

PAOLA SAMANTHA HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ

**PREDAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS SOBRE ULTRAMICROCÉLULAS
BACTERIANAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBONETOS E SEU EFEITO
SOBRE A BIORREMEDIAÇÃO DE AGREGADOS DE SOLO CONTAMINADOS
COM PETRÓLEO**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016

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

T

H557p
2016

Hernández Fernández, Paola Samantha, 1988-
Predação de protozoários sobre ultramicrocélulas
bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos e seu efeito sobre a
biorremediação de agregados de solo contaminados com petróleo
/ Paola Samantha Hernández Fernández. – Viçosa, MG, 2016.
x, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Marcos Rogério Tótola.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.39-45.

1. Solos - Poluição. 2. Biorremediação. 3. Protozoário -
Predação (Biologia). 4. Petróleo. I. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de
Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.

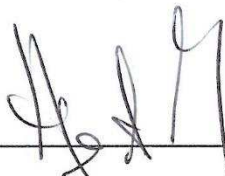
CDD 22. ed. 628.55

PAOLA SAMANTHA HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ

**PREDAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS SOBRE ULTRAMICROCÉLULAS
BACTERIANAS DEGRADADORAS DE HIDROCARBONETOS E SEU EFEITO
SOBRE A BIORREMEDIAÇÃO DE AGREGADOS DE SOLO CONTAMINADOS
COM PETRÓLEO**

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

APROVADA: 20 de maio de 2016.



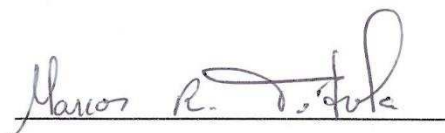
Hugo Alberto Ruiz
(Coorientador)



Antônio Galvão de Nascimento



Ivo Ribeiro da Silva



Marcos Rogério Tótola
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Alianças para a Educação e Capacitação (PAEC-OEA), ao Acordo de Cooperação entre a Organização dos Estados Americanos (OEA), o Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras, e principalmente à Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos e de crescimento pessoal e profissional fora do meu país.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao professor Marcos Rogério Tótola, por sua orientação e apoio na realização do meu trabalho.

Aos meus coorientadores Hugo Alberto Ruiz e Mauricio Dutra Costa pelo assessoramento e ajuda durante a fase de meu projeto.

Aos colegas de Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, pela agradável convivência, ajuda e conselhos sempre que precisei.

À minha família que sempre respeita e apoia minhas decisões, mesmo quando essas decisões envolvam distanciamento e sacrifícios. E por ser minha incentivadora dia à dia para realizar meus sonhos. Amo vocês!

A minha segunda família no Brasil: A galera da microbiologia, por sua paciência com meus problemas de comunicação, pela amizade, momentos incríveis, pela ajuda acadêmica e pessoal que foram fundamentais para minha permanência neste país, e para a finalização deste projeto. Particularmente agradeço de coração o apoio e a amizade de Andres, Aneli, Alan, Hanna, Juan, Phil e Thyara. E as minhas lindas colombianas que foram meu apoio e me acompanharam cada dia nesta trajetória, presenteando-me com sua amizade (Dahiana e Johana,).

SUMÁRIO

Lista de Figuras	v
Lista de tabelas	vi
Resumo.....	viii
Abstract	x
1 INTRODUÇÃO.....	x
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Petróleo	3
2.2 Contaminação de solo com petróleo	3
2.3 Estratégias de recuperação dos solos contaminados com hidrocarbonetos.....	3
2.4 Biorremediação in situ e ex situ.....	4
2.4.1 Biorremediação in situ: bioatenuação, bioestimulação e bioaumentação.....	5
2.5 Fatores que interferem na biorremediação	6
2.5.1 Solo	6
2.5.2 Interações ecológicas.....	7
2.5.3 Predação bacteriana por protozoários.....	7
2.6 Proteção contra a predação	10
2.7 Ultramicrocélulas bacterianas como alternativa na biorremediação in situ.....	10
3 HIPÓTESE.....	13
4 OBJETIVOS.....	14
4.1 Objetivo geral	14
4.2 Objetivos específicos	14
5 MATERIAL E MÉTODOS	15
5.1 Coleta do solo e obtenção de agregados do solo	15
5.2 Obtenção do consórcio microbiano	17
5.2.1 Bactérias	17
5.2.2 Ultramicrocélulas bacterianas (UMCs)	17
5.2.3 Protozoários	18
5.3 Preparação dos microcosmos	18
5.3.1 Contaminação do solo.....	20
5.3.2 Inoculação de micro-organismos	20
5.3.3 Montagem dos microcosmos	20
5.4 Avaliações	21
5.4.1 Medição da área celular das UMCs.....	21
5.4.2 Estimativa da abundância de protozoários.....	21
5.4.3 Avaliação da atividade microbiana	21
5.4.4 Determinação da quantidade de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH)....	21
5.5 Análise estatística	22
6 RESULTADOS	23
6.1 Ultramicrocélulas bacterianas (UMCs).....	23
6.2 Atividade microbiana (produção de CO ₂).....	25
6.3 Hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH).....	29
6.4 Número mais provável de protozoários (NMP).....	31
7 DISCUSSÃO.....	33

8 CONCLUSÕES	38
9 REFERÊNCIAS.....	39
10 APÊNDICE A.....	46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagens em 2D e 3D obtidas a partir de Microscopia de Força Atômica das ultramicrocélulas bacterianas (UMCs) das diferentes culturas bacterianas, após 60 dias de incubação em condições de desnutrição (200 rpm e 14 °C). A) Duas células de *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04; B) *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11; C) conjunto de células de *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b; D) aglomeração celular de *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA.....26
- Figura 2.** Curvas de acumulação de CO₂ ao longo de 30 dias de ensaio para a determinação da atividade metabólica do consórcio de bactérias (B) e ultramicrocélulas bacterianas (UMCs); de protozoários (P) e da interação bactérias/protozoários (BP) e ultramicrocélulas bacterianas/protozoários (UMCsP) dentro de microagregados (Mi) e macroagregados (Ma) no solo com petróleo (O). Os microcosmos foram incubados a temperatura ambiente e mantidos a 60% da CRA.....28
- Figura 3.** Histogramas representando os contrastes analisados da produção de CO₂ após 30 dias de ensaio. *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.....30
- Figura 4** Histogramas representando os contrastes analisados da quantidade de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) após 30 dias de ensaio. *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.....32
- Figura 5.** Histograma representando os contrastes analisados de NMP de protozoários após 30 dias de ensaio. *Significativo a 5% pelo teste F.....34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Caracterização física e química dos agregados de solo.....16
- Tabela 2.** Descrição dos tratamentos, constituídos de dois grupos principais (com e sem petróleo) e suas interações com os diferentes fatores: macroagregados (Ma) e microagregados (Mi); bactérias de tamanho normal (B); ultramicrocélulas bacterianas (UMCs); presença de protozoários (P). Controles abióticos (sem microorganismos) e os controles com apenas o consórcio de protozoários.....20
- Tabela 3.** Médias da produção de CO₂ acumulado após 30 dias de ensaio, considerando-se a ausência e presença de petróleo (O₀ e O_P), o tamanho dos agregados (M_i: microagregados; M_a: macroagregados), a ausência ou a presença de bactérias (B₀: ausência; B_P: presença de bactérias maiores; UMCs: presença ultramicrocélulas bacterianas) e a ausência ou presença de protozoários (P₀ e P_P).....29
- Tabela 4.** Contrastes da emissão acumulada de CO₂ após 30 dias de ensaio, considerando a ausência e presença de petróleo (O₀ e O_P), o tamanho dos agregados (M_i: microagregados; M_a: macroagregados), a ausência ou a presença de bactérias (B₀: ausência; B_P: presença de bactérias maiores; UMCs: presença de ultramicrocélulas bacterianas) e a ausência ou presença de protozoários (P₀ e P_P). O primeiro termo do contraste sempre será precedido do sinal negativo.....30
- Tabela 5.** Hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) em amostras que receberam petróleo, considerando o tamanho dos agregados (M_i: microagregados; M_a: macroagregados), a ausência ou a presença de bactérias (B₀: ausência; B_P: presença de bactérias maiores; UMCs: presença de ultramicrocélulas bacterianas) e a ausência e presença de protozoários (P₀ e P_P).....31
- Tabela 6.** Contrastes entre os resultados dos teores residuais de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) em microcosmos que receberam a aplicação de petróleo, considerando-se o tamanho dos agregados (M_i: microagregados; M_a: macroagregados), a ausência ou a presença de bactérias (B₀: ausência; B_P: presença de bactérias maiores; UMCs: presença de ultramicrocélulas bacterianas) e a ausência e presença de protozoários (P₀ e P_P). O primeiro termo do contraste sempre será precedido do sinal negativo.....32
- Tabela 7.** Número mais provável (NMP) de protozoários nos microcosmos considerando-se a ausência e presença de petróleo (O₀ e O_P), o tamanho dos agregados (M_i: microagregados; M_a: macroagregados) e a ausência ou a presença de bactérias (B₀:

ausência; B_P: presença de bactérias maiores; UMC_s: presença de ultramicrocélulas bacterianas)33

Tabela 8. Contrastes do número mais provável (NMP) de protozoários nos tratamentos onde foram inoculados, considerando-se a ausência e presença de petróleo (O₀ e O_P), o tamanho dos agregados (M_i: microagregados; M_a: macroagregados) e a ausência ou a presença de bactérias (B₀: ausência; B_P: presença de bactérias maiores; UMC_s: presença de ultramicrocélulas bacterianas. O primeiro termo do contraste sempre será precedido do sinal negativo.....34

RESUMO

HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Paola Samantha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2016. **Predação de protozoários sobre ultramicrocélulas bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos e seu efeito sobre a biorremediação de agregados de solo contaminados com petróleo.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Coorientadores: Hugo Alberto Ruiz e Mauricio Dutra Costa.

A contaminação de solos por petróleo e seus derivados tem exigido o desenvolvimento de estratégias para melhorar a eficiência dos processos envolvidos na remoção dos hidrocarbonetos contaminantes. Entre elas, a bioaugmentação, como parte dos processos de biorremediação in situ, representa uma das alternativas para descontaminação ambiental. No entanto, a heterogeneidade do ambiente edáfico e as interações ecológicas microbianas, como a predação, representam um desafio no sucesso da adaptação e desempenho metabólico dos consórcios microbianos inoculados. Em razão disso, a utilização de bactérias hidrocarbonoclásticas que possam se adaptar e se proteger da predação por protozoários pode representar um avanço no processo de bioaugmentação. Portanto, nesse trabalho se avaliou a capacidade de degradação de petróleo e de proteção contra a predação por protozoários, de um consórcio de ultramicrocélulas bacterianas (UMCs) hidrocarbonoclásticas em microcosmos contendo dois tipos de agregados de solo, agregados > 0,5 mm até 4,75mm e agregados < 0,5 mm. A hipótese do trabalho era que as UMCs pudessem colonizar os microporos, proteger-se da predação por protozoários e utilizar as moléculas de hidrocarbonetos retidas nesses locais e indisponíveis para bactérias de maior dimensão. Após 30 dias de incubação, foram determinados a atividade microbiana (emissão de CO₂), número mais provável de protozoários (NMP) e concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) residual. Maior produção de CO₂ foi obtida nos tratamentos sem petróleo e nos microcosmos contendo protozoários + bactérias de tamanho normal e protozoários + UMCs. Maior número de protozoários foi encontrado na presença de UMCs. Em relação à concentração de TPH, a degradação foi influenciada negativamente pela inoculação do consórcio bacteriano, tanto no estado fisiológico normal quanto no estado de UMCs. Concluiu-se que as características intrínsecas do solo limitaram o estabelecimento e crescimento dos dois distintos estados fisiológicos bacterianos dentro dos agregados, o que impediu sua atividade hidrocarbonoclástica. A predação não teve influência na degradação dos hidrocarbonetos e os predadores foram beneficiados na presença de UMCs. Portanto, a mudança celular a estado de UMCs imposta por estresse fisiológico não contribuiu para a proteção das populações bacterianas no interior dos microporos do solo ou para diminuir a

pressão de predação pelos protozoários, nem para melhorar a eficiência da degradação de hidrocarbonetos no solo.

ABSTRACT

HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, Paola Samantha, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2016. **Protozoan predation on hydrocarbons degrading bacterial ultramicrocells and its effect on bioremediation of soil aggregates contaminated with crude oil.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-advisers: Hugo Alberto Ruiz and Mauricio Dutra Costa.

Soil contamination by oil and oil products demand the development of strategies to improve the process to remove hydrocarbons from soil. Set of in situ strategies are termed bioremediation. One critical strategy is a bioaugmentation. However, soil heterogeneity and ecological microbial interactions, such as protozoa predation, represent a challenge in the success of adaptation and metabolic activity of bacterial populations introduced into soil. For this reason, the use of hydrocarbonoclastic bacteria which are able to adapt and protect themselves from protozoan predation, may represent an enhancement in the bioaugmentation process. Therefore, the aim of this study was to evaluate the hydrocarbons oil degradation capacity and protection against protozoan predation of a bacterial consortium induced to ultramicrocells (UMCs) in soil microcosms with aggregates of <4,75- 0,5 mm and 0,5 mm contaminated with crude oil. Our hypothesis was that UMCs could penetrate soil micropores, there UMCs could protect themselves from protozoan predation and use hydrocarbons molecules retained in these micropores and unavailable for large bacteria. After 30 days of incubation were determined the microbial activity (CO₂), most probable number of protozoa (NMP) and the total petroleum hydrocarbons concentration (TPH). Increased CO₂ production was obtained in the treatments without oil and microcosms containing protozoa + normal bacteria and protozoa + UMCS. The number of protozoa increase in the presence of UMCs. Regarding the concentration of TPH, degradation was negatively influenced by the introduction of the bacterial consortium, as normal physiological state or state of UMCs. Thus, we concluded that soil intrinsic characteristics and addition of crude oil, restricted the establishment and growth of bacterial consortium in both physiological states into aggregates soil, thereby inhibiting its hydrocarbonoclastic activity. Predation had no effect on the hydrocarbons degradation and predators were benefited from the presence of UMCs, so cell change for UMCs state by physiological stress, it did not help to protect within soil micropores from protozoan predation or to enhance the hydrocarbon degradation in soil.

1 INTRODUÇÃO

A alta demanda por petróleo tem como consequência a ocorrência de derramamentos acidentais durante as atividades de exploração, refino e transporte, o que resulta na contaminação de diferentes ambientes. Em razão dos potenciais danos ambientais causados pelo petróleo ou seus derivados, estratégias de biorremediação têm sido adotadas como parte do esforço de remoção dessa classe de contaminantes (ALMEIDA et al., 2010).

A biorremediação envolve o uso das capacidades metabólicas dos micro-organismos para degradar os poluentes. A eficiência do processo depende de muitos fatores intrínsecos do ambiente afetado e das suas interações com e entre os micro-organismos presentes, assim como do potencial fisiológico para a degradação dos diferentes compostos presentes no petróleo (HAMAMURA et al., 2006; HEAD et al., 2006).

A biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos representa um desafio, não apenas pela toxicidade e recalcitrância de muitos hidrocarbonetos, mas também pela grande variabilidade e heterogeneidade física e química dos solos e pelas múltiplas interações biológicas que ali ocorrem (HAMAMURA et al., 2006). Assim, a decomposição e a mineralização dos hidrocarbonetos dependem do conjunto desses fatores (LARA et al., 2007).

