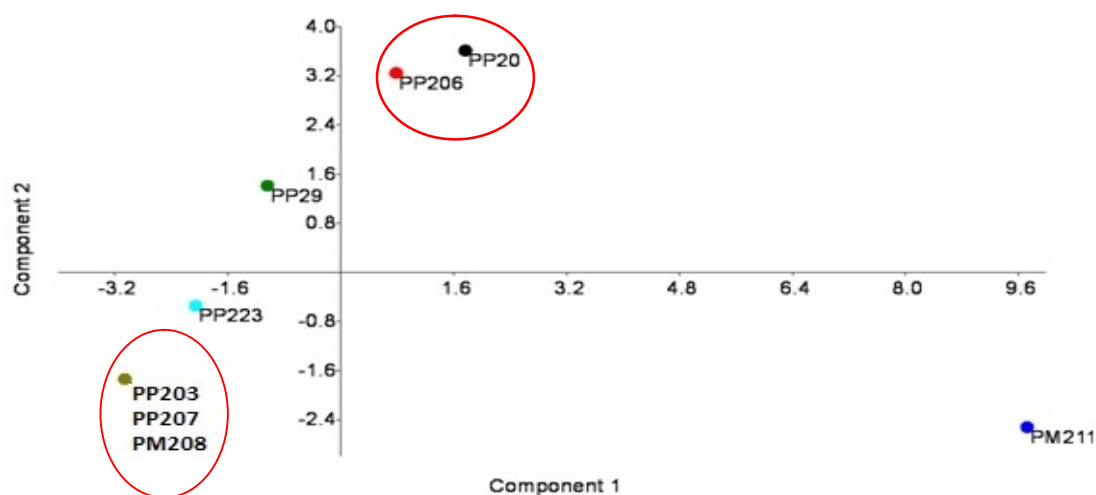


Figura 17 – Agrupamento dos 8 pontos da fração líquida do aquífero amostrados considerando os dados físico-químicos de concentração de COV e COSV por meio de ACP usando o software Past.

A contribuição e correlação de cada um dos compostos para as componentes 1 e 2 (CP loadings) podem ser visualizadas no Anexo 1. Os hidrocarbonetos que mais contribuíram para a CP1 foram Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Dibenzofurano, Fluoreno, 2-Metilnaftaleno, Pireno, Acenaftileno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Criseno e 1,3,5-

Trimetilbenzeno, todos com correlação acima de 0.95. Já os hidrocarbonetos que mais contribuíram para a CP2 foram Naftaleno, Xilenos totais, Benzeno e Tolueno, sendo que as correlações mais fortemente positivas foram observadas para Naftaleno e Xilenos totais (acima de 0.8).

Foi possível observar o grupo formado pelos poços não contaminados PP203, PP207 e PM208, localizados na parte negativa dos dois componentes. O poço PM211, apesar de também possuir alta concentração de contaminantes, permaneceu em um grupo diferente dos poços PP20 e PP206 devido à maior concentração de SVOCs e menor concentração de COVs. Embora os poços PP29 e PP223 tenham ficado próximos na ACP eles permaneceram um pouco separados em relação à componente 2 devido às suas diferenças no perfil de contaminantes, uma vez que o poço PP29 apresentou maiores concentrações de naftaleno e xileno total, dois dos contaminantes que mais contribuíram para o CP2, como já mencionado.

Como forma de sintetizar a informação associada aos 31 contaminantes para uso nas análises subsequentes, buscou-se dividi-los em subgrupos, considerando-se a correlação entre eles. Para tal, foi realizada uma análise de correlação utilizando o coeficiente de Spearman. Observou-se correlação positiva entre os hidrocarbonetos nos diferentes pontos em função do número de anéis aromáticos. Assim, optou-se por classificá-los em função desse parâmetro e no grupo de Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (HTP), sem grande prejuízo em relação ao padrão geral de agrupamento das amostras (Anexo 2), já que todos os grupos observados na Figura 17 foram mantidos.

6.2) Análise da comunidade bacteriana das amostras da fração líquida do aquífero pela técnica de PCR-DGGE

Para compreender, de forma mais geral, a dinâmica da comunidade bacteriana das amostras e sua abundância relativa sob diferentes condições foi utilizada a técnica de PCR-DGGE, na qual o perfil da comunidade bacteriana pôde ser visualizado em função do seu padrão de bandas no gel.

6.2.1) Estrutura da comunidade bacteriana das amostras

Foram realizadas análises de clusterização a partir do perfil de bandas das oito amostras da fração líquida do aquífero utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard. Analisando o

dendrograma gerado para comparar a estrutura da comunidade bacteriana das mesmas, pode-se observar que foram formados dois grupos principais, contendo alguns subgrupos. O primeiro grupo foi formado pelas amostras PP20, PP203, PP207, PP223 e PP29, que apresentaram um índice de similaridade de Jaccard de aproximadamente 50%. O segundo pelas amostras PP206 e PM211, que foram as amostras com estrutura de comunidades mais parecidas dentre todas, com similaridade superior a 80%. A amostra PM208 não se agrupou com nenhuma outra amostra (Figura 18). Dentro do primeiro grupo, observa-se a divisão de algumas amostras em subgrupos. Um deles formado pelas amostras PP29 e PP223, que apresentaram similaridade próxima de 70%, e outro formado pelas amostras PP20, PP203 e PP207, com similaridade de aproximadamente 55%.

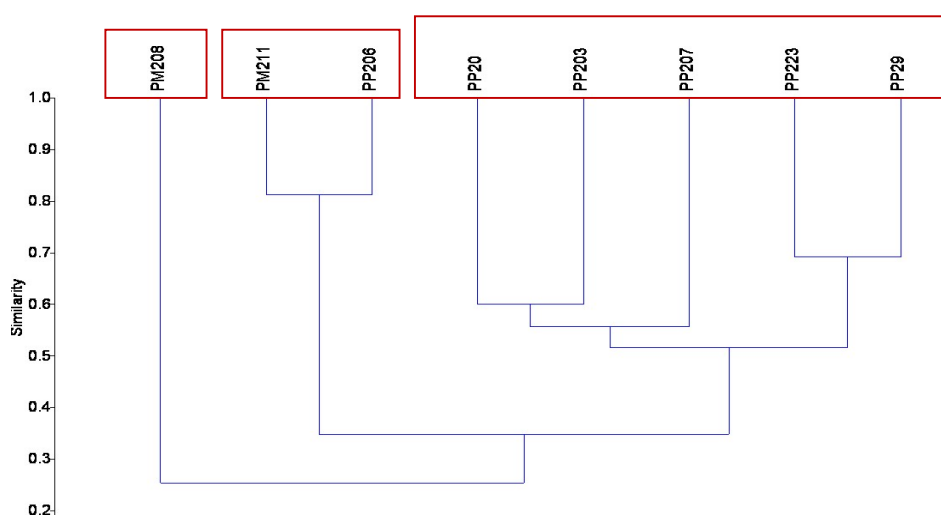


Figura 18 – Dendrograma representativo das comunidades bacterianas presentes em amostras das frações líquidas do aquífero, construído a partir da matriz de similaridade do perfil de bandas das amostras observada na DGGE gerada utilizando coeficiente de Jaccard.

Além do dendrograma, foi realizado um agrupamento das amostras por meio de análise de NMDS utilizando a matriz de presença e ausência gerada a partir do perfil de bandas de cada amostra na DGGE. Na análise, o grupo formado pelas amostras PM211 e P206 se manteve e a amostra PM208 continuou não agrupando com nenhuma outra amostra. Entretanto, todas as demais que haviam apresentado antes similaridade próxima de 50% se agruparam juntas (Figura 19).

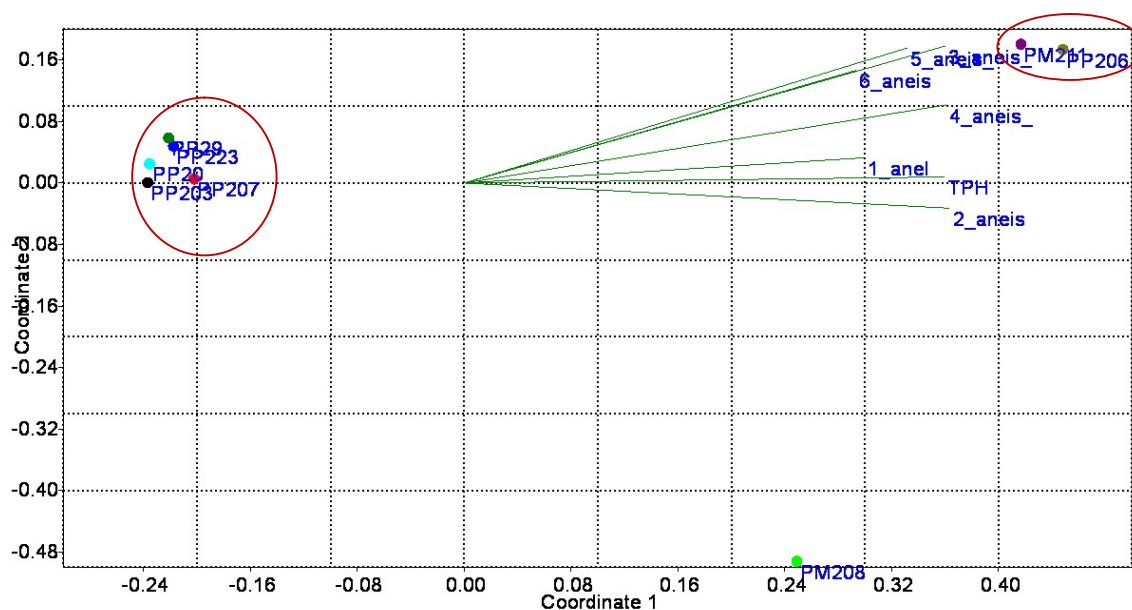


Figura 19– Análise de NMDS da matriz de presença e ausência gerada a partir do perfil de bandas de cada amostra no DGGE em função dos metadados.

Avaliando-se a influência dos metadados na formação dos grupos, observa-se que eles explicam o grupo formado pelas amostras PM211 e PP206. Como já mencionado, apesar das amostras PM206, PM211 e PP20 possuírem concentrações mais altas dos contaminantes, a amostra PP20 possui concentrações mais altas de hidrocarbonetos de cadeia mais curta, enquanto as outras duas possuíam concentrações mais altas dos hidrocarbonetos de cadeia mais longa. Essa amostra possui uma riqueza de bandas bem maior que a apresentada pelas amostras PP206 e PM211 (Figura 20). Como já discutido em outras partes desse trabalho, o aumento do número de anéis dos HPAs é acompanhado do aumento da recalcitrância dos mesmos e consequente redução dos grupos de bactérias capazes de degradá-los. Essas diferenças nos padrões dos contaminantes das amostras ajudam a explicar porque as amostras PM211 e PP206 apresentaram uma estrutura de comunidade tão próxima entre elas, enquanto a amostra PP20 apresentou uma estrutura de comunidade mais próxima das amostras com contaminação intermediária e sem contaminação, padrão semelhante ao observado nas análises metataxonômicas realizadas. O fato dessa amostra, que possui alta contaminação, ter se agrupado com amostras que possuíam concentrações mais baixas ou até mesmo a ausência dos contaminantes, reforça que os contaminantes afetaram a comunidade bacteriana das amostras na área de estudo. Entretanto, apenas concentrações mais

altas desses compostos foram capazes de alterar de forma mais profunda o perfil da comunidade bacteriana.

Em relação à amostra PM208, observa-se que ela possui um número menor de bandas em comparação com as demais amostras, inclusive as outras duas amostras não contaminadas PP203 e PP207. Isso provavelmente explica o fato dela não ter se agrupado junto com elas.

Em áreas contaminadas, a comunidade microbiana tende a ser tipicamente menos diversa que em áreas não contaminadas, pois ela é dominada pelos microrganismos capazes de sobreviver e utilizar os compostos ali presentes como fontes de carbono e energia (Venosa et al., 1999; Del Panno, 2005). Analisando-se o resultado de agrupamento das amostras e até mesmo apenas o perfil de bandas no gel de DGGE, observa-se uma menor diversidade de bandas nas amostras PM211 e PP206, que possuem alta contaminação.

Outros trabalhos que compararam, especificamente por meio de DGGE, a comunidade bacteriana de amostras ambientais, visualizaram padrões bem diferenciados nessas amostras em função da presença dos contaminantes. No trabalho de Thavamani e colaboradores (2012), amostras de solo contaminados com HPAs (variando em concentrações de 335 a 8645 mg Kg⁻¹) e metais pesados apresentaram também uma menor diversidade de bandas quando comparadas às amostras não contaminadas, indicando a influência dos contaminantes na estrutura da comunidade como um todo. Adicionalmente, também foi possível observar que a diversidade variou entre as amostras contaminadas em função das diferentes concentrações dos contaminantes presentes.

6.2.2) Identificação molecular de algumas bandas excisadas do gel de DGGE

Um total de 29 bandas diferentes foram identificadas no gel. Desse total, 15 bandas de maior intensidade, específicas ou comuns às amostras, foram selecionadas e excisadas para serem identificadas por meio de métodos moleculares e 10 delas puderam ser identificadas. A numeração e localização dessas bandas no gel pode ser visualizada na Figura 20 e a identificação das mesmas na Tabela 6.

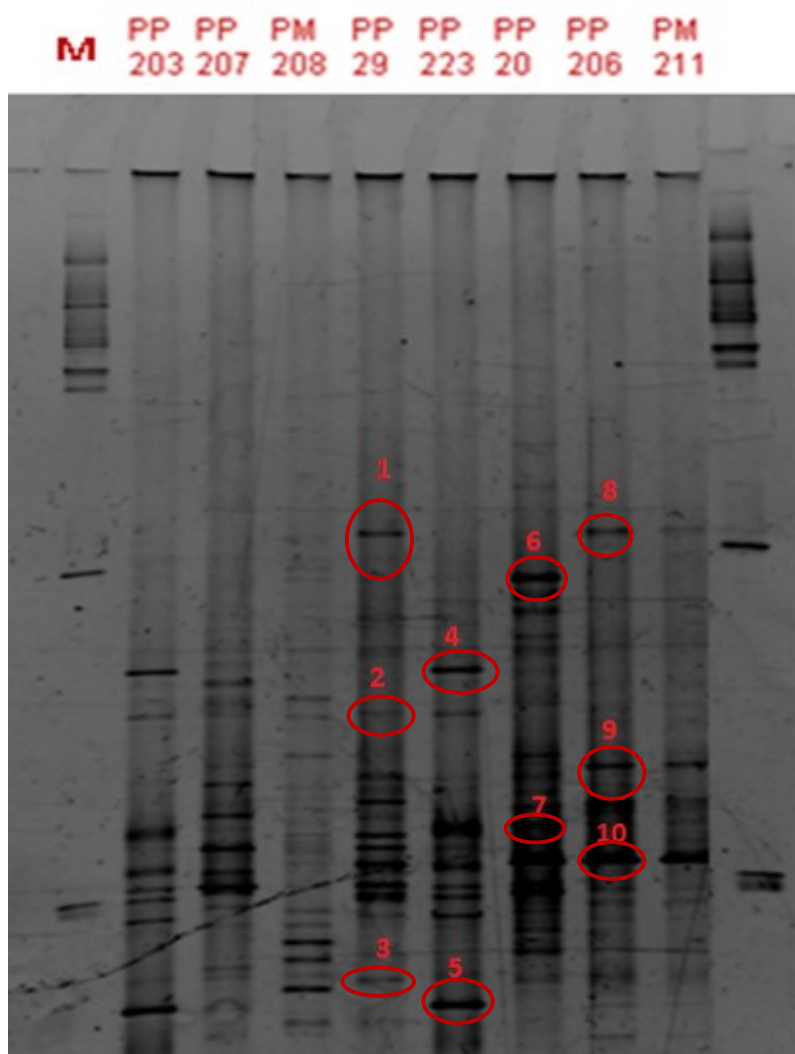


Figura 20: Padrão de bandas obtidos pela técnica de DGGE a partir das amostras de frações líquidas do aquífero. As letras M, nas extremidades, correspondem aos marcadores, cada amostra avaliada está identificada pelo seu código e as bandas excisadas e identificadas estão numeradas.

Tabela 6: Identificação molecular das bandas excisadas do gel de DGGE das amostras da fração líquida do aquífero, quando comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank.

Número no gel	Identificação	Nº Acesso Genbank	Identidade (%)
1	<i>Uncultured Paludibacter sp. clone</i>	KX460174.1	97%
2	<i>Uncultured Treponema sp.</i>	JQ086903.1	97%
3	<i>Methylocystis sp. strain BETA</i>	KX507187.1	98%
4	<i>Burkholderia sp. strain ARD22</i>	KX023254.1	100%
5	<i>Uncultured Acidobacteria bacterium clone GASP-WDOS2</i>	EF075508.1	99%
6	<i>Ignavibacterium sp.</i>	-	100%

7	<i>Uncultured Chlorobi bacterium clone</i>	EF562135.1	97%
8	<i>Xylophilus sp.</i>	JF706531.1	97%
9	<i>Comamonas granuli strain NBRC 101663</i>	NR_114013.1	99%
10	<i>Acidovorax sp.</i>	KM350272.1	99%

As bandas identificadas foram provenientes das amostras contaminadas, com teores intermediários ou altos dos contaminantes. Dentre as bandas identificadas, encontramos sequências dos gêneros *Paludibacter*, do filo Actinobacteria (amostra PP29), *Treponema* do filo Spirochaetes (em todas as amostras), *Methylocystis* do filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria (PP29, PP20, PP206 e PM211), *Burkholderia* do filo Proteobacteria, classe Betaproteobacteria (PP203, PP223, PP20), *Ignavibacterium* do filo Chlorobi e classe Ignavibacteria (PP20), *Xylophilus* do filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria (PP206 e PM211), *Comamonas* do filo Proteobacteria e classe Betaproteobacteria (todas as amostras) e *Acidovorax* do filo Proteobacteria, classe Betaproteobacteria. (PP203, PP29, PP223, PP20, PP206, PM211). Também foi identificada uma sequência do filo Chlorobi (PP203, PP223, PP20) e uma sequência de classe Acidobacteria (PP203 e PP223). Destaca-se que todos os gêneros da classe betaproteobacteria encontrados pertencem à diferentes famílias da ordem Burkholderiales.

Praticamente todos esses grupos também foram identificados nas amostras após classificação taxonômica das sequências obtidas nas análises metataxonômicas. Uma exceção foi o gênero *Ignavibacterium sp*; mas mesmo assim, *reads* do filo ao qual este gênero pertence, Chlorobi, foram identificadas. Destaca-se que alguns dos grupos identificados, tais como *Treponema* e *Paulidibacter*, inclusive, foram enriquecidos nas amostras com concentrações mais altas dos contaminantes quando comparados às demais e foram considerados grupos relevantes e que influenciaram no agrupamento das amostras a partir de análises de beta diversidade.

6.3) Análises metataxonômicas da comunidade bacteriana presente nas amostras

A influência dos níveis de contaminação por creosoto na estrutura e composição da comunidade bacteriana do aquífero foi avaliada por meio de análises metataxonômicas.

6.3.1) Sequenciamento dos amplicons de bactérias

Foi possível obter 2.347.060 reads de bactérias no metagenoma das amostras de fração líquida do aquífero. Desse total, 1.289.429 apresentaram alta qualidade (score Fred \geq 20 e 400 pb), mas após a remoção de “singletons” e quimeras esse número caiu para um total de 1.035.535

reads (média de 129.441 *reads* por amostra). As curvas de rarefação representando OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) com pelo menos 97% de similaridade de seqüência geradas no software QIIME tenderam a uma assíntota atingindo 0,99 de bons valores de cobertura em todos os poços (Figura 21), indicando que a profundidade de sequenciamento foi suficiente para cobrir completamente a diversidade bacteriana. O resultado também mostra que o número de diferentes OTUs foi maior nos poços não contaminados PP203 e PP207, do que naqueles com maiores níveis de contaminação.

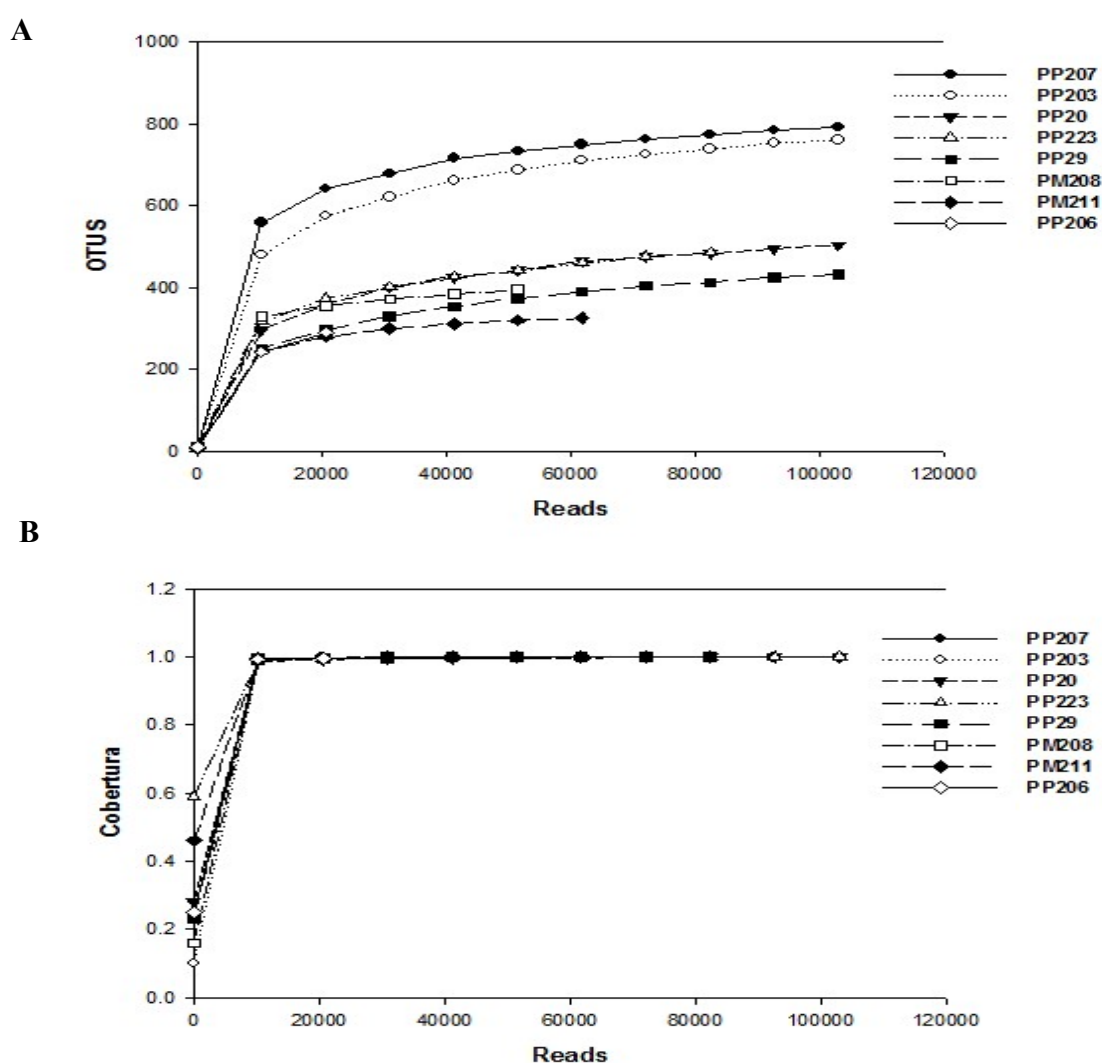


Figura 21 – A) Curvas de rarefação geradas a partir do número de OTUs observados em função dos reads seqüenciados para cada amostra da fração líquida do aquífero usando o programa Sigma Plot. B) Cobertura de seqüenciamento de cada amostra de fração líquida do aquífero usando o programa Sigma Plot.

Aquíferos são considerados ambientes extremos devido à falta de carbono orgânico prontamente disponível, baixos níveis de nutrientes inorgânicos e oxigênio e falta de luz solar, o que torna esses ambientes naturalmente seletivos em relação às comunidades microbianas que os habitam (Goldscheider et al., 2006; Smith et al., 2012). Assim, uma menor riqueza e diversidade de bactérias em amostras de águas subterrâneas em geral é comumente relatada em comparação com outros tipos de amostras ambientais, como solo e sedimentos, tanto por meio de técnicas dependentes quanto independentes de cultivo. No trabalho de Smith e colaboradores (2015), amostras de um aquífero localizado na Austrália e sem histórico prévio de qualquer tipo de contaminação foram submetidas a pirosequenciamento como forma de acessar a diversidade bacteriana. As curvas de rarefação geradas apresentaram uma tendência de estabilização no número de OTUS identificadas a partir de 20000 reads seqüenciados por amostra.

O número de reads seqüenciadas que puderam ser atribuídas a alguma OTU (abundância total) variou de 27.416 a 267.500 reads entre as amostras. O maior valor foi obtido para a amostra PP207, seguido pelas amostras PP20, PP203, PP223, PP29, PM211, PM208 e PP206 (Tabela 7). Em geral, a riqueza bacteriana na maioria dos poços contaminados foi menor que nos não contaminados, de acordo com os números de OTUs observadas e o estimador Chao 1. Os índices de Shannon e Simpson mostraram que a diversidade bacteriana também foi maior em todos os poços não contaminados quando comparados com poços contaminados (Tabela 7).

A redução da riqueza de espécies na maioria das amostras contaminadas em comparação as não contaminadas sugere que os contaminantes afetaram e promoveram seleção nessas comunidades. Outros estudos relatam a redução da riqueza microbiana em diferentes tipos de amostras após exposição a uma variedade de poluentes orgânicos, inclusive HPAs (Johnston & Roberts, 2009). A redução geralmente é atribuída à proliferação diferencial de poucos grupos microbianos degradadores nesses ambientes, onde o contaminante acaba constituindo uma grande fração do carbono orgânico disponível para essas comunidades (Derry et al., 1998; Joynt et al., 2006; Johnston & Roberts, 2009; Thavamani et al., 2012). No entanto, em matrizes ambientais mais complexas, como os aquíferos, outros fatores tais como pH, temperatura e oxigênio disponível podem ser mais limitantes ao sucesso ecológico das comunidades bacterianas do que a presença do contaminante (Miralles-Wilhelm & Gelhar, 2000). Assim, nesses ambientes nem sempre se observa correlação entre o nível do contaminante e a riqueza de microrganismos,

condição na qual esse parâmetro pode não ser o indicador de impacto mais sensível à contaminação (Bundy et al., 2002; Lozupone & Knight, 2007; Johnston & Roberts, 2009).

Tabela 7: Número de reads que puderam ser atribuídos a alguma OTU, número de OTUs observados, estimadores de riqueza e índices de diversidade calculados para a comunidade de bactérias das amostras da fração líquida do aquífero.

Amostra	Nº Reads	OTUs Observados	Estimador de Riqueza		
			Chao1	Shannon	Simpson
PP203	148999	820	863	7.5	0.99
PP207	267500	852	927	6.2	0.96
PM208	53797	396	445	6.7	0.97
PP29	92707	497	586	5.8	0.96
PP223	113377	512	580	4.7	0.91
PP20	264690	518	622	5.2	0.91
PP206	27416	309	368	5.3	0.94
PM211	67049	328	344	5.0	0.90

O índice de diversidade de Shannon considera as espécies raras e abundantes com o mesmo peso e as medidas de Simpson a probabilidade de que dois indivíduos, selecionados aleatoriamente na amostra, pertençam à mesma espécie. Assim, o fato de as amostras contaminadas apresentarem os menores índices de diversidade indica que esses poços apresentam menor equitabilidade dos táxons e maior dominância de OTUs. Isso reforça o fato de que a presença dos contaminantes seja responsável pela seleção de táxons especializados capazes de sobreviver à essas condições, o que afeta a equitabilidade dos grupos bacterianos, levando à redução da diversidade como um todo, o que é refletido pela redução dos índices de Shannon e Simpson. Este padrão tem sido observado em diversos estudos recentes a partir de amostras ambientais com elevadas concentrações de HPAs (Sun et al., 2012; Quero et al., 2015; Korlevic et al., 2015).

Para um melhor entendimento da relação entre os parâmetros físico-químicos e os ecológicos, foi feita uma análise de correlação utilizando o coeficiente de Spearman (Anexo 3). Não foi possível observar correlação significativa entre os valores de abundância total e riqueza das amostras e a concentração dos contaminantes. Entretanto, foi possível observar correlação significativa (p -valor $<0,05$) negativa entre o índice de diversidade de Shannon e os contaminantes com 3,4,5 e 6 anéis e entre o índice de diversidade de Simpson e os contaminantes com 2,3,4,5 e

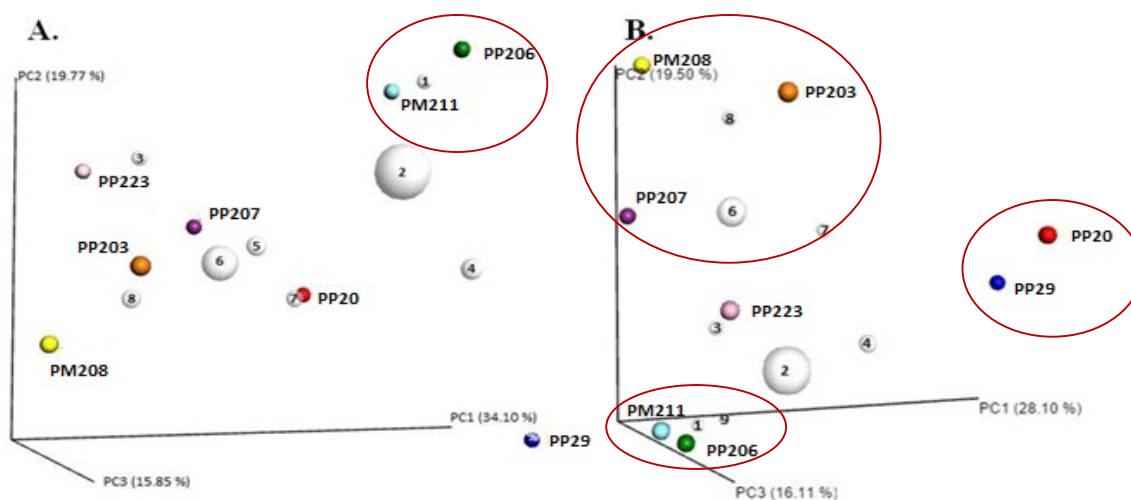
6 anéis (Tabela 8). Assim, a alfa diversidade das amostras diminui com o aumento da concentração desses hidrocarbonetos. Adicionalmente, para ambos os índices calculados, a correlação negativa mais forte ocorreu para o grupo de hidrocarbonetos com 6 anéis. Isso pode estar relacionado ao fato de hidrocarbonetos aromáticos de cadeia mais simples serem mais solúveis e disponíveis à degradação por um número maior de microrganismos, quando comparado com os de maior número de anéis (Passarini et al., 2011).

Tabela 8: P-valor e coeficientes de correlação de Spearman obtidos nas análises de correlação entre índices de diversidade e concentração de HPAs.

PAHs	Shannon		Simpson	
	P-valor	Coefficiente	P-valor	Coefficiente
2 anéis	0,076	-0,659	0,040	-0,728
3 anéis	0,050	-0,708	0,017	-0,803
4 anéis	0,016	-0,805	0,004	-0,877
5 anéis	0,050	-0,708	0,017	-0,803
6 anéis	0,008	-0,848	0,004	-0,878

6.3.2) Beta diversidade e perfis das comunidades de bactérias presentes nas amostras da fração líquida do aquífero

A análise de beta diversidade foi realizada utilizando as distâncias do UniFrac ponderado, que considera as afiliações filogenéticas e abundância relativa das OTUs, e o não ponderado, que é sensível a presença e ausência de táxons, mas não à abundância relativa das OTUs. Ambas podem ser visualizadas nos “biplots” do PCoA (Figura 22A e B). Com ambas as métricas, foi observado o agrupamento próximo entre as comunidades bacterianas da maioria dos poços com algum nível de contaminação por HPAs e também entre aqueles sem os contaminantes. Com destaque para a maior separação das amostras altamente contaminadas PP206 e PM211 das demais, o que indica a riqueza e padrão de táxons semelhantes entre eles e diferente das outras (Figuras 22A e B). Isso corrobora as menores diversidades calculadas para essas amostras (Tabela 7) devido à seleção de táxons causada pelos contaminantes. No UniFrac não ponderado, também foi observada a formação de um grupo especificamente de poços sem contaminação (PP203, PP207 e PM208) e outro entre os poços PP20 e PP29, ambos contaminados.



1. *Desulfomonile sp.* 2. Comamonadaceae 3. *Telmatospirillum sp.* 4. *Treponema sp.*
 5. *Sphingomonas sp.* 6. Rhodocyclaceae 7. Victivallaceae 8. Rhodospirillaceae
 9. *Paulidibacter sp.*

Figura 22 Gráfico Biplot da análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades bacterianas das amostras das frações líquidas do aquífero. A) similaridade da comunidade de bactérias usando métrica unifraca ponderada, B) similaridade da comunidade de bactérias usando métrica unifraca não ponderada. Os círculos claros correspondem às OTUs que mais contribuíram para o padrão de agrupamento.

Todos os táxons representados pelos círculos claros foram os que mais influenciaram o padrão de agrupamento dos poços, especialmente as famílias Comamonadaceae e Rhodocyclaceae, representados pelos maiores círculos claros, além das famílias Rhodospirillaceae e Victivallaceae e dos gêneros *Desulfomonile*, *Telmatospirillum*, *Treponema*, *Sphingomonas* e *Paulidibacter*. A família Comamonadaceae, como observado na Figura 23, foi identificada em todas as amostras, mas observa-se um enriquecimento da mesma nas três amostras com maiores níveis de contaminação (PP20, PP206 e PM211). Já a família Rhodocyclaceae, apesar de também ter sido identificada em todas as amostras, apresentou uma redução da abundância relativa nas amostras com alta contaminação, quando comparada às demais. Especificamente para o grupo formado pelas amostras PP206 e PM211, o gênero *Desulfomonilles* foi o táxon que mais contribuiu para o agrupamento dessas amostras no Unifraca ponderado e o gênero *Paludibacter* no Unifraca não ponderado. Como pode ser observado na Figura 24, ambos os gêneros foram enriquecidos nessas duas amostras com alta contaminação quando comparado às demais, sendo que o gênero *Treponema*, só foi identificado nelas. Para o grupo formado pelas amostras PP203, PP207 e PM208, a família Rhodospirillaceae foi o táxon que mais contribuiu para esse

agrupamento. Essa família, na verdade, foi identificada em todas as amostras, mas sua abundância relativa nessas três amostras sem contaminação foram as mais altas dentre todas.

Mais de 98% dos reads puderam ser identificadas, das quais apenas 0,3% como pertencentes do domínio Archaea, ou seja, houve predominância de bactérias nas amostras. Um total de 38 filos, 84 classes, 102 ordens, 168 famílias e 230 gêneros foram encontrados nas amostras do aquífero. Em geral, a abundância dos táxons bacterianos da comunidade variou de acordo com a amostra e o nível de contaminação por HPAs. Proteobacteria foi o filo mais abundante em todas as amostras, com abundância relativa entre 36,2 e 69,8% (Figura 23A).

O filo Proteobacteria contém mais de 400 gêneros, compreendendo aproximadamente 30% das espécies descritas no Domínio Bacteria. É um filo que possui enorme diversidade de morfologia e fisiologia e compreende a maioria das bactérias gram-negativas de interesse médico, veterinário, industrial e agrícola (Gupta et al., 2000; Kersters et al., 2006). O filo Proteobacteria tem se mostrado predominante na maioria dos estudos com amostras ambientais. No trabalho de Smith e colaboradores (2012), o filo predominou nas comunidades bacterianas de dois aquíferos, um totalmente confinado e outro sujeito à contaminantes da superfície. No trabalho de Yadav e colaboradores (2015), quatro amostras de águas residuárias contaminadas com diferentes hidrocarbonetos, provenientes de um complexo petroquímico, tiveram a estrutura da comunidade investigada por meio de análises metataxonômicas utilizando a plataforma Illumina TruSeq. Foi observada a predominância do filo Proteobacteria em todas as amostras, representando em média 45% dos reads. Outros filos que também apresentaram abundância relativa alta em várias amostras, Planctomycetes, Acidobacteria, Actinobacteria e Firmicutes, também compreendem gêneros e espécies amplamente distribuídas em ambientes com altas variações biogeoquímicas, incluindo solo, sedimento, água doce e marinha, sejam eles poluídos ou não (Gao & Gupta, 2005; Janssen, 2006; Ward et al., 2009).

O padrão das Classes e Famílias dominantes, com abundâncias relativas acima de 3% e 5%, respectivamente, também variou com as amostras em estudo (Figuras 23B e C). Alphaproteobacteria e Betaproteobacteria foram as classes mais freqüentes em praticamente todas as amostras, com relativa abundância entre 7,1 e 28,2% e 5,8 e 38,5%, respectivamente (Figura 23B) A classe Planctomicetia foi mais abundante em poços não contaminados, com médias de abundância relativa correspondendo a 7,5% em contraste com 0,8% em poços contaminados (Figura 23B). As classes Sphirochaetes e Bacteroidia foram detectadas apenas em

poços contaminados e Verrucomicrobiae foi enriquecida especificamente nos poços PP206 e PM211, com abundância relativa entre 3-6% em contraste com valores entre 0.1-0.2% encontrados em outros poços (Fig. 23B).

As famílias Rhodospirillaceae e Rhodocyclaceae, em geral, apresentaram alta frequência em quase todos os poços, com abundância relativa entre 2,7 e 15,7% e 3,0 e 33,1%, respectivamente, mas esses valores são ainda maiores em amostras contaminadas. A família Sphingomonadaceae foi mais frequente em poços não contaminados, com valores médios de abundância relativa correspondendo a 12,5%, em contraste com os valores médios de 3,0% em poços contaminados (Figura 20C). Os poços altamente contaminados (PP20, PP206 e PM211) apresentaram o enriquecimento das famílias Geobacteriaceae, Porphyromonadaceae, Verrucomicrobiaceae, Syntrophaceae, Spirochaetaceae e principalmente Comamonadaceae, correspondendo a uma média de 25% dos reads (Figura 23C).

Membros das famílias Rhodospirillaceae e Rhodocyclaceae compreendem microrganismos com uma ampla gama de atividades metabólicas e são comumente encontrados em ambientes aquáticos como aquíferos, lagos, lagoas, rios, poços, dentre outros (Biebl & Pfenning, 1981; Oren, 2014). Membros da família Sphingomonadaceae também são comumente isolados de ambientes aquáticos, como lagos e oceanos, bem como associados a biofilmes de tubulações de distribuição de água potável (Chen et al., 2010; Jogler et al., 2011; Luhring et al., 2015). A família Comamonadaceae pertence à ordem Burkholderiales e é encontrada em vários ambientes naturais ou contaminados como solos, água doce, lençóis freáticos, lodos ativados e águas residuárias de origem industrial (Hiraishi & Khan, 2003; Wakelin et al., 2011; Willems, 2014). A família Syntrophaceae é formada por gêneros de microrganismos quimioautotróficos ou quimiorganotróficos, mesófilos e encontrados predominantemente em ambientes de água doce (Kuever, 2014). Já a família Spirochaetaceae é formada principalmente por bactérias patogênicas, mas também já foram isoladas de amostras de água doce e fontes termais (Abt et al., 2013); e a família Porphyromonadaceae geralmente é encontrada em lagos e águas de consumo, sinalizando a presença de contaminação fecal e de esgotos (Jeong et al., 2011; Zheng, 2012).

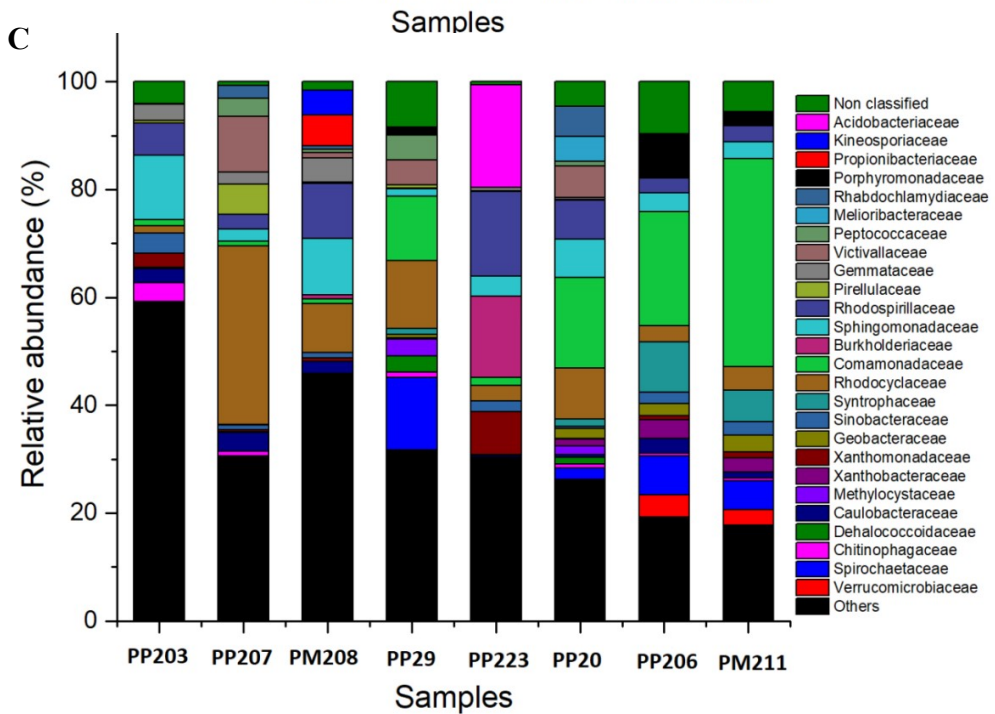
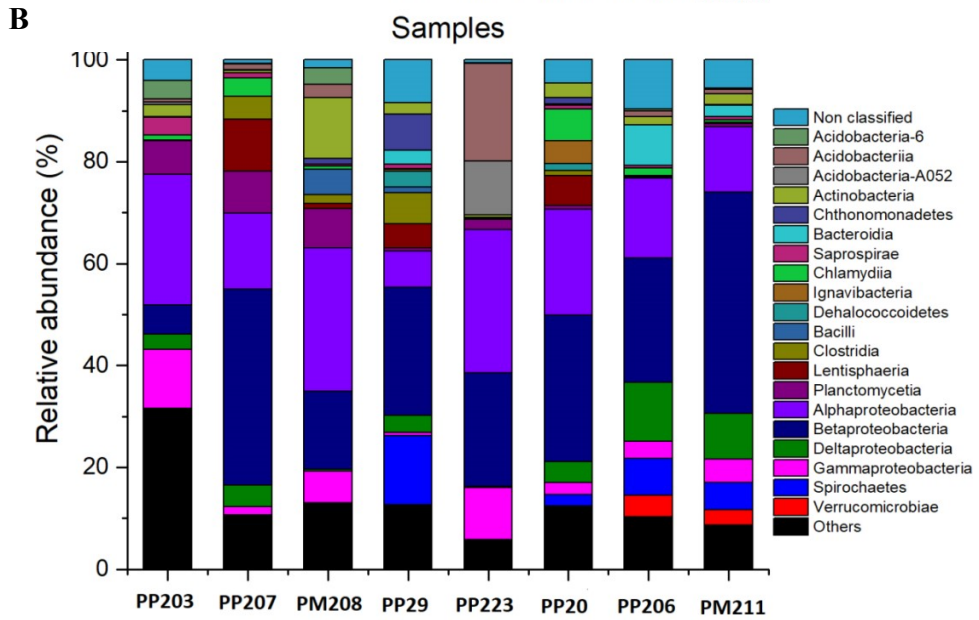
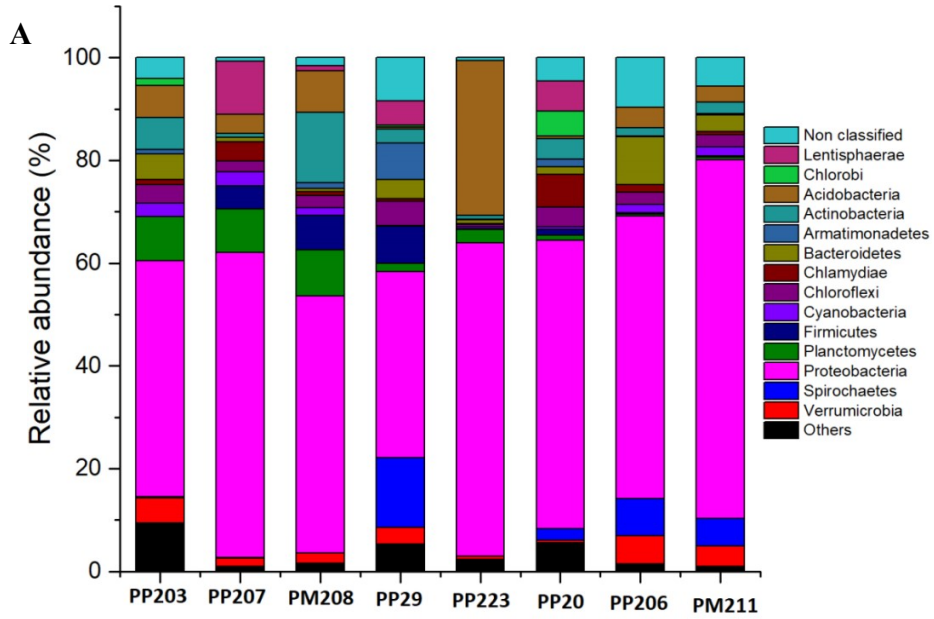


Figura 23: Abundância relativa de (A) Filos; (B) Classes e (C) Famílias de bactérias nas oito amostras de fração líquida do aquífero. Os táxons presentes em pelo menos uma amostra com abundância relativa maior que 2% foram considerados.

O perfil dos gêneros (com abundância relativa acima de 0,5%) foi bastante distinto entre os poços. Apenas o gênero *Sphingomonas* foi compartilhado por todos os poços e vários gêneros foram compartilhados ou enriquecidos apenas por poços com o mesmo nível de contaminação (Figura 24). *Phenylobacterium* e *Planctomyces* foram compartilhados apenas pelos poços não contaminados e este grupo também apresentou os perfis de gêneros mais diferenciados (Figura 24). Os gêneros *Geobacter* da família Geobacteriaceae, *Treponema* da família Spirochaetaceae e *Paludibacter* da família Porphyomonadaceae foram compartilhados apenas pelos poços com algum grau de contaminação e o gênero *Desulfomoniles* da família Syntrophaceae foi encontrado exclusivamente nos três poços com altos níveis de contaminação (Figura 24). Os poços PP206 e PM211 apresentaram perfis semelhantes, compartilhando vários gêneros exclusivos, como *Anaerolinea* da família Anaerolineaceae, *Hydrocarboniphaga* da família Sinobacteraceae, *Parachlamydia* da família Parachlamydaceae e *Prosthecobacter* da família Verrumicrobiaceae (Figura 24).

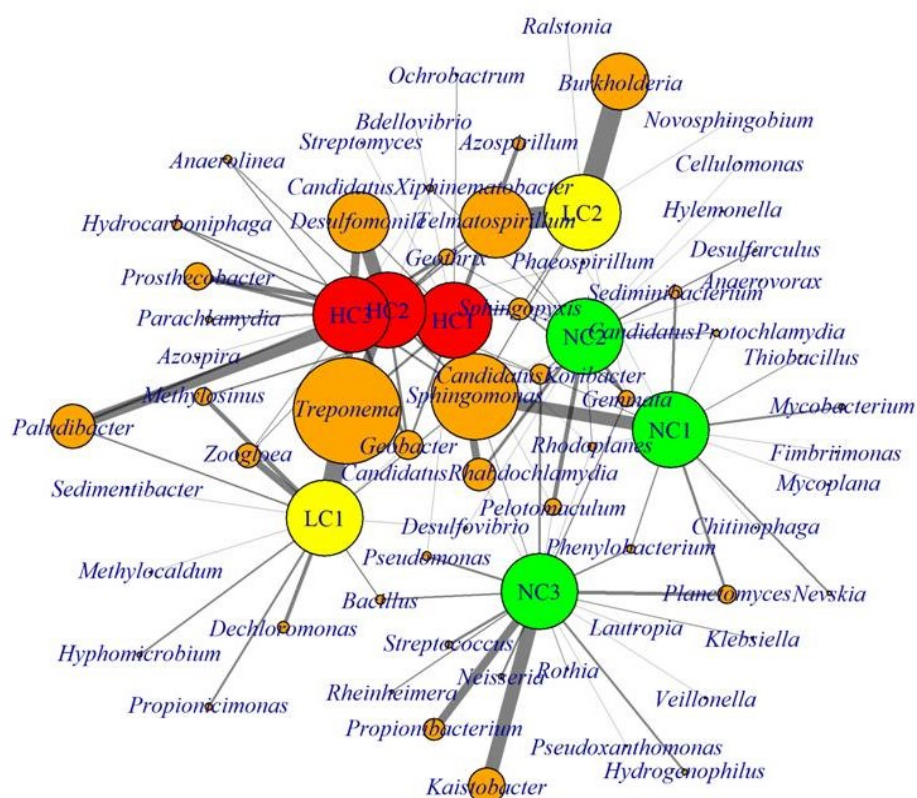


Figura 24: *Network* comparando os gêneros de bactérias dominantes (>0.5%) detectados nas amostras da fração líquida do aquífero. As amostras do aquífero estão representadas por códigos: (PP203=NC1), (PP207=NC2), (PM208=NC3) que correspondem aos círculos verdes; (PP29=LC1), (PP223=LC2) que correspondem aos círculos amarelos e (PP20=HC1), (PP206=HC2), (PM211=HC3) que correspondem aos círculos vermelhos. Os *taxa* estão representados pelos círculos laranja. O tamanho dos nós é proporcional a abundância relativa acumulada de cada *táxon* considerando todas as amostras e, ao contrário, a espessura da aresta conectando as amostras e os *taxa* é proporcional à abundância relativa desse *taxa* em cada amostra especificamente.

Assim, de forma geral, observamos que os poços não contaminados apresentaram perfis mais diversificados de gêneros dominantes e, conseqüentemente, um menor número de gêneros foi compartilhado entre eles quando comparados aos poços altamente contaminados. Como já mencionado, ambientes com pressão seletiva causada pela presença de contaminantes tóxicos, como os HPAs, tendem a ser menos diversificados. Portanto, é comum que um número menor de gêneros possa sobreviver nestas condições e, conseqüentemente, que amostras contaminadas compartilhem esses táxons enriquecidos. Esse padrão também é relatado em outros estudos com amostras contaminadas com hidrocarbonetos e não contaminadas (Mason et al., 2012; Benedek et al., 2013).

As principais alterações entre a comunidade bacteriana de poços sem e com alto nível de contaminação foram exploradas pela análise de significância da abundância absoluta dos táxons usando o pacote EdgeR no software R ($p < 0,05$) e o gráfico de vulcano que mostra uma perspectiva geral das mudanças de OTU entre esses grupos de amostras (Figura 25). Esta análise confirmou o aumento significativo das famílias Rhodospirillaceae, Rhodocyclaceae, do gênero *Anaerolinea*, além dos gêneros *Treponema*, *Geobacter*, *Paulidibacter* e *Hydrocarboniphaga*, nos poços com alta contaminação (Figura 25), o que corrobora com os resultados dos perfis dos táxons e da estrutura geral da comunidade das amostras apresentados anteriormente nos quais esses grupos foram evidenciados como os mais dominantes nessas mesmas amostras ou que haviam contribuído mais significativamente para o agrupamento delas. Nos poços não contaminados, observou-se aumento significativo de um gênero não identificado do filo Chloroflexi (Figura 25).

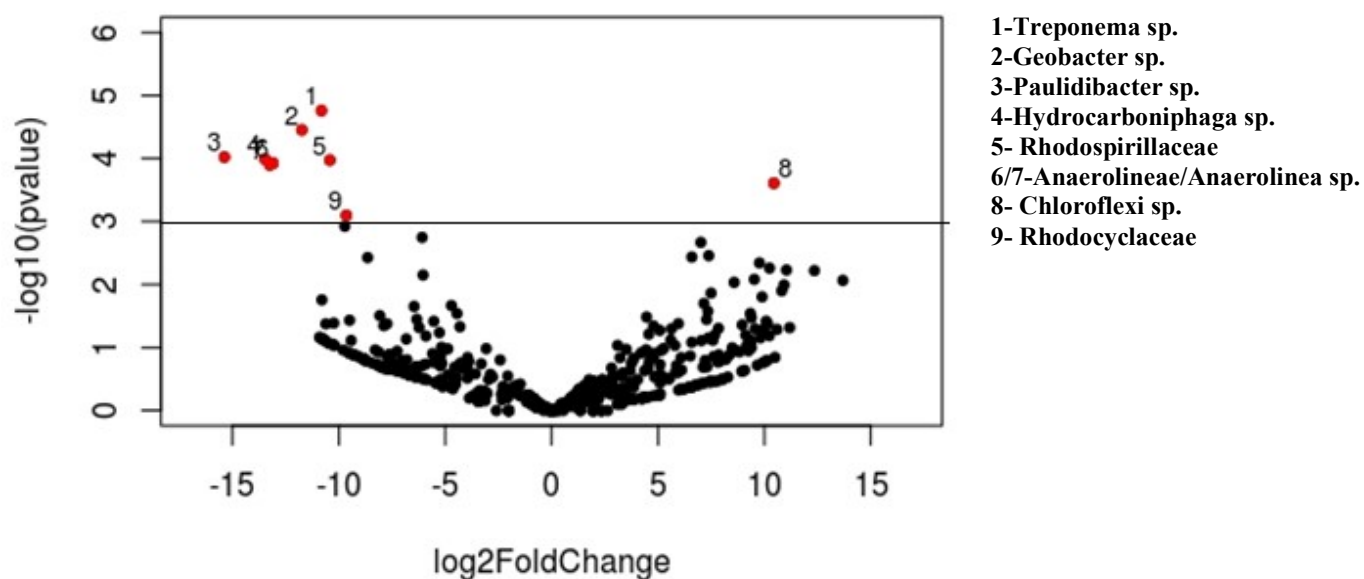


Figura 25: Gráfico Volcano apresentando as OTUs das comunidades bacterianas do grupo de amostras sem contaminação dos compostos de interesse comparadas com as amostras com alta contaminação desses compostos. Os *taxa* diferentes entre esses grupos de amostras são mostrados acima da linha, que corresponde a um p-valor <0,05 no eixo Y e o eixo X exibe as mudanças nas abundâncias das OTUs entre as condições. A análise de significância da abundância relativa dos *taxa* foi realizada usando o pacote EdgeR no programa R.

6.3.3) Efeitos dos metadados na estrutura da comunidade bacteriana das amostras da fração líquida do aquífero

Para avaliar de forma mais substancial como os contaminantes afetaram a estrutura geral da comunidade das amostras foi realizada uma análise de Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS) da composição e abundância relativa dos *taxa* presentes nessas comunidades bacterianas em função dos metadados, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard (Figura 26). Considerando a cordenada 1 e a ordenação dos vetores foi possível confirmar a formação de um grupo constituído pelas amostras PP203, PP207 e PM208 e considerando-se as coordenadas 1 e 2 também foi possível confirmar um segundo grupo, formado pelas amostras PP206 e PM211. Não foi observado agrupamento para as demais amostras (Figura 26).

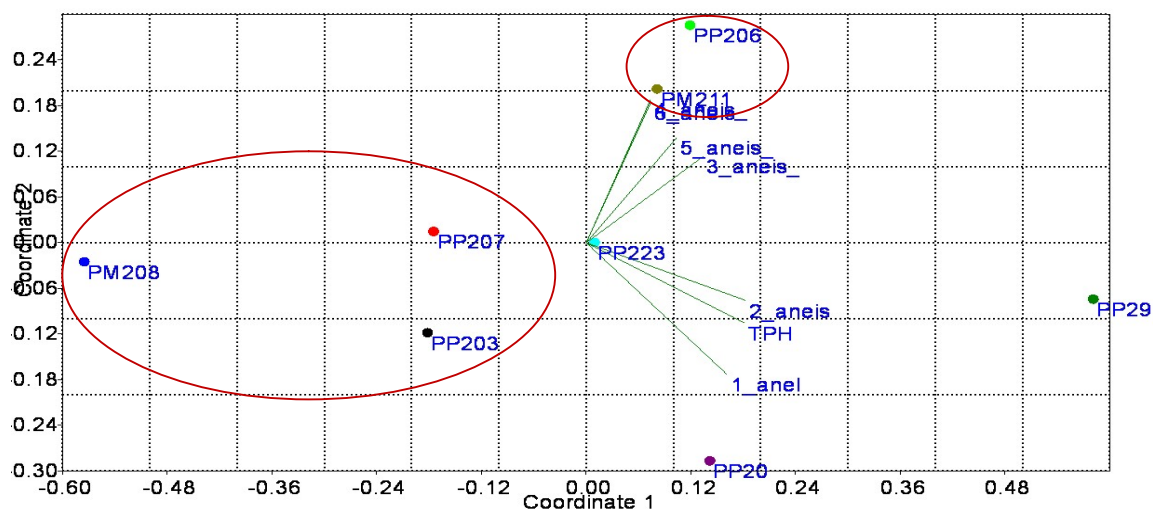


Figura 26: Análise de NMDS da composição da comunidade bacteriana das amostras da fração líquida do aquífero em função dos metadados.

É possível concluir que os contaminantes foram capazes de afetar e alterar a estrutura da comunidade bacteriana das amostras. Entretanto, o padrão de agrupamento dessa comunidade não se correlacionou com o padrão de agrupamento obtido pelas amostras em função da concentração de COV e COSV (Figura 17), pois não houve a formação de três grupos de comunidades em função dos três níveis de contaminação confirmados nessa análise. Entretanto, apesar das amostras terem sido agrupadas inicialmente em função de faixa dos contaminantes de interesse elas possuíam várias diferenças entre as concentrações de grupos específicos desses compostos. Pelos resultados observados, a estrutura da comunidade bacteriana das amostras foi afetada em função não só dos níveis gerais, mas também de quais contaminantes, especificamente, eram predominantes em cada amostra.

Foi possível observar que o grupo formado pelas amostras PP203, PP207 e PM208, na verdade, foi influenciado justamente pela ausência de contaminantes (Figura 26). Já para o grupo formado pelas amostras PP206 e PM211, os contaminantes que mais influenciaram esse agrupamento foram os HPAs com 3,4,5 e 6 anéis. Essas amostras estão entre as mais contaminadas, e de acordo com os dados físico-químicos mensurados, ambas possuem alta concentração justamente desses HPAs, principalmente a PM211, que possui as maiores concentrações de praticamente todos os HPAs mensurados (Tabela 5).

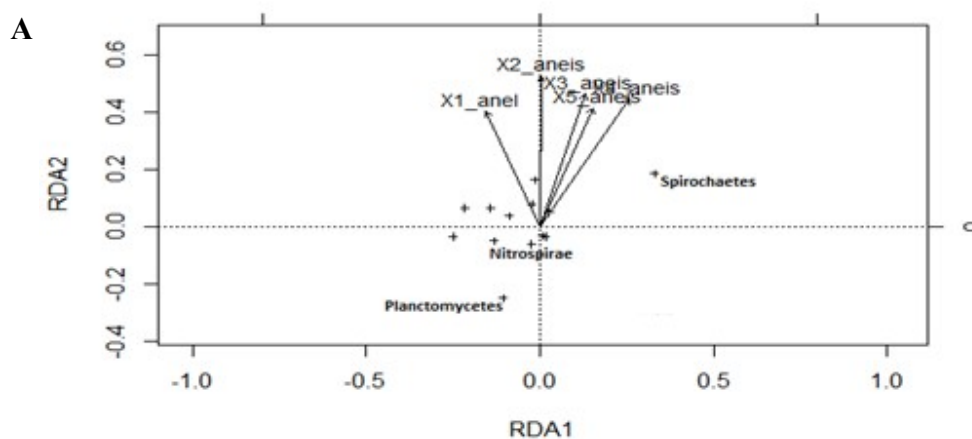
Apesar de algumas enzimas-chaves participarem de etapas de degradação de diferentes HPAs, como as enzimas naftaleno dioxigenases (NDO), em geral, as enzimas catabólicas são altamente específicas em relação ao substrato. Por causa disso, esses contaminantes necessitam de uma ampla gama de enzimas diferentes em suas vias de degradação e isso faz com que grupos microbianos degradadores tenham afinidades específicas apenas para alguns desses contaminantes, de acordo com seu potencial catabólico (Atlas, 1995; Lu et al., 2012). Assim, é esperado que a presença de padrões diferentes de hidrocarbonetos em amostras contaminadas seja responsável pelo enriquecimento de táxons distintos nas mesmas e que em decorrência disso, elas apresentem comunidades bacterianas diferenciadas.

Dentre as demais amostras que não se agruparam, a PP223, considerando ambas as coordenadas, ficou em uma posição intermediária entre as amostras contaminadas e as não contaminadas. A sua estrutura de comunidade não foi tão afetada pelos metadados quanto às demais amostras contaminadas. Dentre as cinco amostras que possuem os contaminantes ela é a que apresenta as menores concentrações de todos os 6 grupos de hidrocarbonetos (Tabela 5). Aparentemente, o nível de contaminantes presentes nessa amostra provocou alterações diferenciadas na estrutura de sua comunidade, de forma que ela não se assemelha às amostras não contaminadas e nem às amostras com altos níveis de contaminação. A amostra PP20, apesar de possuir alta concentração de alguns HPAs de cadeia longa, possui uma concentração bem mais expressiva de HPAs de 1 e 2 anéis, sendo a amostra que possui a maior concentração dos hidrocarbonetos 1,2,4-Trimetilbenzeno, benzeno, xilenos totais e naftaleno (Tabela 5). Isso faz com que ela, inclusive, também tenha uma alta concentração de HTPs, o que explica porque esses grupos mais influenciaram seu posicionamento e possivelmente porque ela não se agrupou com as duas outras amostras com alta contaminação. Em relação a esse padrão de hidrocarbonetos, a amostra PP20 se assemelha à amostra PP29, que também possui baixa concentração de HPAs de cadeia longa, mas concentração mais alta de hidrocarbonetos de 1 e 2 anéis, principalmente benzeno, etilbenzeno e 2,4-dimetilfenol (Tabela 5). Entretanto, é importante ressaltar que outras variáveis ambientais não mensuradas, além dos contaminantes, tais como os teores de nutrientes e de oxigenação também possam estar desempenhando um papel importante na estrutura da comunidade bacteriana dessas amostras.

Usamos uma análise de redundância (RDA) para avaliar se os níveis de HPAs poderiam estar associados a variações estruturais nas comunidades bacterianas em alguns níveis

taxonômicos específicos (Filo, Classe, Família e Gênero). Apenas os táxons com correlações significativas ($p < 0,05$) com os metadados foram representados nos gráficos (Figura 27).

Os filios Planctomycetes e Nitrospirae foram afetados negativamente e suas abundâncias diminuíram com o aumento da concentração de HPAs (Figura 27A). Por outro lado, o filo Spirochaetes respondeu positivamente ao aumento da concentração de contaminantes (Figura 27A). A classe Planctomycetia diminuiu com o aumento da concentração de hidrocarbonetos, enquanto Spirochaetes e Bacteroidia foram enriquecidas; a primeira em resposta a um aumento de HPAs com menor número de anéis ($n \leq 3$) e a segunda em resposta a um aumento de HPAs com maior número de anéis ($n \geq 5$) (Figura 27B). As famílias Gemmataceae e Pirellulaceae diminuíram com o aumento na concentração dos hidrocarbonetos, mas Porphyromonadaceae foi correlacionada com um aumento de HPAs com até dois anéis, Spirochataceae e Syntrophaceae foram associados com HPAs com até cinco anéis, e Comamonadaceae respondeu ao aumento de todos os hidrocarbonetos, incluindo HPAs com 6 anéis (Figura 27C). Além disso, a partir do nível de gênero, o enriquecimento de alguns grupos específicos é observado de forma mais pronunciada, como resultado do aumento da concentração dos contaminantes. O gênero *Anaerolinea* foi enriquecido com o aumento de hidrocarbonetos com menor número de anéis, ($n < 3$) *Bdellovibrio*, *Comamonas*, *Desulfomonille* e *Treponema* com os hidrocarbonetos de tamanho intermediários (n entre 3 e 4) e *Hydrocarboniphraga*, *Geobacter* e *Paulidibacter* com o aumento de todos os contaminantes (Figura 27D)



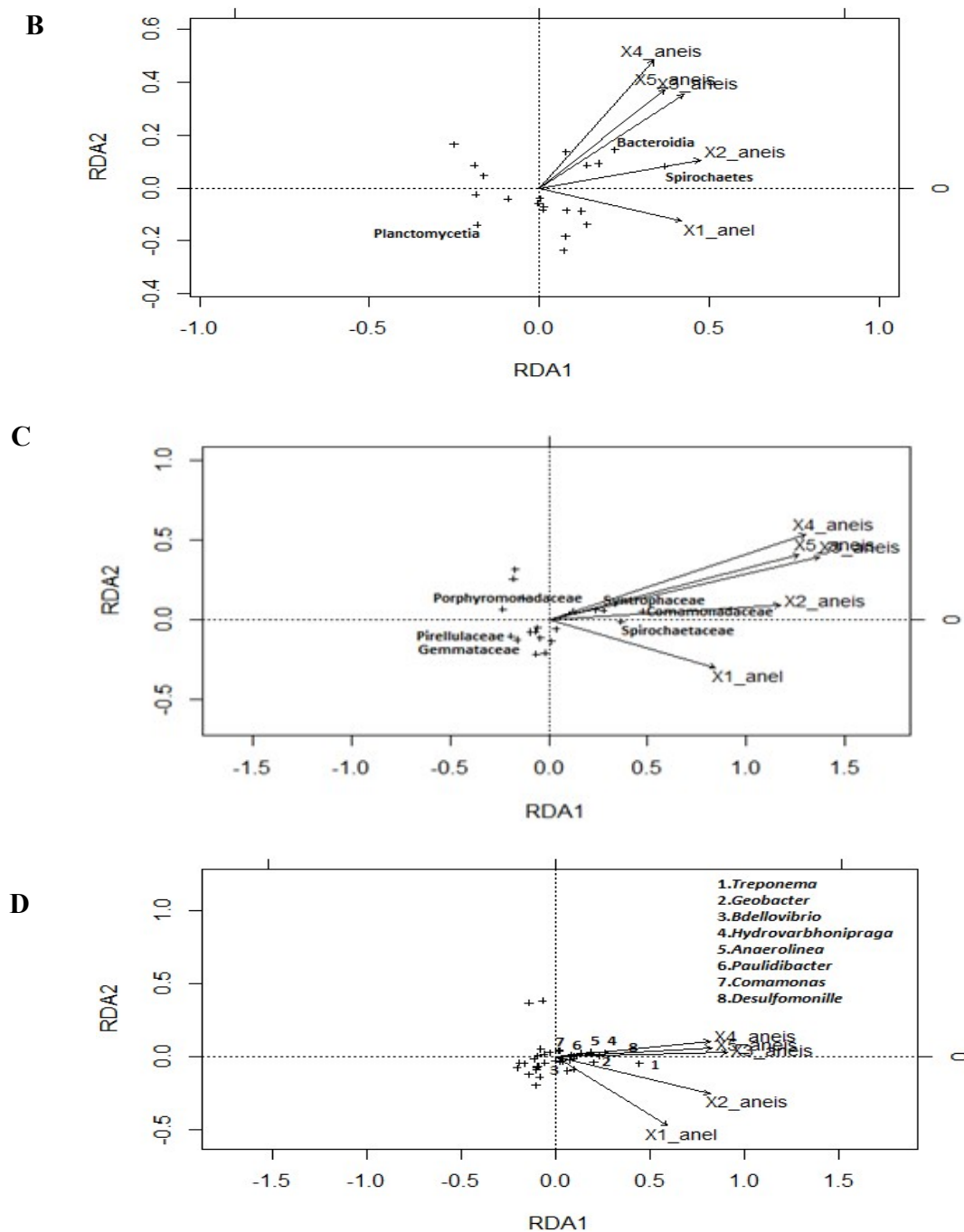


Figura 27: Análise de Redundância (RDA) da comunidade de bactérias nas amostras no nível de A) Filo, B) Classe, C) Família e D) Gêneros em função dos metadados. Os táxons presentes são representados pelas cruzes e apenas aqueles que apresentaram forte correlação com os metadados foram plotados.

Todos esses gêneros possuem membros já caracterizados, direta ou indiretamente, quanto à degradação de xenobióticos por vias aeróbicas ou anaeróbicas. Bactérias do gênero *Comamonas* capazes de degradar fenol (Watanabe et al., 2002) e 3-cloroanilina (Boon et al., 2000) foram isoladas de lodo ativado e isolados capazes de degradar naftaleno, fenantreno e antraceno foram isolados de amostras de sedimento de rio (Goyal et al., 1996). Isolados do gênero *Geobacter* capazes de oxidar compostos aromáticos já foram descritos em aquíferos contaminados (Prakash et al., 2010; Rotaru et al., 2011). O gênero já foi associado à degradação anaeróbica de hidrocarbonetos monoaromáticos, como tolueno, fenol, p-cresol e o-xileno (Kunapuli, et al., 2010). Isolados do Gênero *Bdellovibrio* foram enriquecidos em um reator alimentado com BTEX para tratamento de água (Li & Goel, 2012) e isolados do gênero *Hydrocarboniphaga* em solos contaminados com petróleo (Palleroni et al., 2004; Sheng et al., 2016). *Desulfomonille* é o único gênero anaeróbico conhecido capaz de promover a degradação de compostos aromáticos clorados, como benzoatos em cultura pura (DeWeerd & Suflita, 1990; Mohn & Kennedy, 1992).

Bactérias do gênero *Anaerolinea* são microrganismos estritamente anaeróbios presentes em alta frequência em aquíferos, sedimentos e outros ambientes contaminados com hidrocarbonetos, sugerindo que membros desse gênero tenham um papel na biodegradação anaeróbica desses contaminantes, embora esse papel não seja claro (Sherry et al., 2013; Akbari & Ghoshal, 2015) Os gêneros *Treponema* e *Paludibacter*, que apresentaram correlação positiva com a presença de HPAs, ainda, não foram diretamente caracterizados quanto à capacidade de degradação de hidrocarbonetos. Mas, curiosamente, em mais de um trabalho, são relatados como gêneros que tendem a ser sucessores de microrganismos diretamente envolvidos na degradação de hidrocarbonetos após a redução do contaminante no ambiente (Rodriguez et al., 2015; Yang et al., 2016).

6.3.4) Predição de funções relacionadas à degradação de hidrocarbonetos aromáticos do metagenoma das amostras de fração líquida do aquífero

A maioria das vias presentes no terceiro nível de hierarquia do KEGG foi prevista no metagenoma (292 das 328 descritas). Dentro da categoria metabolismo, estão inclusas as vias de metabolismo secundário, de carboidratos, lipídeos, aminoácidos, nucleotídeos e compostos xenobióticos; na categoria processamento de informações genéticas, as vias relacionadas aos sistemas de reparo, replicação, transcrição e tradução; na categoria processamento de

informações ambientais, as vias relacionadas à sistemas de transportes de membrana, transdução de sinais, secreção bacteriana, produção de moléculas sinalizadoras, dentre outras; na categoria doenças humanas, vias relacionadas a desenvolvimento de cânceres, doenças vasculares, do sistema imune, infecciosas em geral, dentre outras; na categoria processos celulares, as vias relacionadas ao transporte e motilidade celulares, crescimento celular, apoptose; e na categoria sistemas de organismos vias relacionadas à adaptação ambiental, dentre outras.

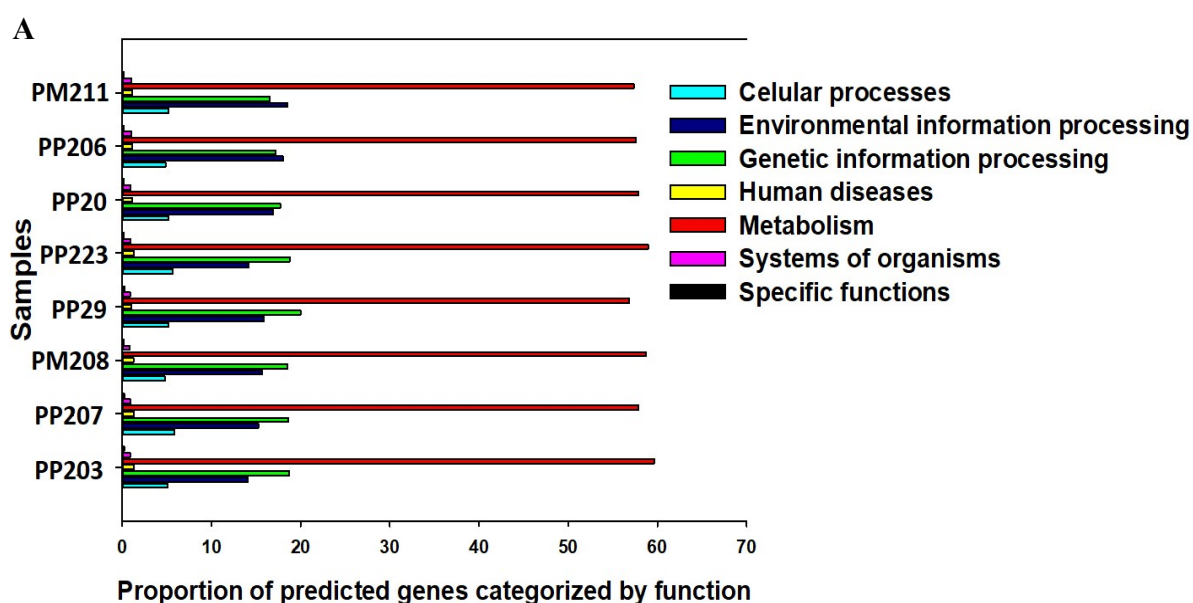
Em geral, não observamos grandes mudanças na proporção das principais funções entre os poços. As vias relacionadas ao metabolismo foram predominantes, representando mais de 50% das vias preditas (Figura 28A). Dentro desta categoria, as vias de degradação de xenobióticos representaram, em média, 6,6% nos poços não contaminados PP203, PP207 e PM208, 7,8% nos poços com contaminações intermediárias PP29 e PP223 e mais de 8,4% nos poços com altos níveis de contaminação PP20, PP206 e PM211 (Figura 28B).

No nível enzimático, inferiu-se a presença de mais de 3000 enzimas, das quais 234 estavam relacionadas à degradação de compostos xenobióticos. Deste total, mais de 100 foram relacionados especificamente à degradação de aromáticos, incluindo enzimas envolvidas em diferentes etapas das vias de degradação de BTEXs, benzoato, estireno, naftaleno e outros HPAs, como as etapas de clivagem de catecol e protocatecoato e metabolismo destes xenobióticos pelo sistema citocromo P450. Em geral, houve um enriquecimento médio de enzimas que participam em diferentes estágios de vias de degradação desses compostos aromáticos e seus intermediários nos poços com algum nível de contaminação quando comparados àqueles que não estavam contaminados (Figura 28C). Dados de abundância relativa de algumas dessas enzimas de vias de degradação de aromáticos, enriquecidas nos tratamentos estão apresentados na (Tabela 9).

Os NSTI, calculados para determinar a acurácia das predições do metagenoma das amostras, foram: PP203 (0,20); PP207 (0,13); PM208 (0,16); PP29 (0,19); PP223 (0,19); PP20 (0,15); PP206 (0,12) e PM 211(0,12), com uma média de 0,16. Para comparação, Langille e colaboradores (2013) encontraram os menores valores de NSTI em amostras associadas a humanos ($0,03 \pm 0,2$). Amostras intestinais de mamíferos apresentaram um valor de NSTI médio mais alto ($0,14 \pm 0,06$), mas comunidades diversas, como o solo, também apresentaram um valor de NSTI muito mais alto ($0,17 \pm 0,02$). Assim, as comunidades diversas e complexas nas amostras de aquíferos fornecem um conjunto de dados satisfatório para serem preditas com uso da ferramenta PICRUSt.

Embora vários estudos tenham encontrado correlação entre as funções realmente expressas por uma determinada comunidade de microrganismos e as inferidas a partir de análises metataxonômicas, essa abordagem de predição não substitui o perfil metatranscriptômico das amostras. Entretanto, tem se mostrado como uma boa ferramenta para indicar o potencial funcional de comunidades bacterianas de interesse em diferentes condições (Jeanbille et al., 2016). No trabalho de Wang e colaboradores (2016), foram observadas grandes alterações nos genes preditos entre as amostras não contaminadas e as contaminadas e o enriquecimento de muitos genes relacionados à degradação de hidrocarbonetos com uso desta ferramenta. Adicionalmente, no mesmo trabalho, entre as amostras contaminadas foram observadas alterações também em função do tipo de hidrocarboneto presente.

Além de fornecer informações sobre a diversidade nos padrões de táxons das amostras, as análises metataxonômicas proporcionam percepções mais amplas sobre a estrutura dessas comunidades como um todo, como a presença dos contaminantes vem afetando essa estrutura e ainda os potenciais representados pelos grupos dominantes ali presentes em relação à biorremediação da área. Em um projeto de biorremediação uma das principais estratégias para alcançar a rápida e satisfatória degradação dos HPAs é estimular o crescimento de bactérias degradadoras presentes no local. Assim, a predição de uma maior proporção de vias relacionadas à degradação xenobiótica (Figura 28B) e o número de enzimas envolvidas na degradação de aromáticos e seus intermediários nos poços altamente contaminados (Figura 28C, Tabela 9), abre perspectivas promissoras para a implementação da estratégia de bioestimulação.



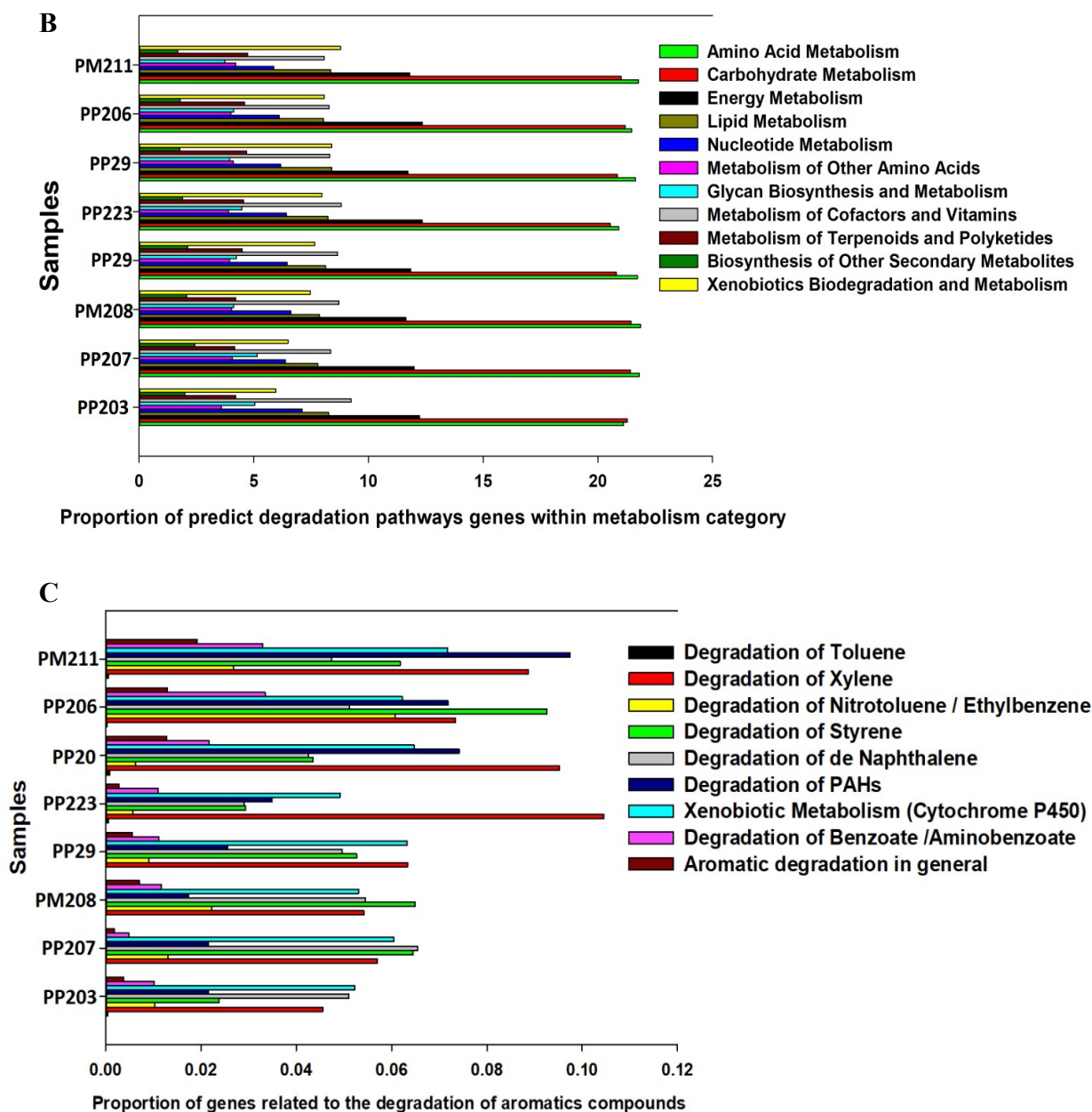


Figura 28: A) Proporção de vias metabólicas previstas nos poços, categorizadas em grupos de acordo com suas funções; B) Proporção de vias de biodegradação xenobiótica e outras vias de degradação dentro da categoria de metabolismo nos poços; e C) Proporção de genes relacionados à degradação de compostos aromáticos nos poços.

No gênero *Comamonas*, por exemplo, a presença de genes que codificam a subunidade alfa de enzimas nafataleno dioxigenases responsáveis pela degradação de HAPs já foi detectada (Moser & Stahl, 2001). No trabalho de Zylstra e colaboradores (1997) foi demonstrado que bactérias do gênero apresentam, inclusive, uma dioxigenase com estrutura gênica um pouco

diferenciada dos genes altamente conservados (nahAaAbAcAd) da napatelno dioxigenase encontrada em bactérias do gênero *Pseudomonas*. Para um isolado de *Geobacter metaloiducens*, foi relatada a produção da enzima benzilsuccinato sintase (BSS), que catalisa a adição do carbono metil do tolueno à dupla ligação do fumarato (Kane et al., 2002). Este é um estágio na degradação anaeróbica do tolueno e que está envolvido na ativação anaeróbica de uma variedade de outros compostos, incluindo m-xileno e 2-metilnaftaleno (Kane et al., 2002). Alguns genes alkB que codificam a enzima alcano 1-monooxigenase, uma enzima chave responsável pela oxidação inicial de alcanos inativados, são comumente encontrados em bactérias do gênero *Bdellovibrio* (Lu, 2012). As espécies de *Desulfomonille tiedjei* possuem genes que codificam enzimas capazes de promover a desalogenação redutiva de compostos aromáticos clorados (Jeanbille et al., 2016). Os resultados mostram que a comunidade bacteriana da área é muito diversificada e dinâmica e que a presença dos contaminantes foi capaz de alterar profundamente sua estrutura, com o enriquecimento de vários grupos de bactérias nos poços contaminados com creosoto em relação aos não contaminados. A maioria desses grupos de bactérias tem sido direta ou indiretamente relacionada, em vários estudos, quanto à capacidade de sobrevivência e degradação de diferentes HPAs que compõem esse contaminante, tanto por meio de vias de degradação aeróbicas quanto anaeróbicas. Assim, é possível confirmar a presença de microrganismos com potencial degradativo na área de estudo, que podem ser bioestimulados *in situ* para acelerar a degradação de contaminantes sob condições nutricionais e físico-químicas adequadas.

Tabela 9: Abundância relativa de algumas enzimas preditas envolvidas na degradação de compostos aromáticos que foram enriquecidos no metagenoma dos poços contaminados.

Função	KO	Descrição KEGG [Nº EC]	PP203	PP207	PM208	PP29	PP223	PP20	PP206	PM211
Degradação de xileno	K01821	praC, xylH; 4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	0.0329	0.0265	0.0325	0.0516	0.0477	0.0468	0.0467	0.0550
	K01617	dmpH, xylI, nahK; 2-oxo-3-hexenedioate decarboxylase [EC:4.1.1.77]	0.0185	0.0210	0.0149	0.0112	0.0061	0.0288	0.0202	0.0260
Degradação de Nitrotolueno / Etilbenzeno	K00632	fadA, fadI; acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	0.0091	0.0057	0.0222	0.0103	0.0131	0.0062	0.0607	0.0268
Degradação de Estireno	K01800	maiA, GSTZ1; maleylacetoacetate isomerase [EC:5.2.1.2]	0.0189	0.0131	0.0166	0.0072	0.0184	0.0224	0.0207	0.0255
Degradação de naftaleno	K04072	adhE; acetaldehyde dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.2.1.10 1.1.1.1]	0.0121	0.0139	0.0111	0.0124	0.0076	0.0210	0.0196	0.0268
Degradação de HPAs	K00480	salicylate hydroxylase [EC:1.14.13.1]	0.0103	0.0230	0.0121	0.0108	0.0147	0.0311	0.0319	0.0403
	K04102	pht5; 4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase [EC:4.1.1.55]	0.0013	0.0016	0.0013	0.0031	0.0029	0.0116	0.0124	0.0171
	K04100	ligA; protocatechuate 4,5-dioxygenase, alpha chain [EC:1.13.11.8]	0.0069	0.0051	0.0020	0.0038	0.0020	0.0155	0.0132	0.0198
	K04101	ligB; protocatechuate 4,5-dioxygenase, beta chain [EC:1.13.11.8]	0.0071	0.0051	0.0020	0.0039	0.0020	0.0159	0.0143	0.0204
Metabolismo de xenobióticos (Citocromo P450)	K04097	HPGDS; prostaglandin-H2 D-isomerase / glutathione transferase [EC:5.3.99.2 2.5.1.18]	0.0257	0.0236	0.0196	0.0208	0.0218	0.0332	0.0340	0.0319
Degradação de benzoato /Aminobenzoato	K03464	catC; muconolactone D-isomerase [EC:5.3.3.4]	0.0020	0.0003	0.0017	0.0009	0.0033	0.0043	0.0026	0.0022
	K01857	pcaB; 3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.2]	0.0072	0.0048	0.0099	0.0042	0.0015	0.0153	0.0150	0.0194
	K04109	hcrB, hbaD; 4-hydroxybenzoyl-CoA reductase subunit beta [EC:1.3.7.9]	0.0015	0.0008	0.0002	0.0015	0.0000	0.0033	0.0078	0.0055
	K07539	oah; 6-oxocyclohex-1-ene-carbonyl-CoA hydrolase [EC:3.7.1.21]	0.0004	0.0026	0.0000	0.0012	0.0000	0.0036	0.0080	0.0059
Degradação de aromáticos em geral	K00529	hcaD; 3-phenylpropionate/trans-cinnamate dioxygenase ferredoxin reductase component [EC:1.18.1.3]	0.0050	0.0015	0.0034	0.0051	0.0042	0.0116	0.0239	0.0126

K01826	hpaF, hpcD; 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconate isomerase [EC:5.3.3.10]	0.0044	0.0052	0.0047	0.0093	0.0017	0.0167	0.0150	0.0199
K05921	hpaG; 5-oxopent-3-ene-1,2,5-tricarboxylate decarboxylase / 2-hydroxyhepta-2,4-diene-1,7-dioate isomerase [EC:4.1.1.68 5.3.3.-]	0.0082	0.0107	0.0107	0.0107	0.0223	0.0172	0.0171	0.0235
K05709	hcaF, hcaA2; 3-phenylpropionate/trans-cinnamate dioxygenase subunit beta [EC:1.14.12.19]	0.0100	0.0038	0.0074	0.0040	0.0021	0.0134	0.0153	0.0221
K05708	hcaE, hcaA1; 3-phenylpropionate/trans-cinnamate dioxygenase subunit alpha [EC:1.14.12.19]	0.0056	0.0028	0.0071	0.0038	0.0018	0.0129	0.0130	0.0192

6.4) Quantificação da população de arqueas e bactérias nas amostras por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real

Para a quantificação absoluta do número de cópias de DNA das bactérias e arqueas presentes nas amostras foram realizados ensaios de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), utilizando o sistema syber Green. A qPCR também apresenta a vantagem de não ser limitada pelo cultivo de microrganismos e vem sendo aplicada com sucesso para quantificar tanto genes funcionais específicos quanto marcadores filogenéticos em diversos tipos de amostras ambientais (Henry et al., 2004; Fierer et al., 2005; He et al., 2007).

6.4.1) Construção da curva padrão

Primeiramente foi construída uma curva-padrão específica para a quantificação de bactérias e uma para a quantificação de arqueas utilizando como controle positivo o produto de amplificação do pool de DNA das amostras com o uso dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para a detecção de cada grupo. Esse controle positivo foi quantificado utilizando nanodrop e o número de cópias do gene do rRNA 16S presentes no amplicon de cada grupo foi calculado utilizando a calculadora online <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html> (Staroscik, 2004), de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Número de cópias} = (\text{Concentração do DNA (g)} * 6.022 \times 10^{23}) / (\text{Tamanho do template (pb)} * 1 \times 10^9 * 650)$$

Onde:

Concentração de DNA(g) = Concentração do produto de PCR amplificado

6.022×10^{23} = Número de Avogrado

650 = Peso de cada par de bases em daltons

Tamanho do template = Tamanho em pares do fragmento gerado a partir dos oligonucleotídeos iniciadores

Posteriormente, esses controles positivos foram diluídos sucessivamente (10:1) até 10^2 números de cópias do gene por ul. As diluições foram utilizadas em triplicata para a construção da curva-padrão e os valores de Ct obtidos foram analisados para definição do “threshold” de

cada curva-padrão, de forma a se obter a eficiência mais próxima de 100%. Para bactérias, 5 pontos da curva foram escolhidos e variaram de 10^9 até 10^5 log do número de cópias do gene rRNA 16S. Para as arqueas, 7 pontos da curva foram utilizados e a mesma variou de 10^9 até 10^3 log do número de cópias do gene rRNA 16S. Os “slopes”, as equações, o coeficiente de determinação (r^2) e a eficiência das curvas-padrão estão na Tabela 10. Foi possível observar que ambas as curvas apresentaram bons coeficientes de determinação ($R^2 > 0,97$), demonstrando que os pontos escolhidos foram adequados para a construção das curvas. A eficiência da reação também foi boa, próxima de 100%.

Tabela 10: Equações das curvas-padrão, valores de “slope”, coeficiente de determinação (r^2) e eficiência das reações de quantificação de bactérias e arqueas nas amostras de fração líquida do aquífero, por meio de qPCR.

Grupo de Microrganismos	Slope	Equação	r^2	Eficiência
Bacteria	-3,506	$y = -3.506x + 35.49$	0.98	92.85%
Archaea	-3,583	$y = -3.583x + 42.51$	0.97	90.15%

Na Figura 29 é possível visualizar as curvas padrões, os gráficos de amplificação com os Cts das triplicatas e as curvas de melting gerados a partir dos pontos escolhidos para cada conjunto de primer. Para o grupo de bactérias, foi possível observar que o limite de detecção dos primers foi baixo, com um Ct máximo de 17,5. Em concentrações menores que 10^5 log do número de cópias do rRNA 16S, não se observava mais alterações nas curvas de amplificação e valores de Cts. Foram testadas várias condições, a inclusão de aditivos, alterações nas concentrações dos reagentes e nas condições de ciclagem, dentre outras, e não foi possível alterar o Ct máximo. Isso indica que os nucleotídeos iniciadores utilizados apresentaram baixa sensibilidade em relação às amostras. Ainda para o grupo de bactérias, as curvas de melting não apresentaram um pico único, o que geralmente é necessário para garantir a especificidade da reação. Entretanto, vários trabalhos já destacaram que no caso de amostras ambientais, divergências no conteúdo GC dos genes alvos presentes nos diferentes microrganismos que compõem a amostra podem acarretar na formação de picos múltiplos ou mal delimitados (Sharma et al., 2007). Dessa forma, para esse tipo de amostras, se tanto a curva padrão quanto às amostras a serem quantificadas apresentarem os mesmos perfis de curvas de melting, o que foi observado nesse trabalho, é o suficiente para garantir a confiabilidade dos resultados (Cardinali-Rezende et

al., 2012). Para o grupo de arqueas os Cts da curva padrão variaram de 9 a 30 e as curvas de melting apresentaram pico único, como esperado.

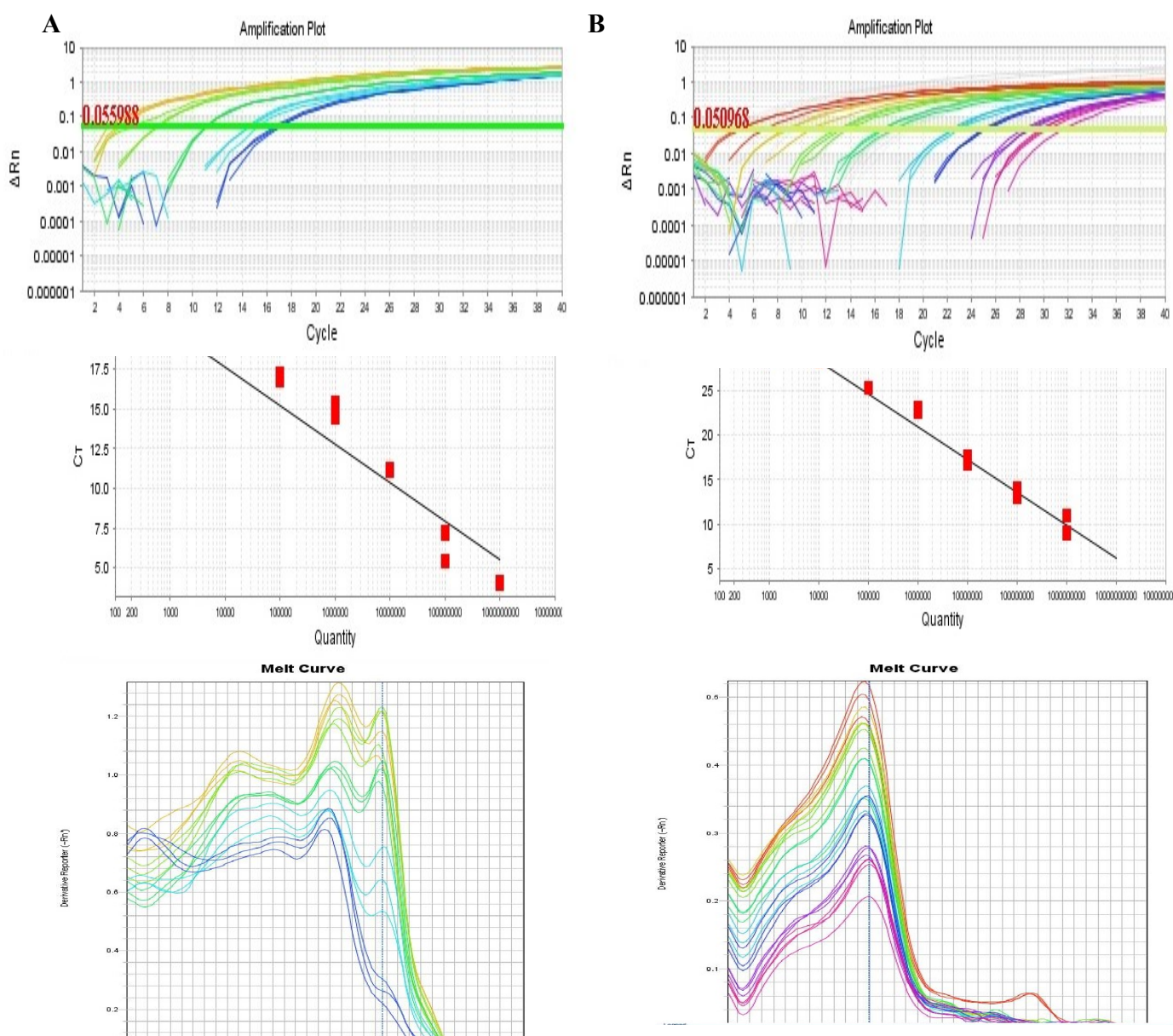


Figura 29: Curvas padrões, gráficos de amplificação e curvas de melting gerados em ensaios de PCR quantitativo em tempo real para quantificação do número de cópias de rRNA 16S de A) bactérias e B) arqueas, nas amostras de fração líquida do aquífero.

6.4.2) Quantificação das bactérias e arqueas presentes nas amostras

Antes da quantificação, foi realizado um teste de inibição, para determinação da concentração de cada amostra a ser utilizada. Para tal uma placa foi montada com a curva-padrão juntamente com diluições sucessivas das amostras em duplicata (10:1). Para todas as amostras foi constatada inibição da reação em concentrações acima de 40ng ul⁻¹ de DNA, pois em concentrações acima desse valor não se observava alteração da curva de amplificação mesmo com maiores quantidades de sequências alvos. Para cada amostra, foi escolhido a menor diluição a partir da qual a mesma passava a apresentar alteração de amplificação em função do número de sequências alvos e com Cts dentro do limite de detecção.

Amostras ambientais comumente possuem grandes quantidades de inibidores de reação, como ácidos húmicos, que são capazes de modificar e/ou inibir a atividade enzimática, alterando o limite de detecção do método e tornando a quantificação menos precisa e confiável (Sharma et al., 2007). Alguns trabalhos já demonstraram, inclusive, que a concentração inibitória mínima varia de acordo com a composição da amostra (Tebbe & Vahjen, 1993). Assim, em reações quantitativas a principal opção de minimizar o efeito de inibidores é diluir a amostra a ser quantificada, com conseqüente redução no número de sequências alvos, o que precisa ser corrigido posteriormente (Sharma et al., 2007).

Posteriormente, uma placa foi montada com as diluições escolhidas para cada amostra em triplicata e o controle negativo também em triplicata. Para as bactérias, os Cts das amostras variaram de 8,5 a 17,5 e para arqueas variaram de 26 a 28,5 (Anexo 4). Todas as amostras em que o valor de Ct ficou acima do limite de detecção mesmo com a ampla variedade de concentrações testadas, foram consideradas ND (não-detectável). O log do número de cópias que havia sido calculado para as amostra foi corrigido em função das diluições que haviam sido usadas para cada amostra, o volume das amostras que haviam sido utilizados para a extração de DNA e o volume final no qual o DNA foi ressuscitado após a extração com o kit utilizado, com o intuito de normalizar a concentração do número de cópias por mL de amostra.

Uma estimativa da quantificação absoluta do número de células de cada grupo por mL de amostra foi realizada considerando o valor médio de quatro cópias do gene do rRNA 16S por célula de bactéria e 2,5 por célula de arquea. Em amostras ambientais complexas, essa estimativa é um pouco limitada porque grupos diferentes de microrganismos possuem números de cópias do gene rRNA 16S que variam de 1 a 13 (Fogel et al, 1999). Apesar disso, quando o interesse

principal é permitir a comparação entre diferentes amostras, essa extrapolação costuma ser utilizada e isso pode ser observado em diferentes trabalhos (Klamppenbach *et al.*, 2001; Cardinali-Rezende *et al.*, 2012).

Os valores dos números de cópias do gene do rRNA 16s de bactérias e arqueas por mL das amostras de fração líquida do aquífero, assim como os números de células estimados podem ser visualizados na Tabela 11.

Tabela 11: Número de Cópias do gene rRNA 16S e de células bactérias e arqueas por mL das amostras de fração líquida do aquífero, quantificados por meio de qPCR

Amostra	Número de Cópias		Número de Células	
	Bactérias	Arqueas	Bactérias	Arqueas
PP203	2.55E+07	ND	6.37E+06	-----
PP207	2.17E+07	ND	5.42E+06	-----
PM208	1.63E+06	ND	4.07E+05	-----
PP29	2.87E+07	ND	7.18E+06	-----
PP223	1.76E+07	ND	4.41E+06	-----
PP20	1.60E+07	9.66E+03	4.01E+06	3.87E+03
PP206	9.85E+05	1.91E+04	2.46E+05	7.64E+03
PM211	2.48E+06	ND	6.21E+05	-----

A densidade variou de $2,46 \times 10^5$ a $7,18 \times 10^6$ células bacterianas/mL entre as amostras. De modo geral, são valores baixos quando comparados com a densidade de bactérias comumente obtidas em outros tipos de amostras ambientais como solos e sedimentos. No trabalho de López-Gutiérrez e colaboradores (2004), em oito diferentes amostras de solos e sedimentos coletados em diferentes áreas e cidades na França, o valor da densidade de bactérias variou de 10^9 a 10^{11} células por grama de solo.

Entretanto, já é relatado que amostras de ambientes aquáticos comumente possuem densidades menores de bactérias, principalmente à medida que se aumenta a profundidade dos pontos de coleta. No trabalho de Rusterholtz & Mallory (1994), a densidade de bactérias mensuradas para amostras provenientes de dois aquíferos localizados no estado de Kentucky (EUA), por meio de técnica de NMP com o uso do corante INT, variou de 10^6 a 10^7 células mL⁻¹.

As densidades de células variaram estatisticamente entre as amostras de acordo com o teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$) e puderam ser agrupados em 2 grupos estatisticamente distintos (Anexo 5). Um grupo foi formado pelas amostras PM208, PP206 e PM211 e o segundo

pelas amostras PP203, PP207, PP29, PP223 e PP20, sendo o primeiro o grupo que apresentou as menores densidades. Essas diferenças indicam a influência dos parâmetros físico-químicos sobre a abundância da comunidade bacteriana das mesmas.

As amostras PP206 e PM211 possuem altos níveis dos contaminantes e em outras análises realizadas nesse trabalho apresentaram baixa abundância total de OTUs, riqueza e diversidade de bactérias. Confirma-se, por meio da qPCR, que essas amostras possuem também baixa densidade de células bacterianas. Já na amostra PM208, não foi detectada a presença de nenhum dos compostos de interesse e, ainda assim, a mesma apresentou uma densidade de bactérias menor que a das demais amostras não contaminadas e estatisticamente igual a PP206 e PM211. Como também observado em outras análises realizadas, essa amostra apresentou alguns parâmetros ecológicos, como riqueza de OTUs e composição de táxons totalmente diferenciados das demais amostras. Assim como para esses outros parâmetros ecológicos, acredita-se que fatores físico-químicos não mensurados possam estar afetando a densidade total de células bacterianas nessa amostra.

Em relação à população de arqueas, foi possível detectá-las apenas em duas amostras, a PP20 e a PP206, e em densidades baixas e próximas para ambas, na casa de 10^3 . Nas demais amostras, os Cts observados foram acima dos limites de detecção independente das diluições testadas. Representantes do Domínio Archaea são associadas a ambientes extremos, mas podem ser considerados ubíquos, com relatos de sua ocorrência na cavidade oral humana, ambientes marinhos costeiros, solos, dentre outros (Kemnitz et al., 2007; Timonen & Bomberg, 2009). Entretanto, essa ocorrência varia muito de acordo com as características das amostras. No nosso trabalho, as bactérias se mostraram numericamente dominantes nas amostras de fração líquida de aquífero porque mesmo nas duas amostras onde foram detectadas a presença de arqueas, as mesmas corresponderam a menos de 6% da população. No trabalho de Yadav e colaboradores (2015) com amostras de águas residuárias contaminadas com hidrocarbonetos foi observado o predomínio de bactérias em relação às arqueas, com abundâncias que variaram de 97.62% a 99.09%. Esta baixa densidade pode ter sido responsável pela não detecção de representantes do Domínio Archaea nas análises metataxonômicas no nosso estudo.

Parte 2. Estudo da diversidade e prospecção de bactérias degradadoras de HPAs presentes em sedimentos contaminados com diferentes concentrações de creosoto utilizando abordagens dependentes e independentes de cultivo.

6.1) Análises físico-químicas das amostras

As amostras dos sedimentos coletadas foram analisadas físico-quimicamente em relação aos parâmetros: Carbono Orgânico Total, Nitrogênio Total, Fósforo Total, pH e concentração dos principais HPAs. No caso dos HPAs, os valores de concentrações de muitos desses compostos estão acima dos limites de investigação industrial em algum ponto, de acordo com a Resolução número 420 do Conama, com excessão do indeno(1,2,3,cd)pireno, naftaleno e benzo(a)antraceno. As concentrações de todos os compostos analisados para as amostras estão listadas na Tabela 12 e, de modo geral, as mesmas apresentaram perfis variados em relação a maioria dos parâmetros analisados.

Tabela 12: Resultados das análises físico-químicas das cinco amostras de sedimentos em estudo.

Parâmetros	S102	S109	S129	S138	S144	
Porcentagem de sólidos (%pp)	87,1	55,4	63	56,7	58,1	
Carbono orgânico total (%pp)	5,68	7,28	7,42	7,59	7,63	
Nitrogênio total Kjeldahl (mg Kg ⁻¹)	1880	2700	4670	2820	3490	
Nitrato (com o N) (mg Kg ⁻¹)	11,8	<1,7	<1,5	<1,6	<1,6	
Nitrito (com o N) (mg Kg ⁻¹)	<0,2	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	
Nitrogênio Total (mg Kg ⁻¹)	1892	2700	4670	2820	3490	
pH (Suspensão a 5%)	6,78	5,9	6,73	6,58	6,6	
Fósforo (mg Kg ⁻¹)	424	357	451	650	480	
HPA(s)	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(mg/Kg)	(mg/Kg)	Limite de intervenção CONAMA 420 (mg Kg⁻¹)
Benzo(a)pireno	4,05	5,33	0,074	1,36	6,25	3,5
Benzo(b)fluoranteno	3,79	2,13	0,128	2,78	15,1	-
Criseno	5,51	3,4	0,092	27,1	10,8	-
Fluoreno	0,061	0,125	0,027	85,8	0,41	-
Antraceno	4,21	1,31	0,783	33,5	2,78	-
Fenantreno	0,839	1,18	0,093	316	1,42	95
Dibenzo(a,h)antraceno	0,279	1,87	0,044	0,142	0,389	1,3
Indeno(1,2,3,cd)pireno	3,79	7,68	0,246	0,249	5,23	130
Pireno	4,16	3,71	0,096	169	27	-
Acenafteno	0,049	0,088	0,016	58	0,317	-
Fluoranteno	3,32	3,96	0,102	246	14,3	-

Naftaleno	0,05	0,253	0,028	20,3	0,093	90
Benzo(a)antraceno	3,06	4,1	0,026	28,6	6,89	65

Os valores de pH não variaram muito entre as diferentes amostras, permanecendo entre 5,9 e 6,78, faixa próxima à neutralidade. Já a concentração de Nitrogênio total variou consideravelmente entre as amostras. A menor concentração detectada foi para a amostra S102 (1892 mg Kg⁻¹) e a maior concentração para a amostra S129 (4670 mg Kg⁻¹). Praticamente não houve a detecção de nitrato e nitrito nas amostras, com exceção da S102, que apresentou 11,8 mg Kg⁻¹ de concentração de nitrato. O nitrogênio é um nutriente essencial para todos os microrganismos e usualmente considerado como principal limitante da atividade microbiana, após o carbono. A sua disponibilidade é um entre os diversos fatores que afetam, inclusive, na taxa de degradação de hidrocarbonetos (Geisseler et al., 2010; Dados et al., 2014).

A concentração de carbono orgânico total (COT), que representa a quantidade de matéria orgânica presente na amostra, não variou de forma considerável entre os pontos e os valores observados foram na faixa de 5,68 a 7,63%. A concentração de fósforo variou de 357 mg Kg⁻¹ a 650 mg Kg⁻¹ entre as amostras, sendo o menor valor observado para a S109 e o maior valor para a S138. Assim como o Nitrogênio, o Fósforo também é um macronutriente essencial para a atividade microbiana, como a degradação de contaminantes. Em projetos de biorremediação, a bioestimulação de populações autóctones do solo para a degradação dos contaminantes é focada na adição de nitrogênio e fósforo (Leys et al., 2005).

Com relação à concentração dos HPAs presentes nas 5 amostras, o ponto S129, que está localizado na borda da lagoa, possui menor concentração média desses compostos e todos estão abaixo de 1mg Kg⁻¹. Por outro lado, o ponto S138, que se encontra no centro da lagoa, destaca-se por possuir alta concentração da maioria dos compostos, exceto para benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno e indeno(1,2,3,cd)pireno. Os pontos S102, S109 e S144 possuem concentrações intermediárias dos compostos de interesse, sendo que dentre eles, as concentrações da maioria dos compostos no ponto S102 são um pouco mais baixas que os demais e no S144 são um pouco mais elevadas que os demais.

As amostras foram agrupadas pela ACP, considerando os parâmetros físico-químicos mensurados para as amostras, inclusive a concentração dos HPAs (Figura 30). A análise permitiu explicar 75% da variância total dos dados, sendo 51,65% deles explicado pela CP1 e 23,37% pela CP2. A contribuição e correlação dos parâmetros para as componentes 1 e 2 podem ser

visualizados no Anexo 6. Os parâmetros que mais contribuíram para a CP1 foram fluoranteno, pireno, fluoreno, acenafteno, fenantreno, naftaleno, antraceno, benzo(a)antraceno, a concentração de fósforo e criseno e todos apresentaram correlação altamente positiva, acima de 0,9. Os parâmetros que mais contribuíram para a CP2 foram nitrito (Com N), carbono orgânico total, nitrogênio total Kjeldahl e nitrogênio total, seguidos pelos compostos dibenzo(a,h)antraceno, benzo(b)fluoranteno, e indeno(1,2,3,cd)pireno. Todos apresentaram correlação positiva, mas a mesma se mostrou mais forte para os parâmetros nitrito (Com N) e carbono orgânico total, acima de 0,88. Assim, de modo geral, a maioria dos HPAs foram os compostos que mais contribuíram para a CP1, enquanto os demais parâmetros físico químicos e os HPAs dibenzo(a,h)antraceno, benzo(b)fluoranteno, e indeno(1,2,3,cd) contribuíram mais para a CP2.

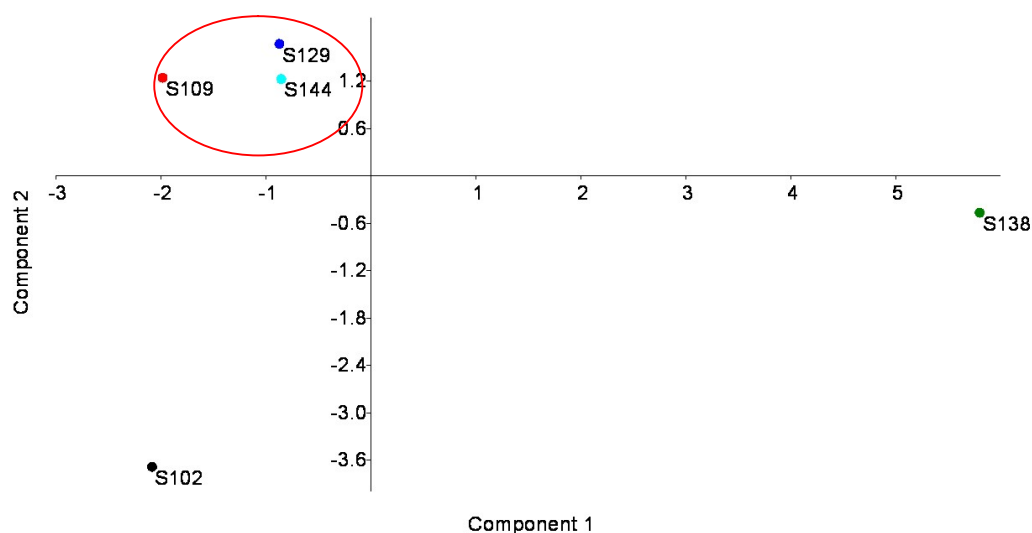


Figura 30 – Agrupamento obtido das 5 amostras de sedimentos coletadas considerando os dados físico-químicos mensurados, por meio de ACP usando o software Past.

Analisando a projeção das componentes, foi possível observar a formação de um grupo constituído pelos pontos S109, S129 e S144. Já os pontos S102 e S138 se posicionaram em posições extremas, não se agrupando com os demais. O ponto S138 possui concentrações bem mais altas de todos os HPAs que contribuíram para a CP1, quando comparados aos demais pontos, e por isso ficou bem separado deles em relação a essa componente. As amostras S109, S129 e S144 se agruparam juntas porque possuem concentrações altas dos parâmetros inorgânicos e/ou dos demais HPAs que mais contribuíram para a CP2, mas não dos HPAs que mais contribuíram para a CP1.

Já a amostra S102 além de também possuir concentrações mais baixas da maioria dos HPAs, como já mencionado, possui as mais baixas concentrações dos parâmetros inorgânicos que contribuíram para a CP2 e por isso se posicionou na parte mais negativa das duas componentes.

6.2 Análise da comunidade bacteriana das amostras de sedimentos pela técnica de PCR-DGGE

6.2.1 Estrutura da comunidade bacteriana das amostras

Analisando o dendrograma gerado para comparar a estrutura geral da comunidade bacteriana das 5 amostras de sedimentos utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard, pode-se observar que todas as amostras apresentaram um mínimo de 45% de similaridade entre si, e não houve a formação de subgrupos de amostras com similaridade acima de 60%. Entretanto, de modo geral, as amostras S129, S109 e S102 foram um pouco mais similares entre si (coeficiente de similaridade de aproximadamente 55%), enquanto as amostras S138 e S144 foram mais dissimilares quando comparadas as demais e um pouco mais similares entre si (50%) (Figura 31).

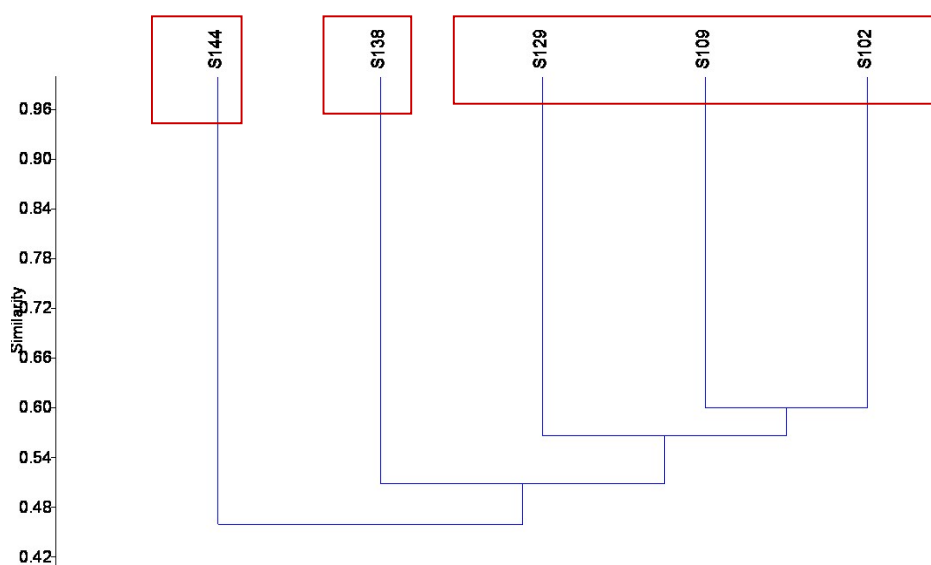


Figura 31 – Dendrograma representativo das comunidades bacterianas presentes em amostras de sedimentos, construído a partir da matriz de similaridade do perfil de bandas das amostras no DGGE gerada pelo coeficiente de Jaccard.