Interações como a predação bacteriana têm um papel crucial nesses processos, ao permitir a transferência do carbono entre diferentes níveis tróficos, o incremento da ciclagem do carbono e a regulação da estrutura e atividade da comunidade bacteriana potencialmente degradadora de hidrocarbonetos (MATTISON et al., 2005). Os principais predadores bacterianos do solo são os protozoários heterotróficos. Os protozoários regulam a densidade das populações bacterianas e previnem a entrada das bactérias na fase estacionária, ao estimularem seu crescimento populacional pelos produtos de excreção liberados após a predação, o que conseqüentemente incrementa a mineralização do carbono e nitrogênio no solo (ENGLAND et al., 1992; BONKOWSKI, 2004; BEAUDOIN et al., 2014).

Quando um evento de contaminação por petróleo ocorre no solo, tem-se como resultado um aumento na abundância de bactérias tolerantes aos hidrocarbonetos e com a capacidade de degradar esses compostos. Concomitantemente, há um incremento na abundância de protozoários tolerantes a esses contaminantes, cuja consequência é uma maior pressão de predação sobre as bactérias ainda em fase de adaptação. Esse aumento da predação na fase de adaptação da comunidade bacteriana reduz o número de células

bacterianas e retarda o seu crescimento, a ponto de causar uma inibição temporária da biodegradação do petróleo (RØNN et al., 2001; BEAUDOIN et al., 2014).

Mesmo que a coevolução predador-presa tenha resultado em estratégias de adaptação das populações bacterianas contra a predação, os protozoários, por sua vez, diversificaram-se num grande número de espécies e morfotipos, conseguindo preda diferentes populações bacterianas. Dessa maneira, bactérias degradadoras introduzidas no solo podem ainda não possuir mecanismos de proteção contra a predação nos novos ambientes e podem ser facilmente eliminadas pelos protozoários predadores (MATZ e KJELLEBERG, 2005; GERTLER et al., 2010).

Embora as bactérias estejam sujeitas à ação dos protozoários, a heterogeneidade do ambiente edáfico oferece diferentes formas de proteção física contra a predação. Os agregados do solo fornecem poros de diferentes dimensões, que dificultam o acesso dos predadores. Os poros de menor dimensão ou microporos evitam a entrada dos predadores e mesmo de células bacterianas, funcionando como refúgio apenas para bactérias de menor dimensão (VARGAS e HATTORI, 1986; POTSMAN et al., 1989; HASSINK, et al., 1993; RØNN et al., 2002).

Neste trabalho, propõe-se que a inoculação de bactérias hidrocarbonoclasticas em solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, após sua indução a um estado de pequena dimensão celular (ultramicrocélulas (UMCs)), pode ser utilizada como uma estratégia para reduzir sua exposição à predação por protozoários e para aumentar a eficiência da degradação do petróleo, já que essas populações poderiam utilizar moléculas do contaminante retidas em microporos inacessíveis a células bacterianas de maior dimensão. O resultado dessa combinação de fatores seria o aumento da eficiência do processo de biorremediação in situ de solos contaminados com petróleo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Petróleo

O petróleo ou óleo cru é um material heterogêneo, contendo uma mistura complexa de hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos. Os constituintes do petróleo podem ser classificados em quatro grupos químicos distintos: hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, compostos não-hidrocarbonetos, resinas e asfaltenos (HEAD et al., 2006).

A proporção relativa de cada fração depende de muitos fatores, como a origem, a história geológica, idade e alteração do óleo cru (BALBA et al., 1998). Essa variação é a razão das diferenças na cor e viscosidade do petróleo entre os diferentes pontos de extração (HEAD et al., 2006).

2.2 Contaminação de solo com petróleo

O petróleo tornou-se uma das principais fontes de energia com o início e crescimento das atividades industriais, mas também se converteu num dos principais contaminantes no ambiente (VALENTIN et al., 2013)

A introdução do petróleo e seus derivados no solo está ligada a atividades relacionadas com a emissão de escoamentos urbanos, efluentes municipais e industriais e vazamentos durante a produção, transporte e armazenagem do petróleo (CHAÎNEAU et al., 2002; WELTER-TONINI et al., 2010).

Dada a complexa composição e toxicidade da maioria dos componentes do petróleo para os organismos, sua ocorrência no ambiente constitui um grande risco ambiental e sanitário (CHAÎNEAU et al., 2002; WELTER-TONINI et al., 2010). Em razão disso, têm sido desenvolvidas e adotadas diversas estratégias como parte de esforços para a remoção dessa classe de poluentes e para a recuperação de ambientes contaminados com petróleo (ALMEIDA et al., 2010).

2.3 Estratégias de recuperação de solos contaminados com hidrocarbonetos

Existem diferentes estratégias para a restauração ou remediação de solos contaminados com petróleo e a sua classificação depende do tipo de processo empregado e dos elementos envolvidos na eliminação do contaminante. Classificam-se principalmente em três diferentes grupos: o que emprega processos físicos; o que emprega processos químicos e o que emprega processos biológicos (GAN et al., 2009).

O tratamento de remediação baseado na utilização de processos físicos faz uso principalmente do calor para a volatilização ou destruição dos compostos orgânicos, seja por meio da incineração, dessorção térmica e/ou extração térmica de vapores (GAN et al., 2009).

Os processos químicos baseiam-se principalmente na oxidação química dos poluentes por meio de agentes químicos, na degradação fotocatalítica e/ou na degradação eletrocinética (GAN et al., 2009).

Em muitas situações, adota-se a integração de processos, como o uso de solventes previamente ao processo de oxidação química. O emprego de solventes permite a dessorção dos compostos fortemente adsorvidos para facilitar sua extração. Também o uso de substâncias surfactantes previamente à oxidação eletroquímica contribui para melhorar a degradação dos hidrocarbonetos (GAN et al., 2009).

As substâncias surfactantes são utilizadas para melhorar a solubilidade e dispersão de moléculas hidrofóbicas, como os hidrocarbonetos. Os surfactantes são moléculas anfífilas sintetizadas quimicamente ou de origem microbiológica, que agem como emulsificantes, envolvendo as moléculas hidrofóbicas dentro de núcleos ou micelas que podem ser mobilizadas e dispersadas numa fase aquosa. Com isso, consegue-se aumentar a eficiência da lavagem do solo e/ou a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos para sua utilização como fonte de carbono pelas populações microbianas (DAS e CHANDRAN, 2011; MEGHARAJ et al., 2011; ADAMS et al., 2015; CHEN et al., 2015).

A estratégia de remediação com base em processos biológicos é conhecida como biorremediação. A biorremediação envolve o uso de organismos e/ou seus produtos metabólicos com o potencial de sequestrar, mineralizar e/ou transformar contaminantes em substâncias atóxicas. A biorremediação de solos contaminados com petróleo geralmente visa dar suporte ao desenvolvimento dos micro-organismos capazes de degradar os hidrocarbonetos do petróleo para diminuir sua concentração no ambiente (BALBA et al., 1998; VENKATA et al., 2006; VALENTIN et al., 2013; CHEN et al., 2015).

A biorremediação é considerada uma estratégia economicamente viável, eficiente e menos invasiva ao ambiente, sendo, portanto, uma alternativa tecnológica para a remoção de contaminantes orgânicos (VENKATA et al., 2006; VALENTIN et al., 2013).