Além do dendrograma, foi realizado um agrupamento das amostras por meio de análise de NMDS utilizando a matriz de presença e ausência gerada a partir do perfil de bandas de cada

amostra no DGGE (Figura 32). Na análise, as amostras S102, S109 e S129 apesar de não terem posicionado juntas ao ponto de poderem ser agrupadas, ficaram mais próximas entre si. Já as amostras S138 e S144 ficaram mais distantes entre si e das demais.

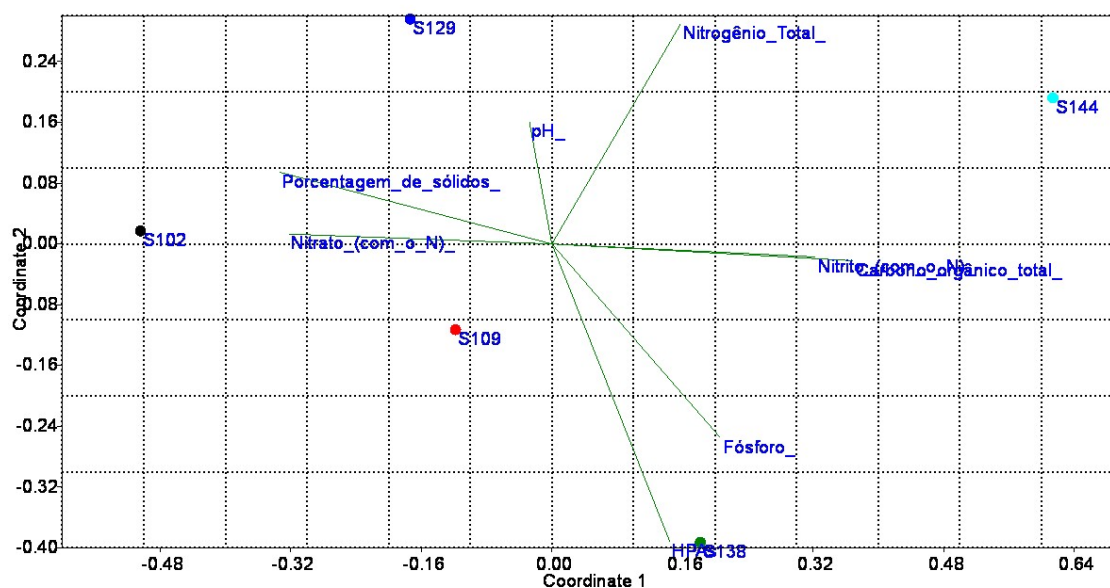


Figura 32 – Análise de NMDS da matriz de presença e ausência gerada a partir do perfil de bandas das amostras do sedimento no DGGE em função dos metadados.

Avaliando-se a influência dos metadados na formação dos grupos, observa-se que os parâmetros físico-químicos que mais influenciaram no posicionamento das amostras S102, S129 e S109 são o pH, porcentagem de sólidos totais e teor de nitrato. Já os parâmetros que mais influenciaram a posição da amostra S144 foram o teor de nitrogênio total e carbono orgânico, enquanto que o posicionamento da amostra S138 foi predominantemente explicado pelo teor de fósforo e a concentração dos HPAs.

Como comentado no tópico anterior, a amostra S138 possui maior concentração dos HPAs quando comparada a todas as demais e a concentração dos contaminantes na mesma possivelmente influenciou e tornou a estrutura dessa comunidade diferenciada. A amostra S144, dentre as demais amostras que possuem concentrações intermediárias dos contaminantes, é a que apresenta a maior concentração dos HPAs, entretanto em concentrações muito abaixo das

mensuradas para a amostra S138. A estrutura dessa comunidade também ficou bem diferenciada em relação às demais, mas nesse caso, aparentemente, a concentração do HPAs pode não ter sido tão relevante, mas sim carbono orgânico e nitrogênio, que são fatores de extrema importância para sobrevivência e estruturação de comunidades microbianas. Em relação às demais amostras, elas apresentam concentrações baixas ou inexistentes de HPAs, e, aparentemente, não foram afetadas por esse parâmetro.

6.2.2) Identificação molecular de algumas bandas excisadas do gel de DGGE

Um total de 17 bandas distintas foram identificadas no gel e desse total, 11 foram selecionadas e excisadas para serem identificadas por meio de métodos moleculares, sendo possível identificar 4 delas, excisadas a partir das amostras 138 e 144. A numeração e localização das mesmas no gel pode ser visualizada na Figura 33 e a identificação na Tabela 13

M S102 S109 S129 S138 S144 M

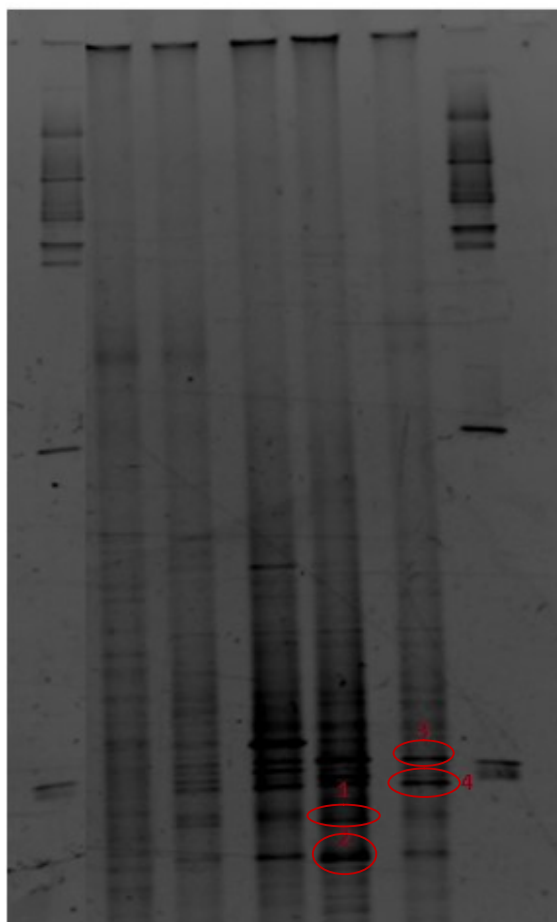


Figura 33: Padrão de bandas obtidos pela técnica de DGGE a partir dos fragmentos rRNA 16S das amostras de sedimentos. As letras M, nas extremidades, correspondem aos marcadores, cada

amostra avaliada está identificada pelo seu código e as bandas excisadas e identificadas estão numeradas.

Duas das bandas foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus*, do filo Firmicutes. As demais não foram identificadas ao nível de gênero, apenas ao nível de filo, que foram Acidobacteria e Actinobacterium. Bactérias do gênero *Bacillus* são encontradas em uma gama de amostras ambientais e vias degradativas de HPAs já foram relatadas em muitos isolados desse gênero (Annweiler et al., 2000). Esse potencial também já foi descrito para membros dos filos Acidobacteria e Actinobacteria (Chaudhary, et al., 2011; John & Okpokwasi, 2012; Xu et al., 2014).

Tabela 13: Identificação molecular das bandas excisadas do gel de DGGE das amostras de sedimentos, quando comparadas com sequências depositadas no banco de dados GenBank.

Número no gel	Identificação	Nº Acesso Genbank	Identidade (%)
1	<i>Bacillus sp. strain ST11</i>	KX021854.1	100%
2	<i>Uncultured Acidobacteria bacterium clone KBS_T1_R4_149264_d12</i>	HM062445.1	97%
3	<i>Uncultured Actinobacterium clone GASP-WDOS1_F01</i>	EF075474.1	99%
4	<i>Bacillus sp. CB25(2010)</i>	GU944514.1	97%

6.3) Análises metataxonômicas da comunidade bacteriana presente nas amostras

Considerando o nível de concentração dos contaminantes (Tabela 12) e o perfil geral das comunidades bacterianas das 5 amostras de sedimentos obtido por meio da técnica de PCR-DGGE e discutidos no tópico anterior, três delas (S138, S129 e S102) foram selecionadas para serem submetidas às análises metataxonômicas como forma de confirmar a influência dos níveis de contaminação por creosoto na estrutura e composição de suas comunidades bacterianas. Essas amostras representavam, respectivamente, amostras com níveis altos, baixos e intermediários de concentração dos contaminantes.

6.3.1) Sequenciamento do gene de rRNA 16S bacteriano

No metagenoma das amostras de sedimento selecionadas foi possível obter 448573 reads de bactérias. Desse total, 259230 apresentaram alta qualidade (score Fred \geq 20 e 400 pb) e após a

remoção de singletons e quimeras, esse número caiu para 221970. As curvas de rarefação geradas no software QIIME a partir de OTUs com pelo menos de 97% de similaridade também tenderam a uma assíntota, atingindo 0,99 de bons valores de cobertura (Figura 34). Assim, a profundidade de sequenciamento também foi suficiente para cobrir a diversidade bacteriana das amostras de sedimento. O resultado também mostrou que o número de OTUs foi maior nos poços S102 e S129 e bem menor no poço S138 (Figura 34).

O número de reads sequenciadas que puderam ser atribuídas a alguma OTU (abundância total) variou de 35.233 a 86.619 entre as amostras. O maior valor foi obtido para a amostra S138, seguido pelas amostras S129 e S102 (Tabela 14). A riqueza bacteriana na amostra altamente contaminada S138 foi bem menor do que nas amostras S129 e S102. Entre as duas, apesar de haver algumas diferenças nos padrões e concentrações de contaminantes, a riqueza foi bem mais alta em ambas. Em relação aos índices, a diversidade bacteriana também foi bem menor na amostra S138 (Tabela 14).

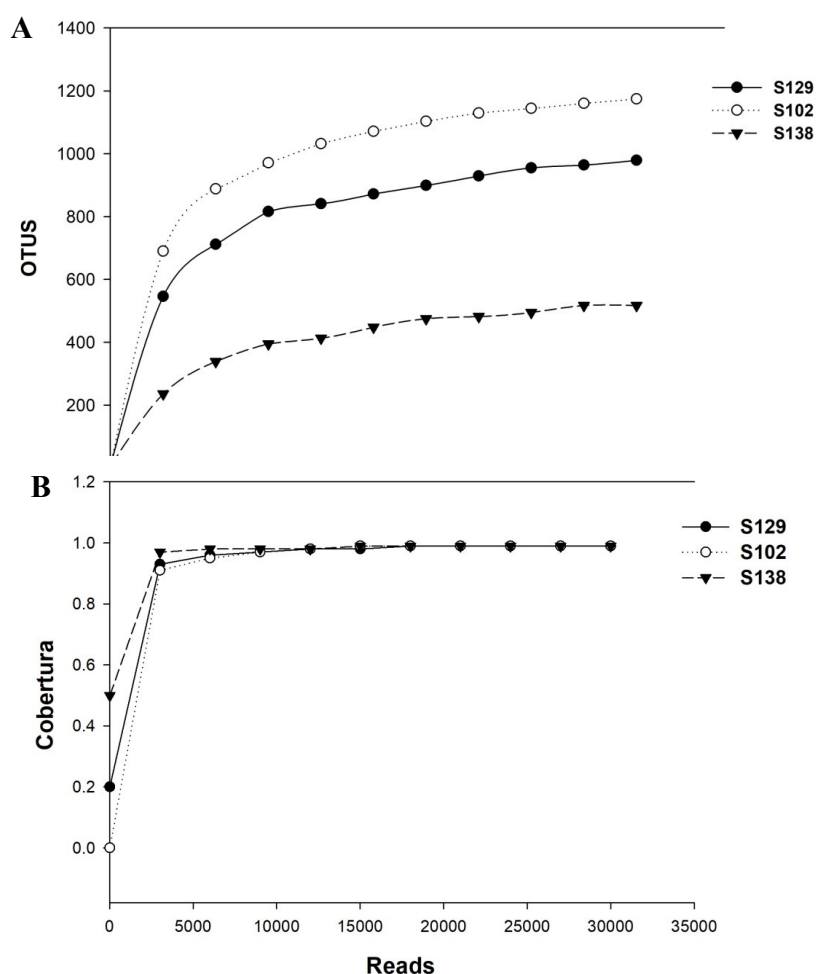


Figura 34 – A) Curvas de rarefação geradas a partir do número de OTUs observados em função dos reads seqüenciados para cada amostra de sedimento usando o programa Sigma Plot. B) Cobertura de seqüenciamento de cada amostra de sedimento usando o programa Sigma Plot.

Tabela 14: Número de reads que puderam ser atribuídos a alguma OTU, número de OTUs observados, estimadores de riqueza e índices de diversidade calculados para a comunidade de bactéria das amostras da fração líquida do aquífero.

Amostra	Nº Reads	OTUs Observados	Estimador de Riqueza		
			Chao1	Shannon	Simpson
S129	62248	979	1062	7.9	0.98
S102	35233	1174	1270	8.6	0.99
S138	86619	517	578	5.1	0.88

Assim, a riqueza e diversidade das amostras decaíram com o aumento da concentração dos contaminantes já que esses parâmetros foram bem inferiores na amostra com mais alta concentração de HPAs, mesmo sendo ela a amostra com maior número de reads atribuídas a alguma OTU. No trabalho de Jung e colaboradores (2016), após a realização de análises metagenômicas em amostras de solos contaminados com óleo diesel também se observou redução na diversidade de grupos bacterianos, o que foi atribuído à toxicidade do contaminante. Como mencionado, esse resultado é consistente com o que têm sido observado na maioria de estudos prévios semelhantes e também ocorreu nas amostras da fração líquida do aquífero. Assim, mesmo em matrizes ambientais diferentes, é observada a seleção de táxons específicos em função da presença de contaminantes.

6.3.2. Beta diversidade e perfis das comunidades de bactérias presentes nas amostras da fração líquida do aquífero

A análise de beta diversidade foi realizada utilizando as distâncias do UniFrac ponderado, que considera tanto as afiliações filogenéticas quanto os valores de abundância relativa das OTUs e pode ser visualizada no PCoA (Figura 35). Foi possível observar que todas as amostras ficaram separadas umas das outras em relação à coordenada 2, entretanto em relação à coordenada 1 apenas a amostra S138 ficou separada. As amostras S102 e S129 ficaram próximas considerando essa coordenada, o que indica não só uma riqueza, como demonstrado anteriormente, mas

também um padrão e abundância de táxons mais semelhante entre elas, o que pôde ser confirmado nas análises posteriores.

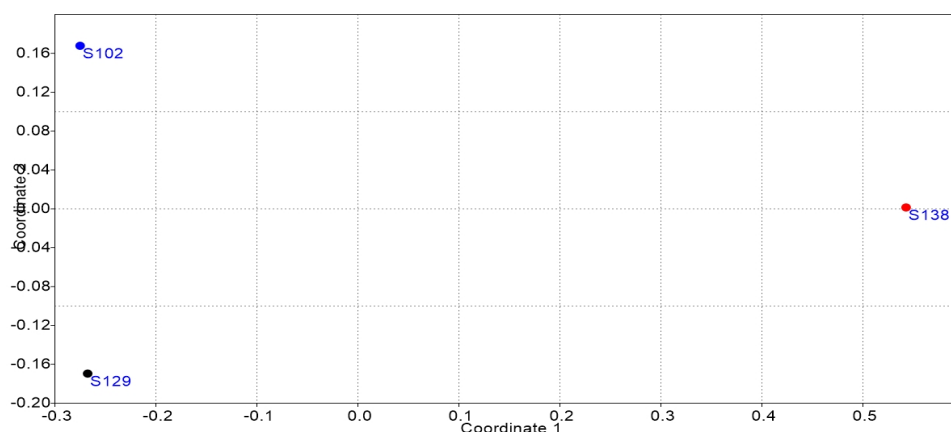


Figura 35 Análise de Coordenadas principais (PCoA) das comunidades bacterianas das amostras de sedimento usando a métrica unifrac ponderada

Mais de 97% das reads puderam ser identificadas, das quais apenas 0,1% como pertencentes ao domínio Archaea, ou seja, houve predominância absoluta de bactérias nas amostras. Foram identificados um total de 32 filos, 75 classes, 136 ordens, 185 famílias e 242 gêneros nas amostras do sedimento. Foi possível confirmar que as amostras com baixa contaminação por HPAs, S102 e S129, apresentaram de modo geral um perfil e predominantemente abundâncias de táxons bem mais semelhantes entre si. Proteobacteria foi o filo mais abundante em todas as amostras e apresentou abundâncias relativas muito próximas entre elas, em média de 35,3% (Figura 36A). Acidobacteria foi o segundo filo mais abundante nas amostras, mas foi ainda mais predominante na amostra S138, com uma abundância relativa de 37,3%, valor muito próximo ao do filo Proteobacteria nessa amostra. Os filos Nitrospirae e Planctomycetes também foram bem frequentes, principalmente nas amostras S102 e S129, com abundâncias relativas que variaram de 8,8% a 11,8%.

Como mencionado anteriormente, a predominância do filo Proteobacteria em amostras ambientais sejam elas contaminadas com hidrocarbonetos ou não é bem reportado (Udotong et al., 2015; Abbasian et al., 2016). Inclusive, no trabalho de Joshi e colaboradores, 2014, mais de 99% dos reads sequenciados em amostras de lodo/resíduos de petróleo pertenciam a esse filo, que acredita-se desempenhar um papel importante na degradação desses contaminantes (Yadav et al.,

2015). Em relação aos demais filos as predominâncias variam muito de um trabalho para outro, mas o enriquecimento do filo Acidobacteria com o aumento da concentração de hidrocarbonetos já foi relatado por diversos autores (Masy et al., 2016; Abbasian et al., 2016; Shahi et al., 2016). Apesar de ter sido reconhecido como filo a relativamente pouco tempo, as acidobactérias são muito difundidas e abundantes em diferentes ecossistemas do planeta, especialmente solos (Kielak et al., 2016). Entretanto, não se conhece bem o seu papel ecológico nesses ecossistemas, principalmente pelo fato de serem bactérias muito difíceis de serem cultivadas pelos métodos clássicos (Bryant et al., 2007). Tem sido citado que o filo compreende microrganismos altamente adaptáveis e metabolicamente bem diversos como ocorre no filo Proteobacteria (Kielak et al., 2016). Ainda assim, bactérias pertencentes a esse filo já foram reportadas como capazes de degradar benzeno (Xie et al., 2011), fluoranteno (Song et al., 2016), fenantreno (Jiang et al., 2015), além de serem amplamente distribuídas em ambientes contaminados com hidrocarbonetos (George et al. 2009; Milton et al. 2010), levantando suspeitas de que elas desempenham um papel importante na degradação de aromáticos (Chadhain et al., 2006). No trabalho de Das e Kazy (2014), análises do gene 16S rRNA revelaram que Acidobacteria foi um dos filos dominantes em amostras de lodo de tanque contaminados com hidrocarbonetos de petróleo em uma instalação de armazenamento de petróleo. Em relação aos demais filos, também encontram-se trabalhos que compararam as estruturas de comunidades bacterianas em amostras ambientais com diferentes concentrações de hidrocarbonetos e de forma semelhante ao nosso evidenciaram o enriquecimento dos Filos Nitrospirae e Planctomycetes em amostras não contaminadas em comparação às contaminadas (Yergeau et al., 2012).

O padrão das Classes dominantes, com abundâncias relativas acima de 1%, foi bem semelhante entre as amostras menos contaminadas, S102 e S129, e mais dissimilar com a amostra altamente contaminada, S138. (Figura 36B). Nas amostras S102 e S129, as classes mais frequentes foram Alphaproteobacteria, Nitrospira e Acidobacteria, com abundâncias relativas média de 14,9%, 10,8% e 10,3%, respectivamente. Já na amostra S138, Acidobacteria foi a classe mais dominante, com abundância relativa de 31,8%, seguida pelas classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria, com abundâncias relativas respectivas de 20,6 e 14,3%.

Alphaproteobacteria costuma ser a classe do filo Proteobacteria com maior predominância de membros em amostras ambientais (Szczeplaniak et al., 2016). No nosso trabalho ela foi frequente em todas as amostras, mas observou-se enriquecimento da classe Gammaproteobacteria

na amostra altamente contaminada. Isso também foi observado em amostras de água profundas no Golfo do México contaminadas com óleo (Mason *et al.*, 2014). O enriquecimento da classe Gammaproteobacteria, que correspondeu a 51% dos reads do filo Proteobacteria, também foi observado em amostras de lodo coletadas de tubulações de petróleo pertencentes a uma indústria de refinaria de óleo na Índia (Joshi *et al.*, 2014). Sugere-se, inclusive, que a comunidade de amostras contaminadas por HPAs seja dominada por Gamaproteobacterias nos estágios finais da remoção dos hidrocarbonetos dos ambientes contaminados (Greer *et al.*, 2010; Szczepaniak *et al.*, 2016). A classe Acidobacteria foi ainda mais enriquecida em função da concentração dos contaminantes. Membros dessa classe já foram reportados como os dominantes em amostra de sedimento contaminadas por derramamentos de óleo no Golfo do México (Liu & Liu, 2013) e um dos grupos destacadamente enriquecidos em amostras de solos contaminadas com pireno, um HPA com grande número de anéis (Ren *et al.*, 2015).

No trabalho de Kumar e Khanna (2010), um padrão semelhante ao obtido nesse trabalho foi encontrado. Eles avaliaram por métodos moleculares os grupos dominantes em amostras de solo contaminado com creosoto e que apresentaram degradação dos HPAs naftaleno, fenantreno e pireno (50 ppm) pela microbiota autóctone. Bactérias das classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria, assim como as acidobactérias, estavam entre os grupos predominantes.

De modo geral, as famílias Koribacteraceae, Thermodesulfobacteriaceae e Rhodospirillaceae foram as mais frequentes nas 3 amostras, com abundâncias relativas entre 8,5% e 31,4%; 3,2% e 9,5% e 5,6% e 6,5%, respectivamente. Entretanto, destaca-se o fato de que na amostra S138, diferente das demais, a família Koribacteraceae foi extremamente enriquecida, com abundância relativa maior que 30%, enquanto as famílias Thermodesulfobacteriaceae e Rhodospirillaceae apresentaram abundâncias menores na amostra S138 quando comparado às demais amostras (Figura 36C).

Koribacteraceae é uma família do filo Acidobacteria cuja abundância geralmente aumenta com o declínio de pH do ambiente e aumento do teor de alumínio extraível (Ivanova *et al.*, 2018). Membros dessa família já foram identificados como dominantes em ecossistemas florestais (Persina *et al.*, 2015), de cerrado (Vieira *et al.*, 2018), ambientes agrícolas (Persina *et al.*, 2015), solos altamente contaminados com drenagem ácida de minas (Wang *et al.*, 2018), sedimentos de rios (Welz *et al.*, 2018), além de solos com baixa concentração de nutrientes (Soman *et al.*, 2017), sendo considerada, inclusive, como uma família oligotrófica e indicadora de

degradação e depleção de nutrientes em amostras de solos (Lewis et al., 2018). Estas características foram observadas nas amostras de sedimentos que, de modo geral, possuíam pHs ligeiramente ácidos e baixo teor de carbono Orgânico Total, como observado na Tabela 12. Não há muitos relatos de sua dominância em amostras ambientais contaminadas com hidrocarbonetos, mas no trabalho de Liu e colaboradores (2018) foi uma das famílias mais abundantes em amostras de solo contaminados com diferentes concentrações de alcanos, representando em média 20% dos reads identificados nesse nível. A família Thermodesulfobacteriaceae pertence ao filo Nitrospirae e compreende bactérias redutoras de sulfato. Semelhante a Koribacteraceae, também é comumente encontrada em ambientes ácidos como solos de mineração (Medeiros et al., 2015), assim como amostras de sedimentos em geral (Mahmoudi et al., 2015).

Em relação ao padrão de gêneros identificados nas amostras, observou-se, em geral, uma alta abundância de gêneros não identificados da família Koribacteriaceae, da família Rhodospirillaceae, do filo Acidobacteria, do filo Planctomycetes e da classe Alphaproteobacteria nas três amostras de sedimento. Nas amostras S129 e S102, observou-se uma abundância um pouco maior do gênero *GOUTA19* da família Thermodesulfobacteriaceae quando comparado à família S138. Por outro lado, na amostra S138, houve o enriquecimento de um gênero não identificado da família Gammaproteobacteria e principalmente do gênero *Candidatus Koribacter*, da família Koribacteraceae, cuja abundância correspondeu a 30% dos reads identificados nesse nível na amostra (Figura 36D).

Esses padrões, em geral, estão de acordo com o descrito por meio da análise de PCR-DGGE descritos no tópico anterior. Novamente a amostra S138 apresenta perfil de comunidade bacteriana totalmente distinto das demais devido às altas concentrações de HPAs presentes. Adicionalmente as amostras S102 e S129, juntamente com a amostra S109, que também possui concentrações bem mais baixas dos contaminantes, assim como também observado antes possuem um perfil de comunidades bacterianas mais próximas entre si.

O gênero *GOUTA19* compreende bactérias redutoras de ferro e sulfato (Sun et al., 2015), sendo descritas em solos, sedimentos e águas subterrâneas contaminados com gasolina (Rama et al., 2018), petróleo (Watanabe et al., 2002) e monoclorobenzeno (Alfreider et al., 2002). Inclusive, Muller e colaboradores (2017) sugeriram a importância desse gênero na degradação de benzeno e naftaleno, dada sua predominância em ensaios de biorremediação *in situ* de lençol

freático contaminado por uma mistura de diesel/bioediesel, no qual esses contaminantes foram rapidamente atenuados.

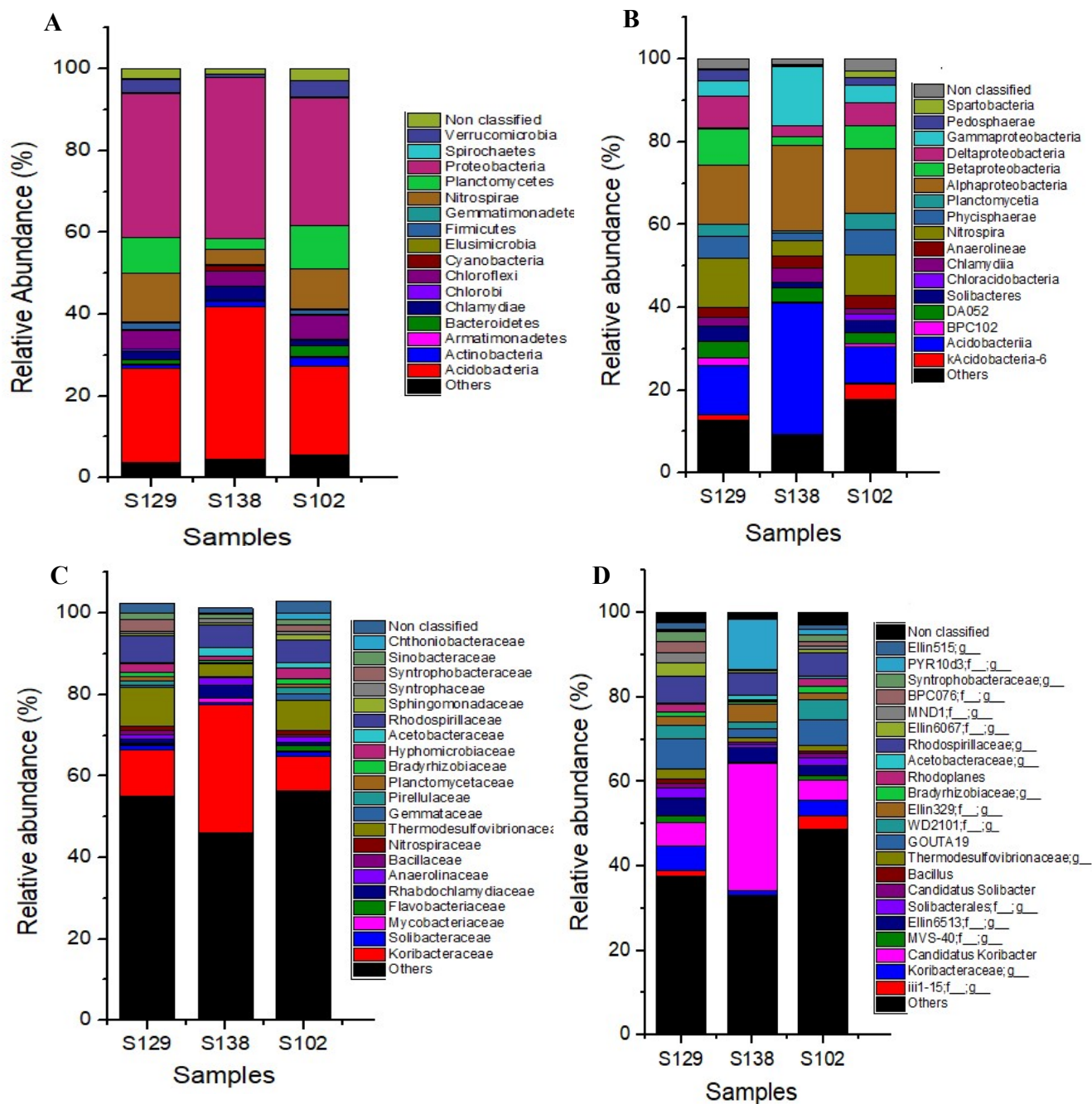


Figura 36: Abundância relativa de (A) Filos; (B) Classes, (C) Famílias e (D) Gêneros de bactérias nas três amostras de sedimento. Os táxons presentes em pelo menos uma amostra com abundância relativa maior que 1% foram considerados.

O gênero *Candidatus Koribacter*, assim como os demais membros da família Koribacter são encontrados, como já mencionado, em ambientes oligotróficos e ácidos, e no caso desse gênero preferencialmente em faixas de pH entre 4,0 a 6,5 (Ward et al., 2009). Ele é um gênero relativamente novo que pertence à primeira subdivisão do filo Acidobacteria e foi identificado em

2002 em amostras de solo de pastagens australianas (Sait et al., 2002). Ele já foi identificado especificamente como dominante em amostras de solos florestais (Kanokratana et al., 2011), no microbioma de solo rizosférico (Debenport et al., 2015), em biofilmes presentes nas tubulações de centrais de abastecimento (Allward et al., 2018) e em diferentes biomas brasileiros como floresta atlântica e caatinga (Pacchioni et al., 2014). Espécies desse gênero são aeróbias e descritas como importantes na fixação de N e C, redução de nitrato, na degradação de fontes de carbono com diferentes níveis de complexidade (Catão et al., 2014; Pacchioni et al., 2014) e na ciclagem de fósforo (Kanokratana et al., 2011), o que pode estar contribuindo para seu enriquecimento na amostra S138, que possui a maior concentração de fósforo (650 mg Kg^{-1}) (Tabela 12). O papel desse gênero na degradação de hidrocarbonetos ainda não é bem elucidado e nunca foi testado em laboratório mas alguns trabalhos mais recentes com técnicas independentes de cultivo têm demonstrado que ele não só tem sido encontrado em ambientes contaminados, incluindo sedimentos (Bouhajja et al., 2016; Mukherjee et al., 2017; Rama et al., 2018) como também parece estar associado com a biodegradação de hidrocarbonetos (Steiner et al., 2018).

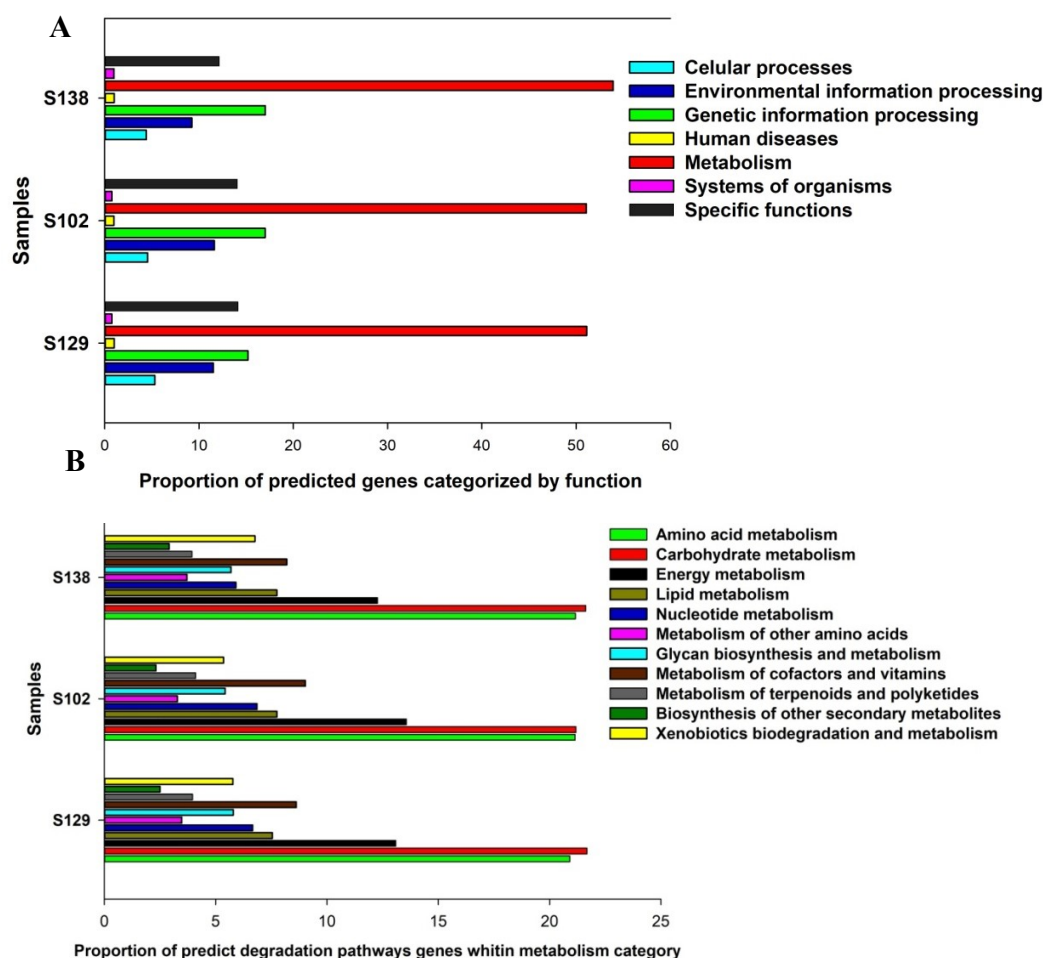
6.3.4) Predição de funções relacionadas à degradação de hidrocarbonetos aromáticos do metagenoma das amostras de sedimentos

Para entender o potencial metabólico da microbiota nas amostras contaminadas com HPAs e compará-las em relação à suas características funcionais, os seus metagenomas foram preditos usando a ferramenta Picrust. As proteínas preditas classificadas como Kegg Ortólogos (KOs) resultaram na identificação de mais de 6900 KOs. Um total de 296 das 328 vias presentes no terceiro nível de hierarquia do KEGG foram preditas no metagenoma das amostras de sedimento. Em relação às funções gerais, as vias relacionadas ao metabolismo foram bem mais predominantes em todas as amostras, que de modo geral apresentaram perfis também semelhantes em relação às demais funções (Figura 37A). As vias de degradação de xenobióticos representaram uma proporção um pouco maior na amostra S138, correspondente a 6,7%, seguido pela amostra S129 com 5,7% e 5,3% na amostra S102 (Figura 37B).

Do total de enzimas preditas nos metagenomas, 105 são relacionadas direta ou indiretamente à degradação de aromáticos. Em relação a esse grupo específico, pode-se observar que enzimas de vias aeróbias e anaeróbias relacionadas principalmente à degradação de aromáticos em geral, metabolismo de xenobióticos via citocromo p450, degradação de naftaleno, degradação de Nitrotolueno/etilbenzeno e de xileno foram enriquecidas e predominantes na

amostra altamente contaminada S138 em relação às demais (Figura 37C). Para as enzimas das demais vias de degradação de aromáticos, também houve aumento na amostra S138, porém de forma menos expressiva. As amostras S102 e S129 apresentaram perfis menos distintos entre si, mas ainda assim, a amostra S129 apresenta uma abundância maior de enzimas degradativas de aromáticos quando comparada com a amostra S102. Algumas das muitas enzimas de degradação de aromáticos enriquecidas nas amostras podem ser visualizados na Tabela 15 e incluem enzimas de vias aeróbias de degradação de catecol e protocatecoato (codificadas pelos genes *cat*, *lig* e *pca*) enzimas codificadas por genes da família *nah*, relacionadas à primeira etapa de degradação da maioria dos HPAs, além de enzimas de vias anaeróbias (codificadas pelos genes *fnr* e *ubiX*).

Os índices NSTI calculados para as amostras S102, S129 e S138 foram respectivamente 0,20, 0,19 e 0,13, com uma média de 0,17. Esse valor foi muito próximo do calculado para as amostras do aquífero e representa que a acurácia das predições dos metagenomas dessas amostras de sedimentos com o uso da ferramenta PICRUSt são adequadas, já que essas faixas de valores estão na faixa dos encontrados para amostras ambientais contaminadas ou não com hidrocarbonetos (Jeanbille et al., 2016; Roy et al., 2018; Langille et al., 2013)



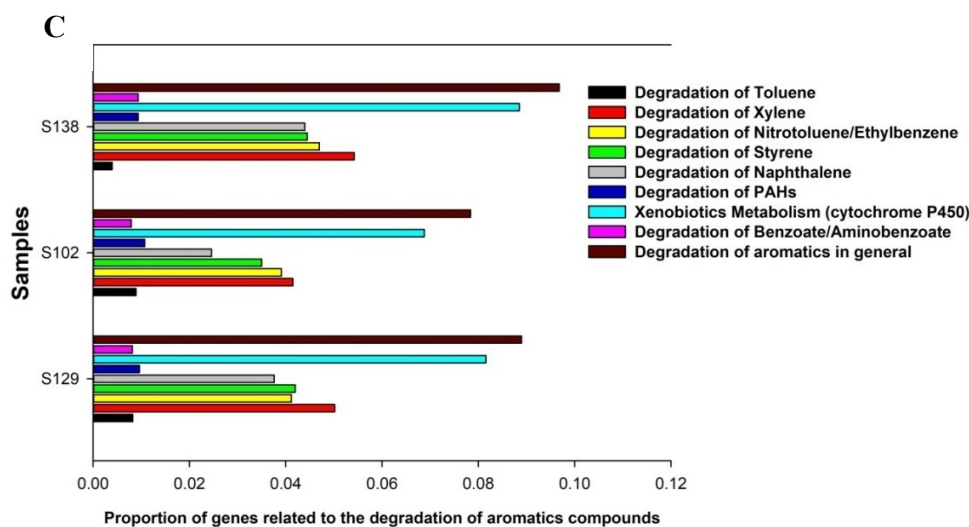


Figura 37: A) Proporção de vias metabólicas previstas nas amostras de sedimentos, categorizadas em grupos de acordo com suas funções; B) Proporção de vias de biodegradação xenobiótica e outras vias de degradação dentro da categoria de metabolismo nos poços; e C) Proporção de genes relacionados à degradação de compostos aromáticos nos poços.

O enriquecimento de algumas enzimas de vias de degradação de hidrocarbonetos na amostra S138 indica que o grupo de bactérias predominantes nessa amostra em comparação às demais, destacadamente as Acidobactérias, possa ser um grupo ativamente envolvido na degradação dos contaminantes. Ainda não se conhece e compreende bem o papel das acidobactérias na degradação de hidrocarbonetos (Abercron et al., 2016). Uma dessas limitações está relacionada à dificuldade de cultivo de bactérias desse grupo, como já mencionado, e o número pequeno de seus genomas sequenciados até o momento (Jones et al., 2009). Apesar disso, o levantamento de diversos trabalhos com o uso de técnicas independentes de cultivo tem demonstrado, assim como o nosso, evidências experimentais que corroboram com a hipótese de que esse seja um grupo de bactérias de extrema relevância na degradação de hidrocarbonetos, principalmente sob condições anaeróbias. Mas ainda há a necessidade de estudos mais aprofundados para confirmar com clareza e entender melhor esse processo (Abercron et al., 2016). No trabalho de Muangchinda e colaboradores (2015), por exemplo, vários genes das vias de degradação de HPAs (*nidA3*, *pyl46*, *pdoA*, *nidA* e *pdoA2*, *phnAc*, dentre outros) foram detectados em amostras de solo contaminadas, confirmando o potencial de degradação dos contaminantes pela microbiota autóctone das amostras que era dominada pelas acidobactérias. O mesmo ocorreu no trabalho de Kumar & Kanna (2009) que descreveram o predomínio das

acidobactérias na comunidade bacteriana de solos contaminados com creosoto ao longo do processo de degradação de naftaleno, fenantreno e pireno e confirmaram a presença de genes das subunidades α e β de dioxigenases. Adicionalmente, no trabalho de Bouhajja e colaboradores (2017), em clones obtidos a partir do DNA metagenômico de amostras de sedimentos contaminados com creosoto e com atividade positiva para a meta clivagem do catecol, intermediário da degradação de tolueno e outros aromáticos, a maioria dos genes identificados mostrou similaridade (30 a 90%) com táxons do filo Acidobacteria, incluindo o gênero *Candidatus Koribacter*, sugerindo a capacidade degradativa de aromáticos.

Dessa maneira, nosso trabalho também agrega informações relevantes e abre perspectivas para estudos futuros direcionados à melhor compreensão da degradação de HPAs pelas acidobactérias, além de reforçar a importância do uso de técnicas independentes de cultivo para acessar a real diversidade de ambientes contaminados. De modo geral, considerando todas as amostras de sedimentos avaliadas, assim como observado nas análises metataxonômicas e preditivas das amostras de aquífero realizadas no capítulo anterior, os resultados demonstram a presença de uma microbiota autóctone no sedimento que apresenta potencial para degradação dos contaminantes. Adicionalmente, novamente o aumento da concentração de HPAs alterou o padrão geral das comunidades bacterianas. Como consequência, ocorre o enriquecimento de alguns táxons e genes direta ou indiretamente envolvidos na degradação dos contaminantes, embora esse efeito tenha sido um pouco mais específico e discreto nas amostras de sedimento quando comparada com as amostras do aquífero. Esse padrão de táxons e vias/genes funcionais preditos e que estão relacionados à degradação de hidrocarbonetos são indicadores úteis do potencial e viabilidade do processo de biorremediação da área, já que a biorremediação de contaminantes complexos como o creosoto requer diferentes grupos, vias e enzimas.

Além de enzimas de vias de degradação de hidrocarbonetos, foram preditas outras enzimas relacionadas indiretamente com a degradação desses contaminantes como a produção de tensoativos. Foram preditas em abundância, também, enzimas e vias que favorecem a sobrevivência desses microrganismos no ambiente, relacionadas principalmente à mecanismos de resistência a metais pesados (sistema de efluxo de cátions, transporte de manganês, ferro e zinco e armazenamento de molibidênio), à antibióticos (MarR-proteínas reguladoras de resistência a múltiplos antibióticos, proteínas de resistência a meticilina, penicilina, eritromicina, dentre outras), à estressores ambientais diversos sejam eles oxidativos (família de proteínas OmpR) ou

condições extremas de pH (transportador MFS), temperatura (htpX-proteínas de choque térmico), oligotrofia (proteína BoIA) e salinidade (proteína StpA). Adicionalmente, proteínas relacionadas à formação de biofilmes (*wspR*, *wecC*, *flgM*), “quorum sensing” e mecanismos de quimiotaxia/comunicação celular em geral (*secA* e proteínas codificadas pelos genes *lux*.) e metabolismo aeróbio e principalmente anaeróbio de nutrientes como nitrogênio (fixação de nitrogênio-proteínas codificadas pelos genes *nif*, nitrificação-proteínas codificadas pelos genes *amoA* e desnitrificação-proteínas codificadas pelos genes *nar*, *norB*, *nirK*), fósforo (proteínas codificadas pelos genes *ppa* e *pho*) e sulfato (*cysP* e proteínas codificadas pelos genes *phs* e *arsC*). Foi possível prever uma proporção maior de enzimas relacionadas ao sistema de “quorum sensing”, formação de biofilme, redução de sulfato e metabolismo de nitrogênio na amostra S129, de enzimas relacionadas à resistência a metais e a antibióticos na amostra S102 e de enzimas relacionadas a resistências a estressores ambientais na amostra S138. Por fim, enzimas relacionadas à produção de tensoativos foram previstas em igual proporção nas amostras S102 e S138 e relacionadas ao metabolismo de fósforo em igual proporção em todas as amostras. Entretanto destaca-se que embora em diferentes proporções, de modo geral, enzimas relacionadas a essas funções foram previstas em abundância em todas as amostras. Essas e várias outras proteínas previstas nas diferentes categorias podem ser visualizados no Anexo 7 e reforçam não só a diversidade, mas também o potencial catabólico da microbiota da área como um todo.

Inclusive, um pré-teste realizado por uma empresa de consultoria ambiental que atua no monitoramento de parâmetros físico-químicos e implementação dos projetos de tratamento da área de estudo (Grupo EPA) confirmou, por meio de testes em campo realizados entre 2016 e 2017, o potencial catabólico da comunidade microbiana da área. No projeto foram injetadas na área 10 m³ de uma solução de micronutrientes e aceptores de elétrons, principalmente nitrato na concentração de 500 mg L⁻¹, para biostimular as bactérias. Posteriormente, ao longo de três meses foram avaliados os parâmetros SVOC, nitrogênio, fósforo e carbono orgânico total. De forma geral, os resultados do teste foram bastante positivos, sendo possível confirmar em alguns pontos de monitoramento reduções expressivas, acima de 50%, nas concentrações de SVOC principalmente durante os primeiros dois meses de monitoramento.

Tabela 15: Seleção e abundância relativa de algumas enzimas preditas envolvidas na degradação de compostos aromáticos que foram enriquecidos no metagenoma dos poços contaminados

Função	KO	Descrição KEGG [N° EC]	S129	S102	S138
Degradação de Tolueno	K03381	catA; catechol 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.1]	0.034791	0.031401	0.051671
Degradação de Xileno	K00055	aryl-alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.90]	0.017641	0.01949	0.019534
	K01821	praC, xylH; 4-oxalocrotonate tautomerase [EC:5.3.2.6]	0.036702	0.023497	0.039679
Degradação de Nitrotolueno/Etilbenzeno	K00632	fadA, fadI; acetyl-CoA acyltransferase [EC:2.3.1.16]	0.040892	0.038764	0.046516
Degradação de estireno	K00451	HGD, hmgA; homogentisate 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.5]	0.029646	0.021006	0.033208
	K01800	maiA, GSTZ1; maleylacetoacetate isomerase [EC:5.2.1.2]	0.00588	0.004873	0.00641
Degradação de Naftaleno	K04072	adhE; acetaldehyde dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.2.1.10 1.1.1.1]	0.027784	0.014401	0.033727
	K14583	nahC; 1,2-dihydroxynaphthalene dioxygenase [EC:1.13.11.56]	0.00392	0	0.010988
Degradação de HPAS	K00448	pcaG; protocatechuate 3,4-dioxygenase, alpha subunit [EC:1.13.11.3]	0.002328	0.001841	0.003022
	K04101	ligB; protocatechuate 4,5-dioxygenase, beta chain [EC:1.13.11.8]	0.011025	0.003248	0.008851
	K04102	pht5; 4,5-dihydroxyphthalate decarboxylase [EC:4.1.1.55]	0.058802	0.043312	0.02747
Metabolismo de Xenobióticos via Citocromo P450	K00121	frmA, ADH5, adhC; S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase / alcohol dehydrogenase [EC:1.1.1.284 1.1.1.1]	0.02379	0.025229	0.026371
	K01253	EPHX1; microsomal epoxide hydrolase [EC:3.3.2.9]	0.002524	0.002274	0.002625
	K04097	HPGDS; prostaglandin-H2 D-isomerase / glutathione transferase [EC:5.3.99.2 2.5.1.18]	0.009531	0.007038	0.008912
	K13953	adhP; alcohol dehydrogenase, propanol-preferring [EC:1.1.1.1]	0.045743	0.034216	0.050606
Degradação de Benzoato/Aminobenzoato	K03186	ubiX; flavin prenyltransferase [EC:2.5.1.129]	0.007105	0.002166	0.017092
	K01857	pcaB; 3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase [EC:5.5.1.2]	0.025236	0.020573	0.041205
Degradação de aromáticos em geral	K05708	hcaE, hcaA1; 3-phenylpropionate/trans-cinnamate dioxygenase subunit alpha [EC:1.14.12.19]	0.007105	0.00758	0.010378
	K01420	fnr; CRP/FNR CRP/FNR family transcriptional regulator, anaerobic regulatory protein	0.044591	0.047427	0.049079
	K01093	appA; 4-phytase / acid phosphatase [EC:3.1.3.26 3.1.3.2]	0.025211	0.012669	0.030827
	K00462	bphC; biphenyl-2,3-diol 1,2-dioxygenase [EC:1.13.11.39]	0.017886	0.014076	0.021671
	K00151	hpaE, hpcC; 5-carboxymethyl-2-hydroxymuconic-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.60]	0.01323	0.006497	0.017092

6.4) Quantificação da população de arqueas e bactérias nas amostras por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real

Para a quantificação absoluta do número de cópias do gene do rRNA 16S das bactérias e arqueas presentes nas amostras dos sedimentos, também foram realizados ensaios de PCR quantitativo em tempo real (qPCR), utilizando o sistema Syber Green.

Os ensaios de quantificação das amostras do sedimento foram realizados em conjunto com as amostras da fração líquida do aquífero, mencionado no capítulo anterior. Assim, os resultados referentes à construção da curva padrão e aos “slopes”, equações, coeficientes de determinação (r^2) e eficiência da reação já foram descritos na Tabela 10 e as curvas padrões, os gráficos de amplificação com os Cts das triplicatas e as curvas de melting podem ser visualizados na Figura 29.

Em relação à quantificação das amostras, também foi determinada para cada uma a diluição a ser utilizada e uma placa foi montada com as diluições selecionadas e o controle negativo em triplicata. Para as bactérias, os Cts das amostras praticamente não variaram e ficaram próximos de 17 (Anexo 8). Ao final, o log do número de cópias obtidos foram corrigidos em função dessas diluições, da quantidade das amostras que haviam sido utilizados para a extração de DNA e o volume final no qual o DNA foi ressuspendido. Além disso, a estimativa da quantificação absoluta do número de células de cada grupo por mL de amostra foi realizada considerando novamente o valor médio de quatro cópias do gene do rRNA 16S por célula de Bacteria e Archaea. Foram consideradas ND (não-detectável) todas as amostras em que o valor de Ct ficou acima do limite de detecção mesmo com a ampla variedade de concentrações testadas. Os valores dos números de cópias do gene rRNA 16s de bactérias e arqueas por grama das amostras dos sedimentos assim como o número de células estimados podem ser visualizados na tabela 16.

Tabela 16: Número de Cópias do gene rRNA 16S e de células bactérias e archaeas por grama das amostras de sedimentos, quantificados por meio de qPCR

Amostra	Número de Cópias		Número de Células	
	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea
S129	6.77E+10	ND	1.69E+10	-----
S102	9.36E+10	ND	2.34E+10	-----
S109	8.69E+10	ND	2.17E+10	-----
S144	7.79E+10	ND	1.95E+10	-----
S138	8.52E+10	ND	2.13E+10	-----

Os números de células de bactérias por grama das amostras ficaram muito próximos, todos na casa de 10^{10} , sugerindo ausência da influência dos parâmetros físico-químicos mensurados nesta variável. Isso ocorreu mesmo para a amostra S138, que pelas análises metataxonômicas havia demonstrando possuir uma menor riqueza de OTUs. Possivelmente a técnica foi menos sensível em detectar as diferenças nas densidades de bactérias das amostras em comparação com as análises metataxonômicas. Densidade altas de bactérias tem sido descritas em amostras de solo e sedimentos sob diferentes condições, incluindo aquelas com elevada concentração de contaminantes. No trabalho de Straub & Buchholz-Cleven, (2010), foi encontrada uma densidade média de 10^{10} células por grama de amostras de sedimentos coletados em uma área com longo histórico de contaminação por hidrocarbonetos.

Não foi possível detectar a presença de arqueas em nenhuma das amostras dos sedimentos, observando uma dominância total de bactérias nas mesmas. Padrão parecido com o sugerido nas análises metataxonômicas realizadas para três das amostras de sedimentos, qual seja, uma proporção bem mais baixa de arqueas, que correspondeu a apenas 0,1% dos reads identificados no metagenoma das amostras de sedimento. Apesar de arqueas serem microrganismos potencialmente encontrados em qualquer ambiente, outros trabalhos também não detectaram a presença de bactérias desse domínio em amostras de sedimentos. No trabalho de Hollister e colaboradores (2010), por exemplo, solos e sedimentos foram coletados em oito diferentes transectos, espaçados por 20 metros, de um lago com características hipersalinas localizados no sul do Estado do Texas e não foi detectada a presença de arqueas em praticamente todos os transectos avaliados.

6.5) Isolamento e identificação molecular de bactérias obtidas a partir das amostras de sedimentos

No trabalho de Alves (2016), realizado previamente no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA), as amostras de sedimento haviam sido submetidas a um processo de enriquecimento em meio mineral contendo creosoto ou fenol como única fonte de carbono, com o objetivo de isolar microrganismos potencialmente degradadores de creosoto. Foram isoladas 43 bactérias com características morfológicas visuais diferentes que foram posteriormente estocadas em meio Lignieri (inoculação por picada) a 4°C e a -80°C em criotubos contendo 20% de glicerol. Dessas, 31 foram identificadas ao menos no nível de gênero. Os 12 isolados restantes foram identificados nesse trabalho e ao total os isolados foram distribuídos em 10 gêneros diferentes: 9 isolados de *Pseudomonas* (20,94%), 9 de *Bacillus* (20,94%), 8 de *Enterobacter* (18,70%), 5 isolados de *Sphingobacterium* (11,62%), 4

de *Comamonas* (9,30%), 3 de *Acinetobacter* (6,98%), 2 de *Stenotrophomonas* (4,65%) e 1 representante dos gêneros *Psychrobacter* (2,32%), *Leucobacter* (2,32%) e *Enterococcus* (2,32%).

Tabela 17 - Identificação das bactérias isoladas a partir das amostras de sedimentos por meio da técnica de enriquecimento

Numeração	Código	Identificação	QC	Identidade (%)
1	1FM1	<i>Pseudomonas sp</i>	100%	99%
2	1FM2	<i>Sphingobacterium sp</i>	100%	98%
3	1FM4	<i>Stenotrophomonas sp</i>	100%	100%
4	1FM5	<i>Psychrobacter faecalis</i>	100%	99%
5	1FM6	<i>Pseudomonas sp.</i>	100%	99%
6	1FM7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	100%
7	1FM9	<i>Bacillus sp.</i>	100%	100%
8	1FM10	<i>Sphingobacterium sp</i>	98%	100%
9	1FM11	<i>Pseudomonas monteilii</i>	100%	100%
10	1FM12	<i>Enterococcus sp</i>	97%	100%
11	1FM14	<i>Bacillus sp</i>	100%	100%
12	2FM1	<i>Sphingobacterium sp.</i>	100%	99%
13	2FM2	<i>Bacillus sp</i>	99%	100%
14	2FM3	<i>Sphingobacterium sp</i>	99%	100%
15	2FM4	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	100%	99%
16	2FM6	<i>Bacillus sp</i>	100%	100%
17	2FM7	<i>Bacillus sp</i>	100%	100%
18	3FM1	<i>Enterobacter sp.</i>	100%	99%
19	3FM2	<i>Enterobacter sp</i>	99%	100%
20	3FM3	<i>Bacillus sp</i>	100%	100%
21	3FM4	<i>Comamonas sp</i>	100%	100%
22	3FM5	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	100%	100%
23	3FM6	<i>Comamonas terrigena</i>	100%	100%
24	3FM7	<i>Bacillus sp.</i>	100%	99%
25	3FM8	<i>Comamonas terrigena</i>	100%	99%
26	3FM9	<i>Comamonas terrigena</i>	100%	100%
27	3FM10	<i>Bacillus sp</i>	99%	100%
28	3FM11	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	99%	100%
29	4FM1	<i>Enterobacter sp.-</i>	100%	99%
30	4FM2	<i>Enterobacter sp</i>	99%	100%
31	4FM3	<i>Acinetobacter tandoii</i>	100%	99%
32	4FM4	<i>Enterobacter sp.</i>	100%	99%
33	5FM1	<i>Enterobacter sp.</i>	100%	99%
34	5FM2	<i>Comamonas terrigena</i>	100%	99%
35	5FM3	<i>Bacillus sp</i>	99%	100%
36	CVM1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100%	99%
37	3C10M1	<i>Pseudomonas monteilii</i>	100%	99%
38	3C10M2	<i>Enterobacter sp</i>	99%	100%

39	3C10M3	<i>Pseudomonas sp</i>	99%	100%
40	4C10M1	<i>Pseudomonas mosselii</i>	99%	100%
41	4C10M2	<i>Leucobacter sp</i>	99%	100%
42	4C10M3	<i>Pseudomonas mosselii</i>	99%	100%
43	5C10M1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	99%	100%

Os códigos utilizados para os isolados foram construídos da seguinte forma: o primeiro número é referente ao ponto de coleta, sendo 1 (S102), 2 (S109), 3 (S129), 4 (S138), 5 (S144) e CV (amostra aquosa com creosoto), seguido do tratamento utilizado no enriquecimento, onde F (fenol) e C10 (creosoto 10%), seguido do meio em que as bactérias foram isoladas (mineral) e por fim o último número é referente ao número do morfotipo.

Todos esses gêneros foram encontrados no metagenoma das amostras do sedimento a partir das análises metataxonômicas descritas no capítulo anterior, mas apenas o gênero *Bacillus* foi considerado como um dos gêneros dominantes, com abundância relativa acima de 1% (Figura 33D). A maioria deles, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Comamonas*, *Sphingobacterium*, *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas* já foram isolados de vários ambientes contaminados com hidrocarbonetos como solo, lodo, sedimentos, água do mar, efluentes de refinarias e ainda de reservatórios de combustíveis (Sanchez et al., 2001; Zhang et al., 2005; Das et al., 2007). Para alguns desses gêneros análises moleculares já evidenciaram também a presença de genes que codificam enzimas envolvidas direta ou indiretamente na degradação desses contaminantes.

O gênero *Pseudomonas* tem sido amplamente isolado de diversos ambientes contaminados com diferentes HPAs, tais como naftaleno, fenantreno, fenilbenzeno (Daane et al., 2001), além de antraceno, pireno, fenol e também creosoto (Atagana et al., 2002). Também, no gênero já foram descritos uma série de genes relacionados à degradação de HPAs, incluindo genes que codificam a enzima naftaleno dioxigenas como *nah* (Menn et al., 1993; Balashova et al., 2001; Li et al., 2004; Ono et al., 2007) *ndo* (Denome et al., 1993b), *dox* e *pah* (Takizawa et al., 1994; Takizawa et al., 1999).

Muitas espécies de *Bacillus* têm a propriedade de colonizar áreas poluídas, sendo muitas vezes os grupos dominantes em ambientes altamente contaminados com hidrocarbonetos (Gaylard et al., 1999; Ijah & Antai, 2003; Calvo et al., 2004; Nkwelang et al., 2008; Kotska et al., 2011; Gudina et al., 2012). Dentre esses ambientes destaca-se sua predominância em solos contaminados com HPAs (Aitken et al., 1998). No genoma de bactérias do gênero *Bacillus* genes que codificam enzimas naftaleno dioxigenases (*nahAc*) (Jurelevicius et al., 2012), genes que codificam a subunidade alfa de enzimas dioxigenases de anéis aromáticos (RHD α) (Chikere & Fenibo, 2018) e das vias de produção da surfactina

(*sfp*), um dos tensoativos lipopeptídeos mais bem conhecidos já foram identificados (Nakamo et al., 1992).

Além do gênero *Sphingobacterium*, bactérias de outros gêneros pertencentes à família Sphingobacteriaceae, incluindo o gênero *Nubsella*, são comumente encontradas no meio ambiente, principalmente em solos (Mao et al., 2012) e água (Asker et al., 2008; Boone & Castenholz, 2001) contaminados com hidrocarbonetos aromáticos. Em isolados desse gênero além de *phnAc* genes, que codificam a enzima fenantreno 3,4-dioxigenase, já foi identificado também a presença dos genes *nag*, envolvidos em uma via alternativa de degradação de naftaleno, avia salicilato/gentisato (Izmalkova et al., 2017).

O gênero *Comamonas* já foi isolado de ambiente contaminado com HPAS e caracterizado como degradador desses hidrocarbonetos por diversos autores (Goyal & Zylstra, 1996; Shi et al., 2013). Algumas bactérias desse gênero também são bem caracterizadas quanto a presença de genes *phd*, que estão relacionados com a síntese de oxigenases responsáveis pela etapa inicial de degradação de HPAs, mas que são evolutivamente diferentes dos genes *nah* (Goyal & Zylstra, 1997).

Bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* e *Enterobacter* já foram isoladas de ambientes contaminados com hidrocarbonetos incluindo solo, lodo, sedimentos e água do mar após as amostras serem submetidas à enriquecimento em meio mineral suplementado com os contaminantes (Sánchez et al., 2001; Zocca et al., 2004; Zhang et al., 2005; Das et al., 2007; Gallego et al., 2007; Rodrigues et al., 2009; Chopade et al., 2010a; Madamwar et al., 2012). Em bactérias do gênero *Acinetobacter* já foram identificados a presença de genes que codificam a enzima catecol 2,3-dioxigenase (*atdB*) (Takeo et al., 2008) e genes de degradação de alcanos (*alk*) (Gralton et al., 1997), inclusive um sistema incomum de degradação de alcanos de cadeia longa a partir de uma enzima monoxigenase ligada a flavina (Throne-Holst et al., 2006), e em bactérias do gênero *Stenotrophomonas* a presença de genes que codificam catecol 1,2 e 2,3-dioxigenase, além de protocatecoato 4,5-dioxigenase (Urszula et al., 2009). Para o gênero *Enterobacter* a presença dos genes que codificam a naftaleno dioxigenase, além de catecol 1-2 e 2-3 dioxigenases já foi confirmada (Hesham et al., 2014).

Por outro lado os gêneros *Leucobacter*, *Psychrobacter* e *Enterococcus* não são tipicamente encontrados em ambientes contaminados e nem caracterizados quanto à capacidade de degradação de hidrocarbonetos. *Leucobacter* é um gênero que possui representantes isolados de diferentes matrizes ambientais como solo (Lin et al., 2004), ar (Martin et al., 2010), ambientes marinhos (Han et al., 2003) e efluentes de águas residuárias

(Moraes et al., 2006). Espécies do gênero *Psychrobacter* geralmente são encontradas em águas profundas (Maruyama et al., 2000), habitats gelados como por exemplo em amostras de gelo da Antártica (Browman et al., 1997; Kim et al., 2012) e ainda numa ampla variedade de produtos alimentícios, incluindo frutos do mar (Broekaert et al., 2013; Noor et al., 2013) e queijos (Coton et al., 2012). Já bactérias do gênero *Enterococcus* são mais frequentes em ambientes aquáticos (Ferguson et al., 2005; Moorre et al., 2008; Badgley et al., 2010), sendo considerados, inclusive, como organismos indicadores de qualidade bacteriológica da água já que sua presença indica poluição fecal de origem humana ou animal (Harwood et al., 2004). Contudo, mesmo para esses gêneros há alguns poucos relatos de sua relação direta ou indireta com a degradação de hidrocarbonetos. Bactérias do gênero *Leucobacter* já foram isoladas a partir de reservatórios de combustíveis, os quais possuem em sua composição basicamente HPAs (Rauch et al., 2006; Saimai et al., 2012). O mesmo ocorre com bactérias do gênero *Enterococcus*, pois linhagens de *E. faecium* já foram isoladas de solo contaminado com creosol, que é encontrado no creosoto (Mueller et al., 1997). Por fim, bactérias do gênero *Psychrobacter* já foram descritas como capazes de degradar hidrocarbonetos de petróleo (Deep et al., 2005).

6.6) Avaliação do crescimento e capacidade de degradação de creosoto pelos isolados

As 43 bactérias isoladas a partir das amostras de sedimentos da lagoa além de 8 bactérias pertencentes ao estoque de microrganismos do LMA com capacidade de degradação de diferentes hidrocarbonetos, foram avaliadas quanto à capacidade de degradação do creosoto extraído das áreas contaminadas em estudo. Essas bactérias também já haviam sido previamente identificadas como *A. junii* LAPM41, *B. subtilis* LAPER93, *B. subtilis* LAPER90, *E. asburiae* LAPER64, *Stenotrophomonas sp.* LAPM27, *Alcaligenes sp.* LAPER94, *A. junii* LAPM30 e *Bacillus sp.* LAPM39.

Os isolados testados diferiram estatisticamente quanto à degradação total do creosoto, utilizando o teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$) e puderam ser agrupados em 3 grupos estatisticamente distintos (Anexo 9). As maiores taxas de degradação foram obtidas para 27 isolados agrupados no grupo 2, todas acima de 29%, sendo que o maior valor de degradação obtido foi de 53%. Dentre os dois outros grupos formados, um é composto por 18 isolados cujas taxas de degradação variaram de 15% a 28% (grupo 3) e o outro por 7 isolados cujas taxas de degradação não diferiram estatisticamente do controle não inoculado (grupo 1). Dentre os isolados que mais degradaram o composto, agrupados no grupo 2, destaca-se *C. terrigena* 3FM6 que apresentou a maior taxa de degradação (acima de 50%). Os isolados

1FM1 e 3C10M3 de *Pseudomonas* sp., 3FM2, 3FM8 de *C. terrigena*, 3FM9, LAPM39, 1FM14 e 2FM2 de *Bacillus* sp., *Sphingobacterium* sp. 1FM2 e 5FM2., *P. plecoglossicida* 3FM5, *Enterobacter* sp. 4FM2, *Enterococcus* sp. 1FM12, *A. junii* LAPM30, LAPM27 e 1FM4 de *Stenotrophomonas* sp. também se destacaram por proporcionarem taxas de degradação do creosoto acima de 40% (Figura 38).

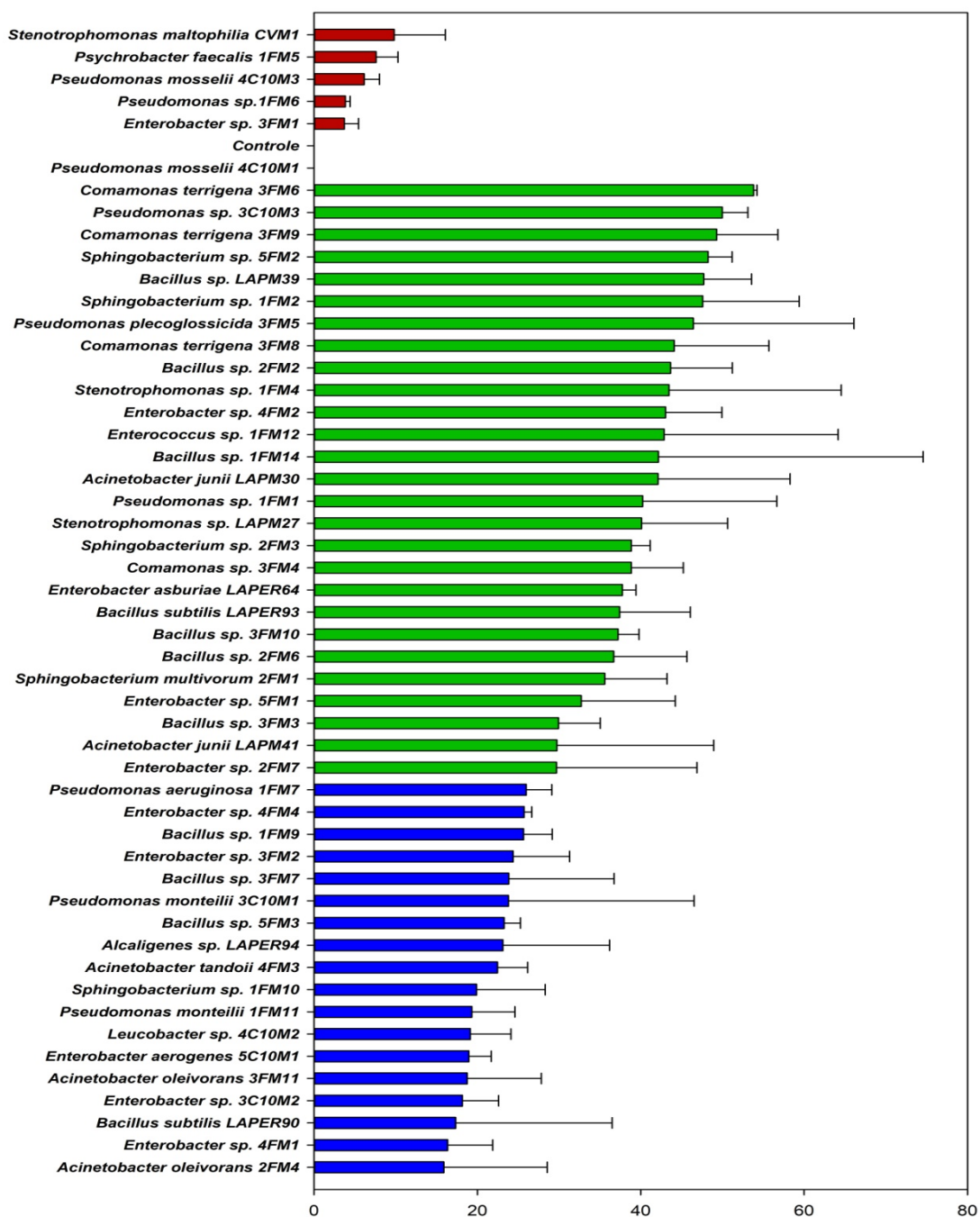


Figura 38: Valores médios de degradação do creosoto suplementado em meio mineral a 0,25% (v/v), obtidos pelos isolados avaliados e agrupados em grupos estatisticamente distintos utilizando o teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$). Grupo 1 (vermelho), Grupo 2 (verde), Grupo 3 (azul)

Muitos trabalhos relatam a degradação de vários HPAS em misturas por isolados bacterianos, com valores, inclusive, bem superiores a 40% (Samanta *et al.*, 2002; Bouchez *et al.*, 1995). Entretanto, há um número menor de estudos que avaliam a degradação do creosoto como um todo, considerando todos os seus componentes. No trabalho de Atagana e colaboradores (2003), em um solo contaminado com creosoto em concentração acima de 250000 mg Kg⁻¹, esse contaminante foi degradado em percentuais superiores a 68%, mas o processo de degradação foi realizado por um consórcio de isolados, que foi bioestimulado por meio da adição de nutrientes e otimização da relação C:N. Outro ponto que merece destaque, apresentado no trabalho de Macnally e colaboradores (1999), é o fato de que a presença de alguns HPAs é capaz de inibir a degradação de outros. Em ensaios de degradação de uma mistura de vários HPAs por culturas puras de *Pseudomonas putida strain KBM-1*, a presença do fenantreno inibiu totalmente a degradação de pireno. Na ausência do fenantreno, o pireno foi degradado em percentuais acima de 70%. Assim, percentuais altos de degradação de vários componentes do creosoto por um único isolado, como observado no nosso estudo, são relevantes e merecem destaque.

Todos os gêneros capazes de degradar o creosoto em percentuais acima de 40% já foram relatados em diferentes trabalhos quanto à sua capacidade de degradar HPAs, principalmente o gênero *Pseudomonas*. No trabalho de Lors e colaboradores (2010), por exemplo, foi estudada a biorremediação de solo contaminado com HPAS contendo predominantemente 2, 3 e 4 anéis aromáticos por um período de 6 meses. Os autores observaram a presença de diversas bactérias gram-negativo durante todo o tratamento, principalmente dos gêneros *Enterobacter sp.* e *Pseudomonas sp.*, acompanhado por alta redução dos HPAs, acima de 80%. Isolados de *Stenotrophomonas* degradadores de vários HPAs em altas taxas tem sido descritos (Molina *et al.*, 2009). Por exemplo, Juhasz e colaboradores (2000) observaram altas taxas de redução de fluoreno (90%), fenantreno (91%), pireno e fluoranteno (74%) em um período de 42 dias por um isolado de *S. maltophilia* isolado de solo contaminado com óleo. O gênero *Bacillus* também tem sido apontado como eficiente degradador de uma ampla gama de HPAs, incluindo àqueles com alto número de anéis aromáticos, como pireno e benzopireno. No trabalho de Hunter e colaboradores (2005), um isolado da espécie *Bacillus subtilis* foi capaz de degradar mais de 40% tanto de pireno quanto benzopireno, adicionados em meio mineral na concentração de 20µg ml⁻¹, após quatro dias de incubação. *Acinetobacter* também tem sido citada como degradador eficiente de uma ampla variedade de hidrocarbonetos, com destaque para os aromáticos (Yuste *et al.* 2000;

Hassanshahian et al., 2012). Isolados do gênero também já foram utilizados com sucesso em consórcio com isolados dos gêneros *Pseudomonas* e *Flavobacterium* na remediação de creosoto e pentaclorofenol, compostos de alta recalcitrância e toxicidade (Portier et al., 1996). No estudo, foi avaliada a eficácia de combinação da degradação biológica com métodos de extração física e química no tratamento de madeiras contaminadas com creosoto. Assim, madeiras tratadas por métodos físico-químicos receberam semanalmente doses do inoculante, bem como dos nutrientes nitrogênio, fósforo e potássio, por até 28 dias. Ao fim do processo foi observada redução de 91% nos níveis dos principais componentes do creosoto remanescente, de 95ppm (partes por milhão) para 8ppm (Portier et al., 1996).

Na amostra de creosoto fornecido pela ETD, foram selecionados os 12 compostos presentes em maiores concentrações: fluoreno, fluoranteno, pireno, acenafteno, dibenzofurano, dibenzotiofeno, antraceno, benz[a]antraceno, trifenileno fenantreno, 4H-Ciclopenta[def]fenantreno e 2-metiltetracosano, sendo que esse último era o único hidrocarboneto que não correspondia a um HPA, mas sim a um hidrocarboneto de cadeia alifática. Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de degradação desses 12 compostos em conjunto e de cada um deles individualmente.

Os isolados testados diferiram estatisticamente quanto à degradação conjunta dos 12 principais hidrocarbonetos presentes na nossa amostra de creosoto, utilizando o teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$) (Anexo 10) e puderam ser agrupados em 4 grupos estatisticamente distintos. As maiores taxas de degradação foram obtidas para 8 isolados agrupados no grupo 2, todas acima de 40% e chegando ao valor máximo de 45.9%. O Grupo 3 foi formado por 12 isolados com taxas de degradação variando de 25 a 37%, o grupo 4 por 15 isolados com taxas de degradação variando de 23 a 15% e o grupo 1 por 16 isolados que não degradaram o creosoto por não diferirem estatisticamente do controle não inoculado (Figura 39). Os isolados do grupo 2 pertencem a espécie *Comamonas terrigena* (3FM8, 3FM6 e 3FM9), *Acinetobacter junii* (LAPM30), *Pseudomonas plecoglossicida* (3FM5) e *Bacillus subtilis* (LAPER93) e aos gêneros *Bacillus* (LAPM39) e *Pseudomonas sp.* (3C10M3) (Figura 39).

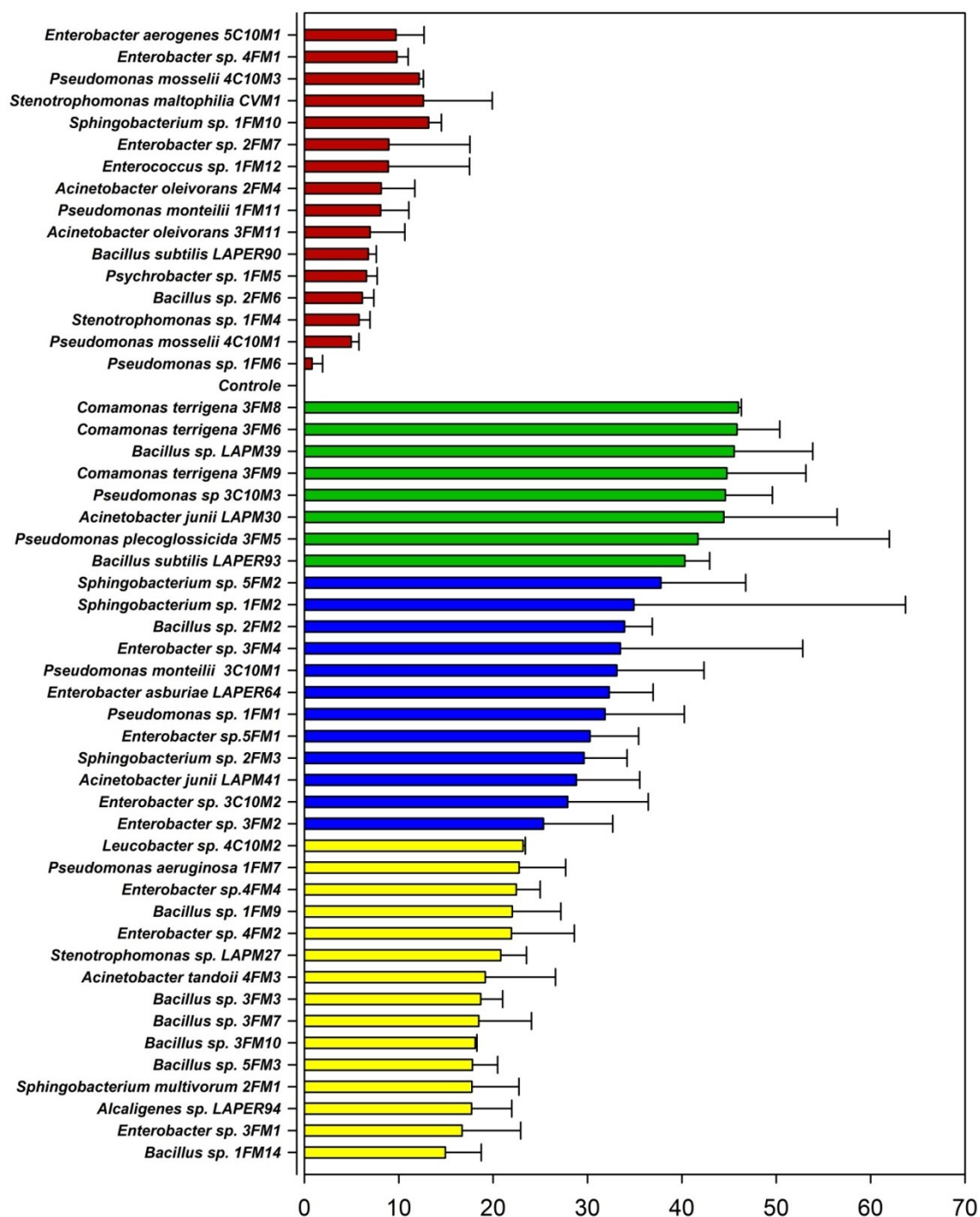


Figura 39: Valores médios de degradação conjunta dos 12 principais hidrocarbonetos presentes na nossa amostra de creosoto, agrupados em grupos estatisticamente distintos utilizando o teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$). Grupo 1 (vermelho), Grupo 2 (verde), Grupo 3 (azul) e Grupo 4 (amarelo).

De modo geral, observa-se que praticamente todos os isolados capazes de degradar os 12 hidrocarbonetos selecionados também estão no grupo dos melhores degradadores do creosoto como um todo, o que já era esperado, devido à representatividade desses 12

hidrocarbonetos em nossa amostra. A única exceção é o isolado *Bacillus subtilis* LAPER93, que está entre os melhores degradadores dos 12 compostos, mas apesar de também estar no grupo dos melhores degradadores do creosoto não se destacou tanto quanto outros, apresentando uma degradação média de 37% do mesmo.

Os isolados foram também caracterizados quanto ao potencial de degradação individual dos 12 hidrocarbonetos selecionados e o perfil completo de degradação dos mesmos por cada isolado pode ser visualizado no Anexo 11. Houve variação estatística da porcentagem de degradação dos compostos avaliados tanto em função do isolado quanto do composto em estudo e os mesmos foram agrupados em 4 grupos estatisticamente distintos, utilizando o teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$) (Anexo 12). De modo geral, os compostos 2-metiltetracosano e o fluoreno apresentaram, respectivamente, os maiores valores médios de degradação e ficaram cada um em grupos a parte. Em seguida, os compostos Fluoranteno, Pireno, Acenafteno, Dibenzofurano, Dibenzotiofeno, Antraceno, Benz[a]antraceno e Trifenileno não apresentaram diferença estatística entre os valores médios de degradação, se agrupando em um terceiro grupo e os compostos Fenantreno e 4H-Ciclopenta[def]fenantreno foram os menos degradados e ficaram agrupados no quarto grupo (Anexo 12).

Dentre os compostos em estudo, 2-metiltetracosano foi degradado por um maior número de bactérias (49) e a porcentagem média de degradação desse composto foi de 53,1%, mas 21 isolados foram capazes de proporcionar reduções do mesmo acima de 80% e o valor máximo de degradação de 95% foi obtida pelo isolado *E. asburiae* LAPER64 (Figura 40). O fluoreno foi degradado por um total 48 isolados e a degradação média do mesmo foi de 30,6%, mas 9 isolados foram capazes de degradá-lo em percentuais acima de 50% e o valor máximo de degradação de 78% foi obtido para o isolado *C. terrigena* 3FM6 (Figura 40). As proporções médias de degradação dos compostos Fluoranteno, Pireno, Acenafteno, Dibenzofurano, Dibenzotiofeno, Antraceno, Benz[a]antraceno e Trifenileno variaram de 16 a 20% e eles foram degradados respectivamente por 39, 44, 40, 40, 42, 41, 45 e 43 isolados (Figura 40). Já os compostos Fenantreno e 4H-Ciclopenta[def]fenantreno tiveram taxas médias de degradação de 15,1% e 14,8% e foram degradados respectivamente por 43 e 34 isolados (Figura 40).

O número de isolados de cada gênero que foram capazes de degradar cada um dos 12 hidrocarbonetos pode ser visualizado na figura 41. Os gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* se destacaram por terem as maiores quantidades de isolados que degradaram todos os compostos. O gênero *Bacillus* apresentou o maior número de isolados degradadores de Fluoreno (11), Dibenzotiofeno (11), Antraceno (11) e Fenantreno (11). Em comparação

com o gênero *Bacillus*, o gênero *Enterobacter* apresentou igual número de isolados degradadores de Fluoranteno, Pireno, Benz[a]antraceno, trifenileno, 2-metil-tetracosano e 4H-Ciclopenta[def]fenantreno (9, 11, 10, 10, 11 e 8 respectivamente) e um número maior de isolados degradadores de Acenafteno (11) e Dibenzofurano (11). O gênero *Pseudomonas* apresentou um menor número de isolados para quase todos os compostos, em comparação com os gêneros *Enterobacter* e *Bacillus*, tendo 8 isolados degradadores de 2-metil-tetracosano, 7 isolados degradadores de Fluoreno, Dibenzotiofeno, Benz[a] antraceno e Trifenileno, 6 isolados degradadores de Fluoranteno, Pireno, Dibenzofurano e Antraceno e 5 isolados degradadores de Acenafteno e 4H-Ciclopenta[def]fenantreno.

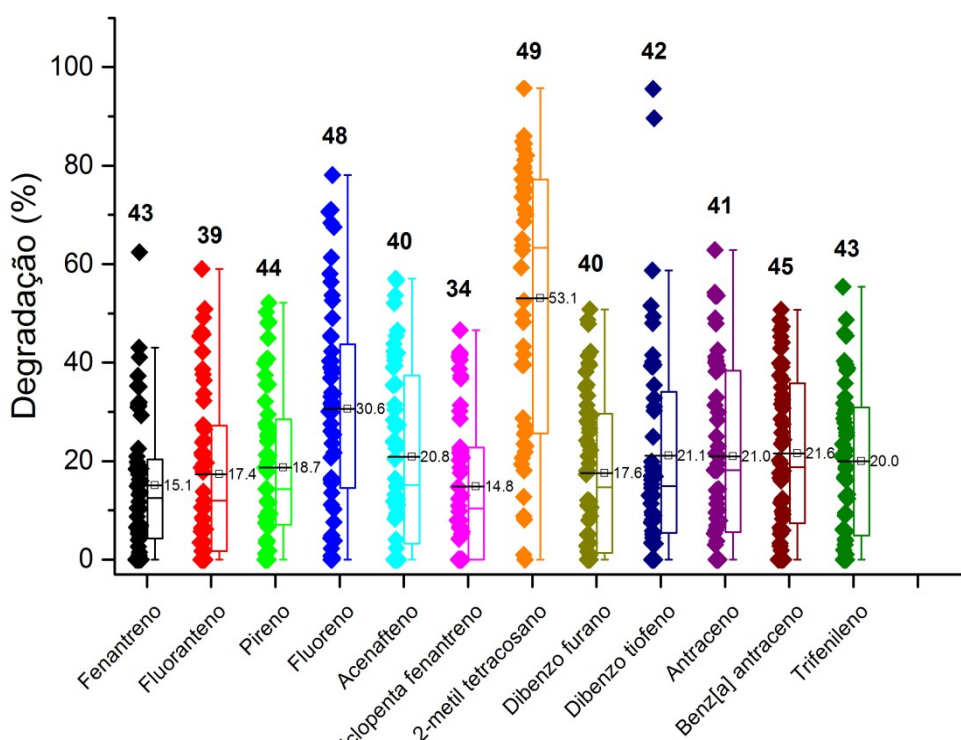


Figura 40 – Porcentagem média de degradação dos 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto, independente do isolado, e o número de isolados que conseguiram degradar o composto

Chamamos atenção para 4 isolados pelas altas taxas de remoção de HPAs específicos, incluindo *C. terrigena* 3FM9, que degradou 62% do fenantreno, 50% do pireno, 89% do dibenzotiofeno e 54% do antraceno; *C. terrigena* 3FM8 que degradou 50% do fluoranteno e 95% do dibenzotiofeno; *Pseudomonas* sp 3C10M3 que degradou 57% do acenafteno e 50% do Benz[a]antraceno; e *A. junii* LAPM30 que degradou 52% do acenafteno e 50% do dibenzofurano. Esses resultados são muito interessantes, porque alguns desses hidrocarbonetos, como o pireno, fluoranteno e benzoantraceno possuem um número elevado

de anéis aromáticos, que os tornam mais recalcitrantes à ação microbiana. Além disso, o ensaio de prospecção foi realizado em uma única condição e mais testes podem ser realizados de forma a otimizar mais ainda essa degradação.

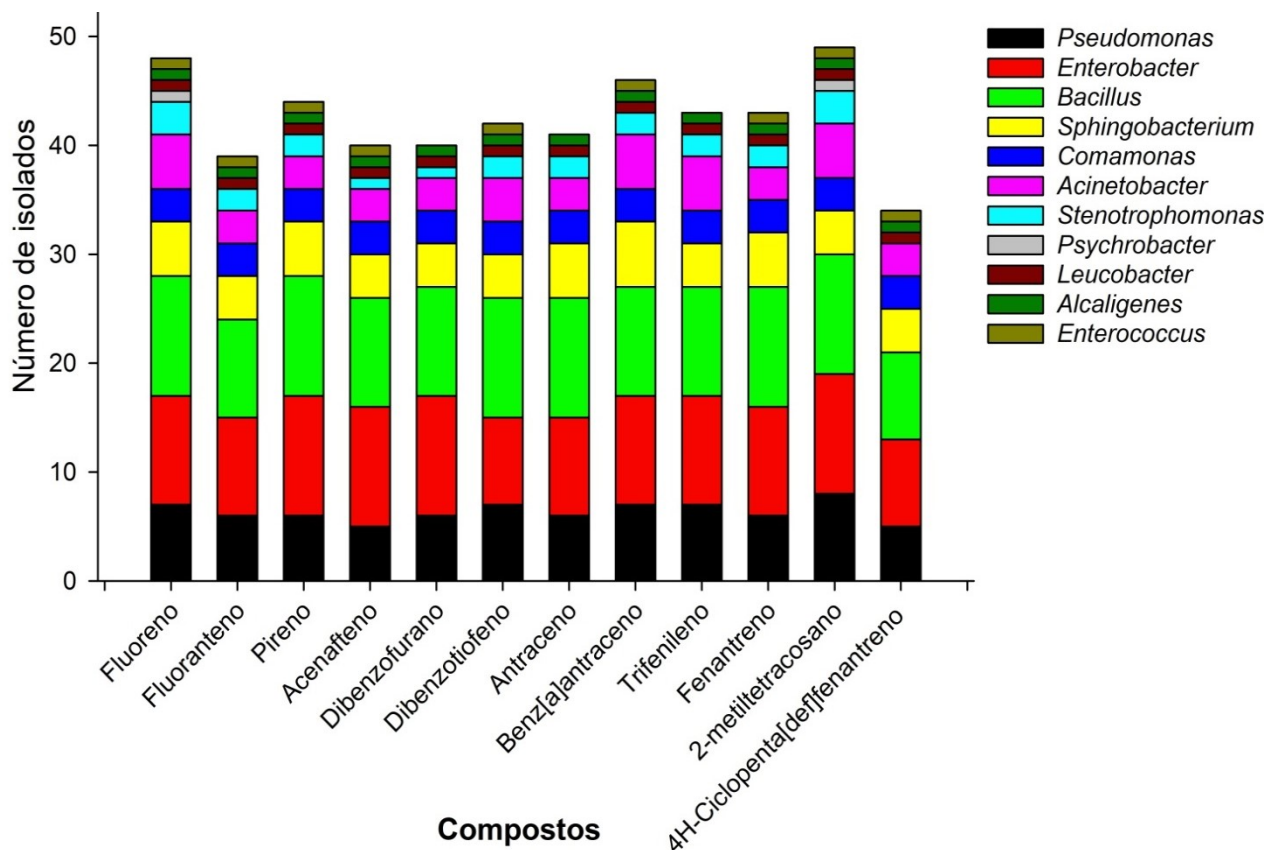


Figura 41 – Quantidade de isolados de cada gênero que degradaram cada um dos 12 presentes em maior concentração no creosoto analisados.

Foi realizada uma caracterização do padrão geral de degradação dos 12 compostos pelos isolados também por uma ACP (Figura 42). A CP1 explica 66,7% da variância total dos dados e a CP2 explica 10%, totalizando 76,7% da variação total. No Anexo 13 a contribuição e correlação de cada um dos isolados para as componentes 1 e 2 (CP loadings) pode ser visualizada. Os principais isolados dentre os que contribuíram para a CP1 foram *E. aerogenes* 5C10M1, *Enterobacter sp.* 4FM1, *Bacillus sp.* 1FM14, *E. asburiae* LAPER64, *P. mosselii* 4C10M3, *A. oleivorans* 2FM4 e *Bacillus sp.* 3FM7. Já os isolados que mais contribuíram para a CP2 foram *Shingobacterium sp.* 1FM10, *Stenotrophomonas sp.* LAPM27, *C. terrigena* 3FM9, *P. plecoglossicida* 3FM5, *Enterobacter sp.* 3FM2 e *C. terrigena* 3FM6.

Pode-se observar que o composto 2-metiltetracosano ficou bem afastado dos demais compostos em relação à CP1. Isso ocorreu porque os isolados que mais contribuíram para a CP1 são aqueles que apresentaram as maiores taxas de degradação desse composto, acima de

78%. O Fluoreno foi o único composto, além do 2-metiltetracosano, que também ficou posicionado na parte positiva do eixo X, porque, de modo geral, correspondeu ao segundo composto mais degradado pelos isolados que mais contribuíram para a CP1 (Figura 42, Anexo 13).

Adicionalmente, o fluoreno foi o composto mais degradado (53%) pelo isolado que mais contribuiu para a CP2 (*Sphingobacterium sp.* 1FM10) e por isso ficou na posição mais positiva do gráfico em relação à essa componente, enquanto o composto 4H-Ciclopenta[def]fenantreno apresentou baixas taxas de degradação pela maioria dos isolados que mais contribuíram para a CP2, se posicionando na porção mais negativa do gráfico em relação à essa componente (Figura 42, Anexo 13).

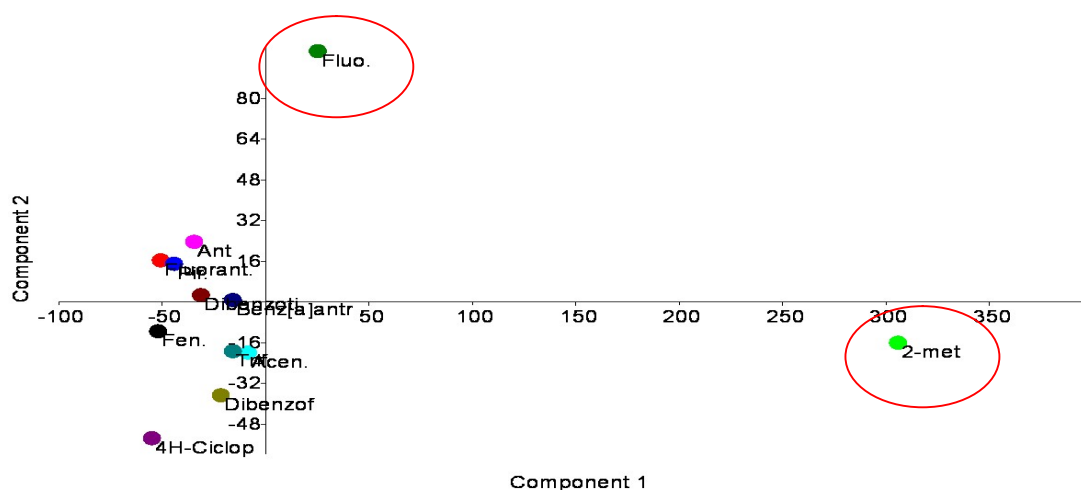
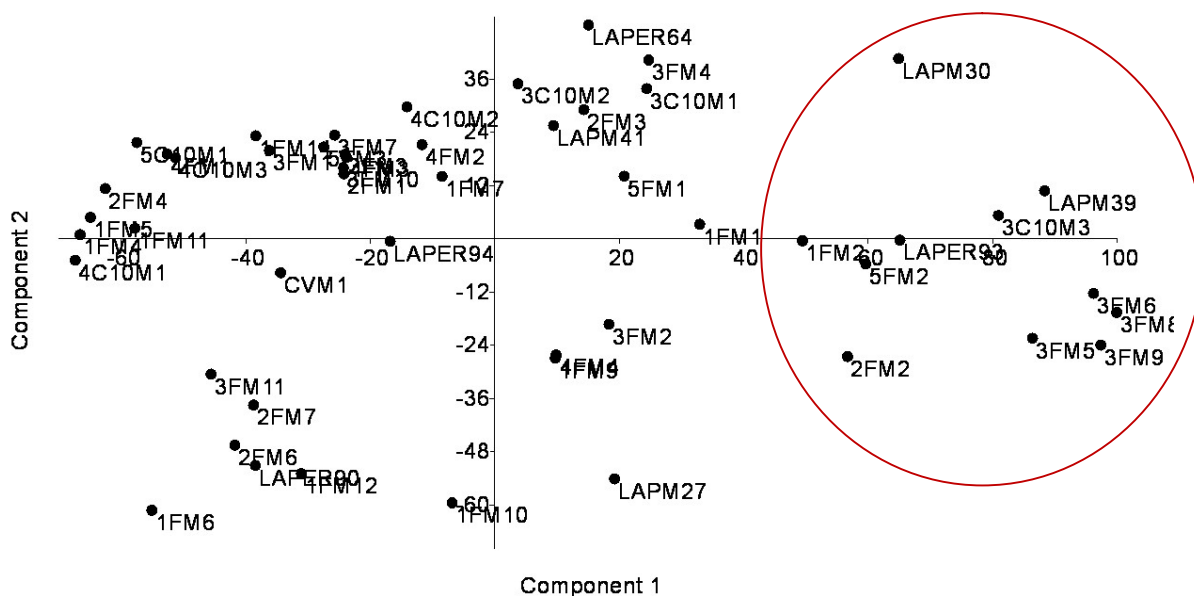


Figura 42 – Perfil de degradação dos 12 principais compostos presentes no creosoto por todos os isolados, obtido por ACP

De modo geral, todos os isolados foram capazes de degradar em alguma extensão pelo menos 1 constituinte do creosoto e 27 foram capazes de degradar em alguma extensão os 12 constituintes do creosoto, sendo identificado como *Enterobacter sp.* (5FM1, 4FM4, 3C10M2, 3FM2, 3FM4, 4FM2); *E. arburiae* LAPER64; *C. terrigena* (3FM8, 3FM6, 3FM9); *A. junni* LAPM30; *Alcaligenes sp.* LAPER94; *Bacillus sp.* (1FM9, LAPM39, 2FM2, 3FM3, 3FM10), *B. subtilis* LAPER93; *Leucobacter sp.* 4C10M2, *Pseudomonas sp.* (1FM1, 3C10M3); *P. aeruginosa* 1FM7, *P. montelli* 3C10M1, *P. plecoglossicida* 3FM5, *Sphingobacterium sp.* (2FM3 e 5FM2) e *S. multivorum* 2FM1.

Visando verificar se os isolados apresentavam perfis catabólicos semelhantes ou não, considerando os 12 compostos selecionados, foi realizada uma ACP para tentar agrupá-los de acordo com os padrões de degradação dos compostos (Figura 43). A análise permitiu explicar 77% da variação total dos dados, sendo 58% explicados pela CP1 e 19% explicado pela CP2. Avaliando os resultados de loadings observa-se que os compostos que mais contribuíram para a CP1 foram Fluoreno, Antraceno, Dibenzotiofeno e Pireno, entretanto todos os demais compostos, com exceção do 2-metiltetracosano, também contribuíram positivamente e de maneira expressiva para essa componente. Por outro lado, o composto que mais contribuiu para CP2 foi predominantemente o 2-metiltetracosano (Anexo 14).

Figura 43 -Perfil de degradação dos isolados em relação aos 12 principais compostos presentes no creosoto obtido por ACP. Os isolados marcados são os que representam os



melhores valores de degradação considerando as duas componentes.

Dessa forma, pode-se concluir que os isolados que apresentaram os melhores resultados de degradação dos 12 compostos avaliados e com maior potencial de uso para a biorremediação de ambientes contaminados com HPA estão localizados principalmente na posição mais positiva da CP1. Os mesmos correspondem aos isolados *C. terrigena* (3FM6; 3FM8, 3FM9), *Bacillus sp.* (2FM2 e LAPM39), *Pseudomonas sp.* 3C10M3, *A. junii* LAPM30, *P. plecoglossicida* 3FM5, *B. subtilis* LAPER93, *Spingobacterium sp.* (1FM2 e 5FM2). Todos esses isolados apresentaram as melhores porcentagens de degradação dos 11 HPAs avaliados, que já haviam sido apresentadas na Figura 39. A maioria deles também se destacou como parte do grupo de isolados que mais degradaram o creosoto como um todo, demonstrando que

também degradam bem outros hidrocarbonetos que fazem parte desse contaminante e que não foram diretamente avaliados nesse trabalho (Figura 38).

Assim, esses isolados demonstram grande potencial para serem utilizados na formação de consórcios microbianos que possam ser utilizados como inoculantes para a biorremediação da área contaminada, pois apresentaram as maiores capacidades de degradação obtidas nesse ensaio, mesmo para HPAs com mais de 3 anéis aromáticos. Sendo que as mesmas podem ainda ser otimizadas e ampliadas a partir de testes tanto *ex situ* quanto *in situ*.

Em relação ao crescimento mensurado para os isolados em meio mineral suplementado com creosoto por meio de medidas da DO₆₀₀, pôde-se observar variação estatística de acordo com o teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$) e puderam ser agrupados em 4 grupos estatisticamente distintos (Anexo 15). De modo geral, as maiores densidades celulares foram obtidas para os 4 isolados agrupados no grupo 2, cujos valores de DO₆₀₀ variaram de 0,93 a 1,28 e identificados como *A. junii* LAPM30, *C. terrigena* 3FM9, *Stenotrophomonas sp.* LAPM27 e *Sphingobacterium sp.* 1FM10. O Grupo 3 foi formado por 13 isolados cujos valores de DO₆₀₀ variaram de 0,83 a 0,57, o grupo 4 por 22 isolados cujos valores de DO₆₀₀ variaram de 0,48 a 0,23 e o grupo 1 por 12 isolados cujo crescimento diferiu estatisticamente do controle (Figura 44). Dentre os isolados que apresentaram os maiores crescimentos, *A. junii* LAPM30, *C. terrigena* 3FM9 e *Stenotrophomonas sp.* LAPM27 também apresentaram as maiores taxas de degradação do creosoto e os melhores resultados, em geral, apresentados nesse trabalho e *Sphingobacterium sp.* 1FM10 não apresentou boa taxa de degradação. Os isolados *Sphingobacterium sp.* 5FM2, *Bacillus sp.* LAPM39 e *Pseudomonas sp.* 3C10M3 apesar de terem apresentado boa degradação do creosoto não se destacaram no crescimento. Não há, necessariamente, uma relação direta entre a degradação de substratos e o crescimento celular, pois as bactérias apresentam coeficientes variados de conversão de substratos especificamente em células (biomassa), podendo os mesmos ser convertidos também em vários outros produtos como metabólitos secundários e proteínas (Abbot & Clamen, 1973). Além do tipo de substrato esse fator é normalmente influenciado pela sua concentração inicial e demais parâmetros de incubação (meio, temperatura, pH).

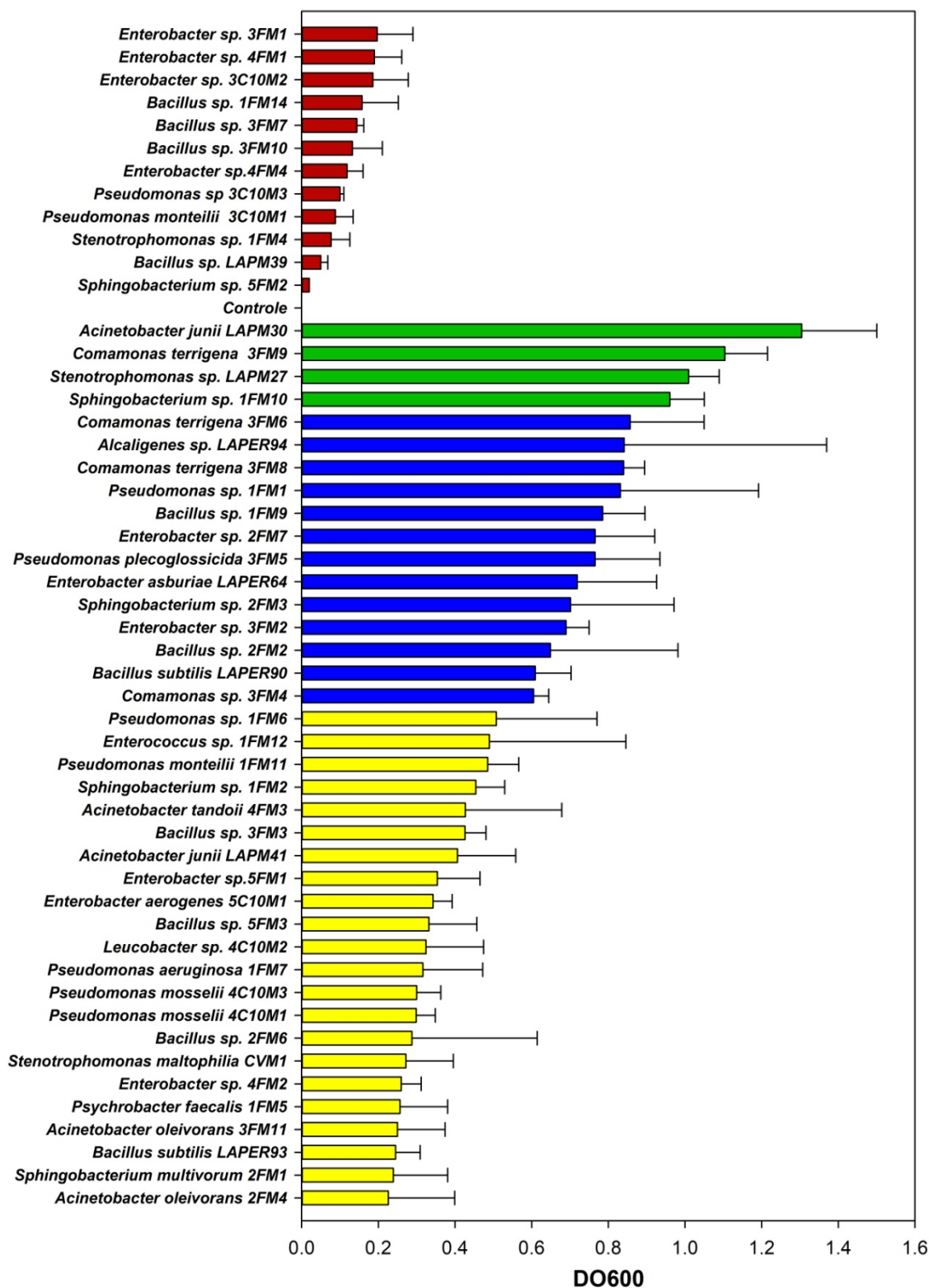


Figura 44: Valores médios do crescimento dos isolados em meio mineral suplementado com cresoto 0,25% (v/v) determinados por leituras de densidade ótica a 600nm e agrupados em grupos estatisticamente distintos utilizando o teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$). Grupo 1 (vermelho), Grupo 2 (verde), Grupo 3 (azul) e Grupo 4 (amarelo).

6.7) Avaliação de crescimento e biorremediação de creosoto na matriz de sedimento individualmente pelos isolados com maior potencial de degradação

Os 15 isolados que apresentaram individualmente os melhores resultados de degradação do creosoto em meio mineral e que foram selecionados para o experimento de degradação na matriz de sedimento foram: *Pseudomonas sp.* 1FM1, *Sphingobacterium sp.* 1FM2, *Enterococcus sp.* 1FM12, *Bacillus sp.* 1FM14, *Bacillus sp.* 2FM2, *P. plecoglossicida*. 3FM5, *C. terrigena*. 3FM6, *C. terrigena*. 3FM8, *C. terrigena* 3FM9, *S. maltophilla* LAPM27, *Enterobacter sp.* 4FM2, *Acinetobacter junii* LAPM30, *Sphingobacterium sp.* 5FM2, *Pseudomonas sp.* 3C10M3, *Bacillus sp.* LAPM39 e *B. subtilis* LAPER93. Todos os isolados apresentaram queda na densidade celular ao final de 30 dias de incubação e 2 deles (*Enterococcus sp.* 1FM12 e *Bacillus sp.* 1FM14) não apresentaram células viáveis ao final da incubação, indicando que ao longo desse período ocorreu a morte desses isolados. Os demais apresentaram densidades variadas com destaque para *Bacillus sp.* LAPM39, *C. terrigena* 5FM2, *S. maltophilla* LAPM 27, *C. terrigena* 3FM9 e *Bacillus sp.* 2FM2, que apresentaram os maiores valores, os quais foram apenas 1 ou 2 ordens de grandeza abaixo da densidade celular inicial (Tabela 18). Isso indica que esses isolados conseguiram sobreviver melhor às condições dos ensaios.

Tabela 18 – Crescimento dos isolados (UFC g⁻¹) no tempo 0 e após 30 dias de incubação em amostras de sedimento contaminado com creosoto (1%)

Identificação	Isolado	Crescimento 0 dias (UFC/g ⁻¹)	Crescimento 30 dias (UFC/g ⁻¹)
<i>Pseudomonas sp.</i>	1FM1	1,97x10 ⁷	1,65x10 ⁴
<i>Enterococcus sp.</i>	1FM12	4,7x10 ⁷	0
<i>Bacillus sp.</i>	1FM14	8,72x10 ⁷	0
<i>Bacillus sp.</i>	2FM2	9,72x10 ⁷	1,2x10 ⁶
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	3FM5	2,55x10 ⁷	1,58x10 ⁴
<i>Comamonas terrigena</i>	3FM6	2,3x10 ⁸	4,0x10 ³
<i>Comamonas terrigena</i> .	3FM8	2,75x10 ⁷	2,9x10 ³
<i>Comamonas terrigena</i>	3FM9	5,3x10 ⁷	3,9x10 ⁶
<i>Stenotrophomonas maltophilla</i>	LAPM27	1,86x10 ⁸	3,4x10 ⁶
<i>Enterobacter sp.</i>	4FM2	3,75x10 ⁷	1,75x10 ³
<i>Acinetobacter junii</i>	LAPM30	2,0x10 ⁷	2,8x10 ⁴
<i>Sphingobacterium sp.</i>	5FM2	6,87x10 ⁷	1,1x10 ⁶
<i>Pseudomonas sp.</i>	3C10M3	4,4x10 ⁷	4,8x10 ³
<i>Bacillus sp.</i>	LAPM39	5,87x10 ⁷	3,3x10 ⁶
<i>Bacillus subtilis</i>	LAPER93	1,75x10 ⁷	3,9x10 ³

Os isolados testados diferiram estatisticamente quanto à degradação do creosoto, utilizando o teste de médias Scott Knott ($p < 0,05$) e puderam ser agrupados em 3 grupos estatisticamente distintos (Anexo 16). As maiores taxas de degradação foram obtidas para 4 isolados agrupados no grupo 2 (verde), acima de 15%, sendo que o maior valor de degradação, de 18%, foi obtido para o isolado *S. maltophilla* LAPM27, seguido pelos isolados *C. terrigena* 3FM8, *Sphingobacterium sp.* 5FM2 e *C. terrigena* 3FM9. Dentre os dois outros grupos formados, um é composto por 2 isolados cujas taxas de degradação ficaram próximas de 10% (grupo 3, azul) e o outro por 9 isolados cujas taxas de degradação não diferiram estatisticamente do controle não inoculado (grupo 1, vermelho). Apesar de não diferirem estatisticamente do controle 3 isolados do grupo 1 apresentaram taxas de degradação que variaram de 2 a 8% (Figura 45).

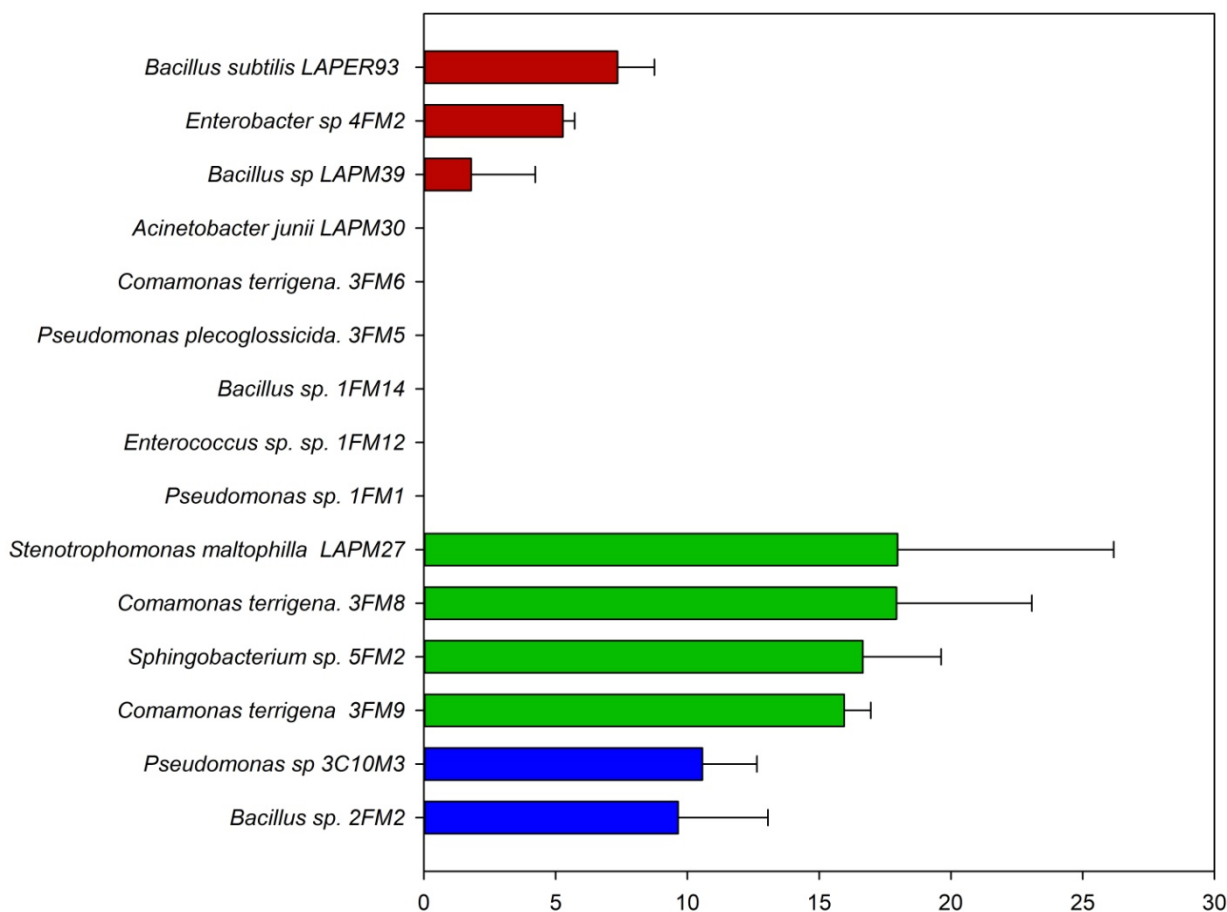


Figura 45 – Valores médios de degradação do creosoto total adicionado na matriz do sedimento a 1%, obtidos pelos isolados avaliados.

Apesar da porcentagem de degradação de creosoto pelos isolados não ter apresentado valores acima de 20%, o que foi inferior aos valores obtidos para esses mesmos isolados no ensaio em meio mineral descrito no tópico anterior, destaca-se o fato de que as interações entre HPAs e a matriz de sedimento podem promover sorções, a partir das quais as moléculas dissolvidas deixam a fase líquida e entram na fase sólida (Weissenfels et al., 1992). Isso faz com que esses contaminantes sejam fortemente adsorvidos principalmente na matéria orgânica presente nessas matrizes, se tornando relativamente indisponíveis à biodegradação microbiana (Miege et al., 1999). Este comportamento já foi relatado por Yu e colaboradores (2005), que observaram percentuais de adsorção de fluoreno, fenantreno e pireno correspondentes a 95%, 97% e 98% após a mistura dos mesmos por 24 h em matriz de sedimento na concentração de 1000 mg⁻¹.

Outros trabalhos também associaram a este efeito a observação de menores taxas de degradação de HPAs em matrizes sólidas quando comparadas a matrizes aquosas. No trabalho de Ramirez e colaboradores (2001), por exemplo, foi avaliada a biodegradação de pireno por cultura isolada e consórcio microbiano tanto em ensaios em meio aquoso quanto em solos lamacentos. As taxas de degradação obtidas tanto pelas culturas isoladas quanto o consórcio em meio líquido foram muito superiores às obtidas em meio sólido, retratando um forte efeito negativo das partículas sólidas na biodisponibilidade do contaminante. No trabalho de Kuppusamy e colaboradores (2016), os resultados da biodegradação dos HPAs Acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno e benzopireno por consórcio degradador em ensaios de microcosmo com amostras de solo também foram diferentes do observado pelo mesmo consórcio em ensaios nas mesmas condições, porém em soluções aquosas. Enquanto que nos ensaios em meio líquido a degradação média de todos os contaminantes foi acima de 95% após 60 dias de incubação, nas amostras de solo o valor médio de degradação dos hidrocarbonetos de baixo e alto peso molecular foi de 60 e 55%, respectivamente.