2.4 Biorremediação in situ e ex situ

A biorremediação pode ser classificada como in situ e ex situ. A biorremediação in situ ocorre no local contaminado e tira proveito da microbiota autóctone capaz de metabolizar as moléculas contaminantes para a obtenção de energia ou para eliminar seus efeitos tóxicos sobre as células microbianas (MEGHARAJ et al., 2011; VALENTIN et al., 2013). Os métodos in situ são geralmente os de menor custo. A eficiência do processo está sujeita às condições naturais como: natureza do solo; condições biológicas e físico-químicas; uso de estratégias que possam manter as condições propícias para prolongar e melhorar a atividade degradadora da microbiota no ambiente natural (SARMA et al., 2014). Em comparação, no emprego da biorremediação ex situ, o material poluído é levado para pilhas ou reatores onde as condições são mantidas adequadas para a atividade microbiana responsável pela biodegradação dos contaminantes, o que resulta em uma biodegradação mais rápida, mas que também envolve custo mais elevado (MEGHARAJ et al., 2011).

2.4.1 Biorremediação in situ: bioatenuação, bioestimulação e bioaugmentação

A biorremediação in situ baseia-se no potencial metabólico da microbiota autóctone para degradar as diferentes moléculas de hidrocarbonetos do petróleo no local contaminado. Assim, sua eficácia depende da diversidade e abundância de micro-organismos degradadores no ambiente alvo do processo. Por sua vez, os micro-organismos dependem de diversos fatores para metabolizarem eficientemente (VENKATA et al., 2006; MEGHARAJ et al., 2011; CHEN et al., 2015). Nesse sentido, considerando a biorremediação in situ, é possível implementar as estratégias de bioatenuação, bioestimulação e bioaugmentação de acordo com a capacidade de resiliência do ambiente, de forma a prolongar e melhorar a atividade de degradação.

Na bioatenuação ou remediação intrínseca, os processos de degradação biológica e outros como a volatilização, a dispersão, a diluição e a sorção do contaminante agem naturalmente, sem a intervenção humana, diminuindo gradativamente a concentração dos contaminantes. O uso da bioatenuação é adequada a locais contaminados com moléculas com baixa toxicidade e de fácil degradação (MULLIGAN e YONG, 2004; MEGHARAJ et al., 2011).

A bioestimulação tem por objetivo assegurar as condições ambientais adequadas para estimular e manter o crescimento dos micro-organismos autóctones degradadores, acelerando com isso a taxa de degradação. A bioestimulação envolve, portanto, a

manipulação de fatores como a disponibilidade de água, de oxigênio, de nutrientes, o pH, etc. (ADAMS et al., 2015; CHEN et al., 2015). Entretanto, não são todos os micro-organismos do ambiente capazes de metabolizar os hidrocarbonetos do petróleo. Além disso, aqueles que possuem tal capacidade podem ser insuficientes para metabolizar o conjunto de moléculas contaminantes que fazem parte de misturas complexas, como o petróleo. Por isso, o emprego da bioaumentação pode ser necessário. Essa estratégia baseia-se na inoculação de biomassa microbiana com a capacidade de degradar os compostos de difícil degradação ou aqueles que a microbiota original não possa metabolizar (VENKATA et al., 2006). Dada a complexidade química dos hidrocarbonetos, geralmente se faz imprescindível o uso de consórcios ou grupos funcionais microbianos para degradar os diferentes tipos de hidrocarbonetos (ADAMS et al., 2015).

Esses consórcios microbianos, utilizados como inóculos, são conjuntos de micro-organismos comumente isolados de ambientes contaminados e que, portanto, possuem a capacidade de sobreviver e degradar as moléculas constituintes do petróleo (DAS e CHANDRAN, 2011; ADAMS et al., 2015).

A bioaumentação tem sido utilizada em solos onde a microbiota autóctone precisa de longos períodos de adaptação, em solos com baixo número de micro-organismos degradadores e em solos onde a microbiota autóctone não é capaz de degradar todos os hidrocarbonetos (MEGHARAJ et al., 2011; ADAMS et al., 2015).

O uso conjunto da bioestimulação e a bioaumentação tem melhorado a taxa de degradação do petróleo em solos, além de melhorar a qualidade do solo e diminuir a toxicidade do poluente (SARMA et al., 2014).

2.5 Fatores que interferem na biorremediação

2.5.1 Solo

A implementação das estratégias de biorremediação em solos contaminados por compostos orgânicos tem apresentado dificuldades. A principal causa é a complexidade e grande variabilidade do ambiente edáfico (MEGHARAJ et al., 2011).

Além da toxicidade de muitos dos hidrocarbonetos do petróleo exercida sobre a microbiota autóctone, os micro-organismos que podem utilizar esses hidrocarbonetos como fonte de energia raramente conseguem fazer uso total dos hidrocarbonetos de petróleo, dada a sua baixa disponibilidade (DAS e CHANDRAN, 2011; ADAMS, 2015). Sendo assim, um dos principais desafios na biorremediação é a biodisponibilidade dos contaminantes. Essa

biodisponibilidade é influenciada por muitos fatores, incluindo as características químicas do composto e propriedades do solo como textura, teor de matéria orgânica, teor de água, pH e estrutura física. Muitos componentes do petróleo são pouco solúveis e facilmente adsorvidos à superfície das partículas de solo. Como consequência, as moléculas orgânicas ficam aprisionados dentro da matriz porosa do solo, limitando sua difusão na fase aquosa e reduzindo a sua acessibilidade para os micro-organismos, o que diminui sua degradação (KYOUOPHILE e ALEXANDER, 1998; MROZIK e PIOTROWSKA-SEGET, 2010; VALENTIN et al., 2013; JOHNSEN et al. 2005; ADAMS et al., 2015; KLAMERUS-IWAM, et al., 2015).

Durante a bioestimulação, existe o problema da distribuição uniforme dos aditivos no solo, de maneira que os nutrientes adicionados muitas vezes não podem ser acessados pelos micro-organismos potencialmente degradadores. Entretanto, esses aditivos podem ser utilizados por outros micro-organismos que competem fortemente com a microbiota capaz de degradar os hidrocarbonetos (ADAMS et al., 2015). Surge, portanto, outro fator que pode se tornar um inconveniente para a biorremediação, consistindo nas interações ecológicas entre as populações microbianas do solo.

2.5.2 Interações ecológicas

A maioria dos micro-organismos autóctones consegue adaptar-se e sobreviver no ambiente poluído. Algumas poucas populações utilizam o poluente como fonte de energia e interagem eficientemente com a microbiota. Embora micro-organismos inoculados durante a bioaugmentação possam resistir a possíveis efeitos tóxicos dos contaminantes e metabolizá-los, diversos fatores ambientais podem limitar o seu estabelecimento na comunidade microbiana, incluindo a competição com populações autóctones. Nesse sentido, fatores intrínsecos podem se tornar os principais obstáculos durante o processo da bioaugmentação (MEGHARAJ et al., 2011).

Além de competir e estar susceptíveis aos efeitos de interações antagônicas com a microbiota bacteriana autóctone, as bactérias inoculadas na bioaugmentação estão sujeitas à predação, principalmente por protozoários (MEGHARAJ et al., 2011).

.5.3 Predação bacteriana por protozoários

Os protozoários são um grupo diverso, apresentando dimensão celular que varia entre 10 μm a mais de 100 μm de comprimento. A grande diversidade entre os protozoários implica em diferenças na morfologia, estruturas celulares, meios de locomoção, formação de estruturas de resistência, formas de reprodução e função ecológica. Tomando por base os diferentes meios de locomoção, os protozoários são agrupados em: amebas, que fazem uso de pseudópodes para sua movimentação; ciliados, cujas células possuem cílios para sua locomoção e alimentação; e os protozoários flagelados, que têm um ou mais flagelos para mover-se no ambiente (BAMFORTH, 1985; FOISSNER, 1999).

Os protozoários bacterívoros dependem de sua morfologia e locomoção para predar, o que determina sua capacidade para atingir e predar sobre as diferentes populações bacterianas no solo. Os protozoários ciliados e flagelados dependem de umidade alta no solo para se mover através da matriz porosa em procura de presas bacterianas. Canais que não possuem umidade suficiente não são acessíveis para esses protozoários. No entanto, em solos com menor disponibilidade de água, como resultado de sua locomoção por pseudópodes, as amebas de vida livre podem mover-se na maior parte da matriz porosa do solo e atingir um maior número de populações bacterianas. Mesmo que amebas de grande tamanho não possam entrar nos pequenos poros do solo, elas conseguem atingir e predar bactérias em poros de menor dimensão, ao alongar pseudópodes finos que podem acessar esses microhabitats (BAMFORTH, 1985; BAMFORTH, 1992; RODRIGUEZ-ZARAGOZA, 1994; BONKOWSKI, 2004; RODRIGUEZ-ZARAGOZA et al., 2005).

Os diferentes mecanismos de predação entre os protozoários lhes tem permitido explorar diferentes meios e predar diferentes populações bacterianas. Em razão disso, são considerados os principais predadores bacterianos do ambiente terrestre, regulando e mantendo a diversidade funcional da comunidade bacteriana. A predação previne a entrada das populações bacterianas em fase estacionária, pela constante renovação de bactérias na comunidade. A manutenção do crescimento bacteriano acelerado é capaz de contrabalancear a perda de biomassa pela predação, o que resulta em aumento da captação de substratos orgânicos, a ciclagem de matéria orgânica e a taxa de mineralização do carbono (POSCH, et al., 1999; KINNER et al., 2002; BONKOWSKI, 2004; MURASE et al., 2006; GERTLER et al., 2010). Além disso, a ação predatória resulta em incremento na mineralização do nitrogênio proveniente da biomassa bacteriana, em razão de sua liberação como produto de excreção (ENGLAND et al., 1992; BONKOWSKI, 2004; HEAD et al., 2006; GERTLER et

al., 2010, BEAUDOIN et al., 2014). Esse incremento na mineralização do carbono e nitrogênio no solo representa uma vantagem para os micro-organismos do solo que estão comumente sob estresse nutricional (ENGLAND et al., 1992).

Em solos contaminados com hidrocarbonetos, são encontrados protozoários de Euplotidae, Scuticociliatia, Acanthamoebidae e Valhkamphidae. No entanto, a comunidade de protozoários muda em resposta à classe, ao teor e ao grau de toxicidade dos hidrocarbonetos presentes, assim como à mudança da estrutura da comunidade bacteriana (ZARDA et al., 1998; LARA et al., 2007; GERTLER et al., 2010; CORTES-PEREZ, 2014).

Quando ocorre um evento de contaminação com hidrocarbonetos, um aumento súbito na abundância de populações bacterianas que conseguiram adaptar-se e degradar os contaminantes gera um aumento na abundância de protozoários que conseguem sobreviver na presença do contaminante e preda essas populações bacterianas (RØNN et al., 2001). Portanto, existe uma pressão de predação sobre as populações degradadoras que leva a uma redução das suas densidades. Na fase inicial, isso ocasiona um aumento na taxa de degradação de hidrocarbonetos por cada célula bacteriana, o que posteriormente mantém a comunidade bacteriana em constante crescimento (ROGERSON e BERGER, 1983; HOLUBAR et al., 2000; MATTISON e HARAYAMA 2001; KINNER et al., 2002; MATTISON et al., 2005; TSO et al., 2006).

Logo após a contaminação, quando as populações hidrocarbonoclásticas ainda se encontram em fase de adaptação, a predação retarda o crescimento dessas populações. A predação pode causar uma inibição temporária da biodegradação e dificultar a recuperação dos consórcios bacterianos introduzidos, podendo causar sua eliminação (KOTA et al., 1999; MATTISON et al., 2005).

KOTA et al., (1999) e BEAUDOIN et al., (2014) mostraram que uma diminuição na pressão de predação por protozoários permitiu às populações microbianas hidrocarbonoclásticas iniciar o seu crescimento mais rapidamente do que na presença de protozoários. Em parte, isso se deve ao investimento energético bacteriano para mecanismos de defesa contra os predadores. Além disso, uma intensa predação sobre as populações com capacidade de degradar os diferentes hidrocarbonetos pode limitar a remediação de poluentes complexos, como o petróleo (BEAUDOIN et al., 2014).

A coevolução predador-presa levou ao desenvolvimento de estratégias bacterianas contra a predação, a saber: mudanças na morfologia celular, produção de toxinas e formação de biopelículas. Ao mesmo tempo, os protozoários também se diversificaram em espécies

com morfotipos diversos, ajustando-se aos diferentes tamanhos e morfologias de suas presas bacterianas (MATZ e KJELLEBERG, 2005; GERTLER et al., 2010). Entretanto, bactérias degradadoras de hidrocarbonetos introduzidas nos solos podem não possuir estratégias contra a predação por protozoários existentes nesses ambientes, estando, portanto, sujeitas à eliminação, o que elimina os benefícios esperados da bioaumentação.

2.6 Proteção contra a predação

Mesmo que a complexidade do solo represente um desafio, o solo fornece diferentes nichos microbianos que podem permitir o estabelecimento de uma grande diversidade de micro-organismos. Esses micro-habitats localizados dentro da matriz porosa do solo se diferenciam pela dimensão do espaço poroso. O tamanho do poro depende da textura do solo e do tamanho dos agregados, o que é determinante para o fluxo de gases, água, nutrientes, micro-organismos e para a biodisponibilidade das moléculas orgânicas contaminantes (VENKATA et al., 2006).

Poros de pequena dimensão representam um habitat bacteriano factível para o crescimento das populações bacterianas hidrocarbonoclásticas e o acesso a moléculas aprisionadas nesses habitats, evitando ainda a predação por protozoários, que dificilmente podem atingir esses poros (WRIGHT, et al., 1995).

Por isso, entre as características desejáveis de um inóculo microbiano a ser empregado em bioaumentação, destacam-se, além do potencial metabólico dos micro-organismos, a sua adaptação a condições adversas do ambiente e sua capacidade de colonizar pequenos poros do solo, permitindo-lhes o acesso aos contaminantes presentes nesses locais (van VEEN et al., 1997; ADAMS et al., 2015) e o escape à predação.

2.7 Ultramicrocélulas bacterianas como alternativa na biorremediação in situ

Inóculos bacterianos que ficam protegidos das interações antagônicas com a microbiota autóctone podem representar uma alternativa para melhorar a eficiência no processo de biorremediação de solos contaminados com óleo. Uma dessas alternativas é o uso de bactérias de menor dimensão, como as ultramicrobactérias e ultramicrocélulas bacterianas (LAPPIN-SCOTT e COSTERTON, 1992; VELIMIROV, 2001; PERNTHALER, 2005).

As ultramicrobactérias (UMBs) e ultramicrocélulas (UMCs) são bactérias fenotipicamente similares. Não obstante, elas se diferenciam por sua fisiologia celular. As

UMBs são bactérias capazes de viver de forma independente, possuindo dimensões celulares extremamente pequenas, $0,1 \mu\text{m}^3$ de volume e um diâmetro menor que $0,3 \mu\text{m}$. As UMBs têm sido isoladas de ambientes considerados limitantes, como o ambiente marinho e edáfico, onde o fluxo de nutrientes é variável. Portanto, seu tamanho pequeno parece ser uma adaptação desenvolvida em ambientes com baixa biodisponibilidade de nutrientes. As UMBs conservam sua pequena dimensão inclusive quando expostas a meios ricos em nutrientes, diferentemente das ultramicrocélulas (UMCs).

As UMCs são bactérias com diâmetro maior que $0,3 \mu\text{m}$, que sofreram uma diminuição no seu tamanho em resposta à exposição a diferentes condições de estresse, como a limitação de nutrientes, mudanças de temperatura e oscilações de pH, e que desenvolveram mudanças fisiológicas que lhes permitem sobreviver nessas condições. Quando as condições de estresse mudam para condições ideais de crescimento, as UMCs recuperam sua dimensão e atividade fisiológica normais (LAPPIN-SCOTT e COSTERTON, 1990; VELIMIROV, 2001; DUDA et al., 2012).