Adicionalmente, destaca-se o fato de que os valores de degradação observados nesse trabalho foram obtidos pela atividade de bactérias individuais, sendo que a literatura, de modo geral, indica a obtenção de resultados maiores com a utilização de consórcios de diferentes microrganismos e de gêneros variados, já que culturas bacterianas individuais são capazes de metabolizar somente uma estreita faixa de hidrocarbonetos (Ghazali et al., 2004). No trabalho de Rahman e colaboradores, 2002, por exemplo, um experimento de biorremediação em microcosmo foi realizado para avaliar as condições ideais de biodegradação de petróleo bruto em amostras de solo contaminado. Inicialmente foram isoladas 130 culturas bacterianas a partir das amostras e, dentre elas, 5 isolados identificados como *Micrococcus* sp. GS2-22,

Corynebacterium sp. GS5- 66, *Flavobacterium* sp. DS5-73, *Bacillus* sp. DS6-86 e *Pseudomonas* sp. DS10-129 foram selecionados para o estudo com base na eficiência da utilização do petróleo bruto. Enquanto as culturas bacterianas individuais apresentaram valores médios de degradação do contaminante de 50%, o consórcio foi capaz de degradar mais de 78% do petróleo bruto.

Assim, como o objetivo era a construção de um consórcio microbiano para ser usado como inoculante, os isolados que apresentaram os melhores resultados de degradação na matriz foram avaliados de forma combinada –consórcio.

6.8) Avaliação de crescimento, diversidade metabólica e biorremediação *ex situ* de amostras de sedimento contaminadas com creosoto a partir de consórcio bacteriano formado pelos isolados com maior potencial de degradação por meio de técnicas de bioestimulação e bioaumentação

De acordo com os resultados das análises cromatográficas realizadas no tópico anterior definiu-se que o consórcio bacteriano a ser testado nos experimentos de biorremediação do sedimento seria composto pelos isolados *Stenotrophomonas maltophilia* LAPER27, *Comamonas terrigena* 3FM8, *Springobacterium* sp. 5FM2, *Pseudomonas* sp. 3C10M3, *Bacillus* sp. 2FM2, *Bacillus subtilis* LAPER93, *Enterobacter* sp. 4FM2 e *Bacillus* sp. LAPM39. Apesar do isolado *Comamonas terrigena* 3FM9 ter apresentado degradação do creosoto próxima a 15% optou-se por não o utilizar também pelo fato de que o consórcio já seria composto por outros dois isolados da mesma espécie e que apresentaram resultados individuais de degradação do contaminante um pouco superiores às dele.

A amostra de sedimento utilizada no experimento foi inicialmente caracterizada físico-quimicamente em relação aos parâmetros porcentagem de sólidos, carbono orgânico total, fósforo e nitrogênio, e, em nosso laboratório, confirmamos a ausência de HPAs na mesma. Essa informação foi importante para o cálculo da concentração do contaminante adicionada no sistema. Após contaminação e adição de nutrientes nos tratamentos correspondentes, uma nova amostra foi separada e enviada para análise, como forma de se mensurar a alteração nesses parâmetros. Os resultados das análises físico-químicas realizadas podem ser visualizados na Tabela 19:

Tabela 19: Resultados das análises físico-químicas da amostra de sedimento original e após a adição de nutrientes e contaminante, utilizadas nos ensaios de biorremediação em microcosmo

Parâmetros	Amostra de sedimento original	Amostra de sedimento após adição de nutrientes e creosoto
Porcentagem de sólidos (%)	80,4	78,8
Carbono orgânico total (%)	0,34	0,81
Nitrogênio total Kjeldahl (mg/Kg)	965,1	2360,9
Nitrato (com o N) (mg/Kg)	<1,4	20
Nitrito (com o N) (mg/Kg)	0,79	28
Fósforo (mg/Kg)	186	463

6.8.1) Crescimento da comunidade bacteriana e degradação de creosoto nos diferentes tratamentos de biorremediação

A densidade bacteriana (UFC g⁻¹) nos tempos 0, 20, 40 e 60 dias de incubação nos microcosmos podem ser visualizados na Tabela 20.

Tabela 20 – Densidade bacteriana (UFC g⁻¹) nos diferentes tratamentos de biorremediação de sedimento contaminado com creosoto (0,5%) nos tempos 0, 20, 40 e 60 dias.

Tratamento	Tempo de incubação (dias)			
	0	20	40	60
SE/N/C/A (1)	2,98 x10 ⁹ ± 8,49 x10 ⁷	6,70 x10 ⁶ ± 2,62 x10 ⁷	5,80x10 ⁶ ± 2,76 x10 ⁶	5,12 x10 ⁷ ± 1,56 x10 ⁷
SE/N/C/SA (2)	2,90 x10 ⁹ ± 2,55x10 ⁹	8,00 x10 ⁶ ± 1,63x10 ⁶	1,80 x10 ⁶ ± 7,57x10 ⁵	5,02 x 10 ⁷ ± 2,93x10 ⁷
SE/SN/C/A (3)	3,26 x10 ⁸ ± 1,77x10 ⁸	6,70 x10 ⁶ ± 4,67x10 ⁶	8,10x10 ⁵ ± 9,90x10 ⁴	4,46 x10 ⁷ ± 2,05x10 ⁷
SE/SN/C/SA (4)	3,20 x10 ⁸ ± 2,83 x10 ⁷	2,50 x10 ⁷ ± 1,56x10 ⁷	4,85 x10 ⁶ ± 5,42x10 ⁶	2,39 x10 ⁷ ± 1,98x10 ⁷
SNE/N/C/A (5)	5,83 x10 ⁹ ± 5,16 x10 ⁹	4,80 x10 ⁷ ± 8,49x10 ⁶	2,55 x10 ⁶ ± 6,22 x10 ⁵	6,44 x10 ⁷ ± 4,95x10 ⁶
SNE/N/C/SA (6)	5,53 x10 ⁹ ± 9,90 x10 ⁸	8,10 x10 ⁵ ± 1,27x10 ⁵	1,25 x10 ⁶ ± 2,12x10 ⁴	4,49 x10 ⁷ ± 8,49x10 ⁶
SNE/N/SC/A (7)	1,32 x10 ⁸ ± 4,24 x10 ⁷	6,74 x10 ⁷ ± 8,13x10 ⁷	1,55 x10 ⁶ ± 7,92 x10 ⁵	5,26 x10 ⁷ ± 3,54x10 ⁶
SNE/N/SC/SA (8)	1,03 x10 ⁸ ± 7,07x10 ⁶	1,46 x10 ⁷ ± 3,54x10 ⁶	6,10 x10 ⁷ ± 4,24x10 ⁷	4,11 x10 ⁷ ± 3,01x10 ⁷
SNE/SN/C/A (9)	4,40 x10 ⁹ ± 3,39 x10 ⁹	1,80 x10 ⁷ ± 8,49x10 ⁶	6,00 x10 ⁷ ± 5,66 x10 ⁷	1,24 x10 ⁷ ± 3,54x10 ⁶
SNE/SN/C/SA (10)	5,53 x10 ⁹ ± 2,47 x10 ⁹	3,45 x10 ⁶ ± 4,01x10 ⁶	2,68 x10 ⁶ ± 8,56 x10 ⁵	7,70 x10 ⁶ ± 1,84x10 ⁶
SNE/SN/SC/A (11)	8,50 x10 ⁷ ± 1,41 x10 ⁷	1,40 x10 ⁷ ± 5,66x10 ⁶	2,23 x10 ⁶ ± 6,86 x10 ⁵	4,60 x10 ⁶ ± 8,49x10 ⁵
SNE/SN/SC/SA (12)	9,00 x10 ⁷ ± 1,41 x10 ⁷	1,50 x10 ⁷ ± 4,24x10 ⁶	1,60 x10 ⁷ ± 7,07 x10 ⁶	8,30 x10 ⁶ ± 2,40x10 ⁶

Praticamente todos os frascos apresentaram uma densidade bacteriana inicial alta (t=0), principalmente aqueles adicionados do consórcio. Isso era o esperado considerando a concentração de inóculo adicionada, na faixa de 10⁸ a 10⁹ células de cada um dos isolados. Observou-se que após 20 dias de incubação, houve reduções que variaram de 1 a 4 ordens de grandezas entre os tratamentos, mas a comunidade de bactérias em todos ainda se manteve

alta, variando entre 10^5 e 10^7 UFC g^{-1} . Padrão semelhante foi observado aos 40 dias de incubação, quando a maioria dos tratamentos apresentou densidades na mesma ordem de grandeza ou queda de apenas uma ordem e para alguns tratamentos, como o 6 e 12, um pequeno aumento na comunidade bacteriana. Ao tempo final de incubação ($t=60$), a comunidade de bactérias não só se manteve, mas na verdade aumentou em pelo menos uma ordem de grandeza para a maioria dos tratamentos (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7). As menores densidades foram observadas para os tratamentos 12 (correspondente a atenuação natural não adicionado de nutrientes, consórcio e sem aeração), 10 (não adicionado de nutrientes e aeração, mas com consórcio) e o 11 (não adicionado de nutrientes e consórcio, mas com aeração). Efeito semelhante foi observado por Rahman e colaboradores (2003) em diferentes ensaios de bioaugmentação e bioestimulação realizados visando o tratamento de tanques de armazenamento contaminados com borra de petróleo.

Os resultados indicam que apesar da comunidade de bactérias ter oscilado e apresentando queda em relação à densidade inicial, de modo geral, conseguiu sobreviver na presença do creosoto e demais condições experimentais, pois mesmo após um período de 60 dias, todos possuíam uma comunidade acima de 10^6 UFC g^{-1} de sedimento (Figura 46). O aumento observado para alguns tratamentos aos últimos 20 dias de incubação, sugere, inclusive, que a redução na concentração do contaminante possa ter favorecido o crescimento de grupos cuja comunidade foi reduzida nos tempos mais iniciais em resposta à concentrações mais altas do contaminante.

A análise estatística das densidades bacterianas aos 60 dias por meio do modelo linear generalizado (MLG), com teste F (significância de 5%) utilizando o programa SAS mostra que a adição do consórcio, de nutrientes e a presença de microrganismos autóctones na amostra (sedimento não esterilizado) foram fatores que afetaram de forma significativa o crescimento de bactérias ($p\text{-valor}<0,05$). A presença de nutrientes mostrou relação positiva com o aumento da densidade de microrganismos e a ausência de esterilização e de adição do consórcio mostrou relação negativa com o aumento da densidade de microrganismos, ou seja, a presença de microrganismos autóctones e a adição do consórcio também favoreceu o crescimento das bactérias.

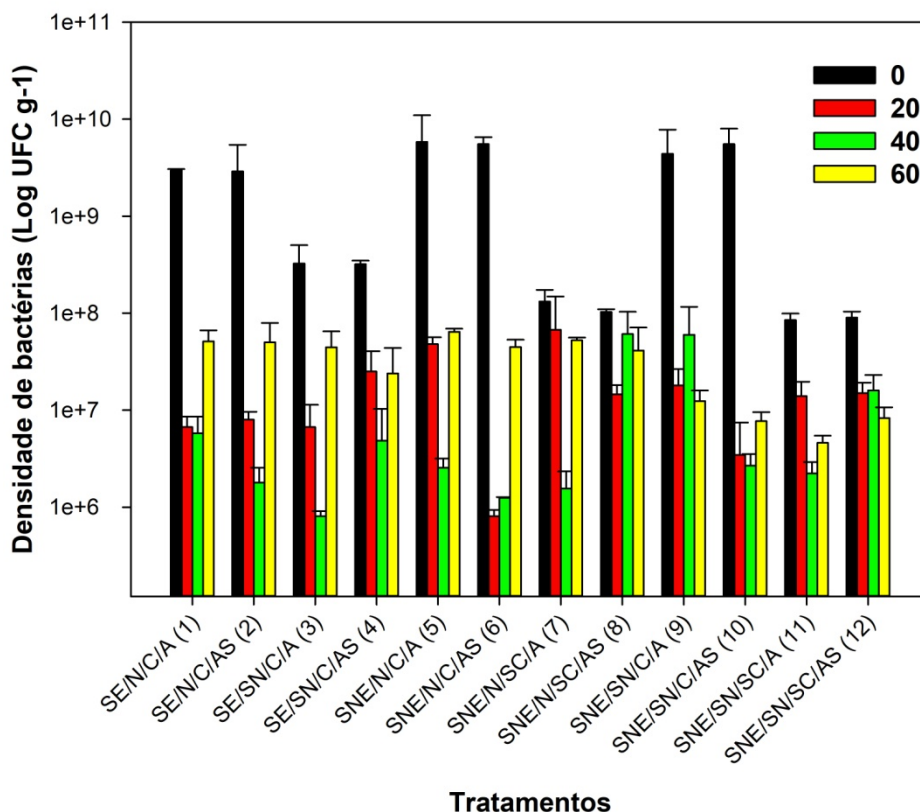


Figura 46 – Densidade da comunidade de bactérias (UFC g⁻¹) nos diferentes tratamentos de biorremediação de sedimento contaminado com creosoto (0,5%) ao longo dos tempos de incubação (0, 20, 40 e 60 dias).

Analisando-se o gráfico contendo as densidades finais de microrganismos obtidas em cada tratamento (Figura 47) é possível visualizar a combinação de todas as variáveis: esterilização (presença ou ausência de microrganismos autóctones), e presença ou ausência de aeração, nutrientes e consórcio assim como aquelas que foram significativas de acordo com a análise estatística. Observa-se, em geral, valores de densidades bacterianas finais maiores na presença de nutrientes, representados pelas figuras de cor azul nos quatro gráficos (A, B, C e D) quando comparados aos tratamentos sem adição de nutrientes, representado pelas figuras de cor rosa. Esses valores também são um pouco maiores na ausência de esterilização (presença de microrganismos autóctones), representados pelas colunas 1 e 3, assim como na presença do consórcio (gráficos B e D) comparados aos tratamentos sem a presença do consórcio (gráficos A e C).

Avaliando-se a perda do contaminante ao longo do tempo, é possível observar que as taxas de remoção (porcentagem de creosoto removida por dia até a estabilização) foram variáveis nos diferentes tratamentos (Figura 48). Para a maioria deles a maior parte dos contaminantes capaz de ser eliminada nos ensaios foi removida nos 30 primeiros dias de incubação, tendendo a estabilização após esse período. Isso ocorreu para os tratamentos 1, 2,

6, 8, 9, 10 e 11, que apresentaram as taxas mais altas e, conseqüentemente, maiores velocidades de remoção. Para os demais tratamentos, 3, 4, 5, 7 e 12, a remoção dos contaminantes ocorreu em uma taxa menor, de forma que ainda se observou perda de creosoto após os 30 primeiros dias de incubação. Entretanto, para todos os tratamentos não se observou grande aumento nos valores de remoção nos últimos 20 dias de incubação. Isso associado às altas porcentagens de creosoto eliminado para os tratamentos, em geral, indica que o valor máximo de degradação possível para cada ensaio foi atingido durante o período de incubação (Figura 48).

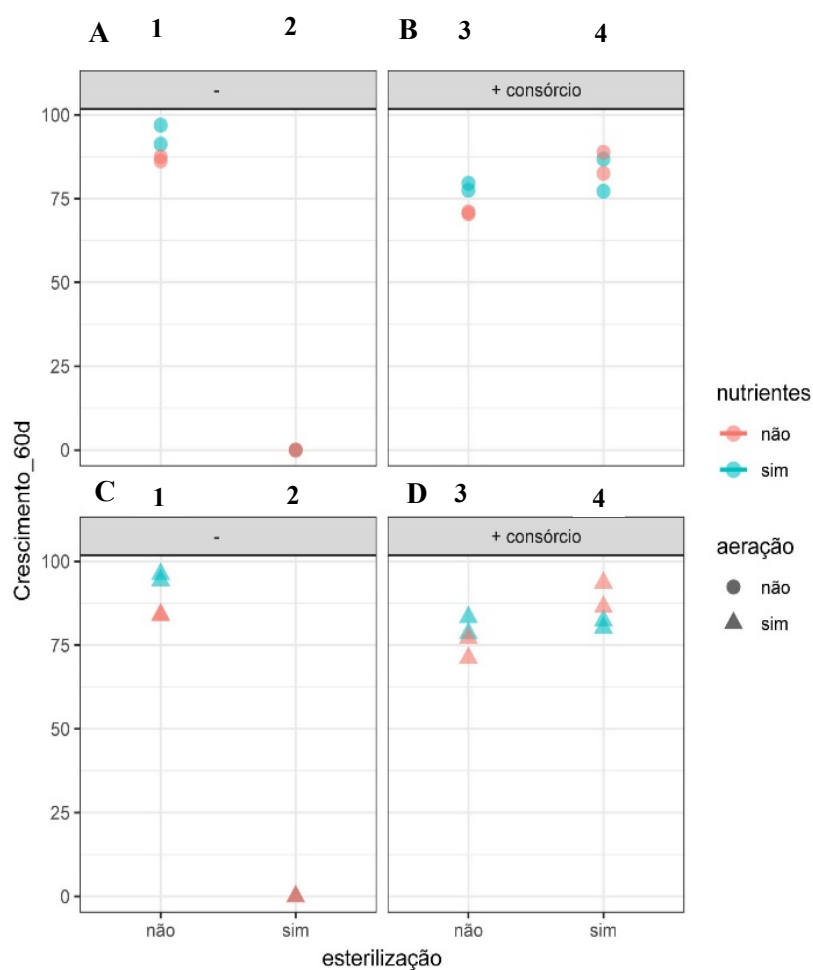


Figura 47 – Densidade de bactérias após 60 dias de incubação considerando as diferentes variáveis combinadas nos tratamentos.

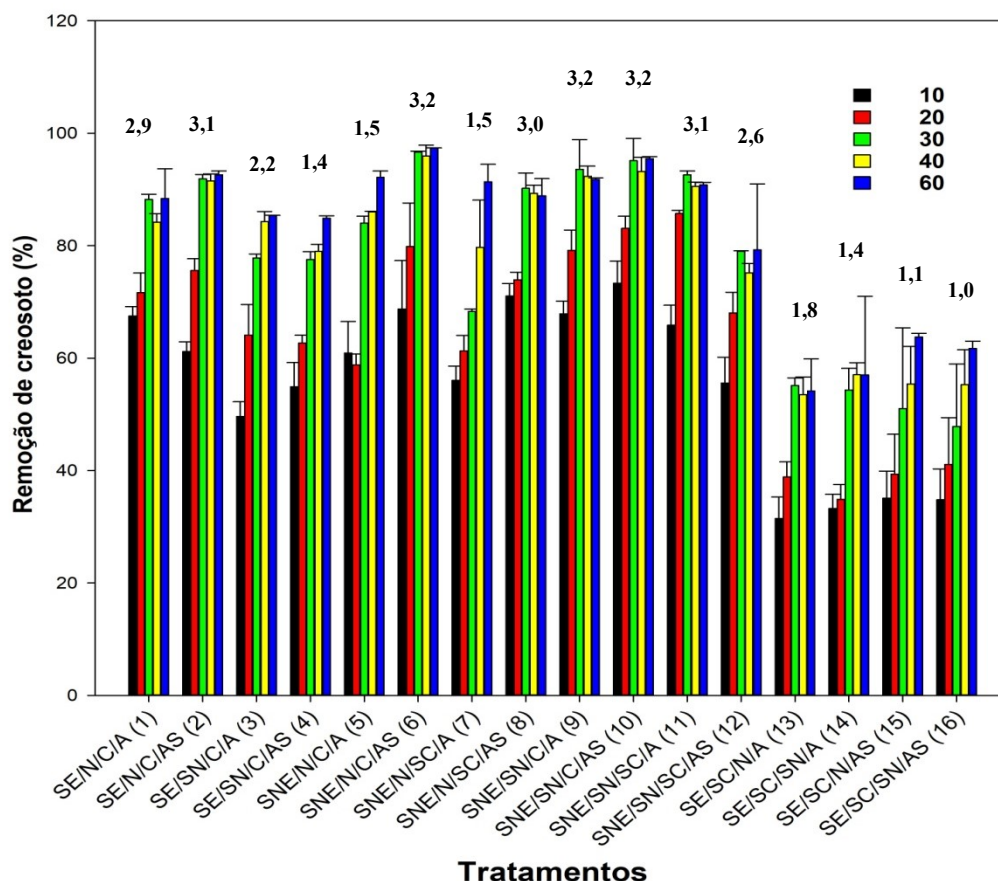


Figura 48 – Porcentagem de remoção de creosoto nos diferentes tratamentos de biorremediação de sedimento contaminado (0,5%) ao longo dos tempos de incubação (10, 20, 30, 40 e 60 dias)

De modo geral, observou-se grande queda na concentração do contaminante adicionado, que variou entre 54 e 97% nos diferentes tratamentos após 60 dias (Figura 49). Os maiores valores de remoção foram obtidos para os tratamentos 6, 10, 2, 5, 9, 7 e 11, todos acima de 90%. A maior porcentagem de remoção foi observada para o tratamento 6, acima de 97%, caracterizado por sedimento não estéril, presença do consórcio de bactérias pré-selecionadas desenvolvido por nossa equipe como técnica de bioaumento, além da adição de nutrientes (microbiota autóctone + bioaugmentação + bioestimulação) e mantido sem aeração contínua. Além dele, de modo geral, a maioria dos demais tratamentos que também apresentaram remoção acima de 90% correspondem àqueles onde foi utilizado sedimento não estéril da área (6, 10, 5, 9, 7 e 11), mas com maior intensidade nos quais houve também a bioaugmentação com o consórcio microbiano, pois apresentaram os 5 maiores valores de degradação (6, 10, 2, 5 e 9). Ressalta-se, inclusive, que mesmo em tratamentos em que os microrganismos autóctones não estavam presentes, a remoção de creosoto chegou a valores próximos de 90% somente com a presença do consórcio. O tratamento a partir do qual foi obtida a menor remoção, um valor de 78%, corresponde ao 12 que é um tratamento apenas

com a presença da microbiota autóctone, sem adição de consórcio e nutrientes (atenuação natural), sem aeração e que apresentou valores de densidade final (UFC g⁻¹ de sedimento) um pouco menor que a maioria dos demais tratamentos. Considerando os tratamentos 13 a 16, que correspondem aos controles estéreis, a perda abiótica foi em média 59%. Dessa forma, para cada tratamento apenas a diferença entre os valores finais de remoção observados e essa perda abiótica pode ser atribuída exclusivamente à degradação microbiana, que variou de 19 a 39%. Perdas abióticas altas também já foram observadas em outros trabalhos com ensaios de biorremediação em microcosmo e estão relacionadas principalmente à evaporação dos compostos mais voláteis, mais também processos de fotodegradação, degradação química, dentre outros (Magesin & Schinner, 1997; Ruberto et al., 2003; Sun et al., 2010). Entretanto, fica claro que apenas fatores abióticos seriam incapazes de eliminar totalmente os contaminantes, principalmente os compostos mais complexos (Figura 49).

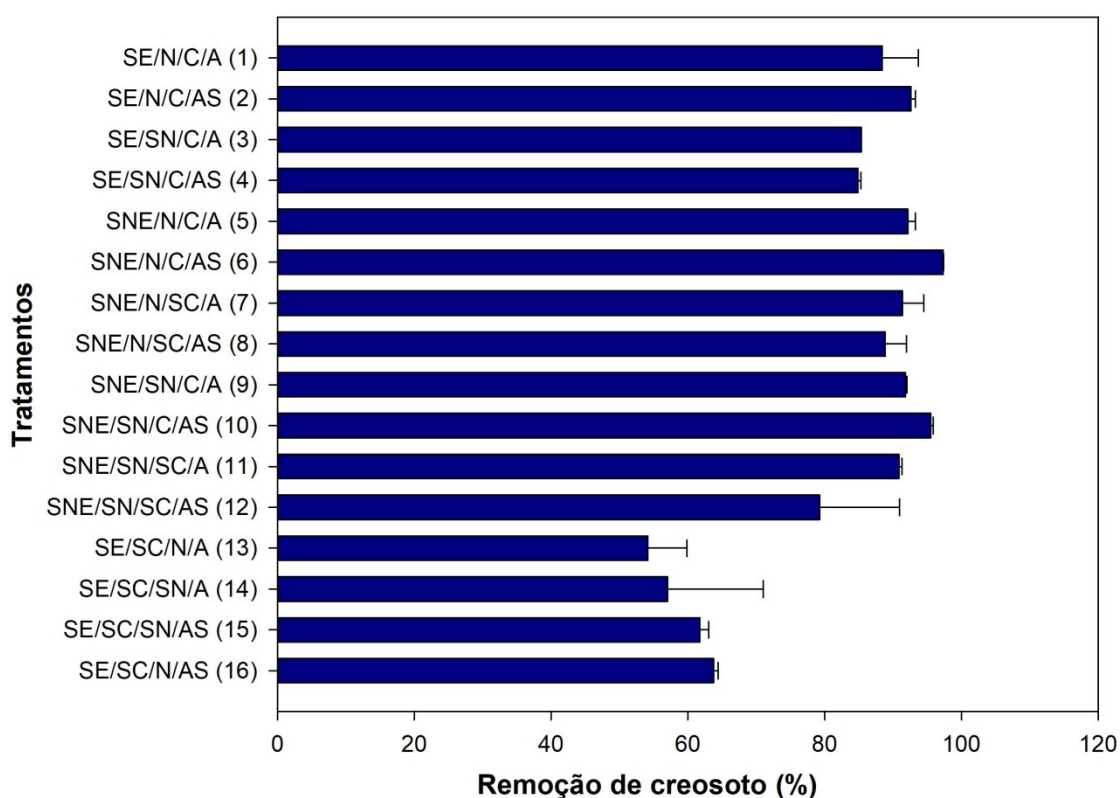


Figura 49 – Valores médios de remoção do creosoto total adicionado na matriz do sedimento a 0,5%, nos diferentes ensaios de biorremediação.

Os resultados reforçam toda a pesquisa desenvolvida até o momento na área, inclusive os dados obtidos por meio das análises metataxonômicas e apresentados no tópico 6.2, e que já havia mostrado em diversos pontos a presença de uma comunidade autóctone de bactérias aptas à sobreviver e degradar o contaminante na área de estudo. Porém é importante ressaltar

a significância e o aumento na degradação média de creosoto em todos os tratamentos nos quais o consórcio foi adicionado, inclusive naqueles onde já havia a presença dos microrganismos autóctones. A presença do consórcio só não promoveu grande aumento na degradação média de creosoto na presença de microrganismos autóctones sob condição aerada, como pode ser visualizado na Figura 48, já que nessas condições com (Figura 48A) ou sem (Figura 48B) a presença do consórcio o resultado de degradação foi muito semelhante e acima de 90%. Assim, o consórcio bacteriano desenvolvido é capaz de otimizar o processo de degradação sem a necessidade de aeração.

Já em relação ao parâmetro adição de nutrientes não foi possível observar nenhuma interação significativa com outros parâmetros, ou seja, a adição de nutrientes não favoreceu o processo. Como pôde ser observado na Tabela 19, a concentração de carbono orgânico total da amostra de sedimento original foi de 0,34% ou 3400 mg Kg⁻¹, a de nitrogênio de 965,1 mg Kg⁻¹ e a de fósforo 186 mg Kg⁻¹, o que correspondia a uma relação C:N:P aproximada de 18,3:5,2:1. Após a adição de contaminante e dos nutrientes, esses valores foram alterados para 0,81% ou 8100 mg Kg⁻¹, 2360 mg Kg⁻¹ e 463 mg Kg⁻¹, ou seja, uma relação C:N:P de 17,5:5,1:1. Assim, a adição de nutrientes foi importante para compensar a adição de carbono (creosoto) de forma a manter as concentrações dos nutrientes N e P próximas as da área de estudo. No entanto, a relação C:N:P não atingiu a recomendada em algumas trabalhos como ótima para a degradação de hidrocarbonetos aromáticos, incluindo, Karanalidis e colaboradores (2010) e Steliga e colaboradores (2012) (100:5:1), Sabaté e colaboradores (2004) e Thapa em colaboradores (2012) (100:10:1), além de Turgay e colaboradores (2010), Filler e colaboradores (2001) e Cardona & Iturbe (2003) (100:15:1). Isso pode explicar porque a adição de nutrientes foi um fator que não afetou significativamente a degradação do contaminante. Por outro lado, pode ser uma característica interessante, já que a adição de nutrientes em grandes áreas para a biorremediação *in situ* é um processo caro e trabalhoso e os resultados de degradação dos melhores tratamentos desse trabalho, como já mencionado, foram altos e superiores aos obtidos em vários outros trabalhos semelhantes, mesmo sem a otimização desse fator

A bioaugmentação com um consórcio enriquecido é uma prática comum para aumentar a taxa e extensão da biorremediação, especialmente em combinação com outros fatores (Vogel, 1996). No entanto, diferentes estudos não obtiveram bons resultados com a bioaugmentação. Launen e colaboradores (2002), por exemplo, relataram que a bioaugmentação com um consórcio microbiano capaz de degradar diversos HPAs não foi capaz de aumentar a eficiência de remediação de sedimentos contaminados por esses compostos em comparação

com a biodegradação efetuada apenas pela microbiota autóctone das amostras. Por outro lado, assim como ocorreu no nosso trabalho, alguns autores formularam consórcios de bactérias aptas a degradar eficientemente HPAs. No trabalho de Yu e colaboradores (2005), por exemplo, um consórcio de bactérias foi formado por meio de técnicas de enriquecimento com HPAs a partir de amostras de sedimentos de manguezais. O consórcio desenvolvido, formado por *Rhodococcus* sp., *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp, foi capaz de degradar 100% dos contaminantes fluoreno e fenantreno em meio líquido após 4 semanas de incubação. E assim como o observado no nosso trabalho, foi confirmado efeito significativo e positivo da adição do consórcio na degradação dos contaminantes. Aplicação de consórcios com taxas de remoção inferiores às obtidas no nosso trabalho também foram encontradas. No trabalho de Mao e colaboradores (2012), por exemplo, foram observadas taxas de remoção de HPAs a partir de solo contaminado correspondente a 20,2% e 35,8% com a adição de 10% e 20% (m/m) de consórcio bacteriano, respectivamente. Já no trabalho de Vinas e colaboradores (2005), que avaliou o efeito de uma série de tratamentos de biorremediação, incluindo a adição de nutrientes, biossurfactantes e um consórcio de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos para tratar solo altamente contaminado com creosoto, também proveniente de uma estação de tratamento de madeiras, as taxas de remoção de HPAs foram altas em todos os tratamentos, após 200 dias de incubação. Mas os valores máximos de degradação variaram de 83 a 87%.

A biorremediação tem uma vantagem sobre outros métodos de tratamento porque é um processo natural, de menor impacto ambiental e capaz de destruir eficientemente os contaminantes, impedindo seu acúmulo (Banat et al., 2000). Foi possível obter altas taxas de degradação do creosoto nas amostras em estudo a partir de diferentes tratamentos de biorremediação empregados. O consórcio bacteriano misto desenvolvido aumenta a degradação do contaminante na maioria das condições e em conjunto principalmente com os microrganismos autóctones presentes na amostra promoveu as maiores taxas de degradação. Portanto, sugerimos o uso dessas condições e o consórcio bacteriano misto para a biorremediação da área da estação da ETD contaminada com creosoto.

6.8.2) Densidade de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de creosoto pela técnica de número mais provável (NMP)

Após o cálculo do número mais provável (NMP g^{-1}), em microplaca, de bactérias totais e degradadoras de creosoto tanto na amostra de sedimento original ($t=0$) quanto nos ensaios de biorremediação realizados após os 60 dias de incubação, foi possível observar que

a densidade de bactérias heterotróficas totais foi de $2,68 \times 10^8$ NMP g^{-1} na amostra original. Entretanto, também foi bem alta em todos os tratamentos de biorremediação ao final da incubação, com exceção dos tratamentos de atenuação natural (tratamentos 13 a 16) que eram estéreis e não inoculados, com ordens de grandeza que variaram entre 10^7 e 10^8 NMP g^{-1} (Figura 51). A densidade das populações de bactérias degradadoras de creosoto foi de $2,71 \times 10^3$ NMP g^{-1} na amostra original e variou de 10^3 a 10^5 NMP g^{-1} nos diferentes tratamentos (Figura 51).

Comparando a densidade de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de creosoto em cada tratamento foi possível mensurar a porcentagem que as bactérias degradadoras representaram em relação à comunidade total (Figura 51 e Tabela 21). A amostra original foi a que apresentou a maior diferença de ordens de grandeza entre a comunidade de bactérias degradadoras e heterotróficas totais, e conseqüentemente, foi a amostra onde uma porcentagem pequena, correspondente a apenas 0.00101% de bactérias foram capazes de degradar o contaminante. Esse resultado não foi inusitado pelo fato da amostra original no tempo 0 não ter sido submetida a nenhum processo de bioaugmentação ou bioestimulação que possa ter favorecido a comunidade de bactérias capazes de degradar o contaminante. As bactérias degradadoras mensuradas nela representam as bactérias que originalmente já se encontravam na amostra enviada e atuavam na degradação do contaminante na área do estudo.

Por outro lado todos os demais tratamentos apresentaram menores diferenças de ordens de grandeza entre as populações de bactérias degradadoras e heterotróficas totais após os 60 dias de incubação, indicando que, de modo geral, os tratamentos de biorremediação realizados favoreceram em algum grau as bactérias degradadoras do contaminante, provocando um aumento em sua comunidade. As populações de bactérias degradadoras de creosoto foram variáveis entre os tratamentos e, dentre eles, os tratamentos 5, 2, 10 e 6 foram os que mantiveram as populações de bactérias degradadoras mais altas, correspondentes, respectivamente, a 0.38023%, 0.22196%, 0.21562%, e 0.20386% das bactérias totais (Figura 51 e Tabela 20). Esses tratamentos correspondem justamente aos 4 nos quais se obteve as maiores porcentagens de remoção do contaminante, como já mencionado no tópico anterior, com valores acima de 92%. Isso evidencia uma correspondência entre as análises e confirma que efetivamente os tratamentos de biorremediação onde foi possível calcular maior degradação do contaminante correspondem àqueles onde havia as maiores populações especificamente de bactérias degradadoras dos mesmos.

De forma semelhante ao observado com o uso da técnica de UFC g^{-1} para estimar a densidade bacteriana, a técnica do NMP mostrou também que todos os tratamentos apresentaram densidades de bactérias altas e relativamente próximas entre si, mesmo após 60 dias de incubação, com poucas reduções de ordens de grandeza. Entretanto, de modo geral, a densidade final de bactérias heterotróficas totais apresentou valores um pouco maiores com o uso da técnica NMP em comparação com o uso da técnica de UFC g^{-1} , em média 1 ou 2 ordens de grandeza maiores (Figura 51 e Tabela 20).

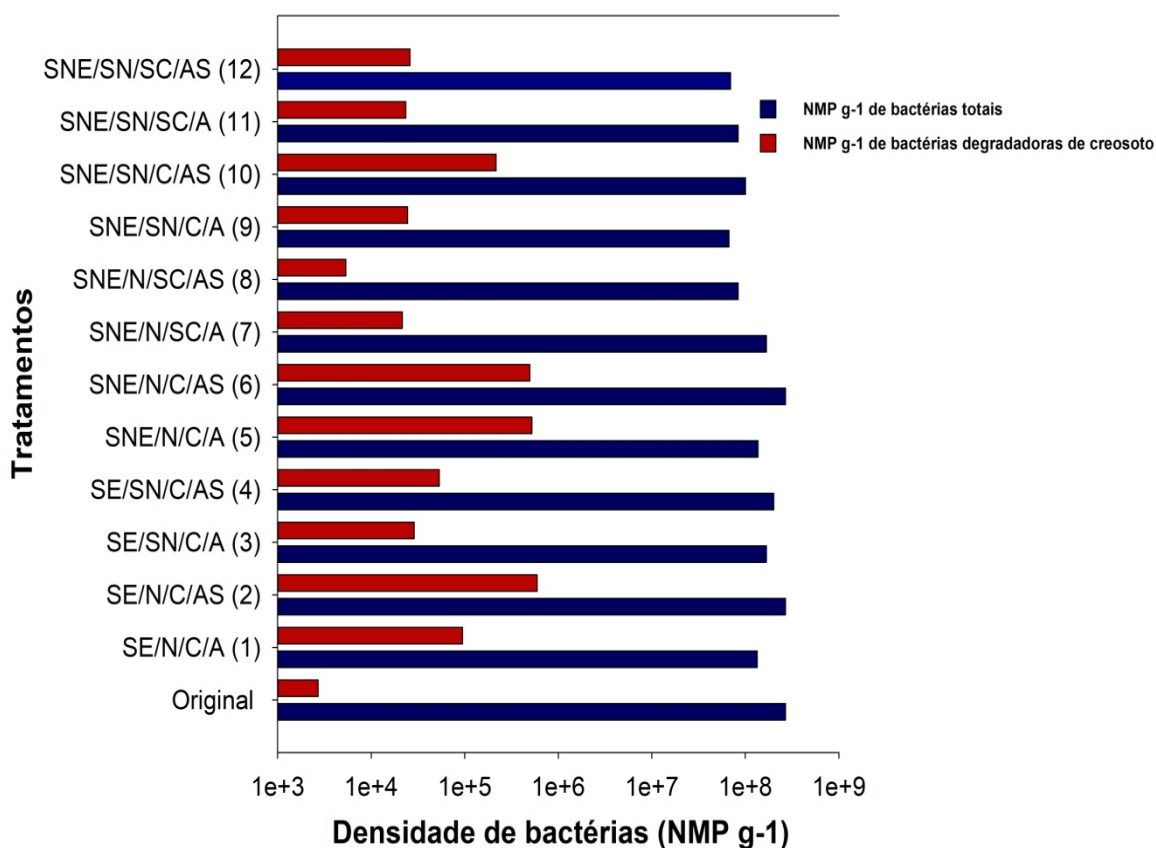


Figura 50 – Densidade da comunidade de bactérias heterotróficas totais e degradadora de creosoto, na amostra de sedimento original e nos tratamentos de biorremediação após os 60 dias de incubação, determinadas pela técnica de NMP.

Tabela 21 – Proporção de bactérias degradadoras de creosoto (0,5%) em relação às bactérias heterotróficas totais na amostra de sedimento original (t=0) e nos diferentes tratamentos de biorremediação após 60 dias de incubação.

Código	Tratamento	Porcentagem de degradadores (%)
Original	Original	0.001
1	SE/N/C/A	0.071
2	SE/N/C/SA	0.222
3	SE/SN/C/A	0.017
4	SE/SN/C/SA	0.027
5	SNE/N/C/A	0.380
6	SNE/N/C/SA	0.204
7	SNE/N/SC/A	0.013
8	SNE/N/SC/SA	0.006
9	SNE/SN/C/A	0.037
10	SNE/SN/C/SA	0.216
11	SNE/SN/SC/A	0.028
12	SNE/SN/SC/SA	0.038

Outros trabalhos que mensuraram a densidade de bactérias totais a partir de ensaios de UFC ou NMP g^{-1} , em amostras de solos e sedimentos contaminados com creosoto ou outros poluentes como petróleo bruto e submetidos a ensaios de biorremediação em microcosmo com diferentes combinações de bioestimulação/bioaumentação também mensuraram populações altas de bactérias totais, acima de 10^6 , mesmo após longos períodos de incubação (Vinas et al., 2005; Kirk et al., 2005; Lors et al., 2010). Apesar de ambas serem técnicas usadas para estimar a densidade microbiana elas possuem algumas diferenças. A contagem de células por plaqueamento direto possui a vantagem de permitir o posterior isolamento, purificação e identificação das culturas obtidas, além de possibilitar a numeração apenas de células viáveis e que apresentam crescimento (Fuchsluger & Fritz, 2011). Já a técnica de número mais provável (NMP) permite estimar a densidade de microrganismos cultiváveis com base na estatística sem a necessidade da contagem direta, porém com a desvantagem de não mensurar apenas células viáveis, mas também células mortas se as mesmas de alguma forma estiverem proporcionando turvação do meio de cultura (Blodgget, 2006), o que pode explicar uma estimativa de densidade celular mais alta com a técnica de NMP em comparação com a técnica de UFC.

6.8.3) Diversidade metabólica da comunidade microbiana total de alguns tratamentos de biorremediação

Para avaliar se a diversidade metabólica da comunidade microbiana variou com a introdução dos tratamentos aeração e nutrientes, amostras correspondentes aos tratamentos de biorremediação 5, 6, (tratamentos com o sedimento não estéril + consórcio + nutrientes e com ou sem aeração) e 9 e 10 (sedimentos não estéril, sem nutrientes + consórcio e com ou sem aeração) nos tempos 0 e 60 dias de incubação foi determinada com a utilização do sistema Biolog-ECOPLATE. Esse sistema permite mensurar o consumo, ao longo do tempo, de 31 diferentes fontes de carbono agrupadas em seis grandes grupos de compostos (carboidratos, polímeros, compostos fenólicos, amidas/aminas, aminoácidos e ácidos carboxílicos), de acordo com Choi & Bobbs (1999).

Todos os 31 compostos foram utilizados pela comunidade de bactérias presentes nas amostras nos diferentes tratamentos e nos 2 tempos de incubação, inclusive os compostos de natureza mais recalcitrante e no tempo 0. Isto confirma que a microbiota da área naturalmente possui uma grande diversidade metabólica com capacidade de consumo de diferentes substratos, o que já havia sido predito nas análises metataxonômicas. Pôde-se observar que o perfil de utilização dos grupos de compostos foi variável (Figura 52). As fases lineares dos gráficos representam o período de atividade metabólica da comunidade nos grupos de substratos específicos e o platô, o ponto onde ocorreu consumo máximo dos mesmos (Konopka et al., 1998). Observa-se que em todos os tratamentos avaliados e em ambos os tempos, todos os substratos foram consumidos mais rapidamente nas primeiras 96h tendendo à estabilização e/ou declínio após esse período, o que ocorreu provavelmente apenas em função do total consumo da fonte (Figura 52).

Não foi possível observar grandes alterações, entre os 4 tratamentos, no padrão de consumo das fontes presentes no sistema Biolog-ECOPLATE. A velocidade de utilização de cada um dos grupos de compostos foi determinada pelo cálculo do coeficiente angular da fase linear dos gráficos gerados pelos dados de consumo dos mesmos. Em todas as condições a velocidade de utilização de carboidratos > aminoácidos > ácidos carboxílicos > polímeros > aminas/amidas > compostos fenólicos (Tabela 22). Apesar do padrão geral de consumo dos grupos de compostos ter se mantido nos tratamentos entre os tempos 0 e 60 dias de incubação, foi possível observar que a velocidade de utilização dos mesmos foi diferente, já que a velocidade de consumo da maioria dos compostos foi maior no tempo 60 (Tabela 21). Os compostos orgânicos não tóxicos, como carboidratos e aminoácidos, que são mais prontamente disponíveis por serem direcionados diretamente para as vias principais,

costumam ser consumidos preferencialmente e de forma mais expressiva. Já os compostos tóxicos, por serem degradados somente por uma porção da comunidade e após a indução de vias específicas, costumam ser metabolizados de forma mais tardia (Garland & Mills, 1991; Cravo-Leurau et al., 2011). A alteração na velocidade de consumo das fontes indica alteração da diversidade funcional da microbiota em algum nível ao longo da incubação

Avaliando-se a densidade de bactérias heterotróficas totais, observada nos ensaios de crescimento pelas técnicas de NMP g^{-1} (Figura 51) e UFC g^{-1} (Tabela 20 e Figura 51), todos os tratamentos de biorremediação realizados apresentaram densidades altas de microrganismos após 60 dias, acima de 10^6 , e muito semelhantes entre eles. Além disso, os 4 tratamentos avaliados pelo sistema Biolog-ECOPLATE apresentaram as populações de bactérias degradadoras mais altas de acordo com a técnica de NMP g^{-1} . Esses dados de crescimento e o fato de que aos 60 dias a velocidade de consumo dos compostos em geral, inclusive os mais tóxicos, foi maior, sugere a presença de uma microbiota diversa e com alta densidade nas condições experimentais dos ensaios de biorremediação em microcosmo após esse período. Isso corrobora com os demais dados do trabalho, de que esses tratamentos com a presença de microbiota autóctone e adição do consórcio não só possuíam ao final do tratamento uma comunidade diversa e apta a degradar os contaminantes, mas também com perfil metabólico-funcional geral diferenciado.

Tabela 22: Coeficientes angulares das equações das retas obtidas pelas plotagens dos valores de densidade ótica a 590 nm de cada um dos grupos de compostos em função do tempo nos tratamentos de biorremediação 5, 6, 9, e 10 a 0 e 60 dias de incubação

Grupo de Compostos	Coeficiente Angular							
	Trat 5		Trat 6		Trat 9		Trat 10	
	t=0	t=60	t=0	t=60	t=0	t=60	t=0	t=60
Carboidratos	5,13	4,81	5,44	4,94	5,19	5,6	5,22	5,13
Aminoácidos	3,18	3,64	3,48	4,0	3,29	3,49	3,62	3,98
Polímeros	2,28	1,80	2,20	2,0	1,83	1,56	1,93	1,85
Ácidos carboxílicos	2,83	3,06	3,30	3,8	3,0	3,27	3,40	3,83
Aminas/Amidas	1,21	1,07	1,31	1,47	0,95	0,99	0,95	1,18
Compostos fenólicos	1,17	0,92	1,12	1,25	0,91	1,0	0,90	1,17

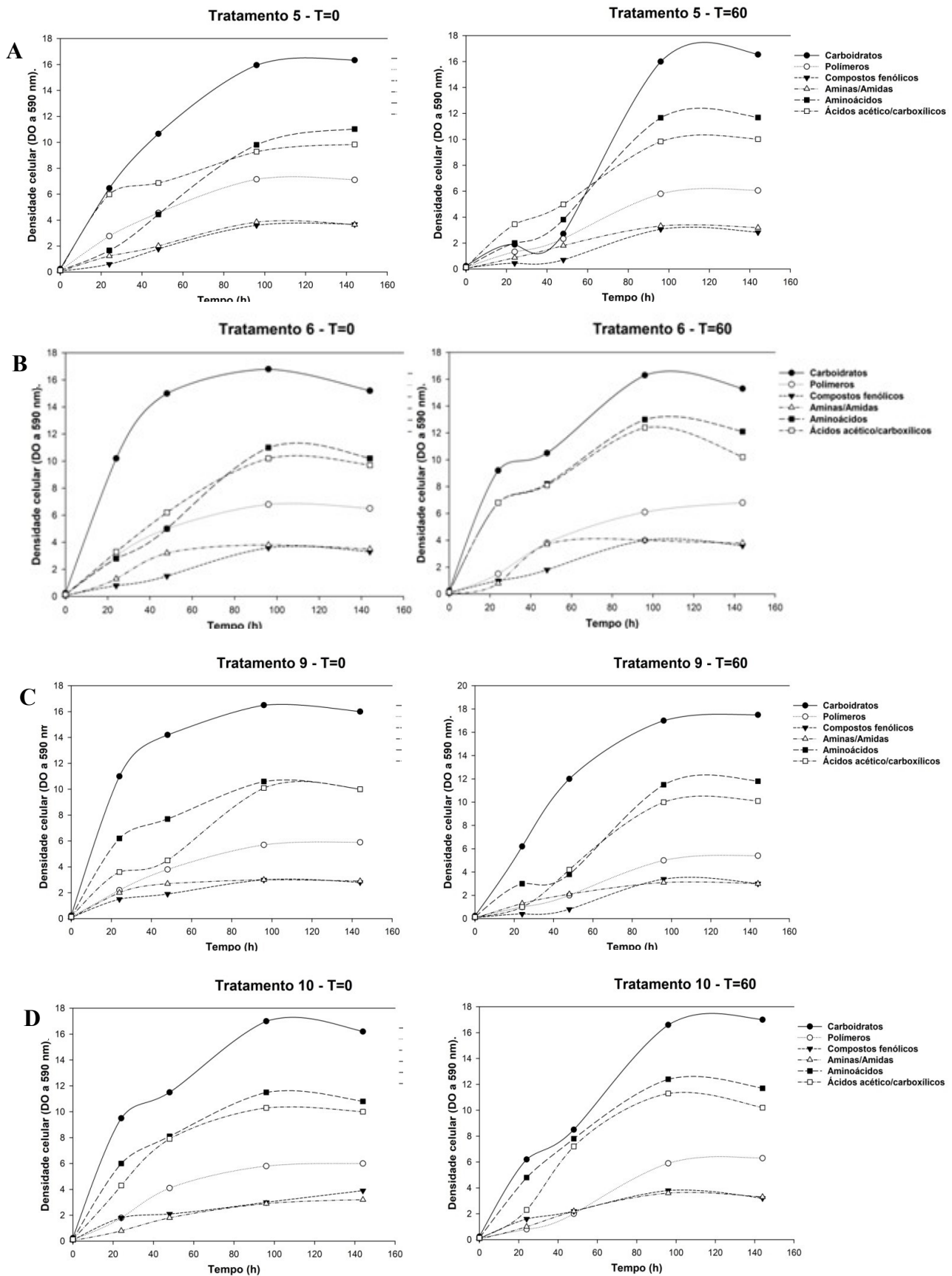


Figura 51: Padrão de utilização de carboidratos, polímeros, compostos fenólicos, amins/amidas, aminoácidos e ácidos acéticos carboxílicos, avaliado pela medida do crescimento celular (densidade ótica 590 nm) de amostras coletadas nos tempos 0 e 60 dias dos microscomos. A) Trat 5: Consórcio + nutrientes + microbiota autóctone + aeração; B) Trat 6: Consórcio + nutrientes + microbiota autóctone; C) Trat 9: Consórcio + microbiota autóctone + aeração e D) Trat 10: Consórcio + microbiota autóctone

6.9. Análises metataxonômicas das comunidades bacterianas presente nas amostras dos tratamentos de biorremediação

6.9.1) Sequenciamento dos amplicons de bactérias e alfa diversidade das amostras

No metagenoma das amostras dos tratamentos de biorremediação foi possível obter um total de 805162 reads de alta qualidade e sem a presença de singletons e quimeras (score Fred ≥ 20 e 400 pb). As curvas de rarefação geradas no software QIIME a partir de OTUs com pelo menos de 97% de similaridade também tenderam a uma assíntota, sendo possível observar a formação de platôs (Figura 52). Assim, a profundidade de sequenciamento também foi suficiente para cobrir a diversidade bacteriana das amostras dos tratamentos.

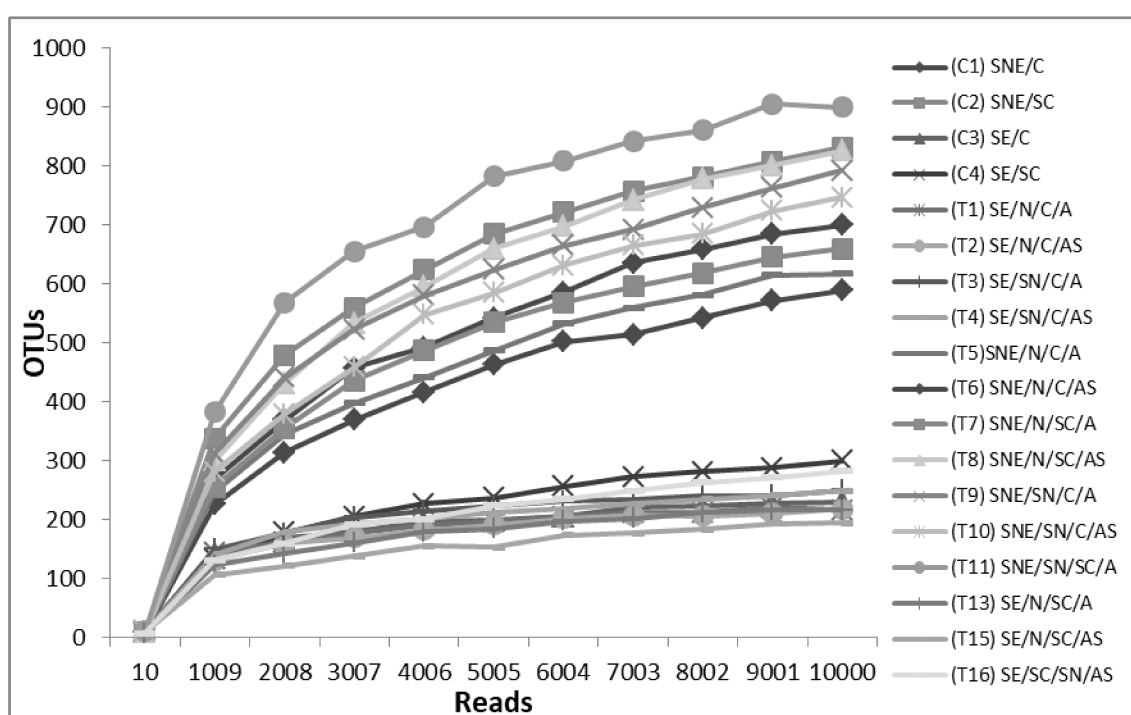


Figura 52 – A) Curvas de rarefação geradas a partir do número de OTUs observados em função dos reads sequenciados para cada amostra. Amostras com código C correspondem aos tratamentos antes da incubação ($t=0$) e amostras com o código T correspondem aos tratamentos de biorremediação após a incubação ($t=60$).

O número de reads sequenciadas que puderam ser atribuídas a alguma OTU (abundância total) variou de 4703 a 46344 entre as amostras, com uma média de 18300 reads por amostra (Tabela 23). Dentre as amostras no tempo 0 de incubação, a C1 e a C2 apresentaram um maior número de OTUs observados em relação às demais, o que já era esperado pois ambas correspondem a amostras sem esterilização, ou seja, são tratamentos iniciais que ainda mantinham a comunidade bacteriana original das amostras. O controle C4, na verdade, por corresponder a uma amostra inicial estéril e sem a adição de consórcio, não

deveria ter apresentado comunidade bacteriana, o fato de ainda ter sido detectado a presença de OTUs, mesmo que em baixo número, indica que não foi possível conseguir uma esterilização completa das amostras antes do tratamento. De modo geral, dentre os tratamentos, T11, T8, T9, T10, T6, T7 e T5 foram os que apresentaram maior número de OTUS observados (Tabela 14). Todos correspondem a tratamentos finais de biorremediação cujas amostras de sedimento não foram submetidas à esterilização antes da montagem dos mesmos, ou seja, que mantiveram a microbiota original da amostra/área. Isso fez com que a riqueza e diversidade da comunidade bacteriana desses tratamentos fosse maior em relação aos demais.

Isso pode ser confirmado pelos valores de riquezas obtidos para as amostras, considerando o estimador Chao1, assim como para a diversidade mensurada pelo índice de diversidade de Shannon, que considera as espécies raras e abundantes com o mesmo peso e o de Simpson, que considera a probabilidade de que dois indivíduos, selecionados aleatoriamente na amostra, pertençam à mesma espécie. Os maiores valores tanto de riqueza quanto diversidade também foram observados para os tratamentos T11, T8, T9, t10, T6, T5, T7 além de C2. (Tabela 23). Os tratamentos T12 e T14, ambos tratamentos nos quais as amostras foram submetidas à esterilização, apresentaram um número de reads e OTUs observadas tão baixo, que não puderam ser exploradas nessas análises.

Tabela 23: Número de reads que puderam ser atribuídos a alguma OTU, número de OTUs observados, estimadores de riqueza e índices de diversidade calculados para a comunidade de bactéria das amostras dos tratamentos de biorremediação

Amostra	Nº Reads	OTUs Observados	Estimador de Riqueza		
			Chao1	Shannon	Simpson
(C1) SNE/C	20500	539	777	6,7	0,96
(C2) SNE/SC	12491	831	1000	7,6	0,97
(C3) SE/C	34224	230	283	5,9	0,95
(C4) SE/SC	14631	300	431	5,8	0,95
(T1) SE/N/C/A	29477	216	268	5,9	0,95
(T2) SE/N/C/AS	33899	218	248	5,8	0,95
(T3) SE/SN/C/A	19685	250	301	6,0	0,96
(T4) SE/SN/C/AS	25910	249	312	6,0	0,95
(T5)SNE/N/C/A	21749	618	809	6,9	0,97
(T6) SNE/N/C/AS	14814	700	931	7,15	0,97
(T7) SNE/N/SC/A	12356	660	845	7,2	0,98
(T8) SNE/N/SC/AS	15033	826	1023	7,4	0,97
(T9) SNE/SN/C/A	17203	792	980	7,5	0,97

(T10)					
SNE/SN/C/AS	23847	747	975	7,3	0,97
(T11)					
SNE/SN/SC/A	16218	900	1044	8,4	0,99
(T13) SE/N/SC/A	12778	216	276	5,5	0,94
(T15) SE/N/SC/AS	14994	194	268	5,4	0,95
(T16)					
SE/SC/SN/AS	12966	283	399	5,5	0,94

6.9.2. Beta diversidade e perfis das comunidades de bactérias presentes nas amostras dos tratamentos de biorremediação

A análise de beta diversidade foi realizada utilizando as distâncias do UniFrac ponderado, que considera tanto as afiliações filogenéticas quanto os valores de abundância relativa das OTUs e pode ser visualizada no PCoA (Figura 53) e do unifrac não ponderado, que é sensível a presença e ausência de táxons, mas não à abundância relativa das OTUs (Figura 54). Considerando a métrica UniFrac ponderado não foi possível observar clara separação da comunidade bacteriana das amostras em função dos diferentes tratamentos de biorremediação realizados ou mesmo dos tempos de incubação. Mas foi possível observar separação da comunidade bacteriana das amostras correspondentes aos tratamentos 13, 15 e 16 em relação aos demais e as mesmas ficaram próximas da comunidade bacteriana identificada na amostra no tempo 0 de incubação C4. Todas são amostras submetidas à esterilização e nas quais não foi adicionado o consórcio, e o fato dessas amostras terem se agrupado separadas das demais sugere que isso afetou muito a comunidade dessas amostras, que provavelmente era composta apenas por alguns grupos bacterianos que sobreviveram à esterilização. Considerando a métrica UniFrac não ponderado, além de novamente ter se observado um grupamento formado pelos tratamentos C4, 13, 15 e 16 foi possível observar também um segundo grupamento formado pelos tratamentos C3, T1, T2, T3 e T4. Todas essas últimas amostras correspondem à tratamentos submetidos inicialmente à esterilização e nos quais foi adicionado o consórcio. Dessa forma, observa-se que a estrutura e principalmente a riqueza da comunidade bacteriana das amostras, em geral, foi mais influenciada pelos tratamentos aos quais elas foram submetidas, principalmente a esterilização e adição de consórcio, em relação aos demais fatores, inclusive ao período de incubação, já que não se observou separação entre as amostras antes e após a incubação. E isso corrobora as menores riquezas e diversidades calculadas para essas (Tabela 23).