O conceito atual de UMBs é considerado uma característica taxonômica, enquanto a definição de UMCs representa características celulares que podem apresentar diferentes grupos bacterianos (DUDA et al., 2012).

As UMBs e UMCs conseguem sobreviver sob condições de estresse por meio da alteração da fisiologia celular, que lhes permite diminuir os requerimentos para a manutenção da célula e evitar a morte celular. Esse mecanismo de regulação leva à degradação de material intracelular não essencial para a sobrevivência e mantém os requerimentos de energia da célula. A redução da taxa metabólica e o uso lento de reservas alteram a biomassa celular, provocando a redução do tamanho e aumentando a área superficial, de forma a otimizar as interações entre as células e o meio circundante. Essas características proporcionam melhoria na captação de nutrientes e prolongam a sobrevivência da célula (MARDEN et al., 1985; YOUNG, 2006; SCHLEHECK, 2009; PORTILLO et al., 2013).

Uma das causas na mudança da morfologia celular das UMBs e UMCs se deve a uma alteração na composição da parede celular nas condições de desnutrição, principalmente na produção de exopolissacarídeos. Duas principais respostas têm sido observadas: algumas bactérias incrementam a produção de polissacarídeos que favorecem a adesão e, portanto, a aglomeração celular e a formação de biopelículas, enquanto outras bactérias respondem com uma diminuição da produção desses polissacarídeos e menor capacidade de adesão. Essa

última resposta, em conjunto com a diminuição da dimensão celular, é de interesse biotecnológico para aplicação dessas células no processo de injeção de fluidos nos reservatórios de óleo, com o objetivo de melhorar a recuperação de hidrocarbonetos (LAPPIN-SCOTT e COSTERTON, 1990).

Estudos demonstram o estabelecimento de bactérias sob condições de desnutrição dentro dos canais de menor tamanho do extrato rochoso dos poços de produção de petróleo, com posterior retomada de sua atividade metabólica e morfologia usuais após a injeção de nutrientes. Dentro dos canais, as bactérias podem formar densas massas populacionais, aglomerando-se e tamponando os canais rochosos. Isso reduz os núcleos de alta permeabilidade, o que evita o desvio do fluido de injeção para outras áreas e assegura sua ação sobre o óleo residual, melhorando sua extração (LAPPIN-SCOTT e COSTERTON, 1990).

Nesse sentido, a introdução de UMCs de bactérias hidrocarbonoclásticas em solos contaminados com petróleo pode ser uma alternativa no processo de biorremediação in situ. Especula-se que as UMCs possam atingir poros menores e estabelecer-se no interior dos microhabitats inacessíveis a outros micro-organismos. Com isso, estariam menos expostas à predação por protozoários e conseguiriam fazer uso das moléculas de hidrocarbonetos que ficam retidas nos microporos, melhorando a eficiência de biodegradação dos hidrocarbonetos.

3 HIPÓTESE

Ultramicrocélulas bacterianas (UMCs) podem colonizar microporos inacessíveis a bactérias de dimensão normal, tornando-se protegidas da predação por protozoários, mantendo a sua atividade metabólica e aumentando a eficiência na biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo, ao utilizarem moléculas contidas nesses locais não-disponíveis à comunidade bacteriana de tamanho normal.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da predação de populações bacterianas e ultramicrocélulas bacterianas hidrocarbonoclásticas (UMCs) por protozoários sobre a eficiência da degradação de hidrocarbonetos de petróleo em duas classes de agregados de solos (4,75 mm - 0,5 mm e < 0,5 mm).

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da predação de bactérias e ultramicrocélulas bacterianas (UMCs) por protozoários durante a degradação de hidrocarbonetos do petróleo e solos.

- Avaliar se a degradação de hidrocarbonetos do petróleo em microcosmos contendo diferentes tamanhos de agregados de solo (4,75 mm - 0,5 mm e < 0,5 mm) inoculados com ultramicrocélulas bacterianas (UMCs) é mais eficiente do que em microcosmos inoculados com bactérias de dimensão normal.

- Determinar se as ultramicrocélulas bacterianas (UMCs) podem se proteger dentro dos microagregados e diminuir a taxa de predação por protozoários.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Solo

O solo utilizado nesse estudo foi classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo, proveniente de uma profundidade de 0 a 30 centímetros abaixo da camada subsuperficial dentro da floresta, na área militar denominada Tiro de Guerra, pertencente à Mata Atlântica no município de Viçosa, MG, sem antecedentes de contaminação com hidrocarbonetos.

5.2 Obtenção dos agregados de solo

A separação dos agregados de solo foi realizada mediante peneiramento do solo seco (VARGAS e HATTORI, 1986). Realizou-se inicialmente um peneiramento com peneira vibratória de abertura de malha de 4,75 mm, para obtenção dos nomeados neste trabalho macroagregados, seguido de peneiramento em peneira com abertura de 0,5 mm, para a separação dos agregados menores, denominados neste trabalho como microagregados.

A caracterização química e física do solo foi realizada no Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Caracterização física e química dos agregados de solo

Parâmetro	Microagregados (<0,5 mm)	Macroagregados (4,75 - 0,5 mm)
Análise Granulométrica		
Areia grossa (kg/kg) ^{a/}	0,125	0,215
Areia fina (kg/kg) ^{a/}	0,098	0,141
Silte (kg/kg) ^{b/}	0,035	0,021
Argila (kg/kg) ^{b/}	0,743	0,623
Classificação textural	Muito argilosa	Muito argilosa
Retenção de água		
-10 KPa (kg/kg)	0,331	0,311
-30kPa (kg/kg)	0,322	0,294
-60kPa (kg/kg)	0,291	0,26
-100kPa (kg/kg)	0,274	0,247
-1500kPa (kg/kg)	0,229	0,21
Densidade do solo (kg/dm ³) ^{c/}	0,91	1,03
Nitrôgenio (dag/kg) ^{e/}	0,403	0,288
P (mg/dm ³) ^{f/}	2,1	4,1
K (mg/dm ³) ^{f/}	36	41
pH em água	4,6	4,67
Ca (cmol _c /dm ³) ^{g/}	0,55	0,54
Mg (cmol _c /dm ³) ^{g/}	0,13	0,13
Carbono orgânico (dag/Kg) ^{h/}	3,59	3,44
Fósforo remanescente (mg/L) ^{i/}	16	7,8

^{a/}Peneiramento (Ruiz, 2004). ^{b/}Método da pipeta (Ruiz, 2004). ^{c/}Método da proveta (Ruiz, 2004). ^{e/}Metodo Kjeldahl (Tedesco et al., 1985). ^{f/}Extrator Mehlich-1. ^{g/}Extrator KCL 1 mol/L. ^{h/}Método Walkley-Black. ^{i/}Extrator CaCl₂ 0,01 mol/L. ^{g/ h/ i/ j/} Procedimentos baseados no manual de laboratório de análises químicas de fertilidade do solo (2005) do Departamento de Solos da UFV.

Após peneiramento, o solo foi autoclavado a 103 KPa de pressão e 121 °C durante 20 minutos e adicionou-se CaCO₃ e MgCO₃ na proporção de 5:1 para a correção de pH a 7.

O solo recebeu aplicação dos elementos K (150 mg/dm³ na forma de KCl), N (200 mg/dm³ na forma de (NH)₂SO₄) e P (200 mg/dm³ na forma de Na₂HPO₄).