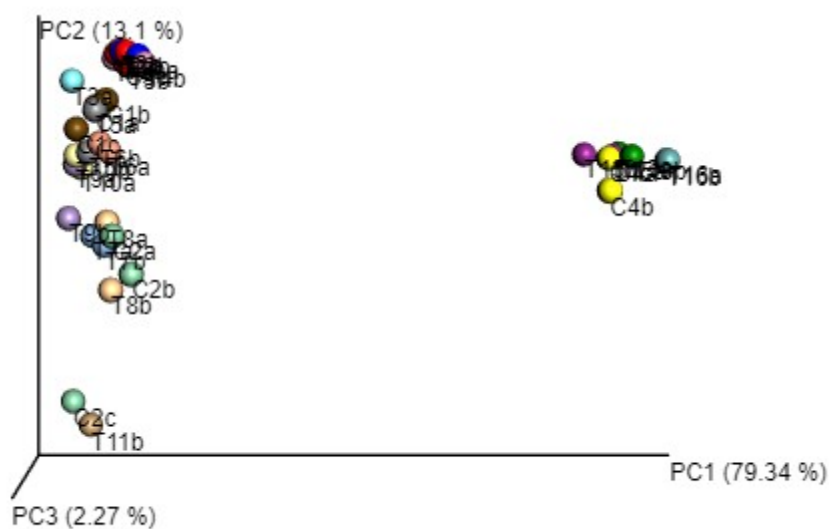


Figura 53: Gráfico Biplot da análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades bacterianas dos tratamentos de biorremediação usando métrica unifrac ponderada.

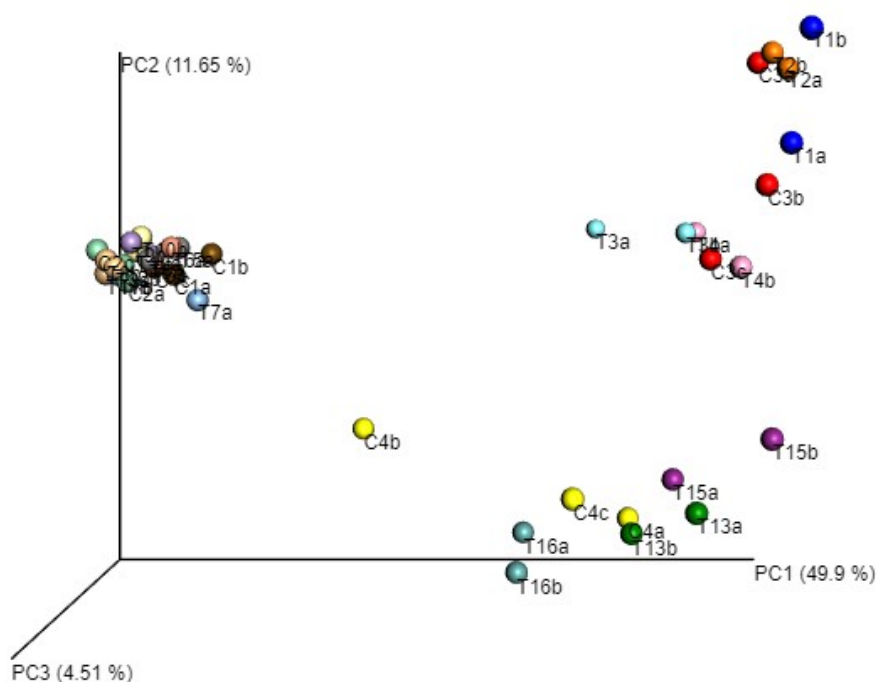


Figura 54: Gráfico Biplot da análise de coordenadas principais (PCoA) das comunidades bacterianas dos tratamentos de biorremediação usando métrica unifrac não ponderada.

Mais de 99% das reads puderam ser identificadas pelo menos ao nível taxonômico de Filo e todas foram classificadas como pertencentes ao domínio Bacteria, não tendo sido

identificado a presença de representantes do domínio Archaea, Foram identificados um total de 27 filos, 70 classes, 125 ordens, 208 famílias e 294 gêneros nas amostras dos tratamentos de biorremediação. Foi possível confirmar que, em geral, as amostras correspondentes ao mesmo grupo de tratamentos em função dos fatores esterilização e adição do consórcio, independente do tempo de incubação ($t=0$ ou $t=60$) apresentaram um perfil e predominantemente abundâncias de táxons bem mais semelhantes entre si. Assim, os grupos de amostras C1, T5, T6, T9 e T10 (solo sem esterilização e com adição de consórcio); C2, T7 e T8 (solo sem esterilização e sem adição de consórcio); C3, T1, T2, T3 e T4 (solo com esterilização e com adição de consórcio) e C4, T13, T15 e T16 (solo com esterilização e sem adição de consórcio) foram os que apresentaram mais similaridade entre elas. Uma exceção a esse padrão foi a amostra T11, que apresentou um perfil de táxons bem diferentes de todos os demais tratamentos.

Proteobacteria foi o filo mais abundante em quase todas as amostras, com abundâncias relativas acima de 50% em todas elas, com exceção das amostras C4, T13, T15 e T16, cujo filo absolutamente predominante foi o Firmicutes (Figura 20A). Essas últimas amostras foram esterilizadas e não tiveram a adição do consórcio e conforme mencionado anteriormente, não deveriam ter apresentado a presença de bactérias. O fato de isso ter ocorrido indica que a esterilização não foi capaz de eliminar todas as bactérias originalmente presentes nas amostras e que os grupos que sobreviveram a esse processo pertencem a gêneros e família não identificados da ordem Bacillales e classe Bacilli (Figura 20 B, C e D). Microrganismos desse grupo são capazes de sobreviver a condições extremas, como elevadas temperaturas, devido a sua capacidade formar endósporos de resistência (Zhuang et al., 2002). Nas demais amostras o filo Firmicutes também foi identificado, porém em abundâncias relativas bem mais baixas, próximas de 5%, assim como Acidobacteria, com abundâncias relativas em torno de 8% (Figura 55 A).

O filo Proteobacteria contém mais de 400 gêneros, compreendendo aproximadamente 30% das espécies descritas no Domínio Bacteria. É um filo que possui enorme diversidade de morfologia e fisiologia e compreende a maioria das bactérias gram-negativas de interesse médico, veterinário, industrial e agrícola (Gupta et al., 2000; Kersters et al., 2006). O filo Proteobacteria tem se mostrado predominante na maioria dos estudos com amostras ambientais. No trabalho de Yadav e colaboradores (2015), quatro amostras de águas residuárias contaminadas com diferentes hidrocarbonetos, provenientes de um complexo petroquímico, tiveram a estrutura da comunidade investigada por meio de análises metataxonômicas utilizando a plataforma Illumina TruSeq. Foi observada a predominância do

filo Proteobacteria em todas as amostras, representando em média 45% dos reads. O filo Firmicutes, também compreende gêneros e espécies amplamente distribuídas em ambientes com altas variações biogeoquímicas, incluindo solo, sedimento, água doce e marinha, sejam eles poluídos ou não (Gao & Gupta, 2005; Janssen, 2006; Ward et al., 2009). Apesar de ter sido reconhecido como filo a relativamente pouco tempo, as acidobactérias são muito difundidas e abundantes em diferentes ecossistemas do planeta, especialmente solos (Kielak et al., 2016). Entretanto, não se conhece bem o seu papel ecológico nesses ecossistemas, principalmente pelo fato de serem bactérias muito difíceis de serem cultivados pelos métodos clássicos (Bryant et al., 2007). Tem sido citado que o filo compreende microrganismos altamente adaptáveis e metabolicamente bem diversos como ocorre no filo Proteobacteria (Kielak et al., 2016).

Em relação às classes, em geral, e com exceção das amostras C4, T13, T15 e T16, Gammaproteobacteria foi a classe predominante, seguida por Alphaproteobacteria, Bacilli e Acidobacteria-6 (Figura 55B). Alphaproteobacteria costuma ser a classe do filo Proteobacteria com maior predominância de membros em amostras ambientais (Szczeplaniak et al., 2016), mas também é comum o enriquecimento da classe Gammaproteobacteria, em amostras contaminadas com derivados de petróleo (Joshi et al., 2014). Sugere-se, inclusive, que a comunidade de amostras contaminadas por HPAs seja dominada por Gamaproteobacterias nos estágios finais da remoção dos hidrocarbonetos dos ambientes contaminados (Greer et al., 2010; Szczeplaniak et al., 2016). Membros da classe Acidobacteria também já foram reportados como os dominantes em amostra de sedimento contaminadas por derramamentos de óleo no Golfo do México (Liu & Liu, 2013) e um dos grupos destacadamente enriquecidos em amostras de solos contaminadas com pireno, um HPA com grande número de anéis (Ren et al., 2015). Comumente também se relata uma grande abundância da ocorrência de bactérias da classe Bacilli em amostras ambientais em geral, principalmente contaminadas (Szczeplaniak et al., 2016).

De modo geral, a família Enterobacteriaceae foi a mais predominante em todas as amostras, com exceção das amostras C4, T13, T15 e T16, seguida em predominâncias menores por uma família não identificada da ordem Rhizobiales e as famílias Rhizobiaceae, Pseudomonadaceae, Xanthomonadaceae, Chthoniobacteraceae, Comamonadaceae, Burkholderiaceae, Rhodospirillaceae e Alcaligenaceae (Figura 55C). Bactérias da família Enterobacteriaceae são muito comumente encontradas no meio ambiente e já foram isoladas de diversas amostras ambientais, tais como solo, sedimentos, efluentes, lodo, sejam elas contaminadas ou não, e até mesmo e diretamente a partir de óleo bruto. Elas também já

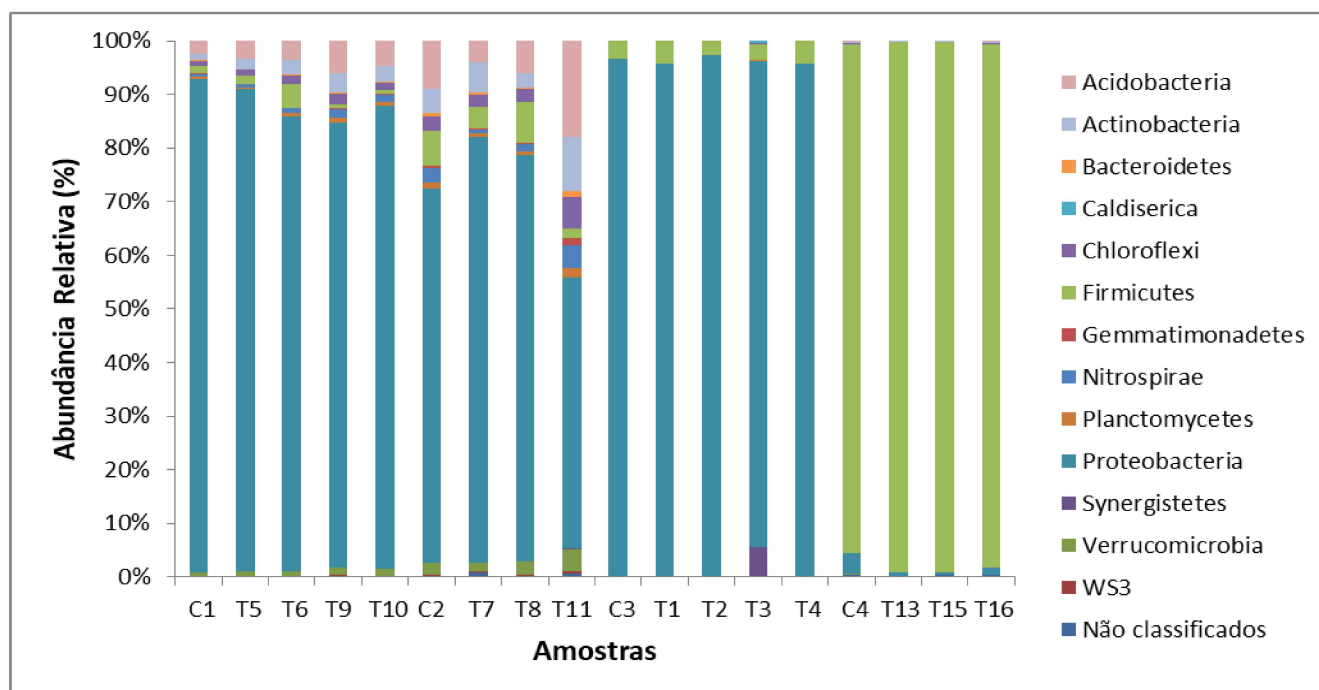
demonstraram crescimento elevado em meios minerais pobres suplementados com hidrocarbonetos (Calvo et al., 2006). Quanto às demais famílias todas também são famílias de bactérias comumente presentes, descritas e isoladas de amostras ambientais.

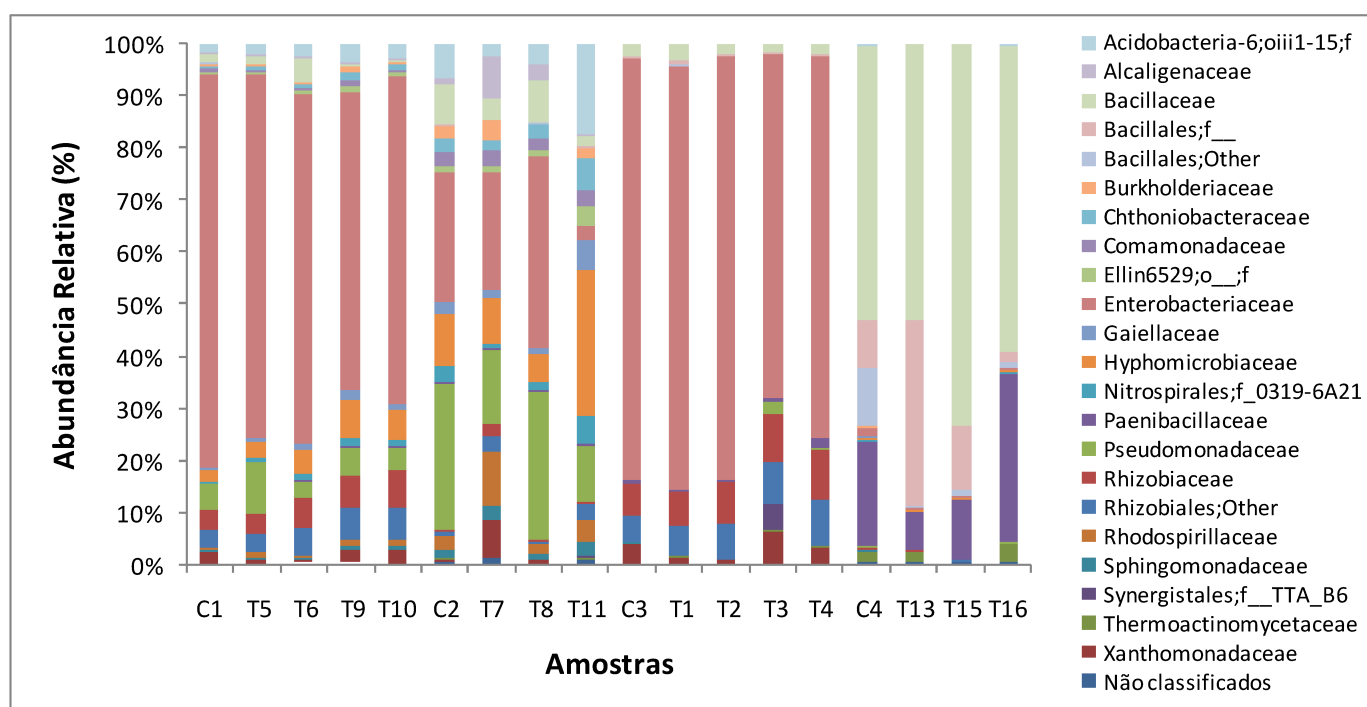
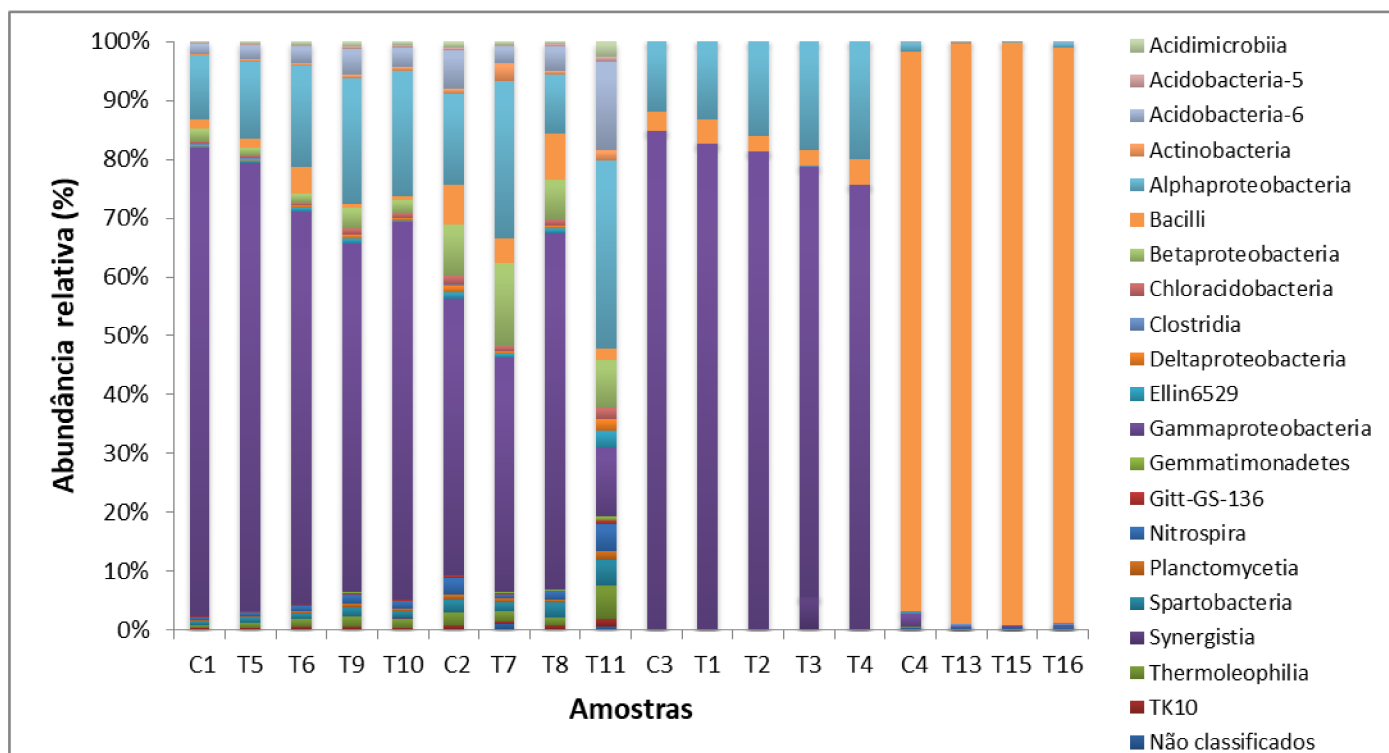
Em relação aos gêneros já se consegue perceber de forma mais pronunciada a diferença no perfil das amostras dos mesmos grupos de tratamentos considerando os fatores esterilização e adição do consórcio. No grupo formado pelas amostras C1, T5, T6, T9 e T10 (solo sem esterilização e com adição de consórcio) observa-se a predominância de dois gêneros não identificados da família Enterobacteriaceae (abundância relativa média de 43 e 11%), um gênero não identificado da família Rhizobiaceae (4,48%), um gênero não identificado da classe Acidobacteria-6 (2,55%) e um da família Xanthomonadaceae (1,16), além dos gêneros *Pseudomonas* (5,28%), *Rodoplanes* (2,74%), *Erwinia* (2,66%), *Bacillus* (1,55%), *Citrobacter* (2,17%) e *Comamonas* (0,52%) (Figura 55D). Como uma parte desses gêneros, tais como *Pseudomonas* e *Bacillus*, também foi isolada a partir das amostras da área, os resultados metataxonômicos confirmam a presença e dominância desses grupos no ambiente contaminado. Adicionalmente, dentre os microrganismos adicionados nessas amostras na forma do consórcio microbiano, haviam isolados dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Comamonas*, um isolado da espécie *Stenotrophomonas maltophilia*, que pertence à família Xanthomonadaceae, e também um isolado do gênero *Enterobacter*, da família Enterobacteriaceae. Isso confirma que a adição do consórcio foi capaz de promover o enriquecimento desses isolados degradadores nas amostras, principalmente quando comparados aos gêneros predominantes nas amostras também não estéreis, porém sem a adição do consórcio, nos quais esses gêneros também foram identificados, porém em abundâncias menores. Nesse grupo último grupo, formado pelas amostras C2, T7 e T8 (solo sem esterilização e sem adição de consórcio) observa-se, por exemplo, a predominância do gênero *Pseudomonas* (19,86%), gêneros da família Enterobacteriaceae (9 e 8%) *Bacillus* (5,42%), *Serratia* (4,52%), *Rodoplanes* (4,19%) e um gêneros não identificado da família Rhodospirillaceae (4,24%) (Figura 55D).

No grupo formado pelas amostras C3, T1, T2, T3 e T4 (solo com esterilização e com adição de consórcio), como era esperado, observa-se que alguns dos gêneros predominantes correspondem aos gêneros dos microrganismos que compunham o consórcio inoculado ou gêneros não identificados das famílias desses microrganismos. Sendo eles, principalmente, gêneros não identificados da família Enterobacteriaceae (54 e 14%). Por fim no grupo formado pelas amostras C4, T13, T15 e T16 (solo com esterilização e sem adição de consórcio), os gêneros dominantes foram completamente diferentes dos observados nos

outros grupos, nessas amostras como já comentado, a predominância foi de isolados formadores de endósporos de gêneros da ordem Bacilales, principalmente *Bacillus* (39%), *Geobacillus* (19%), *Brevibacillus* (6,85%), *Paenibacillus* (2,23%) e um gênero não identificado dessa ordem (14%).

Assim, de modo geral, a partir das análises metataxonômicas foi possível determinar que os fatores nutrientes e aeração não afetaram muito a comunidade bacteriana das amostras, diferente dos fatores esterilização e adição e consórcio, que foram capazes de modular completamente essas comunidades. Esses resultados corroboram com os observados para os ensaios de biorremediação apresentados no tópico anterior, nos quais foi possível determinar que a adição do consórcio e a presença de microrganismos autóctones na amostra (não esterilização) foram os fatores que afetaram de forma positiva e significativa a eliminação do contaminante. Adicionalmente, também foi possível confirmar que a adição do consórcio foi capaz de promover o enriquecimento da população desses isolados degradadores nas amostras, sendo possível observar nos tratamentos de biorremediação que apresentaram os melhores resultados de eliminação do contaminante apresentados anteriormente (T6, T10, T5, T9, T7 e T11), uma alta proporção desses gêneros degradadores adicionados, tais como *Pseudomonas*, *Bacillus* e gêneros da família Enterobacteriaceae.





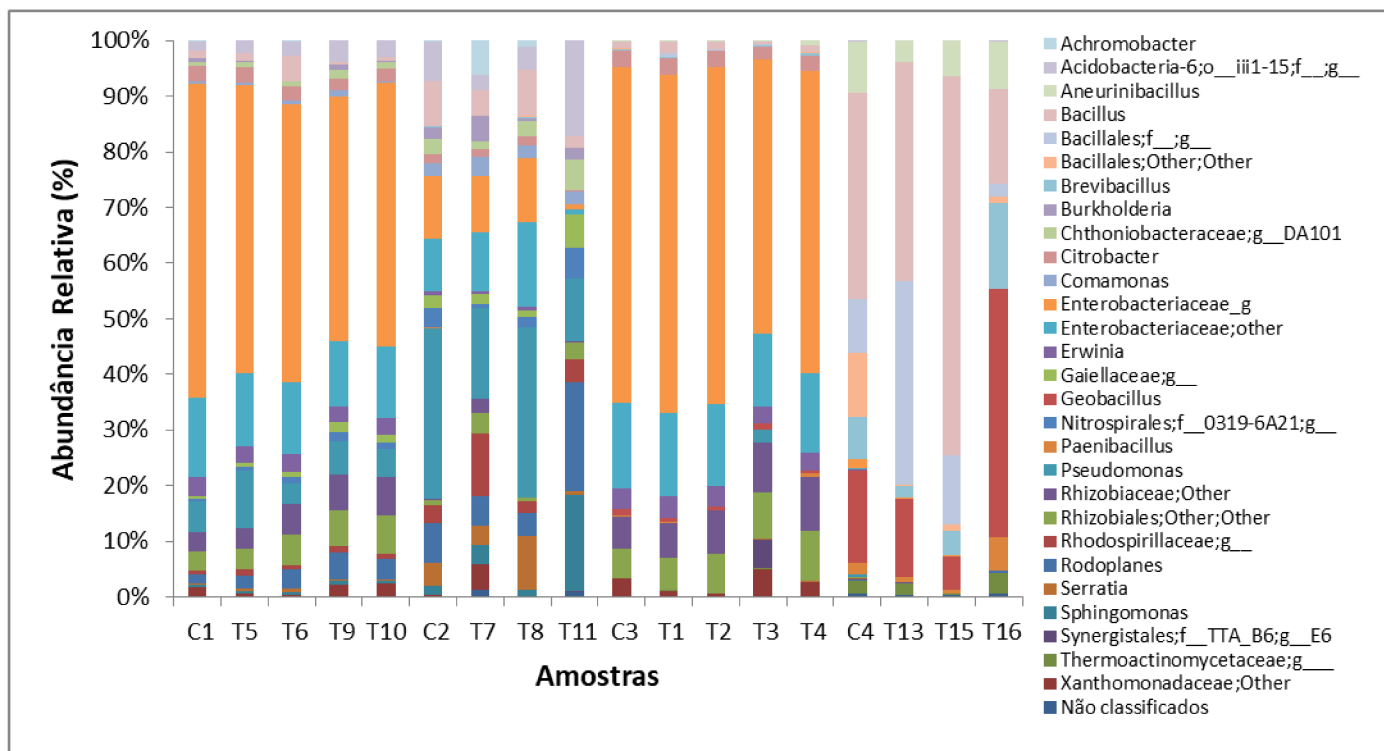


Figura 55: Abundância relativa de (A) Filos; (B) Classes, (C) Famílias e (D) Gêneros presentes nas amostras dos tratamentos de biorremediação. Os táxons presentes em pelo menos uma amostra com abundância relativa maior que 0,5% foram considerados.

7) CONCLUSÕES

Parte 1. Diversidade de bactérias presentes em amostras de fração líquida de aquífero contaminadas com diferentes concentrações de creosoto, utilizando abordagens independentes de cultivo.

Na análise da contaminação por COV e COSV dos poços das frações líquidas do aquífero amostrados, os poços PP20, PP206 e PM211 puderam ser classificados como altamente contaminados, os poços PP207, PM208 e PP203 como poços sem contaminação e os poços PP29 e PP223 como poços com contaminação intermediária.

De modo geral, as amostras com alta contaminação apresentaram menores riquezas e alfa diversidade que as amostras sem contaminantes. No nível de Filo, observou-se predominância do filo Proteobacteria em todas as amostras, mas nos níveis de classes, famílias e gêneros as amostras apresentaram perfis variados, sendo as amostras PP211 e PP206, ambas altamente contaminadas, as que compartilharam o maior número de gêneros em comum. Em relação a beta diversidade, houve a formação de um grupo constituído pelas três amostras sem contaminação (PP203, PP207 e PM208) e um grupo formado pelas amostras PM211 e PP206. Foi possível confirmar o efeito dos níveis e principais grupos de hidrocarbonetos presentes na estruturação da comunidade de bactérias das amostras, sendo que os taxa mais enriquecidos nessas amostras contaminadas foram as famílias Porphyromonadaceae, Gemmataceae e Comamonadaceae e os gêneros *Treponema*, *Geobacter*, *Bdellovibrio*, *Hydrocarboniphaga*, *Anaerolinea*, *Paulidibacter*, *Comamonas* e *Desulfomonille*. Obteve-se a inferência de uma proporção maior de vias e enzimas de degradação de compostos xenobióticos nas amostras altamente contaminadas em comparação com as demais.

As amostras também apresentaram perfis distintos e influenciados pela presença dos contaminantes de acordo com a técnica de DGGE, com a formação de um grupo constituído pelas amostras PP20, PP203, PP207, PP223 e PP29 e outro pelas amostras PP206 e PM211, padrão semelhante ao observado nas análises metatxonômicas. Dentre as bandas seqüenciadas, também foram identificadas seqüências de vários grupos bacterianos enriquecidos pela presença dos contaminantes, de acordo com as análises metatxonômicas. A quantificação por qPCR demonstrou que as bactérias são numericamente dominantes nas amostras de fração líquida de aquífero e a densidade de bactérias das amostras PP206 e PM211 também é menor que as demais.

Parte 2. Diversidade e prospecção de bactérias presentes em sedimentos contaminados com diferentes concentrações de creosoto utilizando abordagens dependentes e independentes de cultivo.

As amostras de sedimentos coletadas apresentaram perfis das características físico-químicas, incluindo os níveis de HPAs, diferenciados.

Novamente por meio das análises metataxonômicas foi possível observar a influência negativa dos contaminantes nos parâmetros riqueza e diversidade bacteriana nas amostras. Foi possível confirmar também alteração do perfil da comunidade bacteriana em função da concentração de contaminantes, com o enriquecimento de táxons específicos na amostra com alta contaminação S138, incluindo representantes da classe Gammaproteobacteria e bactérias do filo Acidobacteria, principalmente as famílias Koribacteraceae, Thermodesulfobibrionaceae e o gênero *Candidatus Koribacter*. De forma mais sutil também obteve-se a predição de uma proporção maior de algumas vias e enzimas de degradação de compostos xenobióticos na amostra altamente contaminada em comparação com as demais.

A alteração do perfil da comunidade em função do nível de contaminação também foi mostrada pela PCR-DGGE e foi possível observar a formação de um grupo constituído pelas amostras S129, S109 e S102. A amostra S144 e a amostra S138, que possui a maior concentração de contaminantes dentre todas, não se agruparam com as demais. Dentre as bandas seqüenciadas foram identificadas seqüências do gênero *Bacillus* e das classes Acidobacteria e Actinobacteria, grupos também identificados por meio das análises metataxonômicas.

A quantificação por qPCR mostrou que não houve variação estatística entre a densidade de células bacterianas nas amostras e não foi detectada a presença de arqueas em nenhuma das amostras de sedimentos.

Os isolados obtidos a partir das amostras de sedimentos e identificados englobaram bactérias pertencentes a 10 gêneros diferentes: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Sphingobacterium*, *Comamonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter*, *Leucobacter* e *Enterococcus*.

Um grupo formado pelos isolados identificados como *Comamonas terrigena* (3FM6; 3FM8, 3FM9), *Springobacterium sp.* (1FM2, 5FM2), *Bacillus sp.* (2FM2, LAPM39 e LAPER93), *Pseudomonas sp.* 3C10M3, *Acinetobacter junii* LAPM30, *Pseudomonas plecoglossicida* 3FM5, *Bacillus subtilis* LAPER93, *Stenotrophomonas maltophilia* LAPER 27

e *Enterobacter sp* 4FM2 foram os que degradaram os 12 principais compostos presentes no creosoto e esse contaminante, como um todo, nas maiores porcentagens, acima de 30%.

Após avaliar esses melhores isolados quanto à degradação de creosoto na matriz de sedimentos determinou-se que o consórcio bacteriano a ser testado como inoculante seria composto por *Stenotrophomonas maltophilia* LAPER27, *Comamonas terrigena* 3FM8, *Springobacterium sp.* 5FM2, *Pseudomonas sp.*3C10M3, *Bacillus sp.*(2FM2, LAPM39), *Bacillus subtilis* LAPER93 e *Enterobacter sp.*4FM2. Após ensaios de remediação com amostras de 300 g dos sedimentos contaminados com 0,25% (v/v) de creosoto em condições de bioestimulação com variação dos fatores aeração, nutrientes e presença da microbiota autóctone, bioaugmentação ou não com o consórcio e atenuação natural em ensaios de microcosmo por um período de 60 dias, foi possível confirmar que a adição do consórcio e a presença de microrganismos autóctones na amostra (não esterilização) afetaram de forma positiva e significativa a degradação de creosoto. Assim como a interação da aeração com esses fatores.

Foi possível obter, nos melhores tratamentos de biorremediação realizados no presente estudo, valores médios de remoção do contaminante acima de 90%. Os mesmos possuíam também as maiores densidades de bactérias degradadoras de creosoto de acordo com a técnica de NMP g^{-1} , além de um perfil metabólico-funcional de consumo das fontes do sistema Biolog-ECOPLATE diferenciado.

Os resultados, em geral, demonstram que a área em estudo é candidata a remediação *in situ* baseada em microrganismos por meio de bioestimulação, uma vez que apresenta bactérias com alto potencial catabólico tanto na fração líquida de aquífero quanto no sedimento da lagoa. Porém destaca-se a significância e o aumento na degradação média de creosoto em todos os tratamentos nos quais houve a bioaugmentação com o consórcio desenvolvido, inclusive naqueles onde havia a presença dos microrganismos autóctones, o que sugere que o inoculante é capaz de otimizar ainda mais o processo de biorremediação. Assim, sugerimos o uso dessas condições para a biorremediação *in situ* da área da estação de tratamento de dormentes contaminados com creosoto.

8) REFERÊNCIAS

- ABT, B.; GÖKER, M.; SCHEUNER, C.; HAN, C.; LU, M.; MISRA, M.; DESHPANDE, S. Genome sequence of the thermophilic fresh-water bacterium *Spirochaeta caldaria* type strain (H1 T), reclassification of *Spirochaeta caldaria*, *Spirochaeta stenostrepta* and *Spirochaeta zuelzeri* in the genus *Treponema* as *Treponema caldaria* comb. nov., *Treponema stenostrepta* comb. nov., and *Treponema zuelzeri* comb. nov., and emendation of the genus *Treponema*. *Standards in genomic sciences*, v.8, p.88, 2013.
- ABBASIAN, F., PALANISAMI, T., MEGHARAJ, M., NAIDU, R., LOCKINGTON, R., & RAMADASS, K. Microbial diversity and hydrocarbon degrading gene capacity of a crude oil field soil as determined by metagenomics analysis. *Biotechnology Progress*, 32(3), 638-648, (2016).
- ABBOTT, B. J., & CLAMEN, A. The relationship of substrate, growth rate, and maintenance coefficient to single cell protein production. *Biotechnology and bioengineering*, 15(1), 117-127, 1973.
- ABERCROM, 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*, 7, 1775, 2016.
- ABURTO, A. & BALL, A. S. Bacterial population dynamics and separation of active degraders by stable isotope probing during benzene degradation in a BTEX-impacted aquifer. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 25, 2009.
- ACOSTA-GONZÁLEZ, A.; MARQUÉS, S. Bacterial diversity in oil-polluted marine coastal sediments. *Current opinion in biotechnology*, v. 38, p. 24-32, 2016.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Toxicological profile for creosote, coal tar creosote, coal tar, coal tar pitch and coal tar pitch volatiles. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, 2002.
- AKBARI, A. & GHOSHAL, S. Effects of diurnal temperature variation on microbial community and petroleum hydrocarbon biodegradation in contaminated soils from a sub-Arctic site. *Environ. Microbiol.* 17, 4916-4928 2015.
- ALAMRI, S.A. Use of microbiological and chemical methods for assessment of enhanced hydrocarbon bioremediation, *Journal of Biological Sciences*, v. 9, p. 37-43, 2009.
- ALFREIDER, A., VOGT, C., & BABEL, W. Microbial diversity in an in situ reactor system treating onochlorobenzene contaminated groundwater as revealed by 16S ribosomal DNA analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2), 232-240, 2002.
- ALLWARD, N. E., GREGORY, B. S., SOTDDART, A. K., & GAGNON, G. A. Potential for manganese biofouling in water transmission lines using model reactors. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 4(6), 761-772, 2018.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, v. 25(17), p. 3389-3402, 1997.

ALVES, L.; MESQUITA, E.; GÍRIO, F.M. Dessulfurização bacteriana de combustíveis fósseis. *Biotecnologia Ambiental*, n. 62, p. 3-8, 1999.

ALVES, N.L.S. Caracterização da diversidade de bactérias degradadoras de creosoto e potencial aplicação na biorremediação de sedimentos contaminados. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

AITKEN, M. D., STRINGFELLOW, W. T., NAGEL, R. D., KAZUNGA, C., & CHEN, S. H. Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian journal of microbiology*, 44(8), 743-752, 1998.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. PHYLOGENETIC identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, v. 59, p. 143-169, 1995.

ANDRADE, J.A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I.C.S.F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*, v. 35, p. 17-43, 2010.

ANDREONI, V.; GIANFREDA, L. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 76, p. 287-308, 2007.

ANNWEILER, E.; RICHNOW, H. H.; ANTRANIKIAN, G.; HEBENBROCK, S.; GARMS, C.; FRANKE, S.; MICHAELIS, W. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the *thermophilebacillus thermoleovorans*. *Applied and environmental microbiology*, v. 66(2), p. 518-523, 2010.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas sp.* 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 95, p. 23-29, 2012.

ARORA, P.K.; BAE, H. Integration of bioinformatics to biodegradation. *Biological procedures online*, v. 16(1), p. 8, 2014.

ARVIN, Erik; FLYVBJERG, J. Groundwater pollution arising from the disposal of creosote waste. *Water and Environment Journal*, v. 6, n. 2, p. 646-651, 1992.

ASKER, D.; BEPPU, T.; UEDA, K. *Nubsella zeaxanthinifaciens* gen. nov., sp. nov., a zeaxanthin-producing bacterium of the family Sphingobacteriaceae isolated from freshwater. *Int. Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, v.58, p.601-606, 2008

ASQUITH, E.A.; GEARY, P.M.; NOLAN, A.L.; EVANS, C.A. Comparative Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Biostimulation, bioaugmentation and surfactant addition. *Journal of Environmental Science and Engineering*, v. 1, p. 637-365, 2012.

ATAGANA, HARRISON IFEANYICHUKWU; HAYNES, R. J.; WALLIS, F. M. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Biodegradation*, v. 14, n. 4, p. 297-307, 2003.

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

ATLAS, R.M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin Oxford*, v. 31, p. 178-182, 1995.

AUFFRET, M. D., YERGEAU, E., LABBÉ, D., FAYOLLE-GUICHARD, F., & GREER, S. N. Changes in soil Acidobacteria communities after 2, 4, 6-trinitrotoluene contamination. *FEMS microbiology letters*, 296(2), 159-166, 2009.

AUFFRET, M. D., YERGEAU, E., LABBÉ, D., FAYOLLE-GUICHARD, F., & GREER, C. W. Importance of *Rhodococcus* strains in a bacterial consortium degrading a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives revealed by metatranscriptomic analysis. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(5), 2419-2430, 2015.

BADGLEY, B. D., THOMAS, F. I., & HARWOOD, V. J. The effects of submerged aquatic vegetation on the persistence of environmental populations of *Enterococcus* spp. *Environmental microbiology*, 12(5), 1271-1281, 2010.

BAKER, K.H.; HERSON, D.S., *Microbiology and Biodegradation*. USA, cap. 2, p. 11-60, 1994., v. 12, p. 179–188, 2001.

BAKER, G.C.; SMITH, Jacques J.; COWAN, D.A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of microbiological methods*, v. 55, n. 3, p. 541-555, 2003.

BALASHOVA, N. V., STOLZ, A., KNACKMUSS, H. J., KOSHELEVA, I. A., NAUMOV, A. V., & BORONIN, A. M. Purification and characterization of a salicylate hydroxylase involved in 1-hydroxy-2-naphthoic acid hydroxylation from the naphthalene and phenanthrene-degrading bacterial strain *Pseudomonas putida* BS202-P1. *Biodegradation*, 12(3), 179-188, 2001.

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.

BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI I.; BESTETTI, G.; Martinotti M.G.; Fracchia L.; Smyth T.J.; Marchant, R. MINI-REVIEW: Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied and Microbiology Biotechnology*, v. 87, p. 427–44, 2010.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, p. 495-508, 2000.

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.

BECKER, L.; MATUSCHEK, G.; LENOIR, D.; KETTRUP, A. Leaching behavior of wood treated with creosote. *Chemosphere*, v. 42, p. 301-308, 2001.

BENEDEK, T., VAJNA, B., TÁNCSICS, A., MÁRIALIGETI, K., LÁNYI, S., & MÁTHÉ, I. Remarkable impact of PAHs and HTPs on the richness and diversity of bacterial species in surface soils exposed to long-term hydrocarbon pollution. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29(11), p. 1989-2002, 2013.

BENEDIK, M.J.; GIBBS, P.R.; RIDDLE, R.R.; WILLSON, R.C. "Microbial denitrogenation of fossil fuels", *Trends in Biotechnology*, v. 16, n. 9, p. 390-395, 1998.

BERRY, D.; MAHFOUDH, K.B.; WAGNER, M.; LOY, A. Barcoded primers used in multiplex amplicon pyrosequencing bias amplification. *Applied and environmental microbiology*, v. 77(21), p. 7846-7849, 2011.

- BIEBL, HANNO; PFENNIG, NORBERT. Isolation of members of the family Rhodospirillaceae. In: The prokaryotes. Springer Berlin Heidelberg, p. 267-273, 1981.
- 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.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. Um método rápido para a extração total de lipídeos e de purificação. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911-917, 1959.
- BLUM, P.; SAGNER, A.; TIEHM, A.; MARTUS, P.; WENDEL, T.; GRATHWOHL, P. Importance of heterocyclic aromatic compounds in monitored natural attenuation for coal tar contaminated aquifers: A review. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 126, p. 181-194, 2011.
- BOJES, H.K.; POPE, P.G. CHARACTERIZATION OF EPA's 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tank bottom solids and associated contaminated soils at oil exploration and production sites in Texas. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 47, p. 288-295, 2007.
- BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria. In G.M. Garrity. Vol. 1: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Springer-Verlag, New York, 2001
- BOON, N., GORIS, J., DE VOS, P., VERSTRAETE, W., & TOP, E. M. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosteroni* strain, I2gfp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(7), 2906-2913, 2000.
- BOUCHEZ, M.; BLANCHET, D.; VANDECASTEELE, J. P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 43, p. 156-164, 1995.
- BOUHAJJA, E., MCGUIRE, M., LILES, M. R., BATAILLE, G., AGATHOS, S. N., & George, I. F. (2017). Identification of novel toluene monooxygenase genes in a hydrocarbon-polluted sediment using sequence-and function-based screening of metagenomic libraries. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(2), 797-808, 2017.
- BOWMAN, John P.; NICHOLS, David S.; MCMEEKIN, Tom A. *Psychrobacter glacincola* sp. nov., a halotolerant, psychrophilic bacterium isolated from Antarctic sea ice. *Systematic and applied microbiology*, v. 20, n. 2, p. 209-215, 1997.
- 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.
- BRIONES, A. Estimating microbial population counts by “most probable number” using Microsoft Excell. *Journal of Microbiological Methods*, v. 32, p. 272-280, (1999).
- BROEKAERT, K.; NOSEDA, B.; HEYNDRICKX, M.; VLAEMYNCK, G.; DEVLIEGHERE, F. Volatile compounds associated with *Psychrobacter* spp. and *Pseudoalteromonas* spp., the dominant microbiota of brown shrimp (*Crangon crangon*) during aerobic storage. *International journal of food microbiology*, 166(3), 487-493, 2013.

- BRYANT, D. A., COSTAS, A. M. G., MARESCAM, J. A., CHEW, A. G., KLATT, C. G., BATESON, M. M., ET AL. *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*: an aerobic phototrophic acidobacterium. *Science* 317, 523–526, 2007.
- BUNDY, J. G.; PATON, G. I.; CAMPBELL, C. D. Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. *Journal of Applied Microbiology*, v. 92, n. 2, p. 276–288, 2002.
- CALDWELL, D.R. MICROBIAL PHYSIOLOGY AND METABOLISM. 2nd ed. Belmont: Star, 2000. 403p.
- CALVO, C.; TOLEDO, F.L.; GONZÁLEZ-LOPEZ, J. Surfactant activity of naphthalene degrading *Bacillus pumilus* strain isolated from oil sludge. *Journal of Biotechnology*, v. 109, p. 255–262, (2004).
- CAMARGO, O.A.; MONIZ, A.C.; JORGE, J.A.; VALADARES, J.M.A.S. Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agronômico de Campinas. Campinas, Instituto Agronômico, 94p. (Boletim Técnico, 106), 1986.
- CAMARGO-DE-MORAIS, M. M.; RAMOS, S. A. F.; PIMENTEL, M. C. B.; MORAIS-JUNIOR, M. A.; LIMA-FILHO, J. L. Production of an extracellular polysaccharide with emulsifier properties by *Penicillium citrinum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.19, p.191-194, 2003.
- 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.
- CANADIAN ENVIRONMENTAL PROTECTION ACT. Priority Substances List Assessment Report. Creosote-impregnated waste materials. Ottawa, Ontario: Minister of Supply and Service; 1993. p. 25.
- CAO, BIN; NAGARAJAN, KARTHIGA; LOH, KAI-CHEE. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 85, n. 2, p. 207-228, 2009.
- CAPORASO.; J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F. D.; COSTELLO, E. K.; HUTTLEY, G. A. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, v. 7(5), p. 335-336, 2010.
- CARCIONE, J. M., SERIANI, G. & GEI, D. Acoustic and electromagnetic properties of soils saturated with salt water and NAPL. *J. Appl. Geophy.* 52, 177-191, 2003.
- CARDINALI-REZENDE, J.; COLTURATO, L. F.; COLTURATO, T. D.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M.; SANZ, J. L. Prokaryotic diversity and dynamics in a full-scale municipal solid waste anaerobic reactor from start-up to steady-state conditions. *Bioresource technology*, v. 119, p. 373-383, 2012.
- CARDONA, S.; ITURBE, R. Biodegradación de diesel mexicano por un consorcio de bacterias de un suelo agrícola. *DYNA*, 138, 13- 26, 2003.
- CARVALHAIS, L.C.; DENNIS, P.G.; TYSON, G.W.; SCHENK, P.M. APPLICATION of metatranscriptomics to soil environments. *Journal of Microbiology Methods*, v. 91, p.246–251, 2012.

- CASTRO, S.P. Avaliação da aplicabilidade de processos biológicos no tratamento de efluentes oleosos com elevada carga orgânica. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual da Paraíba, 2009.
- CATÃO, E. C., LOPES, F. A., ARAÚJO, J. F., DE CASTRO, A. P., BARRETO, C. C., BUSTAMANTE, M., ... & KRÜGER, R. H. Soil acidobacterial 16S rRNA gene sequences reveal subgroup level differences between savanna-like cerrado and Atlantic forest Brazilian biomes. *International journal of microbiology*, 2014, 2014.
- CEBRON, A.; NORINI, M.; BEGUIRISTAIN, T.; LEYVAL, C. Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDa) genes from gram positive and gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methodes*, v. 73, p. 148-159, 2008.
- CERNIGLIA, C.E. Biodegradation Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* , v. 4, p. 331–338, 1993.
- CHADHAIN, S. M. N., NORMAN, R. S., PESCE, K. V., KUKOR, J. J., & ZYLSTRA, G. J. Microbial dioxygenase gene population shifts during polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(6), 4078-4087, 2006.
- CHAUDHARY, P., SHARMA, R., SINGH, S. B., & NAIN, L. Bioremediation of PAH by *Streptomyces* sp. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 86(3), 268-271, 2011.
- 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. *Journal of Environmental Management*, v. 181,p. 728-736, 2016.
- CHAUHAN, A.; FAZLURRAHMAN; OAKESHOTT, J.G.; JAIN, R.K. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, v. 48, p. 95–113, 2008.
- CHEN, C.; ZHENG, Q.; WANG, Y. N.; YAN, X. J.; HAO, L. K.; DU, X.; JIAO, N. *Stakelama pacifica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Sphingomonadaceae isolated from the Pacific Ocean. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 60(12), p 2857-2861, 2010
- CHIKERE, C. B., & FENIBO, E. O. Distribution of PAH-ring hydroxylating dioxygenase genes in bacteria isolated from two illegal oil refining sites in the Niger Delta, Nigeria. *Scientific African*, 1, e00003, 2018.
- CHOI, K-H.; DOBBS, F.C. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, v. 36, p. 203–213, 1999.
- CHOPADE, B.A.; SATPUT, S.K.; BANAT, I.M.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANPURKAR, A.G. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 436-450, 2010.
- CLARK, L. Hydrocarbon pollution control and remediation of groundwater: a brief review. *J. Eng. Geol. Hydrogeol.* 28, (Supplement 2), S93-S100, 1995.

COLWELL, R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 18, p. 302-307, 1997.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Directive 2001/90/EC. *Official Journal of the European Communities, Legis, L*, 283:41, 2001. Cooper Sr, Andre R. Cooper's toxic exposures desk reference with CD-ROM. CRC Press, 1996. copies of a temavo-Laureau, C.; Hernandez-Raquet, G.; Vitte, I.; Jézéquel, R.; Bellet, V.; Godon, J-J.; Caumette, P.; Balaguer, P.; Duran, R. Role of environmental fluctuations and microbial diversity in degradation of hydrocarbons in contaminated sludge. *Research in Microbiology*, v. 162, p. 888-895, 2011.

CRAVO-LAUREAU, C., HERNANDEZ-RAQUET, G., VITTE, I., JÉZÉQUEL, R., BELLET, V., GODON, J. J., & DURAN, R. Role of environmental fluctuations and microbial diversity in degradation of hydrocarbons in contaminated sludge. *Research in microbiology*, 162(9), 888-895, 2011.

DAANE, L.L.; HARJONO, I.; ZYLSTRA, G.J.; HAGGBLOM, M.M. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl Environ Microbiol* 67, 2683–2691, 2001

DADOS, A.; OMIROU, M.; DEMETRIOU, K.; PAPASTEPHANOU, C.; LOANNIDES, M. L. Rapid remediation of soil heavily contaminated with hydrocarbons: a comparison of different approaches. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg and the University of Milan, 2014.

DAGHIO, M.; TATANGELO, V.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; PAPACCHINI, M.; CAREGHINI, A.; BESTETTI, G. Hydrocarbon degrading microbial communities in bench scale aerobic biobarriers for gasoline contaminated groundwater treatment. *Chemosphere*, v. 130, p. 34-39, 2015.

DANIEL, R. The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology*, v.3(6), p.470-478, 2005.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1191–1199, 2007.

DAS, N., & CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: an overview. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 25(1), p. 165-186, 2008.

DAS, R., & KAZY, S. K. Microbial diversity, community composition and metabolic potential in hydrocarbon contaminated oily sludge: prospects for in situ bioremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(12), 7369-7389, 2014.

DEBENPORT, S. J., ASSIGBETSE, K., BAYALA, R., CHAPUIS-LARDY, L., DICK, R. P., & GARDENER, B. B. M. Association of shifting populations in the root zone microbiome of millet with enhanced crop productivity in the Sahel region (Africa). *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(8), 2841-2851, 2015.

DEL PANNO, M.T.; MORELLI, I.S.; ENDELEN, B.; BERTHE-CORTI, L. Effect of petrochemical sludge concentrations on microbial communities during soil bioremediation *FEMS Microbiol. Ecol*, 53: 305-316, 2005.

- DENOME, S. A.; OLSON, E. S.; YOUNG, K. D. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus sp.* Strain IGTS8. *Environmental Microbiologic*, p. 2837 – 2843, 1993.
- DERRY, A. M.; STADDON, W. J.; TREVORS, J. T. Functional diversity and community structure of microorganisms in uncontaminated and creosote-contaminated soils as determined by sole-carbon-source-utilization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 14, n. 4, p. 571-578, 1998.
- DESAI, C.; PATHAK, H.; MADAMWAR, D. Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. *Bioresource technology*, v. 101(6), p. 1558-1569, 2010.
- DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their comercial application. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 61, p. 47-74, 1997.
- DEVARAPALLI, P.; KUMAVATH, R.N.; Metagenomics—A Technological Drift in Bioremediation. 2015.
- DEWEERD, K. A. & SUFLITA, J. M. Anaerobic aryl reductive dehalogenation of halobenzoates by cell extracts of “*Desulfomonile tiedjei*”. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2999-3005 (1990).
- DEZIEL, E.; PAQUETTE, G.; VILLEMUR, R.; LEPINE, F.; BISAILLON, J. Biosurfactant production by a soil pseudomonas strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and environmental microbiology*, v. 62, p. 1908-1912, 1996.
- DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*, v. 7, p. 173-180, 2004.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analitical Chemistry*, v. 28, p. 350-356, 1956.
- EDGAR.; ROBERT C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, v. 26, n. 19, p. 2460-2461, 2010
- EDWARDS, N. T. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) in the terrestrial environment—a review. *J. Environ. Qual.* 12, 427-441, 1983.
- ENSLEY, B.D., GIBSON, D.T. AND LABORDE, A.L. Oxidation of naphthalene by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas sp.* strain NCIB 9816. *J. Bacteriol.* 149, 948-954, 1982.
- EVANS, F.F.; ROSADO, A.S.; SEBASTI, G.V.; CASELLA, R.; MACHADO, P.L.O.A.; HOLMSTROM, C.; KJELLEBERG, S.; van ELSAS, J.; SELDIN, L. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49: 295-305, 2004.
- FANTROUSSI, S.; AGATHOS, N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Current opinion in microbiology*, v. 8, n. 3, p. 268-275, 2005.

FERGUSON, D. M., MOORE, D. F., GETRICH, M. A., & ZHOWANDAI, M. H. Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3), 598-608, 2005.

FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; VALENZUELA-ENCINAS, C.; MARSCH, R.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, C.; VÁZQUEZ-NÚÑEZ, E.; DENDOOVEN, L. Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 18, p. 12-30, 2011.

FIERER, N.; JACKSON, J. A.; VILGALYS, R.; JACKSON, R. B. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71(7), p. 4117-4120, 2005.

FILLER, D. M., LINDSTROM, J. E., BRADDOCK, J. F., JOHNSON, R. A., & NICKALASKI, R. Integral biopile components for successful bioremediation in the Arctic. *Cold Regions Science and Technology*, 32(2-3), 143-156, 2001.

FOGEL, G.B.; COLLINS, C.R.; LI, J.; BRUNK, C.F. Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: estimation of microbial relative abundance from a mixed population. *Microb. Ecol.* 38, 93 – 113, 1999.

FORTIN, N. Y., MORALES, M., NAKAGAWA, Y., FOCHT, D. D., & DESHUSSES, M. A. Methyl tert-butyl ether (MTBE) degradation by a microbial consortium. *Environmental Microbiology*, 3(6), 407-416, 2001.

FOX, S.L.; BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource Technology*, v. 75, p. 235-240, 2000.

FRACCHIA, L.; CAVALLO, M.; MARTINOTTI, M.G.; BANAT, I.M. Biosurfactants and bioemulsifiers biomedical and related applications—present status and future potentials. *Biomedical science, engineering and technology*, v.14, p.326-335, 2012.

FREIRE, R.S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L.T.; DURÁN, N. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. *Química Nova*, v. 23, p. 504-511, 2000.

FRITSCH, W.; HOFRICHTER. Degradation by microorganisms. *Biotechnology*, v. 11b, p. 145-167, 2000.

FUCHSLUGER, C., PREIMS, M., & FRITZ, I. Automated measurement and quantification of heterotrophic bacteria in water samples based on the MPN method. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 38(1), 241-247, 2011.

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(9), p. 2522-2530, 1998.

GALLANGHER, J.R.; OLSON, E.S.; STANLEY, D.C. Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur-specific pathway. *FEMS Microbiology Letters*, v. 107, p. 31 - 36, 1993.

GAO, B.; GUPTA, R.S.; Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum Actinobacteria. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 55, n. 6, p. 2401-2412, 2005.

GARBAN, B.; BLANCHOU, H.; MOTALAY-MASSEI, A.; CHEVREUIL, M. & OLLIVON, D. Atmospheric bulk deposition of PAHs onto France: trends from urban to remote sites. *Atmospheric Environment*, v. 36, p. 5395-5403, 2002.

GARLAND, J.L.; MILLS, A.L. Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *American Society for Microbiology*, v. 57, p. 2351-2359, 1991.

GAYLARD, C.C.; BENTO, F.M.; KELLEY, J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. *Revista de Microbiologia*, v. 30, p. 01-10, 1999.