5.3 Obtenção dos consórcios microbianos

5.3.1 Bactérias

Utilizou-se um consórcio bacteriano composto dos isolados bacterianos *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04, *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58, *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b e *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11, previamente caracterizados como hidrocarbonoclasticos (LOPES, 2009). Esses isolados foram obtidos de amostras coletadas em ambientes contaminados com petróleo e são mantidos a -80 °C na coleção de culturas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente do Departamento de Microbiologia da UFV. Cada cultura foi reativada em ágar R₂A (Reasoner's 2A) durante 24 h a 30 °C e uma colônia foi inoculada em 10 ml de caldo Luria-Bertani (LB). Após 22 h a 30 °C e 200 rpm de agitação orbital, foram transferidos 2 ml da cultura para 100 ml de caldo LB em frasco de Erlenmeyer de 250 ml. Os frascos foram incubados a 30 °C por 22 horas sob agitação de 200 rpm (FARAHAT e EL-GENDY, 2008). As culturas foram centrifugadas a 10.000 g por 20 minutos, lavadas duas vezes e ressuspensas em 100 ml de solução de tampão fosfato (1X) durante 24 h.

A concentração de células cultiváveis nas suspensões foi determinada por meio de diluições seriadas e inoculação em placas com ágar LB. Microscopia de luz a 1.000X foi utilizada para calcular a área celular média de cada isolado nessas condições de crescimento, com base na medição automática da área de 100 células bacterianas por meio do software Image-Pro plus versão 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA).

5.3.2 Ultramicrocélulas bacterianas (UMCs)

Os isolados bacterianos foram reativados em meio R₂A e cultivados em caldo LB, conforme descrito anteriormente. Após a lavagem em solução tampão fosfato (1X), as células foram ressuspensas em 500 ml de solução tampão fosfato (1X) em um frasco Erlenmeyer de 1 L e mantidas a 14 °C sob 200 rpm de agitação durante aproximadamente 60 dias, para induzir a diminuição de tamanho em resposta à limitação de nutrientes. A mudança morfológica foi observada durante os primeiros 10 dias sob microscopia óptica e o diâmetro celular foi determinado por microscopia de força atômica.

A culturabilidade e densidade de células viáveis foram determinadas por diluições seriadas e plaqueamento em ágar LB (LAPPIN-SCOTT et al., 1988; TRUEX et al., 1992).

5.3.3 Protozoários

Os protozoários foram extraídos a partir de uma suspensão de 1 g de solo de horta em caldo extrato de solo 1:10, segundo Bamforth (1992) e modificado por Rodriguez-Zaragoza et al., (2005). A suspensão foi homogeneizada em agitador por três vezes durante 15 segundos e deixada em repouso para decantação do solo. O sobrenadante foi recuperado e centrifugado a 1.000 g por 10 min. O sobrenadante foi inoculado em placa de ágar-extrato de solo 1:10, seguindo-se incubação durante 48 h a temperatura ambiente (MATTISON e HARAYAMA, 2001). Depois da incubação, a placa foi observada em microscópio invertido para conferir a presença de protozoários (RODRIGUEZ-ZARAGOZA et al; 2005). Uma vez confirmada a presença de protozoários, a placa foi esfregada com alça de repicagem para a separação dos protozoários aderidos sobre o ágar. Em seguida, a suspensão resultante foi recuperada em tubo tipo Falcon e o volume corrigido para 10 ml com extrato de solo 1:10. A partir desta solução realizaram-se diluições seriadas até 10^{-7} , as quais foram inoculadas em placas com ágar triptona de soja (TSA) para determinar as unidades formadoras de colônias (UFC) antes do tratamento com antibiótico. Posteriormente, foi acrescida à suspensão de protozoários uma solução mista de antibióticos (ampicilina, penicilina, gentamicina e ácido nalidíxico), na concentração de 100 mg/L (ROSENBERG et al., 2009; SHERR e SHERR, 1992), seguindo-se incubação por 24 h a temperatura ambiente. Para conferir a eficiência dos antibióticos na eliminação das populações bacterianas, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-7} e inoculação das mesmas em placas de TSA, seguindo-se avaliação e contagem de colônias bacterianas.

A densidade populacional de protozoários nos solos dos microcosmos foi determinada por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP) modificada por Darbyshire (1974). A partir de uma suspensão de 1 g de solo em 10 ml de extrato de solo 1:10, foram feitas diluições seriadas até 10^{-13} com quatro réplicas por diluição em placas de 96 poços. As placas foram incubadas por até 5 dias em temperatura ambiente e foram examinadas quanto à presença de protozoários sob microscópio invertido, usando-se objetivas de 20X e 40X (EKELUND et al., 2001; RØNN et al., 2002; ADL e COLEMAN, 2005; RODRIGUEZ-ZARAGOZA et al., 2005).

5.4 Preparação dos microcosmos

Estabeleceram-se 24 tratamentos com 3 repetições, em delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos foram divididos em dois grupos principais (com e sem petróleo),

para as duas faixas de dimensão dos agregados (macro e microagregados). Cada grupo foi constituído de um tratamento estéril, um tratamento com o consórcio bacteriano em estado fisiológico normal com e sem protozoários e um tratamento com o consórcio bacteriano no estado de ultramicrocélulas bacterianas (UMCs) com e sem protozoários (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição dos tratamentos, constituídos de dois grupos principais (com e sem óleo cru) e suas interações com os diferentes fatores: macroagregados (Ma) e microagregados (Mi); (B): bactérias de tamanho normal; (UMCs): ultramicrocélulas; (P): presença de protozoários; (-) ausência do grupo microbiano (bactérias ou protozoários).

Tratamentos				
	Agregado	Bactéria	Protozoário	
COM ÓLEO CRU	Ma	-	-	
	Mi	-	-	
	Ma	-	P	
	Mi	-	P	
	Ma	B	-	
	Mi	B	-	
	Ma	B	P	
	Mi	B	P	
	Ma	UMCs	-	
	Mi	UMCs	-	
	Ma	UMCs	P	
	Mi	UMCs	P	
	SEM ÓLEO CRU	Ma	-	-
		Mi	-	-
Ma		-	P	
Mi		-	P	
Ma		B	-	
Mi		B	-	
Ma		B	P	
Mi		B	P	
Ma		UMCs	-	
Mi		UMCs	-	
Ma		UMCs	P	
Mi		UMCs	P	

5.4.1 Contaminação do solo

Os microcosmos foram preparados em frascos respirométricos de borossilicato de 150 ml contendo 50 g de agregados de solo. Uma parte dos microcosmos foi contaminada com 2.072 mg/kg de petróleo (previamente aquecido até 210 °C gradativamente para remoção dos hidrocarbonetos leves). O petróleo foi diluído em volume de hexano suficiente para saturar o solo a 60% da CRA. Em seguida, o petróleo foi aplicado em cada microcosmo e misturado com bastão de vidro para se obter uma distribuição homogênea no solo. Os microcosmos foram mantidos em repouso até a completa evaporação do hexano (24 h). O solo com e sem petróleo foi esterilizado em autoclave a 121 °C e 103 KPa de pressão durante 20 min por três vezes.

5.4.1 Inoculação dos micro-organismos

Os isolados bacterianos de tamanho normal e em condições de desnutrição (UMCs), foram inoculados nos solos a uma concentração final de 10^6 UFC/g de solo seco, após a contaminação com petróleo e esterilização dos microcosmos. Nos tratamentos com ambos os grupos de micro-organismos (bactérias e protozoários), a inoculação do consórcio bacteriano foi feita inicialmente para permitir o estabelecimento das populações bacterianas dentro dos agregados do solo durante 24 h. Após as 24 h, foram inoculados os protozoários, numa concentração aproximada de 10^4 protozoários por grama de solo seco. Para distribuir as populações microbianas dentro dos agregados de solo, após a inoculação ao solo adicionou-se água destilada estéril para obter 60 % de retenção de água, utilizando-se um bastão de vidro para homogeneização.