GEISSELER, D.; HORWATH, W.R.; JOERGENSEN, R.G.; LUDWIG, B. Pathways of nitrogen utilization by soil microorganisms. *Soil. Biol. Biochem*, 42: 2058-2067, 2010.

GEORGE, I. F., LILES, M. R., HARTMANN, M., LUDWIG, W., GOODMAN, R. M., & AGATHOS, S. N. Changes in soil Acidobacteria communities after 2, 4, 6-trinitrotoluene contamination. *FEMS microbiology letters*, 296(2), 159-166, 2009.

GHALY, A.; ZHANG, B.; DAVE, D. Biodegradation of Phenolic Compounds in Creosote Treated Wood Waste by a Composting Microbial Culture Augmented with the Fungus *Thermoascus aurantiacus*. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, v. 7, p. 90-103, 2011.

GHAZALI, F. M., RAHMAN, R. N. Z. A., SALLEH, A. B., & BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(1), 61-67, 2004.

GIEG, L.M.; OTTER, A.; FEDORAK, P.M. "Carbazole Degradation by *Pseudomonas* sp. LD2: Metabolic Characteristics and the Identification of Some Metabolites", *Environmental Science & Technology*, v. 30, n. 2, p. 575-585, 1996.

GILBRIDE, K. A., LEE, D. Y., & BEAUDETTE, L. A. Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *Journal of microbiological methods*, 66(1), 1-20, 2006.

GIRAFFA, G.; NEVIANI, E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food. Microbiol*, 67: 19-34, 2001.

GOLDSCHIEDER, N.; HUNKELER, D; ROSSI, P. Review: microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. *Hydrogeology Journal*, v. 14, n. 6, p. 926-941, 2006.

GOODWIN, S., MCPHERSON, J. D., & MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333, 2016.

GOYAL, A.K.; ZYLSTRA, G.J. Molecular cloning of novel genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation from *Comamonas testosteroni* GZ39. *Applied and environmental microbiology*, v. 62, n. 1, p. 230-236, 1996.

GOYAL, A. K., & ZYLSTRA, G. J. Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 19(5-6), 401-407, (1997).

- GRALTON, E. M., CAMPBELL, A. L., & NEIDLE, E. L. Directed introduction of DNA cleavage sites to produce a high-resolution genetic and physical map of the *Acinetobacter* sp. strain ADP1 (BD413UE) chromosome. *Microbiology*, 143(4), 1345-1357, 1997.
- GRANT, R.J.; MUCKIAN, L.M.; CLIPSON, N.J.W.; DOYLE, E.M. Microbial community changes during the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Letters in Applied Microbiology*, v. 44, p. 293-300, 2006.
- GREENE, E.A. AND VOORDOUW, G. Analysis of environmental microbial communities by reverse sample genome probing. *Journal of Microbiological Methods* 53: 211– 219, 2003.
- GREER, C. W., WHYTE, L. G., & NIEDERBERGER, T. D. Microbial communities in hydrocarbon-contaminated temperate, tropical, alpine, and polar soils. *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, 2313-2328, (2010).
- GUDIÑA, E.J.; PEREIRA, J.F.B.; RODRIGUES, L.R.; COUTINHO, J.A.P.; TEIXEIRA, J.A. Isolation and study of microorganisms from oil samples for application in Microbial Enhanced Oil Recovery. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 68, p. 56-64, 2012.
- GUERIN T.F. Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosote contaminated soil using ex-situ land treatment. *Journal of Hazardous Materials*, v. 65, p. 305-315, 1999.
- GUPTA, R.S. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 24, n. 4, p. 367-402, 2000.
- HABE, H.; OMORI, T. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, v. 67(2), p. 225-243, 2003.
- HAMADY, M.; WALKER, J.J.; HARRIS, J.K.; GOLD, N.J.; KNIGHT, R. Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nature Methods*, v. 5, p. 235–237, 2008.
- HAMMER, P.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. Paleontological Statistics Software: Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 2001.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 68, p. 669–685, 2004.
- HAN, S. K., NEDASHKOVSKAYA, O. I., MIKHAILOV, V. V., KIM, S. B., & BAE, K. S. *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family Microbacteriaceae from the marine environment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(6), 2061-2066, 2003.
- HARWOOD, V. J., DELAHOYA, N. C., ULRICH, R. M., KRAMER, M. F., WHITLOCK, J. E., GAREY, J. R., & LIM, D. V. Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Letters in applied microbiology*, 38(6), 476-482, 2004.
- 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.

HARWATI, T. U., KASAI, Y., KODAMA, Y., SUSILANINGSIH, D., & WATANABE, K. Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Indonesian seawater. *Microbes and Environments*, 22(4), 412-415, 2007..

HASSANSHAHIAN, M.; EMTIAZI, G; CAPPELLO, S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine pollution bulletin*, v. 64, n. 1, p. 7-12, 2012.

HE, J.Z.; SHEN, J.P.; ZHANG, L.M.; ZHU, Y.G.; ZHENG, Y.M.; XU, M.G.; DI, H. Quantitative analyses of the abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea of a Chinese upland red soil under long-term fertilization practices. *Environmental Microbiology*, v. 9(9), p. 2364-2374, 2007.

HEMME, C.L.; TU, Q.; SHI, Z.; QIN, Y.; GAO, W.; DENG, Y.; TRINGE, S.G. Comparative metagenomics reveals impact of contaminants on groundwater microbiomes. *Frontiers in microbiology*, 6, 2015.

HENRY, S.; BAUDOIN, E.; LÓPEZ-GUTIÉRREZ, J.C.; MARTIN-LAURENT, F.; BRAUMAN, A.; PHILIPPOT, L. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, v. 59(3), p. 327-335, 2004.

HESHAM, A. E. L., MAWAD, A. M., MOSTAFA, Y. M., & SHOREIT, A. Study of enhancement and inhibition phenomena and genes relating to degradation of petroleum polycyclic aromatic hydrocarbons in isolated bacteria. *Microbiology*, 83(5), 599-607, 2014.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P.S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, v. 10, p. 413-417, 1992.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., & WATSON, R. Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11, 1026–1030, 1993.

HIRAIISHI, A.; KHAN, S.T. Application of polyhydroxyalkanoates for denitrification in water and wastewater treatment. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 61, n. 2, p. 103-109, 2003.

HOLLISTER, E.B.; ENGLEDDOW, A.S.; HAMMETT, A.J.M.; PROVIN, T.L.; WILKINSON, H.H.; GENTRY, T.J. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. *The ISME journal*, v. 4(6), p. 829-838, 2010.

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(2), p. 267-271, 2005.

HUNTER-CEVERA, J. The value of microbial diversity. *Current Opinion in Microbiology*, v. 1, p. 278-285, 1998.

IRLINGER, F.; YUNG, S.A.Y.I.; SARTHOU, A.S.; DELBÈS-PAUS, C.; MONTEL, M.C.; COTON, E HELINCK, S. Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese. *International journal of food microbiology*, v. 153(3), p. 332-338, 2012.

IVANOVA, E. A., PERSHINA, E. V., KUTOVAYA, O. V., SERGALIEVA, N. K., NAGIEVA, A. G., ZHIENGALIEV, A. T., ... & ANDRONOV, E. E. Comparative Analysis of Microbial

Communities of Contrasting Soil Types in Different Plant Communities. Russian journal of ecology, 49(1), 30-39, (2018).

IWAMOTO, T.; NASU, M. Current Bioremediation Practice and Perspective. J. Biosci. Bioeng, 92: 1-8, 2001.

IZMALKOVA, T. Y., GAFAROV, A. B., SAZONOVA, O. I., SOKOLOV, S. L., KOSHELEVA, I. A., & BORONIN, A. M. Diversity of Oil-Degrading Microorganisms in the Gulf of Finland (Baltic Sea) in Spring and in Summer. Microbiology, 87(2), 261-271, 2018.

JACQUES, R. J., OKEKE, B. C., BENTO, F. M., TEIXEIRA, A. S., PERALBA, M. C., & CAMARGO, F. A. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. Bioresource Technology, 99(7), 2637-2643, 2008.

JANSSEN, P.H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. Applied and environmental microbiology, v. 72, n. 3, p. 1719-1728, 2006.

JEANBILLE, M., GURY, J., DURAN, R., TRONCZYNSKI, J., GHIGLIONE, J. F., AGOGUÉ, H., AUGUET, J. C. Chronic polyaromatic hydrocarbon (PAH) contamination is a marginal driver for community diversity and prokaryotic predicted functioning in coastal sediments. Frontiers in microbiology, 7, 1303, 2016.

JENSEN, A.M.; FINSTER, K.W.; KARISON, U. Degradation of carbazole, dibenzothiophene, and dibenzofuran at low temperature by *Pseudomonas sp.* Strain C3211. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 22, p. 730-735, 2003.

JEONG, J. Y.; PARK, H. D.; LEE, K. H.; WEON, H. Y.; KA, J.O. Microbial community analysis and identification of alternative host-specific fecal indicators in fecal and river water samples using pyrosequencing. The Journal of Microbiology, v. 49(4), p. 585-594, 2011.

JIANG, L., SONG, M., LUO, C., ZHANG, D., & ZHANG, G. Novel phenanthrene-degrading bacteria identified by DNA-stable isotope probing. PloS one, 10(6), e0130846, 2015.

JOGLER, M.; SIEMENS, H.; CHEN, H.; BUNK, B.; SIKORSKI, J.; OVERMANN, J. Identification and targeted cultivation of abundant novel freshwater sphingomonads and analysis of their population substructure. Applied and environmental microbiology, v. 77(20), p. 7355-7364, 2011.

JOHN, R.C.; OKPOKWASILI, G.C. Crude oil-degradation and plasmid profile of nitrifying bacteria isolated from oil-impacted mangrove sediment in the Niger Delta of Nigeria. Bulletin of environmental contamination and toxicology, v. 88(6), p. 1020-1026, 2012.

JOHNSEN, A.R.; WICK L.Y.; HARMS, H. Principles of microbial PAH degradation in soil. Environmental Pollution, v. 133, p. 71-84, 2005.

JOHNSTON, E.L.; ROBERTS, D.A. Contaminants reduce the richness and evenness of marine communities: a review and meta-analysis. Environmental Pollution, v. 157, n. 6, p. 1745-1752, 2009.

JONES, R. T., ROBESON, M. S., LAUBER, C. L., HAMADY, M., KNIGHT, R., AND FIERER, N. A comprehensive survey of soil acidobacterial diversity using pyrosequencing and clone library analyses. ISME J. 3, 442-453. doi: 10.1038/ismej.2008.127, 2009.

JOSHI, M. N., DHEBAR, S. V., BHARGAVA, P., PANDIT, A. S., PATEL, R. P., SAXENA, A. K., & BAGATHARIA, S. B. Metagenomic approach for understanding microbial population from petroleum muck. *Genome Announc.*, 2(3), e00533-14, 2014.

JOYNT, J.; BISCHOFF, M.; TURCO, R.; KONOPKA, A.; NAKATSU, C.H. Microbial community analysis of soils contaminated with lead, chromium and petroleum hydrocarbons. *Microbial ecology*, v. 51(2), p. 209-219, 2006.

JUHASZ, A.L.; SMITH, E.; WALLE, N.; STEWART, R.; WEBER, J. Bioavailability of residual polycyclic aromatic hydrocarbons following enhanced natural attenuation of creosote-contaminated soil. *Environmental Pollution*, v. 158, p. 585-591, 2010.

JUHASZ, A.L.; STANLEY, G.A.; BRITZ, M.L. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Letters in Applied Microbiology*, v. 30, p. 396-401, 2000.

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

JURELEVICIUS, D.; ALVAREZ, V.M.; MARQUES, J.M.; DE SOUSA LIMA, L.R.F.; DE ALMEIDA DIAS, F.; SELDIN, L. Bacterial community response to petroleum hydrocarbon amendments in freshwater, marine, and hypersaline water-containing microcosms. *Applied and environmental microbiology*, v. 79(19), p. 5927-5935, 2013.

JURYS, A.; GAILIŪTĒ, I.; AIKAITĒ-STANAITIENĒ, J.; GRIGIŠKIS, S.; MARUŠKA, A.; STANKEVIČIUS, M.; LEVIŠAUSKAS, D. Review of Creosote Pollution Toxicity and Possibilities of Bioremediation. *Vide Tehnoloģija. Resursi (Latvia)*, 2013.

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

KANE, S. R., BELLER, H. R., LEGLER, T. C. & ANDERSON, R. T. Biochemical and genetic evidence of benzylsuccinate synthase toluene-degrading, ferric iron-reducing *Geobacter metallireducens*. *Biodegradation*. 13, 149-154 2002.

KANOKRATANA, P., UENGWETWANIT, T., RATTANACHOMSRI, U., BUNTERNGSOOK, B., NIMCHUA, T., TANGPHATSORNRUANG, S., ... & EURWILAICHITR, L. Insights into the phylogeny and metabolic potential of a primary tropical peat swamp forest microbial community by metagenomic analysis. *Microbial ecology*, 61(3), 518-528, 2011.

KEMNITZ, D.; KOLB, S.; CONRAD, R. HIGH. Abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. *FEMS microbiology ecology*, v. 60(3), p. 442-448, 2007.

KENNEDY, J.; O'LEARY, N.D.; KIRAN, G.S.; MORRISSEY, J.P.; O'GARA, F.; SELVIN, J.; DOBSON, A.D.W. Functional metagenomic strategies for the discovery of novel enzymes and biosurfactants with biotechnological applications from marine ecosystems. *Journal of applied microbiology*, v. 111, n. 4, p. 787-799, 2011.

KENT, A.D., TRIPLETT, E.W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review in Microbiology* 56, 211-236, 2002.

KERSTERS, K.; DE-VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; Vandamme, P. Stackebrandt, E. Introduction to the Proteobacteria. In *The prokaryotes* (pp. 3-37). Springer New York, 2006.

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.

KIELAK, A. M., BARRETO, C. C., KOWALCHUK, G. A., VAN VEEN, J. A., & KURAMAE, E. E. The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Frontiers in microbiology*, 7, 744, 2016.

KILBANE, J.J.; JACKOWSKY, K. Biodesulfurization of water-soluble coal derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 40, p. 1107-1114, 1992.

KIM, S. J., SHIN, S. C., HONG, S. G., LEE, Y. M., CHOI, I. G., & PARK, H. Genome sequence of a novel member of the genus *Psychrobacter* isolated from Antarctic soil, 2012.

KIM, K-M.; KOO, W-M.; KIM, K-N.; KIM, H-Y.; PARK, J-Y.; KANG, S-M. Investigation of PAHs mobility Leached from creosote treated wood in soil environment. Korea Forest Research Institute, p. 82-83, 2011.

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(2), p. 474-484, 2006.

KIRAN, G.S.; SELVIN, J.; MANILAL, A.; SUJITH, S. Biosurfactants as green stabilizers for the biological synthesis of nanoparticles. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 31, p. 354–364, 2011.

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

KIRK, J. L., KLIRONOMOS, J. N., LEE, H., & TREVORS, J. T. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution*, 133(3), 455-465, 2005.

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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(8), 3577-3585, 2001.

KLAMPPENBACH, J.A.; SAXMAN, P.R.; COLE, J.R.; SCHIDMIDT, T.M. Rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database. *Nucleic Acids Res.* 29, 181–184. Martín-González, L., Castro, R., Pereira, M.A., Alves, M.M., Font, X., Vicent, T., 2011.

KLINDWORTH, A.; PRUESSE, E.; SCHWEER, T.; PEPLIES, J.; QUAST, C., HORN, M.; GLÖCKNER, F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 41: e1, 2013.

KODAMA K.; NAKATINI, S.; UMEHARA K.; SHIMIZU, K.; MINODA Y.; YAMADA, K. Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 37, p. 45–50, 1973.

- KODAMA K.; NAKATINI, S.; UMEHARA K.; SHIMIZU, K.; MINODA Y.; YAMADA, K. Microbial conversion of petro-sulfur compounds. Part III. Isolation and identification of products from dibenzothiophene. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 34, p. 1320–1324, 1970.
- KÖLBEL-BOELKE, J.; ANDER, E.M.; NEHRKORN, A. Microbial communities in the saturated groundwater environment II: diversity of bacterial communities in a Pleistocene sand aquifer and their in vitro activities. *Microbial ecology*, v. 16, n. 1, p. 31-48, 1988.
- KORLEVIĆ, M.; ZUCKO, J.; DRAGIĆ, M. N.; BLAŽINA, M.; PUSTIJANAC, E.; ZELJKO, T.V.; LONG, P. F. Bacterial diversity of polluted surface sediments in the northern Adriatic Sea. *Systematic and applied microbiology*, v. 38(3), p. 189-197, 2015.
- KOSARIC, N. Biosurfactants ad their application for soil bioremediation. *Food Technology and Biotechnology*, v. 39, p. 295-304, 2001.
- KOSTKA, J.E.; PRAKASH, O.; OVERHOLT, W.A.; GREEN, S.J.; FREYER, G.; CANION, A.; DELGARDIO, J.; NORTON, N.; HAZEN, T.C.; HUETTEL, M. Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill. *Applied and environmental microbiology*, v. 1, p. 7962–7974, 2011.
- KRIIPSALU, M.; MARQUES, M.; NAMMARI, D.R.; HOGGLAND, W. Bio-treatment of oily sludge: The contribution of amendment material to the content of target contaminants, and the biodegradation dynamics. *Journal of Hazardous Materials*, v. 48, p. 616-622, 2007.
- KUEVER, Jan. The Family Syntrophaceae. In: *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, p. 281-288, 2014
- 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, M., & KHANNA, S. Diversity of 16S rRNA and dioxygenase genes detected in coal-tar-contaminated site undergoing active bioremediation. *Journal of applied microbiology*, 108(4), 1252-1262, 2010.
- KUNAPULI, U.; JAHN, M.K.; LUEDERS, T.; GEYER, R.; HEIPIEPER, H.J.; MECKENSTOCK, R.U. *Desulfitobacterium aromaticivorans* sp. nov. and *Geobacter toluenoxydans* sp. nov., iron-reducing bacteria capable of anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 60 (3), p. 686e695, 2010.
- KUPPUSAMY, S., THAVAMANI, P., MEGHARAJ, M., & NAIDU, R. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by novel bacterial consortia tolerant to diverse physical settings—Assessments in liquid-and slurry-phase systems. *International biodeterioration & biodegradation*, 108, 149-157, 2016.
- KURTBOKE, D.I.; SWINGS, J.; STORMS, V. *Microbial genetic resources and Biodiscovery*. WFCC Publications, UK, 2004.
- LABBÉ, D.; MARGESIN, R.; SCHINNER, F.; WHYTE, L.G.; GREER, C.W. Comparative phylogenetic analysis of microbial communities in pristine and hydrocarbon-contaminated Alpine soils. *FEMS microbiology ecology*, v. 59(2), p. 466-475, 2007.
- LABUTO, G., & CARRILHO, E. N. V. M. Bioremediation in Brazil: scope and challenges to boost up the bioeconomy. In *Bioremediation and Bioeconomy* (pp. 569-588). Elsevier, 2016.

- LAFORTUNE, I., JUTEAU, P., DÉZIEL, E., LÉPINE, F., BEAUDET, R., & VILLEMUR, R. Bacterial diversity of a consortium degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in a two-liquid phase biosystem. *Microbial ecology*, 57(3), 455-468, 2009.
- LAHA, S.; TANSEL, B.; USSAWARUJIKULCHAI, A. Surfactant–soil interactions during surfactant-amended remediation of contaminated soils by hydrophobic organic compounds: a review. *Journal of environmental management*, v. 90, p. 95-100, 2009.
- LANE D.J. 16S/23S rDNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, Chichester, pp 115–175, 1991.
- LANGILLE, M. G.; ZANEVELD, J.; CAPORASO, J. G.; MCDONALD, D.; KNIGHTS, D.; REYES, J. A.; BEIKO, R.G. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature biotechnology*, v. 31(9), p. 814-821, 2013.
- LARKIN, M. J., ALLEN, C. C., KULAKOV, L. A., & LIPSCOMB, D. A. Purification and characterization of a novel naphthalene dioxygenase from *Rhodococcus sp.* strain NCIMB12038. *Journal of bacteriology*, 181(19), 6200-6204, 1999.
- LARSSON, M.; HAGBERG, J.; ROTANDER, A.; VAN BAVEL, B.; ENGWALL, M. Chemical and bioanalytical characterisation of PAHs in risk assessment of remediated PAH-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 20, p. 8511-8520, 2013.
- LAUNEN, L. A., BUGGS, V. H., EASTEP, M. E., ENRIQUEZ, R. C., LEONARD, J. W., BLAYLOCK, M. J. & Häggblom, M. M. Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon-contaminated sediments in aerated bioslurry reactors. *Bioremediation Journal*, 6(2), 125-141, 2002.
- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, v. 54, p. 305-315, 1990.
- LEGENDRE, P.; GALLAGHER, E.D. Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, v. 129, n. 2, p. 271-280, 2001.
- LEVIN, J.Z.; YASSOUR, M.; ADICONIS, X.; NUSBAUM, C.; THOMPSON, D.A.; FRIEDMAN, N.; GNIRKE, A.; REGEV, A. Comprehensive comparative analysis of strand-specific RNA sequencing methods. *Nature Methods*, v. 7, p. 709–715, 2010.
- LEYS, N.M. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, New York, 66: 726-736, 2005.
- LEWIS, R., BARTH, V., COFFEY, T., MCFARLAND, C., HUGGINS, D., & SULLIVAN, T. Altered bacterial communities in long-term no-till soils associated with stratification of soluble aluminum and soil pH. *Soil Systems*, 2(1), 7, 2018.
- LI, L; GOEL, R. Biodegradation of naphthalene, benzene, toluene, ethyl benzene, and xylene in batch and membrane bioreactors. *Environmental Engineering Science*, v. 29, n. 1, p. 42-51, 2012.
- LI, W., SHI, J., WANG, X., HAN, Y., TONG, W., MA, L. & CAI, B. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from *Pseudomonas sp.* strain ND6. *Gene*, 336(2), 231-240, 2004.

LIMA, T. M. S. Determinação estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficácia de biossurfactantes na remoção de fenantreno e cádmio de solo. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 2008.

LIMA, T. M. S. Produção de biossurfactantes visando ao tratamento de borra oleosa. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, 2003.

LIN, S.C.; MINTON, M.A.; SHARMA, M.M.; GEORGIU, G. Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. Applied and environmental microbiology, v. 60(1), p. 31-38, 1994.

LIN, T.C.; PAN, P.T.; CHENG, S.S. Ex situ bioremediation of oil-contaminated soil. Journal of hazardous materials, v. 176, p. 27-34, 2010.

LIN, Y. C., UEMORI, K., DE BRIEL, D. A., ARUNPAIROJANA, V. & YOKOTA, A. *Zimmermannella helvola* gen. nov., sp. nov., *Zimmermannella alba* sp. nov., *Zimmermannella bifida* sp. nov., *Zimmermannella faecalis* sp. nov. and *Leucobacter albus* sp. nov., novel members of the family Microbacteriaceae. Int J Syst Evol Microbiol 54, 1669–1676, 2004.

LIU, W.; LUO, Y.; TENG, Y.; LI, Z.; MA L.Q. Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. Environmental Geochemistry and Health, v. 10, p. 23-29, 2010.

LIU, Y., DING, A., SUN, Y., XIA, X., & ZHANG, D. Impacts of n-alkane concentration on soil bacterial community structure and alkane monooxygenase genes abundance during bioremediation processes. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 12(5), 3, 2018.

LIU, Z., & LIU, J. Evaluating bacterial community structures in oil collected from the sea surface and sediment in the northern Gulf of Mexico after the Deepwater Horizon oil spill. MicrobiologyOpen, 2(3), 492-504, 2013.

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

LOGARES, R.; SUNAGAWA, S.; SALAZAR, G.; CORNEJO-CASTILLO, F.M.; FERRERA, I.; SARMENTO, H.; RAES, J. Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. Environmental microbiology, 16(9), 2659-2671, 2014.

LÓPEZ-GUTIÉRREZ, J.C.; HENRY, S.; HALLET, S.; MARTIN-LAURENT, F.; CATROUX, G.; PHILIPPOT, L. Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. Journal of Microbiological Methods, v. 57(3), p. 399-407, 2004

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, 81(10), 1263-1271, 2010.

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

- LORS, C.; DAMIDOT, D.; PONGE, J-F.; PÉRIÉ, F. Comparison of a bioremediation process of PAHs in a PAH-contaminated soil at field and laboratory scales. *Environmental Pollution*, v. 165, p. 11-17, 2012.
- LORS, C.; PONGE, J.F.; DAMIDOT, D. Comparison of solid-phase bioassays and ecoscores to evaluate the toxicity of contaminated soils. *Environmental Pollution*, v. 158, p. 2640-2647, 2010a.
- LOVLEY, D.L. *Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation*. Nature Publishing Group, v. 1, 2003.
- LOVLEV, D. R. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18, 75-81, 1997.
- LOWE, D. F., OUBRE, C. L. & WARD, C. H. *Surfactants and cosolvents for NAPL remediation a technology practices manual (Vol. 1)*. CRC Press, 1999.
- LOWRY, O.H.; ROSEBOROUGH, N.J.; FARR, N.J.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The journal of biological chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.
- LOZUPONE, Catherine A.; KNIGHT, Rob. Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, n. 27, p. 11436-11440, 2007.
- LU, Z.; Deng, Y.; Van Nostrand, J.D.; He, Z.; Voordeckers, J.; Zhou, A.; Tom, L.M. Microbial gene functions enriched in the Deepwater Horizon deep-sea oil plume. *The ISME journal*, v. 6(2), p. 451-460, 2012.
- LÜHRIG, K.; CANBÄCK, B.; PAUL, C.J.; JOHANSSON, T.; PERSSON, K.M.; RÅDSTRÖM, P. Bacterial community analysis of drinking water biofilms in southern Sweden. *Microbes and Environments*, v. 30(1), p. 99, 2015.
- MADAMWAR, D.; PATEL, V.; CHETURVEDULA, S. Phenanthrene degradation by *Pseudoxanthomonas* sp. DMVP2 isolated from hydrocarbon contaminated sediment of Amlakhadi canal, Gujarat, India. *Journal of Hazardous Materials*, v. 201, p. 43– 51, 2012.
- MAHMOUDI, N., ROBESON, M.S., CASTRO, H.F., FORTNEY, J.L., TECHTMANN, S.M., JOYNER, D.C., PARADIS, C.J., PFIFFNER, S.M., HAZEN, T.C. Microbial community composition and diversity in Caspian Sea sediments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 1-11. 19, 2015.
- MAHMOUDI, N.; SLATER, G.F.; JUHASZ, A.L. Assessing Limitations for PAH Biodegradation in Long-Term Contaminated Soils Using Bioaccessibility Assays. *Water air and soil pollution*, v. 224. p. 1411, 2013.
- MAIER, R.M.; CHAVÉS, G.S. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.54, p.625-633, 2000.
- MANEERAT, S. Biosurfactants from marine microorganisms. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v. 27, p. 1263-1272, 2005.
- MANOLI, E., & SAMARA, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18(6), 417-428, 1999.

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*, 70, 141-147, 2012.

MARCHESI, J.R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, v. 3, n. 1, p. 1, 2015.

MARGESIN, R., & SCHINNER, F. Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47(4), 462-468, 1997.

MARIANO, A. P., BONOTTO, D. M., ANGELIS, D. D. F. D., PIRÔLLO, M. P. S., & CONTIERO, J. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 133-142, 2008.

MARIANO, A. P., KATAOKA, A. P. D. A. G., ANGELIS, D. D. F. D., & BONOTTO, D. M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 346-353, 2007.

MARTIN, E., LODDERS, N., JÄCKEL, U., SCHUMANN, P., & KÄMPFER, P. *Leucobacter aerolatus* sp. nov., from the air of a duck barn. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60 (12), 2838-2842, 2010.

MARUYAMA, A.; HONDA, D.; YAMAMOTO, H.; KITAMURA, K.; HIGASHIHARA, T. Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species *Psychrobacter pacificensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* v. 50, p. 835–846, 2000.

MASIH, A.; TANEJA, A. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) concentrations and related carcinogenic potencies in soil at a semi-arid region of India. *Chemosphere*, v. 65, p. 449-456, 2006.

MASON, O.U.; HAZEN, T.C.; BORGLIN, S.; CHAIN, P.S.; DUBINSKY, E.A.; FORTNEY, J.L.; MACKELPRANG, R. Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *The ISME journal*, v. 6(9), p. 1715-1727, 2012.

MASY, T., DEMANÈCHE, S., TROMME, O., THONART, P., JACQUES, P., HILIGSMANN, S., & VOGEL, T. M. Hydrocarbon biostimulation and bioaugmentation in organic carbon and clay-rich soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 99, 66-74, 2016.

MCINERNEY, M.J.; KNAPP, R.M.; DUNCAN, K.; SIMPSON, D.R.; YOUSSEF, N.; RAVI, N.; FOLMSBEE, M.J.; FINCHER, T.; MAUDGALYA, S.; DAVIS, J.; WEILAND, S. Development of an in situ biosurfactant production technology for enhanced oil recovery. Final Report, 2007.

MCNALLY, D.L.; MIHELICIC, James R.; LUEKING, D.R. Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions. *Chemosphere*, v. 38, n. 6, p. 1313-1321, 1999.

MEDEIROS, J.D., LEITE, L.R., CUADROS-ORELLANA, S., OLIVEIRA, G. Taxonomic and functional diversity of microbial community from a mining environment. *BMC Bioinformatics* 16, A3, 2015.

- MELO, A.J. Metagenômica: Busca de novos genes envolvidos com a biodegradação de hidrocarbonetos e síntese de Biosurfactantes. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.
- MENN, F. M., APPLGATE, B. M., & SAYLER, G. S. NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(6), 1938-1942, 1993.
- MESQUITA, A.C. Uso das Técnicas de Oxidação Química e Biodegradação na Remoção de Alguns Componentes Recalcitrantes. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
- MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E.M.; KUBAL, M.; EDWARDS, R.A. The metagenomics RAST server—a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC bioinformatics*, v. 9(1), p. 386, 2008.
- MEYER, S.; STEINHART, H. Effects of heterocyclic PAHs (N, S, O) on the biodegradation of typical tar oil PAHs in a soil/compost mixture. *Chemosphere*, v. 40, p. 359–367, 2000.
- MIEGE, C., BOUZIGE, M., NICOL, S., DUGAY, J., PICHON, V., & HENNION, M. C. Selective immunoclean-up followed by liquid or gas chromatography for the monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban waste water and sewage sludges used for soil amendment. *Journal of Chromatography A*, 859(1), 29-39, 1999.
- MILITON C., ET AL. Bacterial community changes during bioremediation of aliphatic hydrocarbon-contaminated soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74, 669–681, 2010.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa SDA N.º 17. Diário Oficial da União- Seção 1, n.º 99, 24 de maio de 2007. Métodos Analíticos Oficiais para Análise de Substratos para Plantas e Condicionadores de Solo. Brasília, 2007.
- MIRALLES-WILHELM, F.; GELHAR, L.W. Stochastic analysis of oxygen-limited biodegradation in heterogeneous aquifers with transient microbial dynamics. *Journal of contaminant hydrology*, v. 42(1), p. 69-97, 2000.
- MOCALI, S., & BENEDETTI, A . Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Research in Microbiology*, 161(6), 497-505, 2010.
- MOHAN, S.V.; KISA, T.; OHKUMA, T.; KANALY, R.A.; Shimizu, Y. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 5, p. 347-374, 2006.
- MOHN, W.W.; KENNEDY, K.J. Reductive dehalogenation of chlorophenols by *Desulfomonile tiedjei* DCB-1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 4, p. 1367-1370, 1992.
- MOLDES, A.B.; PARADELO, R.; RUBINOS, D.; DEVESA-REY, R.; CRUZ, J.M.; BARRAL, M.T. Ex situ treatment of hydrocarbon-contaminated soil using biosurfactants from *Lactobacillus pentosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 9443–9447, 2011.
- 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*, 20(6), 789-800, 2009.

- MONFERRÁN, M.V.; ECHENIQUE, J.R.; WUNDERLIN, D.A. Degradation of chlorobenzenes by a strain of *Acidovorax avenae* isolated from a polluted aquifer. *Chemosphere*, v. 61, n. 1, p. 98-106, 2005.
- MOORE, D. F., GUZMAN, J. A., & MCGEE, C. Species distribution and antimicrobial resistance of enterococci isolated from surface and ocean water. *Journal of applied microbiology*, 105(4), 1017-1025, 2008.
- MORAIS, P.V., R. FRANCISCO, R. BRANCO, A.P. CHUNG, AND M.S. DA COSTA. *Leucobacter chromiireducens* sp. nov., and *Leucobacter aridicollis* sp. nov., two new species isolated from a chromium contaminated environment. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 646-652, 2004.
- 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.
- MORIKAWA, M.; HIRATA, Y.; IMANAKA, T. A study on the structure function relationship of the lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1488, p. 211–218, 2000.
- MOSER, R. & STAHL, U. Insights into the genetic diversity of initial dioxygenases from PAH-degrading bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 609-618 2001.
- MUANGCHINDA, C., CHAVANICH, S., VIYAKARN, V., WATANABE, K., IMURA, S., VANGNAI, A. S., & PINYAKONG, O. Abundance and diversity of functional genes involved in the degradation of aromatic hydrocarbons in Antarctic soils and sediments around Syowa Station. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4725-4735, 2015.
- MUKHERJEE, A., & CHATTOPADHYAY, D . Exploring environmental systems and processes through next-generation sequencing technologies: insights into microbial response to petroleum contamination in key environments. *The Nucleus*, 60(2), 175-186, 2017.
- MÜLLER, J. B., RAMOS, D. T., LAROSE, C., FERNANDES, M., LAZZARIN, H. S., VOGEL, T. M., & CORSEUIL, H. X. Combined iron and sulfate reduction biostimulation as a novel approach to enhance BTEX and PAH source-zone biodegradation in biodiesel blend-contaminated groundwater. *Journal of hazardous materials*, 326, 229-236, 2017.
- MUELLER, J.G.; CHAPMAN, P.J.; PRICHARD, P.H. Creosote contaminated sites: Their potential for bioremediation. *Environmental Science Technology*, v. 23, p.1197-1201, 1989.
- MUELLER, J. G., DEVEREUX, R., SANTAVY, D. L., LANTZ, S. E., WILLIS, S. G., & PRITCHARD, P. H. Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 71(4), 329-343, 1997.
- MUKHERJEE, A., CHETTRI, B., LANGPOKLAKPAM, J. S., BASAK, P., PRASAD, A., MUKHERJEE, A. K., & CHATTOPADHYAY, D. Bioinformatic approaches including predictive metagenomic profiling reveal characteristics of bacterial response to petroleum hydrocarbon contamination in diverse environments. *Scientific reports*, 7(1), 1108, 2017.
- MULLIGAN, C.N. Enviromental applications for biosurfactants. *Environmental Poluttion*, v. 133, p. 183-198, 2005.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700, 1993.

- MUYZER, G.; TESKE A.; WIRSEN, C.O.; JANNASCH H.W. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel-electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol* 164: 165–172, 1995.
- MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol*, 2: 317–322, 1999.
- MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 127–141, 1998.
- NACKE, H.; WIL, C.; HERZOG, S.; NOWKA, B.; ENGELHAUPT, M.; DANIEL, R. Identification of novel lipolytic genes and gene families by screening of metagenomic libraries derived from soil samples of the German Biodiversity Exploratories. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 78, p. 188-201, 2011.
- NADIM, F., HOAG, G. E., LIU, S., CARLEY, R. J. & ZACK, P. Detection and remediation of soil and aquifer systems contaminated with petroleum products: an overview. *J. Pet. Sci. Technol.* 26, 169-178 2000.
- NAKANO, M. M., CORBELL, N., BESSON, J., & ZUBER, P. Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics MGG*, 232(2), 313-321, 1992.
- NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, v. 54, p. 655-670, 2003.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. *Química Nova*. Campinas-SP, v. 25, p. 772-776, 2002.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 336-341, 2006.
- NKWELANG, G.; KAMGA, H.F.L.; NKENG, G.E. ANTAI, S.P. Studies on the diversity, abundance and succession of hydrocarbon utilizing micro organisms in tropical soil polluted with oily sludge. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 1075-1080, 2008.
- NOCKER, A.; BURR, M.; CAMPER, A. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Microb. Ecol*, 54: 276-289, 2007
- NOJIRI, H.; HABE, H.; OMORI, T. "Bacterial degradation of aromatic compounds via angular dioxygenation", *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 47, n. 6, p. 279-305, 2001b.
- NOJIRI, H.; NAM, J-W.; KOSAKA, M.; MORII, K-I.; TAKEMURA, T.; FURIHATA, K.; YAMANE, H.; OMORI, T. Diverse oxygenation catalyzed by carbazole 1,9-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain CA10. *Journal of Bacteriology*, v. 181, p. 3105–3113, 1999.
- NOJIRI, H.; SEKIGUCHI, H.; MAEDA, K.; URATA, M.; NAKAI, S.I.; YOSHIDA, T.; HABE, H., OMORI, T. "Genetic Characterization and Evolutionary Implications of a car Gene Cluster in the Carbazole Degradier *Pseudomonas* sp. Strain CA10", *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 12, p. 3663-3679, 2001a.

NOOR U.; Gazi, M. Bacterial flora and antimicrobial resistance in raw frozen cultured seafood imported to Denmark. *Journal of Food Protection*®, v. 76, n. 3, p. 490-499, 2013.

OGUNSEITAN, O. *Microbial diversity: form and function in prokaryotes*. John Wiley & Sons, 2008.

OKERENTUGBA, P.O.; EZERONYE, O.U. Petroleum degrading potentials of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, v. 2, p. 288-292, 2003.

OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L.D.; GARBOGGINE, F.F. *Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos*. MultiCiência, 2006.

ONO, A., MIYAZAKI, R., SOTA, M., OHTSUBO, Y., NAGATA, Y., & TSUDA, M. Isolation and characterization of naphthalene-catabolic genes and plasmids from oil-contaminated soil by using two cultivation-independent approaches. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(2), 501-510, 2007.

OREN, A. The Family Rhodocyclaceae. In: *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, p. 975-998, 2014.

OUCHIYAMA, N.; MIYACHI, S.; OMORI, T. "Cloning and nucleotide sequence of carbazole catabolic genes from *Pseudomonas stutzeri* strain OM1, isolated from activated sludge", *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 44, p. 57-63, 1998.

PACCHIONI, R. G., CARVALHO, F. M., THOMPSON, C. E., FAUSTINO, A. L., NICOLINI, F., PEREIRA, T. S., ... & AGNEZ-LIMA, L. F. Taxonomic and functional profiles of soil samples from Atlantic forest and Caatinga biomes in northeastern Brazil. *MicrobiologyOpen*, 3(3), 299-315, 2014.

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.

PALLERONI, N.J.; PORT, A.M.; CHANG, H.K.; ZYLSTRA, G.J. *Hydrocarboniphaga effusa* gen. nov., sp. nov., a novel member of the gamma-Proteobacteria active in alkane and aromatic hydrocarbon degradation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* V. 54, p. 1203–1207, 2004.

PANDEY, A.; SELVAKUMAR, P.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Current Science.*, v. 77, p. 149-162, 1999.

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.

PARALES, R.E.; HADDOCK, J.D. Biocatalytic degradation of pollutants. *Current opinion in biotechnology*, v. 15, p. 374-379, 2004.

PASSARINI, M.R.; SETTE, L.D.; RODRIGUES, M.V. Improved extraction method to evaluate the degradation of selected PAHs by marine fungi grown in fermentative medium. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22(3), p. 564-570, 2011.

PEDDINGHAUS, S.; BRINKMANN, M.; BLUHM, K.; SAGNER, A.; HINGER, G.; BRAUNBECK, T.; EISENTRÄGER, A.; TIEHM, A.; HOLLERT, H.; KEITER, S.H.

Quantitative assessment of the embryotoxic potential of NSO-heterocyclic compounds using zebrafish (*Danio rerio*). *Reproductive Toxicology*, v. 33, p. 224-232, 2012.

PEDRÓS-ALIÓ, C. Genomics and marine microbial ecology. *International microbiology: official journal of the Spanish Society for Microbiology*, v. 9, n. 3, p. 191-198, 2006.

PENNER, G.C. Estudos Laboratoriais da Contaminação do Solo por Gasolina com o Uso de Detetor de Fotoionização. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo, 2000.

PEREIRA NETTO, A.D.; MOREIRA, J.C.; DIAS, A.E.X.O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.V. OLIVEIRA, A.S., BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. *Química Nova*, São Paulo, v. 23(6), p. 765-773, 2000.

PERSHINA, E., VALKONEN, J., KURKI, P., IVANOVA, E., CHIRAK, E., KORVIGO, I., ... & ANDRONOV, E. Comparative analysis of prokaryotic communities associated with organic and conventional farming systems. *PLoS One*, 10(12), e0145072, 2015.

PERSHINA, E., VALKONEN, J., KURKI, P., IVANOVA, E., CHIRAK, E., KORVIGO, I., PROVOROV, N., ANDRONOV, E. Comparative analysis of prokaryotic communities associated with organic and conventional farming systems. *PLoS ONE* 11, 1–16, 2015.

PHILLIPS, T.M.; Seech, A.G.; Liu, D.; Lee, H.; Trevors, J.T. Monitoring biodegradation of creosote in soils using radiolabels, toxicity tests, and chemical analysis. *Environmental toxicology*, v. 15, p. 99-106, 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, n. 4, p. 151-156, 1989.

PORTIER, R.J.; HOOVER, D.G.; MILES, M.S. Microbial-assisted remediation of creosote- and pentachlorophenol-treated wood products *Journal of Industrial Microbiology*. 17, i-5 _9 1996 Society for Industrial Microbiology 0169-4146/96, 1996.

PRAKASH, O.; GIHRING T.M.; DALTON, D.D.; CHIN, K.J, GREEN, S.J, AKOB, D.M.; KOSTKA, J.E *Geobacter daltonii* sp. nov., an Fe(III)-and uranium (VI)-reducing bacterium isolated from a shallow subsurface exposed to mixed heavy metal and hydrocarbon contamination. *Intl J Syst Evol Microbiol* v. 60(3), p. 546–553, 2010.

PROVIDENTI, M.A.; FLEMING, C.A.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Effect of addition of rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries, *FEMS Microbiology Ecology*, v. 17, p. 15–26, 2005.

PUGAZHENDI, A.; ABBAD WAZIN, H.; QARI, H.; BASAHI, J.M.A.B.; GODON, J. J.; DHAVAMANI, J. Biodegradation of low and high molecular weight hydrocarbons in petroleum refinery wastewater by a thermophilic bacterial consortium. *Environmental Technology*, p. 1-11, 2016.

PUNTUS, I.F.; SAKHAROVSKY, V.G.; FILONOV, A.E.; BORONIN, A.M.; SKRYABIN, G.K. Surface activity and metabolism of hydrocarbon-degrading microorganisms growing on hexadecane and naphthalene. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2643-2648, 2005.

PUPO, M.T.; GALLO, M.B.C. *Biologia química: Uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais*. *Química Nova*, v. 30, p. 1446-1455, 2007.

PYLRO, V.; Satler et al. Brazilian microbiome project: revealing the unexplored microbial diversity—challenges and prospects. *Microbial ecology*, v. 67, n. 2, p. 237-241, 2014.

QUAISER, A., LÓPEZ-GARCÍA, P., ZIVANOVIC, Y., HENN, M. R., RODRIGUEZ-VALERA, F., & MOREIRA, D. Comparative analysis of genome fragments of Acidobacteria from deep Mediterranean plankton. *Environmental microbiology*, 10(10), 2704-2717, 2008.

QUERO, G.M.; CASSIN, D.; BOTTER, M.; PERINI, L.; LUNA, G.M. Patterns of benthic bacterial diversity in coastal areas contaminated by heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). *Frontiers in microbiology*, 6, 2015.

RAMA, F., RAMOS, D. T., MÜLLER, J. B., CORSEUIL, H. X., & MIOTLINSKI, K. Flow field dynamics and high ethanol content in gasohol blends enhance BTEX migration and biodegradation in groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology*, 2019.

RAMIREZ, N., CUTRIGHT, T., & JU. Pyrene biodegradation in aqueous solutions and soil slurries by *Mycobacterium* PYR-1 and enriched consortium. *Chemosphere*, 44(5), 1079-1086, 2001.

RANJARD, L.; NAZARET, S.; GOURBIERE, F.; THIOULOUSE, J.; LINET, P.; RICHAUME, A. A soil microscale study to reveal the heterogeneity of Hg (II) impact on indigenous bacteria by quantification of adapted phenotypes and analysis of community DNA fingerprints. *Microbiol. Ecol*, 31: 107–115, 2000.

RAPPÉ, M. S., & GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 369-394. 2003.

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.

RAUCH, M.E.; GRAEF, H.W.; ROZENZHAK, S.M.; JONES, S.E.; BLECKMANN, C.A.; KRUGER, R.L.; NAIK, R.R.; STONE, M.O. Characterization of microbial contamination in United States Air Force aviation fuel tanks. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 33, p. 29–36, 2006.

REIS, M.P.; ÁVILA, M.P.; COSTA, P.S.; BARBOSA, F.A.; LAANBROEK, H.J.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. The influence of human settlement on the distribution and diversity of iron-oxidizing bacteria belonging to the Gallionellaceae in tropical streams. *Frontiers in microbiology*, v. 5, p. 630, 2014.

REN, G., REN, W., TENG, Y., & LI, Z. Evident bacterial community changes but only slight degradation when polluted with pyrene in a red soil. *Frontiers in microbiology*, 6, 22, (2015).

RESNICK, S.M.; TOROK, D.S.; GIBSON, D.T. Oxidation of carbazole to 3-hydroxycarbazole by naphthalene 1,2-dioxygenase and biphenyl 2,3-dioxygenase. *FEMS Microbiology Letters*, v. 113, p. 297–302, 1993.

RIDDLE, R.R. Purification and properties of 2-hydroxy-6-oxo-6-(20-aminophenyl)hexa-2,4-dienoic acid hydrolase involved in microbial degradation of carbazole. *Protein Expression and Purification*, v. 28, p. 182–189, 2003.

RAHMAN, K. S. M., THAHIRA-RAHMAN, J., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., & Banat, I. M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource technology*, 85(3), 257-261, 2002.

RAHMAN, K. S., RAHMAN, T. J., KOURKOUTAS, Y., PETSAS, I., MARCHANT, R., & BANAT, I. M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresource Technology*, 90(2), 159-168, 2003.

RISER-ROBERTS, E. Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes. CRC Press LLC, Boca Raton, FL, 1998.

ROBINSON, S.L.; NOVAK, J.T.; WIDDOWSON, M.A.; CROSSWELL, S.B.; FETTEROLF, G.J. Field and Laboratory Evaluation of the Impact of Tall Fescue on Polyaromatic Hydrocarbon Degradation in an Aged Creosote-Contaminated Surface Soil. *Journal of Environmental Engineering*, v. 129, p. 232-240, 2003.

RODRIGUES, D.F. Caracterização polifásica da biodiversidade de isolados degradadores de hidrocarbonetos. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, 2002.

RODRIGUES, K.C.; MAIOLI, O.L.; KNOPPERS, B.A.; AZEVEDO, D.A. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from two Brazilian estuarine systems. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21(8), P. 1543-1551, 2009.

RODRIGUEZ-R,L.M.; OVERHOLT, W.A.; HAGAN, C.; HUETTEL, M.; KOSTKA, J.E.; KONSTANTINIDIS, K.T. Microbial community successional patterns in beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *The ISME journal*, 2015.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F.; MENDONÇA-HAGLER, L.C. A moderna microbiologia do solo: Aplicação de técnicas de biologia molecular. *R. Bras. Ci. Solo*, 64: 429-448, 1999.

ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 52, p. 154-162, 1999.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, v. 25, p. 39-67, 2001.

ROTARU, D.E.H.; FRANKS, A.E; ORELLANA, R.; RISSO, C.; NEVIN, K.P. *Geobacter*: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications. *Advances in microbial physiology*, v. 59, p. 1, 2011.

ROY, A., DUTTA, A., PAL, S., GUPTA, A., SARKAR, J., CHATTERJEE, A., ... & KAZY, S. K. Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. *Bioresource technology*, 253, 22-32, 2018.

RUBERTO, L., VAZQUEZ, S. C., & MAC CORMACK, W. P. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(2), 115-125, (2003).

RUSTERHOLTZ, K. J.; MALLORY, L. M. Density, activity, and diversity of bacteria indigenous to a karstic aquifer. *Microbial ecology*, v. 28, n. 1, p. 79-99, 1994.

SAFINOWSKI, M.; GRIEBLER, C.; MECKENSTOCK, R.U. Anaerobic cometabolic transformation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons: evidence from laboratory and field studies. *Environmental Science and Technology*, v.40, p. 4165-4173, 2006.

SHAHI, A., AYDIN, S., INCE, B., & INCE, O. Reconstruction of bacterial community structure and variation for enhanced petroleum hydrocarbons degradation through biostimulation of oil contaminated soil. *Chemical Engineering Journal*, 306, 60-66, 2016.

SAIKIA, R.R.; DEKA, S.; DEKA, M.; BANAT, I.M. Isolation of biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* RS29 from oil-contaminated soil and evaluation of different nitrogen sources in biosurfactant production. *Annals of Microbiology*, v. 62, p. 753–763, 2012.

SAIT, M., HUGENHOLTZ, P., & JANSSEN, P. H. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environmental microbiology*, 4(11), 654-666, 2002.

SAITO, A., IWABUCHI, T., & HARAYAMA, S. Characterization of genes for enzymes involved in the phenanthrene degradation in *Nocardioides sp.* KP7. *Chemosphere*, 38(6), 1331-1337, 1999.

SAMANTA, S.K.; SINGH, O.V.; JAIN, R.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, v. 20, p. 243-248, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning* (Vol. 2, pp. 14-9). New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989

SÁNCHEZ, J.; GALLEGO, J.L.R.; LOREDO, J.; LLAMAS, J.F.; VÁZQUEZ, F. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, v. 12, p. 325–335, 2001.

SARACHAT, T.; PORNUNTHORNTAWEE, O.; CHAVADEJ, S.; RUJIRAVANIT, R. Purification and concentration of a rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using foam fractionation. *Bioresource technology*, v. 101, n. 1, p. 324-330, 2010.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA, R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: Comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. *Environmental Pollution*, v. 136, p. 187-195, 2005.

SATO, S-I.; NAM, J-W.; KASUGA, K.; NOJIRI, H.; YAMANE, H.; OMORI, T. "Identification and Characterization of Genes Encoding Carbazole 1,9a-Dioxygenase in *Pseudomonas sp.* Strain CA10", *Journal of Bacteriology*, v. 179, n. 15, p. 4850-4858, 1997.

SATPUTE, S.K.; BANAT, I.M.; Dhakephalkar, P.K.; Banpurkar, A.G.; Chopade, B.A. Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 436-450, 2010a.

SATPUTE, S.K.; BANPURKAR, A.G.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANAT, I.M.; CHOPADE, B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical reviews in biotechnology*, v. 30, p. 127-144, 2010b.

SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. *Current opinion in biotechnology*, v. 14(3), p. 303-310, 2003.

SCHNEIDER, C. A., MO, K., & LISS, S. N. Applying phenotypic fingerprinting in the management of wastewater treatment systems. *Water Science and Technology*, 37(4-5), 461-464, 1998.

SCHMEISSER, C.; STEELE, H.; STREIT, W.R. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 75(5), p. 955-962, 2007.

SCULLION, J. Remediating polluted soils. *Naturwissenschaften*, v. 93, p. 51–56, 2006.

SEKHON, K.K.; KHANNA, S.; CAMEOTRA, S.S. ENHANCED biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release. *Microbial cell factories*, v. 10, p. 1-10, 2011.

SEMPLE, K.T; REID, B.J.; FERMOR, T.R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants, v. 112, p. 269-283, 2001.

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.

SHARMA, S.; RADL, V.; HAI, B.; KLOOS, K.; FUKA, M.M.; ENGEL, M.; SCHLOTTER, M. Quantification of functional genes from procaryotes in soil by PCR. *Journal of Microbiological Methods*, v. 68(3), p. 445-452, 2007.

SHENG, Y.; WANG, G.; HAO, C.; XIE, Q.; ZHANG, Q. Microbial Community Structures in Petroleum Contaminated Soils at an Oil Field, Hebei, China. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 2016.

SHEPPARD, J.D.; MULLIGAN, C.N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. *Applied microbiology and Biotechnology*, v. 27(2), p. 110-116, 1987.

SHERRY, A.; GRAY, N.D.; DITCHFIELD, A.K.; AITKEN, C.M.; JONES, D.M.; RÖLING, W.F.M.; HEAD, I.M. Anaerobic biodegradation of crude oil under sulphate-reducing conditions leads to only modest enrichment of recognized sulphate-reducing taxa. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 81, p. 105-113, 2013.

SHETE, A.M.; WADHAWA, G.; BANAT, I.M.; Chopade, B.A. Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: A review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 65, p. 91-115, 2006.

SHI, S., ZHANG, X., MA, F., SUN, T., LI, A., ZHOU, J., & QU, Y. Cometabolic degradation of dibenzofuran by *Comamonas sp.* MQ. *Process Biochemistry*, 48(10), 1553-1558, 2013.

SHO, M.; HAMEL, C.; GREER, C.W. Two distinct gene clusters encode pyrene degradation in *Mycobacterium sp.* strain S65. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 48, p. 209–220, 2004.

SHOEB, E.; AKHLAQ, F.; BADAR, U.; AKHTER, J.; IMTIAZ, S. Classification and industrial applications of biosurfactants. *Natural and Applied Sciences*, v. 4, p. 243-252, 2013.

SIERRA-GARCÍA, I.N.; ALVAREZ, J.C.; DE VASCONCELLOS, S.P.; DE SOUZA, A.P.; DOS SANTOS NETO, E.V.; DE OLIVEIRA, V.M. New Hydrocarbon Degradation Pathways in the Microbial Metagenome from Brazilian Petroleum Reservoirs. *PloS one*, v. 9(2), e90087, 2014.

SILVA, A.A.R.; LOBO, I.; GUEDES, C.L.B.; PINTO, J.P. Análise de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) em solos utilizando agitação ultra-sônica, tubo

aquecedor/minicondensador e cromatografia gasosa. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 27(2), p. 105-112, 2007.

SILVA, C.C.; HAYDEN, H.; SAWBRIDGE, T.; MELE, P.; DE PAULA, S.O.; SILVA, L.C.; OLIVEIRA, V. M. Identification of genes and pathways related to phenol degradation in metagenomic libraries from petroleum refinery wastewater. *PloS one*, v. 8(4), e61811, 2013.

SILVA, F.L.N.; SANTOS, J.R.Jr.; NETO, J.M.M.; SILVA, R.L.G.N.P.; FLUMIGNAN, D.L.; OLIVEIRA, J.E. Determinação de benzeno, tolueno etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos do estado do Piauí. *Quim. Nova*, 32: 56-60, 2009.

SILVA, R. L. B., BARRA, C. M., MONTEIRO, T. C. D. N., & BRILHANTE, O. M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis conseqüências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 18, 1599-1607, 2002.

SILVA, T.F.; AZEVEDO, D.B.; AQUINO NETO, F.D. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments and waters from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 3, p. 628-637, 2007.

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.

SIMON, C.; DANIEL, R. Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and environmental microbiology*, v. 77(4), p. 1153-1161, 2011.

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

SINGH, A.; VAN-HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, v. 25, p. 99-121, 2007.

SINGH, A.; WARD, O.P. *Biodegradation and Bioremediation: Series: Soil Biology*, vol. 2, Springer-Verlag, New York, 2004.

SINGLETON, D.R.; RAMIREZ, L.G.; AITKEN, M.D. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon degradation gene cluster in a phenanthrene-degrading *Acidovorax strain*. *Applied and environmental microbiology*, v. 75(9), p. 2613-2620, 2009.

SHAHI, A., AYDIN, S., INCE, B., & INCE, O. Reconstruction of bacterial community structure and variation for enhanced petroleum hydrocarbons degradation through biostimulation of oil contaminated soil. *Chemical Engineering Journal*, 306, 60-66, 2016.

SMITH, R.J.; JEFFRIES, T.C.; ROUDNEW, B.; FITCH, A.J.; SEYMOUR, J.R.; DELPIN, M.W.; MITCHELL, J.G. Metagenomic comparison of microbial communities inhabiting confined and unconfined aquifer ecosystems. *Environmental microbiology*, 14(1), 240-253, 2012.

SMITH, R.J.; PATERSON, J.S.; SIBLEY, C.A.; HUTSON, J.L.; MITCHELL, J.G. Putative effect of aquifer recharge on the abundance and taxonomic composition of endemic microbial communities. *PloS one*, v. 10(6), e0129004, 2015.

SOMAN, C., LI, D., WANDER, M. M., & KENT, A. D. Long-term fertilizer and crop-rotation treatments differentially affect soil bacterial community structure. *Plant and soil*, 413(1-2), 145-159, 2017.

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

SONG, M., JIANG, L., ZHANG, D., LUO, C., WANG, Y., YU, Z., ... & ZHANG, G. Bacteria capable of degrading anthracene, phenanthrene, and fluoranthene as revealed by DNA based stable-isotope probing in a forest soil. *Journal of hazardous materials*, 308, 50-57, 2016.

STALEY, J. *Microbial Diversity and the Biosphere*. www.bdt.org.br/oea/sib/staley, 1998.

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 and Evolutionary Microbiology*, v. 44, n. 4, p. 846-849, 1994.

STAROSCIK, A. Calculator for determining the number of copies of a template. URI Genomics & Sequencing Center. Accessed online April, v. 19, p. 2012, 2004.

STEINER, L. V., RAMOS, D. T., LIEDKE, A. M. R., SERBENT, M. P., & CORSEUIL, H. X. Ethanol content in different gasohol blend spills influences the decision-making on remediation technologies. *Journal of environmental management*, 212, 8-16, 2018.

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.

STROHL, W.R. The role of natural products in modern drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 5, p. 39-41, 2000.

SUN, M.Y.; DAFFORN, K.A.; BROWN, M.V.; JOHNSTON, E.L. Bacterial communities are sensitive indicators of contaminant stress. *Marine pollution bulletin*, v. 64(5), p. 1029-1038, 2012.

SUN, M., XIAO, T., NING, Z., XIAO, E., & SUN, W. Microbial community analysis in rice paddy soils irrigated by acid mine drainage contaminated water. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(6), 2911-2922, 2015.

SUN, T. R., CANG, L., WANG, Q. Y., ZHOU, D. M., CHENG, J. M., & XU, H. Roles of abiotic losses, microbes, plant roots, and root exudates on phytoremediation of PAHs in a barren soil. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3), 919-925, 2010.

SUN, X.; WU, L.; LUO, Y. Application of organic agents in remediation of heavy metals-contaminated soil. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao- The journal of applied ecology*, v. 17, p.1123-1128, 2006.

SZCZEPANIAK, Z., CZARNY, J., STANINSKA-PIĘTA, J., LISIECKI, P., ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A., CYPLIK, P., ... & GLAZAR, K. Influence of soil contamination with PAH on microbial community dynamics and expression level of genes responsible for biodegradation of PAH and production of rhamnolipids. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(22), 23043-23056, 2016.

SZULC, A.; AMBROZEWICZ, D.; SYDOW, M.; QAWNICZAK, L.; PIOTROWSKA-CYPLIK, A.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. *Journal of Environmental Management*, v. 132, p. 121-128, 2014.

TAKEO, M., NISHIMURA, M., SHIRAI, M., TAKAHASHI, H., & NEGORO, S. Purification and characterization of catechol 2, 3-dioxygenase from the aniline degradation pathway of *Acinetobacter sp.* YAA and its mutant enzyme, which resists substrate inhibition. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 0706060442-0706060442, 2007.

TABATABAEE, A.; ASSADI, M.M.; NOOHI, A.A.; SAJADIAN, V.A. Isolation of biosurfactant producing bacteria from oil reservoirs. *Iranian Journal Environmental Health Science Engineering*, v. 2, p. 6-12, 2005.

TAKETANI, R.G.; FRANCO, N.O.; ROSADO, A.S.; VAN-ELSAS, J.D. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. *The Journal of Microbiology*, v. 48(1), p. 7-15, 2010.

TAKIZAWA, N., IIDA, T., SAWADA, T., YAMAUCHI, K., WANG, Y. W., FUKUDA, M., & KIYOHARA, H. Nucleotide sequences and characterization of genes encoding naphthalene upper pathway of *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 and *Pseudomonas putida* OUS82. *Journal of bioscience and bioengineering*, 87(6), 721-731, 1999.

TAKIZAWA, N., KAIDA, N., TORIGOE, S., MORITANI, T., SAWADA, T., SATOH, S., & KIYOHARA, H. Identification and characterization of genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase and polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol dehydrogenase in *Pseudomonas putida* OUS82. *Journal of Bacteriology*, 176(8), 2444-2449, 1994.

TANKÉRÉ, S.P.C.; BOURNE, D.G.; MULLER, F.L.L.; TORSVIK, V. Microenvironments and microbial community structure in sediments. *Environmental Microbiology*, 4(2), 97-105, 2002.

TAPI, A.; CHOLLET-IMBERT, M.; SCHERENS, B.; JACQUES, P. New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, p.1521–1531, 2010.

TEBBE, C.C.; VAHJEN, W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. *Applied and environmental microbiology*, v. 59, n. 8, p. 2657-2665, 1993.

THAVAMANI, P.; MALIK, S.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Microbial activity and diversity in long-term mixed contaminated soils with respect to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals. *Journal of environmental management*, 99, 10-17, 2012.

THRONE-HOLST, M., WENTZEL, A., ELLINGSEN, T. E., KOTLAR, H. K., & ZOTCHEV, S. B. Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter sp.* strain DSM 17874. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(10), 3327-3332, 2007.

TIMONEN, S.; BOMBERG, M. Archaea in dry soil environments. *Phytochemistry Reviews*, v. 8(3), p. 505-518, 2009.

TING, Y.P.; HU, H.L.; TAN, H.M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil microcosms. *Resource and Environmental Biotechnology*, v. 2, p. 197-218, 1999.

TISCHER, K.; KLEINSTEUBER, S.; SCHLEINITZ, K. M.; FETZER, I.; SPOTT, O.; STANGE, F.; SCHMIDT, C. Microbial communities along biogeochemical gradients in a hydrocarbon-contaminated aquifer. *Environmental microbiology*, v. 15(9), p. 2603-2615, 2013.

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

TORSVIK, V., DAAE, F. L., SANDAA, R. A., & ØVREÅS, L. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of biotechnology*, 64(1), 53-62, 1998.

TRINGE, S.G.; VON MERING, C.; KOBAYASHI, A.; SALAMOV, A.A.; CHEN, K.; CHANG, H.W.; BORK, P. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science*, v. 308(5721), p. 554-557, 2005.

TURGAY, O. C., ERDOGAN, E. E., & KARACA, A. Effect of humic deposit (leonardite) on degradation of semi-volatile and heavy hydrocarbons and soil quality in crude-oil-contaminated soil. *Environmental monitoring and assessment*, 170(1-4), 45-58, 2010.

UDOTONG, I. R., UKO, M. P., & UDOTONG, J. I. R. Microbial diversity of a remote aviation fuel contaminated sediment of a lentic ecosystem in Ibeno, Nigeria. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, 5(6), 2015.

UHLIK, O.; LEEWIS, M.C.; STREJCEK, M.; MUSILOVA, L.; MACKOVA, M.; LEIGH, M.B.; MACEK, T. Stable isotope probing in the metagenomics era: a bridge towards improved bioremediation. *Biotechnology advances*, v. 31(2), p. 154-165, 2013.

URICH, T.; LANZÉN, A.; QI, J.; HUSON, D.H.; SCHLEPER, C.; SCHUSTER, S.C. Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. *PloS one*, v. 3(6), e2527, 2008.

URSZULA, G., IZABELA, G., DANUTA, W., & SYLWIA, Ł. Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(2), 285-291, 2009.

UYSAL, A.; TURKMAN, A. Effect of biosurfactant on 2,4-dichlorophenol biodegradation in an activated sludge bioreactor, *Process Biochemistry*, v. 40, p. 2745–2749, 2005.

VAN-BEILEN, J.B.; FUNHOFF, E.G. Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, p. 13–21, 2007.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 67, p. 503-549, 2003.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge-contaminated soil. *Environment International*, v. 26, n. 5, p. 409-411, 2001.

VATER, J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S.S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 6210-6219, 2002.

- 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.
- VENOSA, A.D.; STEPHEN, J.R.; MACNAUGHTON, S.J.; CHANG, Y.; WHITE, D.C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Biorremediation*, 1999.
- VENTER, J.C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.F.; HALPERN, A.L.; RUSCH, D.; EISEN, J.A.; SMITH, H.O. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, v. 304(5667), p. 66-74, 2004.
- VIEIRA, C. K., DOS ANJOS BORGES, L. G., MARCONATTO, L., GIONGO, A., & STÜRMER, S. L. Microbiome of a revegetated iron-mining site and pristine ecosystems from the Brazilian Cerrado. *Applied Soil Ecology*, 131, 55-65, 2018.
- VINAS, M.; SABATÉ, J.; ESPUNY, M. J.; SOLANAS, A. M. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation CUNHA, C.D.; LEITE, S.G.F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 45-49, 2005.
- VINAS, M., SABATÉ, J., ESPUNY, M. J., & SOLANAS, A. M. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(11), 7008-7018, 2005.
- VOGEL T M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr Opin Biotechnol* 1996;7:311 – 6, 1996.
- 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. *Biores. Technol*, 99: 2687–2693, 2007.
- WAKELIN, S.A.; NELSON, P.N.; ARMOUR, J.D.; RASIAH, V.; COLLOFF, M.J. Bacterial community structure and denitrifier (*nir-gene*) abundance in soil water and groundwater beneath agricultural land in tropical North Queensland, Australia. *Soil Research*, v. 49(1), p. 65-76, 2011.
- WANG, H.; WANG, B.; DONG, W.; HU, X. Co-acclimation of bacterial communities under stresses of hydrocarbons with different structures. *Scientific Reports*, 6, 2016.
- WANG, H., ZENG, Y., GUO, C., BAO, Y., LU, G., REINFELDER, J. R., & DANG, Z. Bacterial, archaeal, and fungal community responses to acid mine drainage-laden pollution in a rice paddy soil ecosystem. *Science of the Total Environment*, 616, 107-116, 2018.
- WARD, N.L.; CHALLACOMBE, J.F.; JANSSEN, P.H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P.M.; WU, M.; BARABOTE, R.D. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Applied and environmental microbiology*, v. 75(7), p. 2046-2056, 2009.
- WATANABE, K., KODAMA, Y., & KAKU, N. Diversity and abundance of bacteria in an underground oil-storage cavity. *BMC microbiology*, 2(1), 23, 2002.

- WEISSENFELS, W. D., KLEWER, H. J., & LANGHOFF, J. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 36(5), 689-696, 1992.
- WELZ, P. J., KHAN, N., & PRINS, A. The effect of biogenic and chemically manufactured silver nanoparticles on the benthic bacterial communities in river sediments. *Science of The Total Environment*, 644, 1380-1390, 2018.
- WETLER-TONINI, R.M.C.; REZENDE, C.E.; GRATIVO, A.D. Degradação e biorremediação de compostos de petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia Australis*, v. 14, p. 1010-1020, 2010.
- WHITELEY, A.S.; JENKINS, S.; WAITE, I.; KRESOJE, N.; PAYNE, H.; MULLAN, B.; O'DONNELL, A. Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. *Journal of microbiological methods*, v. 91(1), p. 80-88, 2012.
- WILLEMS, A. The family Comamonadaceae. In: *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, p. 777-851, 2014.
- WILSON, A.S.; DAVIS, C.D.; WILLIAMS, D.P.; BUCKPITT, A.R.; PIRMOHAMED, M.; PARK, B.K. Characterisation of the toxic metabolite (s) of naphthalene. *Toxicology*, v. 114(3), p. 233-242, 1996
- WINDERL, C.; SCHAEFER, S.; LUEDERS, T. Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (bssA) genes as a functional marker. *Environmental microbiology*, v. 9(4), p. 1035-1046, 2007.
- WINQUIST, E.; BJÖRKLÖF, K.; SCHULTZ, E.; RÄSÄNEN, M.; SALONEN, K.; ANASONYE, F.; CAJTHAML, T.; STEFFEN, K.T.; JØRGENSEN, K.S.; TUOMELA, M. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi e From laboratory to field scale. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.86, p. 238-247, 2014
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol*, 51: 221-271, 1987.
- WOJCIESZYNSKA, D.; GUZIK, U.; GREN, I.; PERKOSZ, M.; HUPERT-KOCUREK, K. Induction of aromatic ring: cleavage dioxygenases in *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 in cometabolic systems. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 805-811, 2011.
- WREN, B.; VENOSA, A.D. Selective enumeration of aromatic an aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by most probable number. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 252-258, 1996.
- WYCISK, P., WEISS, H., KASCHL, A., HEIDRICH, S. & SOMMERWERK, K. Groundwater pollution and remediation options for multi-source contaminated aquifers. *Toxicol. Lett.* 140, 343-351, 2003.
- XIE, S., SUN, W., LUO, C., & CUPPLES, A. M. Novel aerobic benzene degrading microorganisms identified in three soils by stable isotope probing. *Biodegradation*, 22(1), 71-81, 2011.
- 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, p. 398-405, 2006.

- XU, Y.; SUN, G.D.; JIN, J.H.; LIU, Y.; LUO, M.; ZHONG, Z.P.; LIU, Z.P. Successful bioremediation of an aged and heavily contaminated soil using a microbial/plant combination strategy. *Journal of hazardous materials*, v. 264, p. 430-438, 2014.
- YADAV, T.C.; PAL, R.R.; SHASTRI, S.; JADEJA, N.B.; KAPLEY, A. Comparative metagenomics demonstrating different degradative capacity of activated biomass treating hydrocarbon contaminated wastewater. *Bioresource technology*, v. 188, p. 24-32, 2015.
- YANG, S.; WEN, X.; SHI, Y.; LIEBNER, S.; JIN, H.; PERFUMO, A. Hydrocarbon degraders establish at the costs of microbial richness, abundance and keystone taxa after crude oil contamination in permafrost environments. *Scientific Reports*, 6, 2016.
- YERGEAU, E, SANSCHAGRIN, S., BEAUMIER, D., & GREER, C. W. Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated Canadian high arctic soils. *PloS one*, 7(1), e30058, 2012.
- YU, S.H.; KE, L.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a consortium enrichment from mangrove sediments. *Environment International*, v. 32, p. 149–154, 2005.
- YUSTE, L., CORBELLA, M. E., TURIÉGANO, M. J., KARLSON, U., PUYET, A., & ROJO, F. Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS Microbiology Ecology*, 32(1), 69-75, 2000.
- 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*, 318, 702-710, 2016.
- ZEIN, M.M.; PINTO, P.X.; GARCIA-BLANCO, S.; SUIDAN, M.T.; VENOSA, A.D. Treatment of groundwater contaminated with PAHs, gasoline hydrocarbons, and methyl tert-butyl ether in a laboratory biomass-retaining bioreactor. *Biodegradation*, v. 17, p. 57-69, 2006.
- ZHANG, C., & ANDERSON, A. J. Polycyclic aromatic hydrocarbon degrading gene islands in five pyrene-degrading *Mycobacterium* isolates from different geographic locations. *Canadian journal of microbiology*, 58(1), 102-111, 2011.
- ZHANG, C.; LI, Q.; KANG, C. Waste water produced from an oilfield and continuous treatment with an oil-degrading bacterium. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 873–877, 2005.
- ZHANG, W.; CHEN, J.; YANG, Y.; TANG, Y.; SHANG, J.; SHEN, B. A practical comparison of de novo genome assembly software tools for next-generation sequencing technologies. *PloS one*, v. 6(3), e17915, 2011b.
- ZHANG, Z.; HOU, Z.; YANG, C.; MA, C.; TAO, F.; XU, P. Degradation of n-alkanes and polycyclic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4111- 4116, 2011a.
- ZHENG, W. Integrative microbial contamination assessment for water quality monitoring in the Great Lakes, 2012.
- ZHOU, H.W.; GUO, C.L.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. *FEMS Microbiology Letters*, v. 262(2), p. 148-157, 2006.

ZHU, B.; IBRAHIM, M.; CUI, Z.; XIE, G.; JIN, G.; KUBE, M.; ZHOU, X. Multi-omics analysis of niche specificity provides new insights into ecological adaptation in bacteria. *The ISME journal*, 2016

ZOCCA, C.; GREGORI, S.D.; VISENTINI, F.; VALLINI, G. Biodiversity amongst cultivable polycyclic aromatic hydrocarbon-transforming bacteria isolated from an abandoned industrial site. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 375–382, 2004.

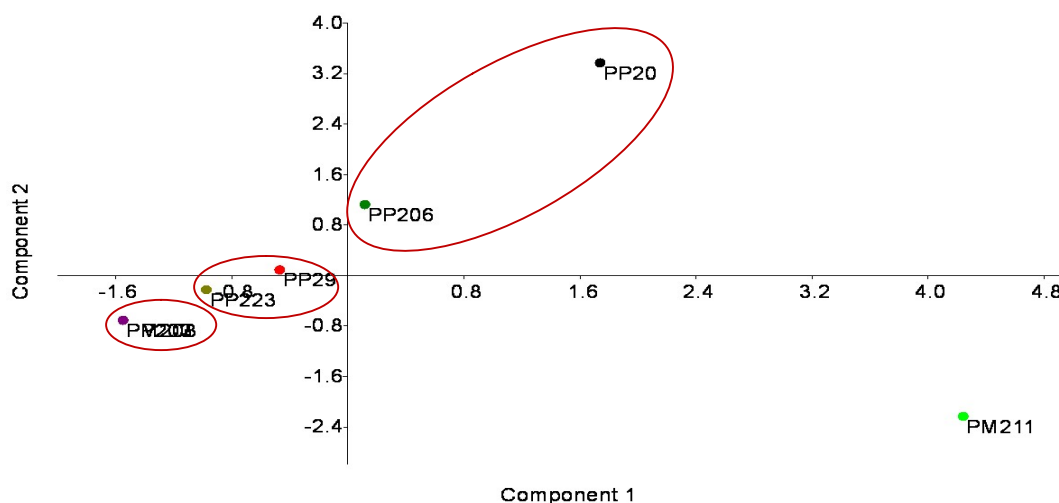
ZYLSTRA, G. J., KIM, E. & GOYAL, A. K. Comparative molecular analysis of genes for polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. *Genet. Eng.* 19, 257–269 (1997).

ANEXOS

Anexo 1: CP loadings, evidenciando A) a contribuição (coeficientes) e B) correlação de cada um dos contaminantes para com as componentes principais 1 e 2, na ACP realizada para agrupar as amostras da fração líquida do aquífero em função da concentração desses contaminantes.

A	Composto	CP1	CP2	B	Compostos	CP1	CP2
	1,2,4-Trimetilbenzeno	0.1928	0.1892		1,2,4-Trimetilbenzeno	0.8365	0.4592
	1,3,5-Trimetilbenzeno	0.2195	0.06271		1,3,5-Trimetilbenzeno	0.9523	0.1522
	Benzeno	0.0364	0.3244		Benzeno	0.1579	0.7875
	Estireno	0.1224	0.128		Estireno	0.5312	0.3106
	Etilbenzeno	0.006828	0.2285		Etilbenzeno	0.02962	0.5547
	Tolueno	0.04954	0.2794		Tolueno	0.2149	0.6782
	Xilenos_totais	0.07268	0.3327		Xilenos_totais	0.3153	0.8075
	2,3,4,6-Tetraclorofenol	0.1247	0.2443		2,3,4,6-Tetraclorofenol	0.5412	0.593
	2,4-Dimetilfenol	-0.0186	0.1166		2,4-Dimetilfenol	-0.08068	0.2829
	2-Metilfenol_(o-cresol)	0.1347	0.2438		2-Metilfenol_(o-cresol)	0.5842	0.5919
	2-Metilnaftaleno	0.2244	-0.04833		2-Metilnaftaleno	0.9733	-0.1173
	Acenafteno	0.2155	-0.1307		Acenafteno	0.9348	-0.3172
	Acenaftileno	0.2225	-0.07429		Acenaftileno	0.9653	-0.1803
	Antraceno	0.2281	-0.04965		Antraceno	0.9896	-0.1205
	Benzo(a)antraceno	0.2215	-0.1141		Benzo(a)antraceno	0.9606	-0.277
	Benzo(a)pireno	0.2211	-0.11		Benzo(a)pireno	0.9591	-0.267
	Benzo(b)fluoranteno	0.2183	-0.1299		Benzo(b)fluoranteno	0.9468	-0.3154
	Benzo(k)fluoranteno	0.2225	-0.1004		Benzo(k)fluoranteno	0.9651	-0.2438
	Benzo(g,h,i)perileno	0.2172	-0.1303		Benzo(g,h,i)perileno	0.9422	-0.3162
	Carbazol	0.1923	0.1364		Carbazol	0.834	0.3312
	Criseno	0.2208	-0.1185		Criseno	0.9577	-0.2876
	Di(2-etilhexil)ftalato	0.1347	0.2438		Di(2-etilhexil)ftalato	0.5842	0.5919
	Dibenzo(a,h)antraceno	0.04235	0.2522		Dibenzo(a,h)antraceno	0.1837	0.6122
	Dibenzofurano	0.2277	0.04397		Dibenzofurano	0.9876	0.1067
	Fenantreno	0.2286	-0.00744		Fenantreno	0.9918	-0.01807
	Fluoranteno	0.2277	-1.52E-05		Fluoranteno	0.9878	-3.70E-05
	Fluoreno	0.2264	-0.06706		Fluoreno	0.9821	-0.1628
	Indeno(1,2,3,cd)pireno	0.2145	-0.1463		Indeno(1,2,3,cd)pireno	0.9307	-0.3552
	Naftaleno	0.08191	0.3555		Naftaleno	0.3553	0.8629
	Pentaclorofenol	0.01685	0.2226		Pentaclorofenol	0.07308	0.5404
	Pireno	0.2237	-0.09469		Pireno	0.9703	-0.2298

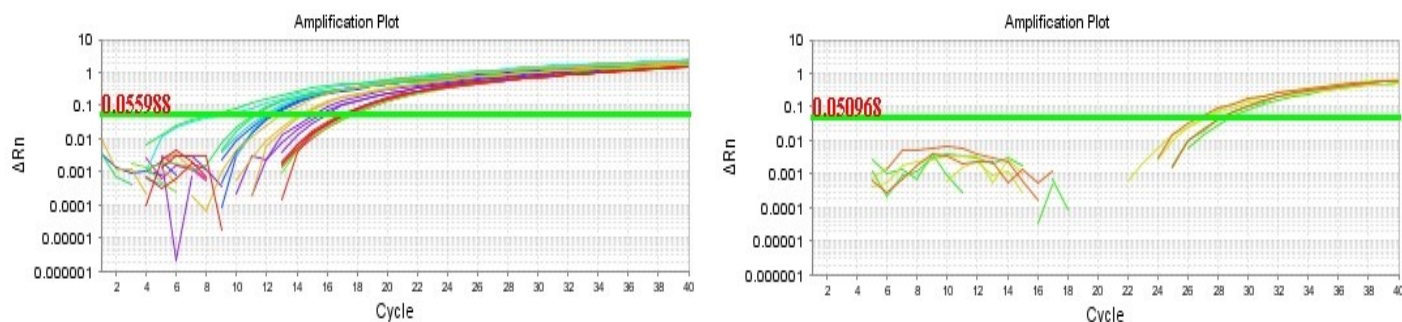
Anexo 2: Agrupamento obtido dos 8 pontos da fração líquida do aquífero amostrados, após os dados de COV e COSV mensurados para as amostras terem sido agrupados em função do número de anéis, por meio de ACP.



Anexo 3: Resultados dos coeficientes de correlação de Spearman obtidos na análise de correlação entre os parâmetros, abundância, riqueza e diversidade de OTUS calculados para as amostras de fração líquida do aquífero, a partir dos resultados das análises metataxonômicas, e os metadados.

	Abundância total	Otus observados	Chao1	Shanon	Simpson
Otus observados	0.952 0.000				
Chao1	0.881 0.004	0.952 0.000			
Shanon	0.095 0.823	0.333 0.420	0.476 0.233		
Simpson	0.072 0.865	0.349 0.396	0.494 0.213	0.952 0.000	
1 anel	-0.146 0.729	-0.342 0.408	-0.244 0.560	-0.610 0.108	-0.580 0.132
2 anéis	-0.220 0.601	-0.464 0.247	-0.415 0.307	-0.659 0.076	-0.728 0.040
3 anéis	-0.195 0.643	-0.464 0.247	-0.488 0.220	-0.708 0.050	-0.803 0.017
4 anéis	-0.390 0.339	-0.634 0.091	-0.683 0.062	-0.805 0.016	-0.877 0.004
5 anéis	-0.195 0.643	-0.464 0.247	-0.488 0.220	-0.708 0.050	-0.803 0.017
6 anéis	-0.326 0.431	-0.574 0.137	-0.639 0.088	-0.848 0.008	-0.878 0.004
TPH	-0.220 0.601	-0.464 0.247	-0.415 0.307	-0.659 0.076	-0.728 0.040

Anexo 4: Curvas de amplificação das amostras de fração líquida do aquífero para quantificação de A) bactérias e B) arqueas.



Anexo 5: Análise de variância (ANOVA) para a densidade de bactérias nas amostras de fração líquida de aquífero determinadas pela técnica de PCR quantitativo em tempo real

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRATAMENTO	7	7.740377	1.105768	20.099	0.0000
erro	16	0.880250	0.055016		
Total corrigido	23	8.620627			

DV (%) =	3.72				
Média geral:	6.2977758	Número de observações:	24		

Anexo 6: CP loadings, evidenciando A) a contribuição (coeficientes) e B) correlação de cada um dos parâmetros físico-químicos para com as componentes principais 1 e 2, na ACP realizada para agrupar as amostras dos sedimentos em função desses metadados.

A			B		
Parâmetros	CP1	CP2	Parâmetros	CP1	CP2
Porcentagem_de_sólidos_	-0.3882	-0.8662	Porcentagem_de_sólidos_	-0.3882	-0.8662
Carbono_orgânico_total_	0.4377	0.8855	Carbono_orgânico_total_	0.4377	0.8855
Nitrato_(com_o_N)_	-0.3557	-0.9301	Nitrato_(com_o_N)_	-0.3557	-0.9301
Nitrito_(com_o_N)_	0.3539	0.9291	Nitrito_(com_o_N)_	0.3539	0.9291
Nitrogênio_total_Kjeldah	0.000665	0.7829	Nitrogênio_total_Kjeldah	0.000665	0.7829
Nitrogênio_Total_	-0.00116	0.7808	Nitrogênio_Total_	-0.00116	0.7808
pH_	0.1674	-0.415	pH_	0.1674	-0.415
Fósforo_	0.9533	-0.07702	Fósforo_	0.9533	0.07702
Benzo(a)pireno_	-0.479	-0.04759	Benzo(a)pireno_	-0.479	0.04759
Benzo(b)fluoranteno_	-0.1158	0.1175	Benzo(b)fluoranteno_	-0.1158	0.1175
Criseno	0.9241	-0.1615	Criseno	0.9241	-0.1615
Fluoreno	0.9843	-0.116	Fluoreno	0.9843	-0.116
Antraceno	0.9727	-0.1987	Antraceno	0.9727	-0.1987
Fenantreno	0.9839	-0.1173	Fenantreno	0.9839	-0.1173
Dibenzo(a.h)antraceno_	-0.3874	0.2682	Dibenzo(a.h)antraceno_	-0.3874	0.2682
Indeno(1.2.3.cd)pireno_	-0.6203	0.08148	Indeno(1.2.3.cd)pireno_	-0.6203	0.08148

Pireno_	0.9853	-0.08705	Pireno_	0.9853	0.08705
Acenafteno_	0.9844	-0.116	Acenafteno_	0.9844	-0.116
Fluoranteno_	0.9859	-0.1088	Fluoranteno_	0.9859	-0.1088
Naftaleno_	0.9832	-0.1142	Naftaleno_	0.9832	-0.1142
Benzo(a)antraceno_	0.9611	-0.1075	Benzo(a)antraceno_	0.9611	-0.1075

Anexo 7 Seleção e abundância relativa de algumas enzimas preditas no metagenoma das amostras de sedimento envolvidos

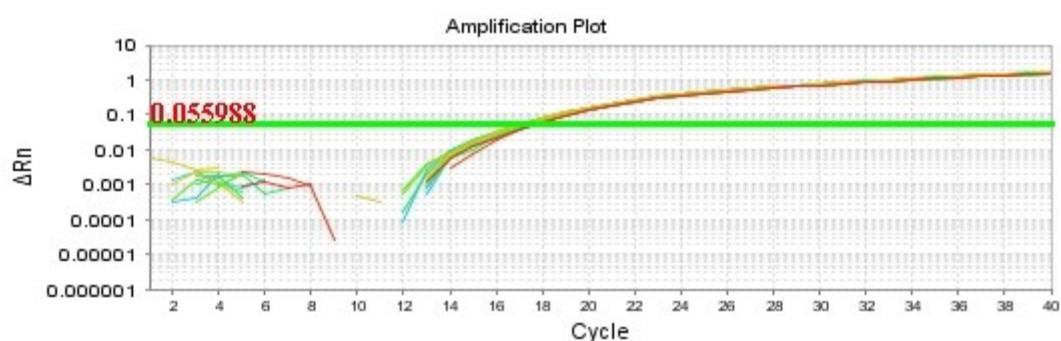
Função	K.O	Descrição Kegg	S129	S102	S138
Quorum sensing	K10108	malE; maltose/maltodextrin transport system substrate-binding protein	0.00172	0.00368	0.00235
	K07173	luxS; S-ribosylhomocysteine lyase [EC:4.4.1.21]	0.00027	0.00022	0.00006
	K07344	trbL; type IV secretion system protein TrbL	0.00434	0.00390	0.00662
	K02416	fliM; flagellar motor switch protein FliM	0.05182	0.04526	0.04713
	K03406	mcp; methyl-accepting chemotaxis protein	0.20657	0.19923	0.14651
	K03409	cheX; chemotaxis protein CheX	0.03501	0.03281	0.03586
	K11033	nheA; non-hemolytic enterotoxin A	0.00005	0.00000	0.00000
	K09936	TC.BAT2; bacterial/archaeal transporter family-2 protein	0.02279	0.01364	0.03071
	K03070	secA; preprotein translocase subunit SecA	0.06182	0.06897	0.06049
	K10912	luxO; two-component system, repressor protein LuxO	0.00029	0.00000	0.00018
Resistência a estressores ambientais	K07664	baeR, smeR two-component system, OmpR family, response regulator BaeR	0.00354	0.00552	0.01066
	K07662	cpxR two-component system, OmpR family, response regulator CpxR	0.06645	0.02783	0.05084
	K05527	BolA family transcriptional regulator, general stress-responsive regulator	0.01276	0.00725	0.00838
	K11932	uspG universal stress protein G	0.00043	0.00087	0.00093
	K08168	MFS transporter, DHA2 family, metal-tetracycline-proton antiporter	0.00546	0.01159	0.01267
	K07570	GSP13 general stress protein 13	0.00073	0.00650	0.00196
	K03799	htpX heat shock protein HtpX [EC:3.4.24.-]	0.05869	0.05479	0.05878
	K05978	stpA glucosylglycerol 3-phosphatase [EC:3.1.3.69]	0.00037	0.00076	0.00025
Formação de biofilme	K02659	pillI; twitching motility protein PillI	0.00328	0.00314	0.00186
	K11444	wspR; two-component system, chemotaxis family, response regulator WspR [EC:2.7.7.65]	0.00005	0.00011	0.00003
	K02658	pilH; twitching motility two-component system response regulator PilH	0.01727	0.01527	0.00662
	K02398	flgM; negative regulator of flagellin synthesis FlgM	0.03930	0.02425	0.03754
	K10941	fleQ; sigma-54 dependent transcriptional regulator, flagellar regulatory protein	0.01007	0.00509	0.00330
	K10930	tcpA; toxin coregulated pilin	0.00586	0.00476	0.01019

	wecC; UDP-N-acetyl-D-mannosaminuronic acid dehydrogenase [EC:1.1.1.336]	K02472	0.00049	0.00119	0.00079
	acfA; accessory colonization factor AcfA	K10936	0.00159	0.00206	0.00247
Metabolismo de fósforo	pphA serine/threonine protein phosphatase 1 [EC:3.1.3.16]	K07313	0.00982	0.01321	0.00830
	pphB serine/threonine protein phosphatase 2 [EC:3.1.3.16]	K07314	0.01093	0.00650	0.00363
	stpA glucosylglycerol 3-phosphatase [EC:3.1.3.69]	K05978	0.00064	0.00032	0.00024
	comB -2-phosphosulfolactate phosphatase [EC:3.1.3.71]	K05979	0.00382	0.00953	0.00211
	phrE phosphatase RapE regulator	K06354	0.00029	0.00011	0.00055
	phoA, phoB; alkaline phosphatase [EC:3.1.3.1]	K01077	0.02288	0.03248	0.01291
	ppa inorganic pyrophosphatase [EC:3.6.1.1]	K01507	0.10187	0.10546	0.10881
	sixA phosphohistidine phosphatase [EC:3.1.3.-]	K08296	0.04052	0.03508	0.05079
	ppaX pyrophosphatase PpaX [EC:3.6.1.1]	K06019	0.00056	0.00032	0.00034
Resistencia a metais	MFS transporter, DHA2 family, metal-tetracycline-proton antiporter	K08168	0.00103	0.00087	0.00052
	cation efflux system protein involved in nickel and cobalt tolerance	K11326	0.00421	0.00433	0.00284
	manganese/iron transport system permease protein	K09819	0.00517	0.01039	0.00583
	zinc transport system substrate-binding protein	K09815	0.01833	0.01570	0.01062
	heme acquisition protein HasA	K12545	0.00120	0.00130	0.00107
	mosAB molybdenum storage protein	K00947	0.02876	0.01787	0.03190
	cbiK nickel transport protein	K10094	0.00206	0.00195	0.00134
	cotA spore coat protein A, manganese oxidase [EC:1.16.3.3]	K06324	0.00066	0.00097	0.00037
	troB, mntB, znuC manganese/zinc/iron transport system ATP-binding protein		0.00492	0.01148	0.00510
	feoA ferrous iron transport protein A	K04758	0.03584	0.04093	0.02396
	ABC.ZM.P zinc/manganese transport system permease protein	K02075	0.00703	0.00704	0.00592
Produção de tensoativos	rgpF rhamnosyltransferase [EC:2.4.1.-]	K07272	0.00005	0.00011	0.00000
	lapA surface adhesion protein	K12549	0.00850	0.01004	0.01299
	rhaM L-rhamnose mutarotase [EC:5.1.3.32]	K03534	0.02521	0.01624	0.03086
	wapR alpha-1,3-rhamnosyltransferase [EC:2.4.1.-]	K12988	0.00047	0.00152	0.00024
	migA alpha-1,6-rhamnosyltransferase [EC:2.4.1.-]	K12987	0.01269	0.02371	0.01245
	rhaP rhamnose transport system permease protein	K10560	0.00010	0.00030	0.00032
	rhaT rhamnose transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.17]	K10562	0.00051	0.00089	0.00141

Redução de sulfato	K12990	rfbF; rhamnosyltransferase [EC:2.4.1.-]	0.00042	0.00087	0.00012
	K08357	ttrA; tetrathionate reductase subunit A	0.00216	0.00260	0.00195
	K02439	glpE; thiosulfate sulfurtransferase [EC:2.8.1.1]	0.00020	0.00022	0.00006
	K07306	dmsA; anaerobic dimethyl sulfoxide reductase subunit A [EC:1.8.5.3]	0.00015	0.00000	0.00003
	K07306	anaerobic dimethyl sulfoxide reductase subunit A [EC:1.8.5.3]	0.00015	0.00000	0.00003
	K18701	arsC; arsenate-mycothioliol transferase [EC:2.8.4.2]	0.00113	0.00195	0.00171
	K02048	cysP; sulfate transport system substrate-binding protein	0.02173	0.01895	0.01917
	K05301	sulfite dehydrogenase [EC:1.8.2.1]	0.00020	0.00043	0.00049
	K08352	phsA; thiosulfate reductase / polysulfide reductase chain A [EC:1.8.5.5]	0.01367	0.00888	0.00745
	K08353	phsB; thiosulfate reductase electron transport protein	0.00044	0.00065	0.00076
Resistência a antibióticos	K00133	asd; aspartate-semialdehyde dehydrogenase [EC:1.2.1.11]	0.08543	0.07623	0.09123
	K00602	purH; phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase / IMP cyclohydrolase [EC:2.1.2.3 3.5.4.10]	0.11942	0.12376	0.11745
	K00611	OTC; ornithine carbamoyltransferase [EC:2.1.3.3]	0.04881	0.05208	0.04328
	K14370	eryK; erythromycin 12 hydroxylase [EC:1.14.13.154]	0.00100	0.00173	0.00082
	K14374	aveD; avermectin B 5-O-methyltransferase [EC:2.1.1.-]	0.00012	0.00000	0.00006
	K02547	mecR1; methicillin resistance protein	0.00064	0.00097	0.00037
	K05366	mrcA; penicillin-binding protein 1A [EC:2.4.1.129 3.4.16.4]	0.12219	0.10319	0.11595
	K03712	MarR family transcriptional regulator, multiple antibiotic resistance protein MarR	0.01695	0.00520	0.02683
Metabolismo do Nitrogenio	K04561	norB; nitric oxide reductase subunit B [EC:1.7.2.5]	0.01416	0.01104	0.01392
	K02591	nifK; nitrogenase molybdenum-iron protein beta chain [EC:1.18.6.1]	0.01847	0.01473	0.01706
	K00926	arcC; carbamate kinase [EC:2.7.2.2]	0.00622	0.01429	0.00473
	K10944	pmoA-ammoA; methane/ammonia monooxygenase subunit A [EC:1.14.18.3 1.14.99.39]	0.00076	0.00173	0.00073
	K10944	pmoA-ammoA methane/ammonia monooxygenase subunit A [EC:1.14.18.3 1.14.99.39]	0.01551	0.01137	0.01377
	K04018	nrfG formate-dependent nitrite reductase complex subunit NrfG	0.00064	0.00054	0.00568
	K00374	narI, narV nitrate reductase gamma subunit [EC:1.7.5.1 1.7.99.-]	0.00294	0.00184	0.00256
	K00372	nasA; assimilatory nitrate reductase catalytic subunit [EC:1.7.99.-]	0.00840	0.01397	0.00977

K00531	anfG; nitrogenase delta subunit [EC:1.18.6.1]	0.00037	0.00043	0.00018
K02305	norC; nitric oxide reductase subunit C	0.00326	0.00292	0.00656
K00368	nirK; nitrite reductase (NO-forming) [EC:1.7.2.1]	0.01250	0.00801	0.00522

Anexo 8: Curvas de amplificação para quantificação de bactérias nas amostras de sedimentos



Anexo 9: Análise de variância (ANOVA) para a degradação média total do creosoto pelos isolados selecionados.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ISOLADOS	51	31638.842532	620.369461	5.203	0.0000
erro	104	12400.739600	119.237881		
Total corrigido	155	44039.582133			
CV (%) =	37.18				
Média geral:	29.3733753	Número de observações:	156		

Anexo 10: Análise de variância (ANOVA) para a degradação conjunta dos 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto usado nos ensaios pelos isolados selecionados

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ISOLADOS	51	27048.501087	530.362766	9.137	0.0000
erro	104	6037.060055	58.048654		
Total corrigido	155	33085.561141			
CV (%) =	34.46				
Média geral:	22.1080028	Número de observações:	156		

Anexo 11- Perfil de degradação dos 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto usado nos ensaios pelas bactérias isoladas das amostras de sedimento

Isolados Bacterianos	Fenantreno	Fluoranteno	Pireno	Fluoreno	Acenafteno	Ciclopenta fenantreno	2-metil tetracosano	Dibenzo furano	Dibenzo tiofeno	Antraceno	Benz[a] antraceno	Trifenileno	Total
<i>Acinetobacter tandoii</i> 4FM3	11.79	12	14.32	16.23	0	7.96	77.18	5.13	16.9	18.2	23.48	26.71	19.16
<i>Enterobacter</i> sp. 4FM1	0.03	1.78	1.77	23.62	15.07	0	78.74	5.08	0	0	8.27	0	9.8
<i>Enterobacter</i> sp. 5FM1	22.54	23.85	26.9	13.54	23.76	14.74	62.78	29.82	39.33	28.31	39.11	38.47	30.26
<i>Comamonas terrigena</i> 3FM8	30.97	50.88	39.84	70.66	39.06	41.73	25.49	29.4	95.59	53.59	44.13	30.4	45.98
<i>Acinetobacter junii</i> LAPM30	31.24	33.69	35.58	56.41	52.1	31.34	79.49	50.81	41.57	38.56	42.91	39.62	44.44
<i>Acinetobacter junii</i> LAPM41	19.79	24.25	27.59	33.92	0	20.68	82.1	1.68	35.39	21.5	39.97	38.9	28.81
<i>Acinetobacter oleivorans</i> 2FM4	0	0	0	4.89	4.04	0	73.66	0	0	0	5.96	8.93	8.12
<i>Acinetobacter oleivorans</i> 3FM11	0	0	0	3.82	12.28	0	27.17	0	15.27	0	11.82	13.23	6.96
<i>Alcaligenes</i> sp. LAPER94	7.02	5.64	11.83	36.86	20.42	9.9	52.55	23.31	12.78	18.18	9.97	4.12	17.71
<i>Bacillus</i> sp. 1FM9	15.4	19.48	18.7	21.69	41.98	20.23	20.65	27.67	18.12	21.23	18	21.14	22.02
<i>Bacillus</i> sp. 3FM7	1.47	8.49	9.61	31.05	23.99	0	77.21	12.04	8.05	11.33	20.1	18.47	18.48
<i>Bacillus</i> sp. LAPM39	43.06	45.36	48.31	58.05	41.28	46.61	49.65	47.9	39.6	47.93	47.34	55.41	45.54
<i>Bacillus subtilis</i> LAPER90	6.62	5.73	6.66	2.24	0	9.76	8.78	0	7.57	9.56	12.05	12.34	6.78
<i>Bacillus subtilis</i> LAPER93	37.33	38.69	40.78	39.08	26.93	42.05	43.28	42.23	40.15	41.13	46.7	45.45	40.32
<i>Bacillus</i> sp. 1FM14	6.57	0	3.38	37.99	22.58	0	78.65	18.09	5.09	6.94	0	0	14.94
<i>Bacillus</i> sp. 2FM2	29.29	42.21	45.01	67.54	42.28	17.61	18.06	25.85	3.22	49.02	36.57	30.43	33.92
<i>Bacillus</i> sp. 2FM6	0.92	0	11.62	0.75	2.37	4.24	12.71	7.97	18.85	3.73	6.49	3.85	6.12
<i>Bacillus</i> sp. 3FM3	10.5	10.63	11.63	33.71	9.32	6.47	75.53	11.04	13.07	8.39	17.54	16.52	18.7
<i>Bacillus</i> sp. 5FM3	5.27	8.16	9.39	29.9	27.35	0	73.48	18.03	3.41	5.25	16.59	16.86	17.81
<i>Comamonas terrigena</i> 3FM6	41.09	49.14	52.19	78.07	53.66	30.15	25.82	39.89	30.22	62.87	46.63	40.35	45.84
<i>Sphingobacterium</i> sp. 5FM2	31.68	32.27	35.54	45.43	16.45	38.73	39.54	31.35	48.05	39.57	48.73	45.97	37.78
<i>Enterobacter aerogenes</i> 5C10M1	2.61	6.39	3.94	7.62	8.76	0	83.39	11.75	0	3	0	1.97	9.7

<i>Enterobacter asburiae</i> LAPER64	17.3	21.63	21.07	42.27	35.67	12.49	95.71	33.33	32.78	19.46	30.73	25.16	32.3
<i>Enterobacter</i> sp. 3FM1	31.98	0	1.21	15.51	11.11	0	79.45	8.84	0	32.97	5.19	5.62	16.71
<i>Enterobacter</i> sp. 4FM4	17.48	19.65	21.25	16.6	28.31	21.14	23.52	17.32	18.81	21.57	32.51	31.36	22.46
<i>Enterobacter</i> sp. 2FM7	0	0	8.97	0	8.26	40.54	23.08	0.96	13.15	0	9.23	3.03	8.93
<i>Enterobacter</i> sp. 3C10M2	14.95	17.87	19.85	38.72	30.46	13.01	84.43	24.21	19.88	14.32	28.56	28.64	27.91
<i>Enterobacter</i> sp. 3FM2	15.95	26.46	17.98	33.08	56.7	36.8	28.69	35.48	8.98	39.99	2.77	1.07	25.33
<i>Enterobacter</i> sp. 3FM4	18.39	6.16	26.82	61.37	39.37	28.62	84.89	39.51	13.04	38.18	24.33	21.05	33.47
<i>Enterobacter</i> sp. 4FM2	6.92	3.58	9.36	26.08	15.16	10.96	74.82	3.41	39.17	12.53	31.59	29.71	21.94
<i>Leucobacter</i> sp. 4C10M2	16.28	18.7	17.87	20.74	11.86	12.29	86.04	22.24	16.18	21.03	16.05	18.89	23.18
<i>Enterococcus</i> sp. 1FM12	10.36	27.12	3.83	15.85	10.69	21.68	8.13	0	5.81	0	3.29	0	8.9
<i>Comamonas terrigena</i> 3FM9	62.38	46.31	50.25	68.36	14.8	22.78	21.86	21.06	89.62	54.16	45.28	40.26	44.76
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1FM7	3.99	59.02	8.94	31.95	31.54	5.65	71.23	19.52	11.39	14.1	9.72	6.11	22.76
<i>Pseudomonas monteilii</i> 3C10M1	18.6	21.74	24.03	40.35	40.5	18.67	79.91	26.59	31.04	25	35.01	35.82	33.11
<i>Pseudomonas monteilii</i> 1FM11	0	0	0	11.16	0	0	63.79	0	0	0	12.38	9.48	8.07
<i>Pseudomonas mosselii</i> 4C10M1	0	0	0	0	0	0	59.36	0	0	0	0	0	4.95
<i>Pseudomonas mosselii</i> 4C10M3	4.53	6.2	8.31	0.37	0	0	81.09	0.02	9.1	6.63	16.87	12.88	12.17
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> 3FM5	35.13	45.75	48.01	70.98	45.45	22.37	19.38	28.11	58.74	53.61	39.9	33.01	41.7
<i>Bacillus</i> sp. 3FM10	6.52	3.46	7.45	27.59	13.2	6.72	70.08	10.59	14.55	7.9	25.78	23.43	18.11
<i>Pseudomonas</i> sp. 1FM6	0	0	0	0	0	0	0	0	9.63	0	0	0	0.8
<i>Pseudomonas</i> sp. 3C10M3	35.27	37.6	40.61	45.22	57.03	41.17	41.69	48.68	49.35	39.34	50.73	48.66	44.61
<i>Pseudomonas</i> sp. 1FM1	18.48	21.2	25.51	31.66	46.5	37.3	48.26	38.16	24.97	40.47	27.51	22.27	31.86
<i>Psychrobacter</i> sp. 1FM5	0	0	0	10.28	0	0	68.61	0	0	0	0	0	6.57
<i>Sphingobacterium multivorum</i> 2FM1	5.72	1.71	8.58	25.43	11.11	5.2	70.97	2.8	39.61	10.11	5.86	25.81	17.74
<i>Sphingobacterium</i> sp. 1FM10	13.16	27.29	29.44	53.65	0	0	0	0	0	22.96	11.5	0	13.17
<i>Sphingobacterium</i> sp. 1FM2	20.95	0	32.14	40.3	43.77	41.58	39.6	41.36	51.53	42.51	33.43	31.74	34.91
<i>Sphingobacterium</i> sp. 2FM3	13.64	13.78	25.03	49.09	35.46	22.76	77.05	34.97	16.95	31.34	19.49	16.11	29.64
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> CVM1	8.72	10.49	8.77	30.08	13.06	0	49.75	11.91	4.46	5.96	1.85	6.06	12.59

<i>Stenotrophomonas</i> sp. LAPM27	19.22	36.44	37.44	52.63	0	0	0.94	0	7.85	29.96	37.42	27.79	20.81
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 1FM4	0	0	0	4.4	0	0	65.05	0	0	0	0	0	5.79

Anexo 12: Análise de variância (ANOVA) para a degradação individual dos 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto usado nos ensaios pelos isolados selecionados

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
COMPOSTOS	11	201967.216862	18360.656078	47.884	0.0000
erro	1824	699398.011694	383.441892		
Total corrigido	1835	901365.228556			
CV (%) =	91.71				
Média geral:	21.3525022	Número de observações:	1836		

Teste Scott-Knott (1974) para a FV COMPOSTOS

NMS: 0.05

Média harmonica do número de repetições (r): 153
 Erro padrão: 1.58308438161727

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
4H-Ciclopenta[def]fenantreno	12.918634	a1
Fenantreno	13.954116	a1
Fluoranteno	16.443104	a2
Dibenzofurano	16.502999	a2
Pireno	17.809293	a2
Trifenileno	18.389814	a2
Antraceno	18.451208	a2
Acenafteno	18.905148	a2
Dibenzotiofeno	19.092103	a2
Benz[a]antraceno	20.681830	a2
Fluoreno	29.496782	a3
2-metiltetracosano	53.584996	a4

Anexo 13: CP loadings, evidenciando a contribuição (coeficientes) dos isolados para com as componentes principais 1 e 2, na ACP realizada para agrupar os 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto em função de sua degradação média pelo isolados selecionados

Isolados	CP1	CP2	Isolados	CP1	CP2
1FM1	0.05675	-0.05379	3FM10	0.1769	0.03009
1FM2	0.02692	-0.02927	3FM11	0.06891	-0.03046
1FM4	0.1858	-0.0376	4FM1	0.2242	0.03899
1FM5	0.1973	-0.00531	4FM2	0.1777	0.02311
1FM6	-0.00281	0.002138	4FM3	0.1824	0.001955
1FM7	0.1567	0.1012	4FM4	0.005671	-0.04011
1FM9	0.002088	-0.03534	5FM1	0.1006	-0.08677
1FM10	-0.02796	0.4062	5FM2	0.00939	0.07659
1FM11	0.1806	-0.00531	5FM3	0.192	0.03604
1FM12	-0.00674	0.0275	CVM1	0.1277	0.105
1FM14	0.2185	0.09272	3C10M1	0.1615	0.0266
2FM1	0.1768	0.04612	3C10M2	0.1921	0.03398
2FM2	-0.02991	0.3238	3C10M3	6.86E-05	-0.02207
2FM3	0.165	0.08067	4C10M1	0.1686	-0.05874
2FM4	0.2079	-0.05827	4C10M2	0.1968	-0.02893
2FM6	0.01883	-0.02774	4C10M3	0.2127	-0.06941
2FM7	0.03459	-0.162	5C10M1	0.2284	-0.06407
3FM1	0.1984	0.001609	LAPM27	-0.0486	0.3927
3FM2	0.01496	-0.01221	LAPM30	0.126	0.04406
3FM3	0.1897	0.08279	LAPM39	0.01329	0.0635
3FM4	0.184	0.1072	LAPM41	0.1689	0.08516
3FM5	-0.05281	0.3368	LAPER64	0.2144	0.03635
3FM6	-0.04285	0.3123	LAPER90	0.002907	-0.01817
3FM7	0.2018	0.06896	LAPER93	0.008032	-0.00694
3FM8	-0.05323	0.2817	LAPER94	0.1239	0.09674
3FM9	-0.06816	0.3552			

Anexo 14: CP loadings, evidenciando a A) contribuição (coeficientes) e B) correlação dos os 12 compostos presentes em maior concentração no creosoto para com as componentes principais 1 e 2, na ACP realizada para agrupar os isolados selecionados em função da degradação média desses 12 compostos.

A

Composto	CP1	CP2
Fenantreno	0.2588	0.001096
Fluoranteno	0.2834	-0.07659
Pireno	0.3076	-0.03962
Fluoreno	0.3735	0.0804
Acenafteno	0.2694	0.147
4H-Ciclopenta[def]fenantreno	0.2435	-0.01209
2-metiltetracosano	-0.1508	0.9544
Dibenzofurano	0.26	0.1789
Dibenzotiofeno	0.3484	0.02856
Antraceno	0.3488	0.00146
Benz[a]antraceno	0.2911	0.07486
Trifenileno	0.2619	0.1225

B

Composto	CP1	CP2
Fenantreno	0.9036	0.002202
Fluoranteno	0.8181	-0.1273
Pireno	0.959	-0.0711
Fluoreno	0.8515	0.1055
Acenafteno	0.737	0.2314
4H-Ciclopenta[def]fenantreno	0.7908	-0.02261
2-metiltetracosano	-0.2636	0.9602
Dibenzofurano	0.8012	0.3173
Dibenzotiofeno	0.7873	0.03715
Antraceno	0.9422	0.002269
Benz[a]antraceno	0.8812	0.1304
Trifenileno	0.8217	0.2213

Anexo 15: Análise de variância (ANOVA) para o crescimento dos isolados em meio mineral suplementado com creosoto 0,25% (v/v), avaliado por meio de leituras de Densidade ótica a 600 nm.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ISOLADOS	51	13.515881	0.265017	8.829	0.0000
erro	104	3.121817	0.030017		
Total corrigido	155	16.637698			
DV (%) =	40.33				
Média geral:	0.4295833	Número de observações:	156		

Anexo 16: Análise de variância (ANOVA) para a degradação de creosoto usado na matriz de sedimento pelos isolafos seleciona

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA					
FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
ISOLADOS	14	2260.805313	161.486094	10.208	0.0000
erro	30	474.595219	15.819841		
Total corrigido	44	2735.400532			
CV (%) =	57.58				
Média geral:	6.9072886	Número de observações:	45		

Teste Scott-Knott (1974) para a FV ISOLADOS	
NMS:	0.05

Média hamonica do número de repetições (r):	3
Erro padrão:	2.29636238695364

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
3FM5	0.000000	a1
3FM6	0.000000	a1
LAPM30	0.000000	a1
1FM14	0.000000	a1
1FM12	0.000000	a1
1FM1	0.000000	a1
LAPM39	2.084392	a1
4FM2	5.447179	a1
LAPERS3	7.347989	a1
2FM2	9.650273	a2
3C10M2	10.566137	a2
3FM9	15.951408	a3
5FM2	16.659207	a3
3FM8	17.931379	a3
LAPM27	17.971365	a3

Anexo 17: Análise de variância (ANOVA) por meio de modelos lineares generalizados (GLM) utilizando o teste F em nível de significância de 5% para avaliar se os fatores presença de microrganismos autóctones na amostra (sedimento não esterilizado), adição de consórcio, nutrientes e aeração afetaram significativamente o crescimento dos isolados em ensaios de biorremediação em microcosmo na matriz de sedimento avaliado por meio de contagens e cálculo de UFC g⁻¹.

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	84.992	1.321	64.268	2e-16 ***
Esterilização- sim	84.392	1.730	48.779	2e-16 ***
Nutrientes-sim	10.306	1.730	5.957	3.22e-06 ***
Consórcio - sim	-11.917	1.730	-6.888	3.21e-07 ***
Esterilização-sim.Nutrientes-sim	-11.366	1.998	-5.690	6.34e-06 ***
Esterilização-sim:Consórcio-sim	98.718	1.998	49.415	2e-16 ***
Nutrientes-sim:Consórcio-sim	-4.099	1.998	-2.052	0.508 .

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

Adjusted R-squared: 0.7386

Anexo 18: Análise de variância (ANOVA) por meio de modelos lineares generalizados (GLM) utilizando o teste F em nível de significância de 5% para avaliar se os fatores presença de microrganismos autóctones na amostra (sedimento não esterilizado), adição de consórcio, nutrientes e aeração afetaram significativamente a degradação de creosoto (%) em ensaios de biorremediação em microcosmo na matriz de sedimento avaliado por meio de cromatografia gasosa.

DESCRITIVA POR TRAT

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
esterilizacao	2	esteril naoester
nutrientes	2	nao sim
consorcio	2	nao sim
aeracao	2	nao sim

Number of observations 32

=====

DESCRITIVA POR TRAT

The GLM Procedure

Dependent Variable: Degradacao

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	15	6305.031750	420.335450	16.32	<.0001
Error	16	412.069200	25.754325		
Corrected Total	31	6717.100950			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Degradacao Mean
0.938654	6.175407	5.074872	82.17875

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
esterilizacao	1	2422.428013	2422.428013	94.06	<.0001
nutrientes	1	43.012813	43.012813	1.67	0.2146
consorcio	1	2484.772512	2484.772512	96.48	<.0001
aeracao	1	20.865800	20.865800	0.81	0.3814
esteriliz*nutrientes	1	0.231200	0.231200	0.01	0.9257
esteriliza*consorcio	1	971.523200	971.523200	37.72	<.0001
esterilizaca*aeracao	1	67.570312	67.570312	2.62	0.1248
nutrientes*consorcio	1	0.001250	0.001250	0.00	0.9945
nutrientes*aeracao	1	34.320612	34.320612	1.33	0.2653
consorcio*aeracao	1	19.500013	19.500013	0.76	0.3971
esteri*nutrie*consor	1	67.686613	67.686613	2.63	0.1245
esteri*nutrie*aeraca	1	0.884450	0.884450	0.03	0.8553
esteri*consor*aeraca	1	140.616450	140.616450	5.46	0.0328

nutrie*consor*aeraca	1	16.245000	16.245000	0.63	0.4387
este*nutr*cons*aerac	1	15.373512	15.373512	0.60	0.4510

=====

DESCRITIVA POR TRAT

The GLM Procedure
Least Squares Means

esterilizacao	consorcio	aeracao	Degradacao LSMEAN	Standard Error	Pr > t	LSMEAN Number
esteril	nao	nao	62.7325000	2.5374360	<.0001	1
esteril	nao	sim	55.5800000	2.5374360	<.0001	2
esteril	sim	nao	88.7450000	2.5374360	<.0001	3
esteril	sim	sim	86.8550000	2.5374360	<.0001	4
naoester	nao	nao	84.0550000	2.5374360	<.0001	5
naoester	nao	sim	91.1000000	2.5374360	<.0001	6
naoester	sim	nao	96.4125000	2.5374360	<.0001	7
naoester	sim	sim	91.9500000	2.5374360	<.0001	8

Least Squares Means for effect esteri*consor*aeraca
Pr > |t| for H0: LSMean(i)=LSMean(j)

Dependent Variable: Degradacao

i/j	1	2	3	4	5	6	7	8
1		0.0636	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
2	0.0636		<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001	<.0001
3	<.0001	<.0001		0.6056	0.2097	0.5210	0.0484	0.3850
4	<.0001	<.0001	0.6056		0.4466	0.2541	0.0170	0.1749
5	<.0001	<.0001	0.2097	0.4466		0.0672	0.0033	0.0428
6	<.0001	<.0001	0.5210	0.2541	0.0672		0.1582	0.8158
7	<.0001	<.0001	0.0484	0.0170	0.0033	0.1582		0.2316
8	<.0001	<.0001	0.3850	0.1749	0.0428	0.8158	0.2316	