5.4.2 Montagem dos microcosmos

Os microcosmos foram montados em frascos respirométricos acoplados a um sistema de captura de CO₂ (Mod. TR-RM8 Respirometer Multiplexer, Sable Systems) e de detecção por infravermelho (Sable Systems International, NE, USA), para se medir a emissão de CO₂. Os microcosmos foram mantidos acoplados ao respirômetro durante 30 dias em temperatura ambiente. A correção de umidade dos microcosmos foi feita a cada 5 dias com água destilada estéril.

A coleta das amostras do solo para as análises da estimativa de NMP de protozoários e determinação de TPH foi realizada ao final do experimento.

5.5 Avaliações

5.5.1 Medição da área celular das UMCs

A área celular foi determinada por microscopia de força atômica no Laboratório de Nanoscopia no Departamento de Física da UFV.

Uma suspensão celular de 250 µl de cada cultura bacteriana em estado de UMCs foi centrifugada, lavada três vezes e ressuspensa em 100 µl de solução tampão fosfato (1X). A suspensão foi agitada durante 15 min para a separação de células aglomeradas. Uma gota de 20 µl de cada suspensão foi colocada sobre mica de 1 cm² e deixou-se secar completamente ao ar.

A varredura das amostras foi realizada por um cantilever com ponta de silício. A área celular foi determinada por meio do software NT-MDT Nova (Inc. Rússia, 2006).

5.5.2 Estimativa da abundância de protozoários

A estimativa da abundância de protozoários no solo foi realizada por meio da técnica de Número Mais Provável, modificada por Darbyshire (1974), a partir de uma suspensão de 1g de solo em 10 ml de extrato de solo 1:10. Diluições seriadas até 10⁻¹³ com quatro réplicas por diluição foram feitas em placas de 96 poços e incubadas até 4 dias a temperatura ambiente. Nesse período, foram inspecionadas quanto à presença ou ausência de protozoários sob microscópio invertido (EKELUND et al., 2001; RØNN et al., 2002; ADL e COLEMAN, 2005; RODRIGUEZ-ZARAGOZA et al., 2005).

5.5.3 Avaliação da atividade microbiana

A atividade de degradação dos hidrocarbonetos de petróleo foi avaliada por meio da emissão de CO₂. Ar atmosférico foi injetado nos frascos respirométricos a um fluxo de 500 mL/min a cada 5.6 horas durante 5 minutos, para reposição do oxigênio e arraste do CO₂ para o detector.

5.5.4 Determinação da concentração de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) remanescente

Os hidrocarbonetos totais do petróleo (TPH) foram quantificados ao final do experimento utilizando-se o kit RemediAid. O teste baseia-se na reação de Friedel-Crafts, pela qual se forma um intermediário colorido que pode ser quantificado por colorimetria.

Em um tubo de reação contendo sulfato de sódio anidro, foram adicionados 1 g de

solo dos microcosmos e 20 ml de diclorometano para a extração dos hidrocarbonetos do solo. A solução foi tratada com Florisil (silicato de magnésio) para eliminar hidrocarbonetos polares que interferem com o desenvolvimento da cor. Finalmente, o solvente contendo os hidrocarbonetos foram succionados para uma ampola contendo cloreto de alumínio, promovendo uma reação que resulta na produção de um produto solúvel colorido cuja intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de hidrocarbonetos. A intensidade da cor foi registrada como absorvância utilizando luz visível de comprimento de onda de 430 nm através de um fotômetro LED portátil, e convertida a mg/kg de hidrocarbonetos no solo através da fórmula:

$$\text{mg TPH /Kg} = [(A \times S) - I] \times V/W$$

onde,

A: Absorvância

S: Inclinação para um mix específico de hidrocarbonetos mg/l (óleo cru 196,6)

I: Interceptação para um mix específico de hidrocarbonetos mg/l (óleo cru 5,1)

V: Volume da extração (ml)

W: Peso da amostra de solo (kg)

Foi realizada a quantificação de TPH para os dois tipos de agregados de solo (fora do experimento), para se determinar o valor de TPH detectado pelo método logo após a adição do petróleo (\approx 2.000 mg/Kg). A quantificação resultou em valores superiores ao valor adicionado (2.624 mg/Kg nos microagregados e 2.347 mg/Kg nos macroagregados), indicando possível interferência da matéria orgânica do solo na precisão do kit utilizado. Com base nesses valores, os dados de concentração de TPH nos microcosmos ao final do período de incubação foram corrigidos pelo fator de correção calculado a partir da quantidade de petróleo adicionada inicialmente ao solo e a determinada pelo kit.

5.6 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e consistiu de 24 tratamentos com 3 repetições. A comparação das médias dos diferentes tratamentos foi realizada por meio de contrastes, avaliando-se a significância estatística por meio do teste de F para cada variável medida. A construção dos gráficos foi realizada utilizando-se o software SigmaPlot, versão 11.

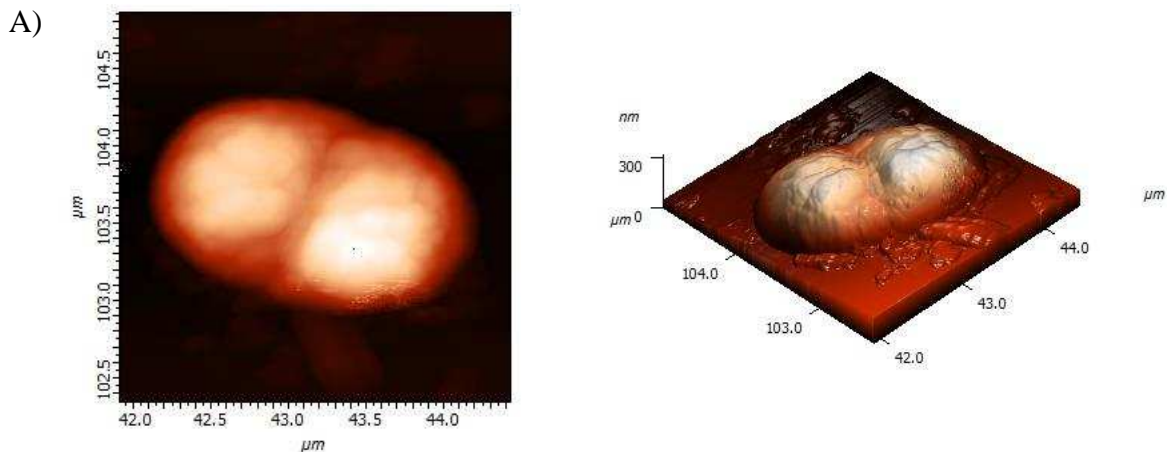
6 RESULTADOS

6.1 Ultramicrocélulas bacterianas

As culturas bacterianas crescendo em caldo LB (200 rpm e 30 °C) durante 24 h apresentaram uma área e diâmetro celular de 0,75 μm^2 e 0,97 μm para *O. anthropi* LBBMA 88b; 1 μm^2 e 1,28 μm para *A. baumannii* LBBMA 04; 1,05 μm^2 e 1,26 μm para *P. aeruginosa* LBBMA 58; e 1,19 μm^2 e 1,36 μm para *A. baumannii* LBBMA ES11.

A área e o diâmetro celular das UMCs, conferida por microscopia de força atômica foi de 0,45 μm^2 e 0,5 μm para *A. baumannii* LBBMA ES11; 0,45 μm^2 e 0,7 μm para *O. anthropi* LBBMA 88B; 0,73 μm^2 e 0,85 μm para *A. baumannii* LBBMA 04; e de 0,73 μm^2 e 0,7 μm para *P. aeruginosa* LBBMA (Figura 1). Em comparação com as dimensões celulares das bactérias em condições de crescimento adequadas, a área e o diâmetro celular das UMCs diminuiu entre 27%-62% e 29%-65%, respectivamente.

A observação em microscopia de força atômica revelou a formação de aglomerados de células e superfície celular irregular das UMCs de *O. anthropi* LBBMA 88b e *P. aeruginosa* LBBMA 58 (Figura 1, C e D).



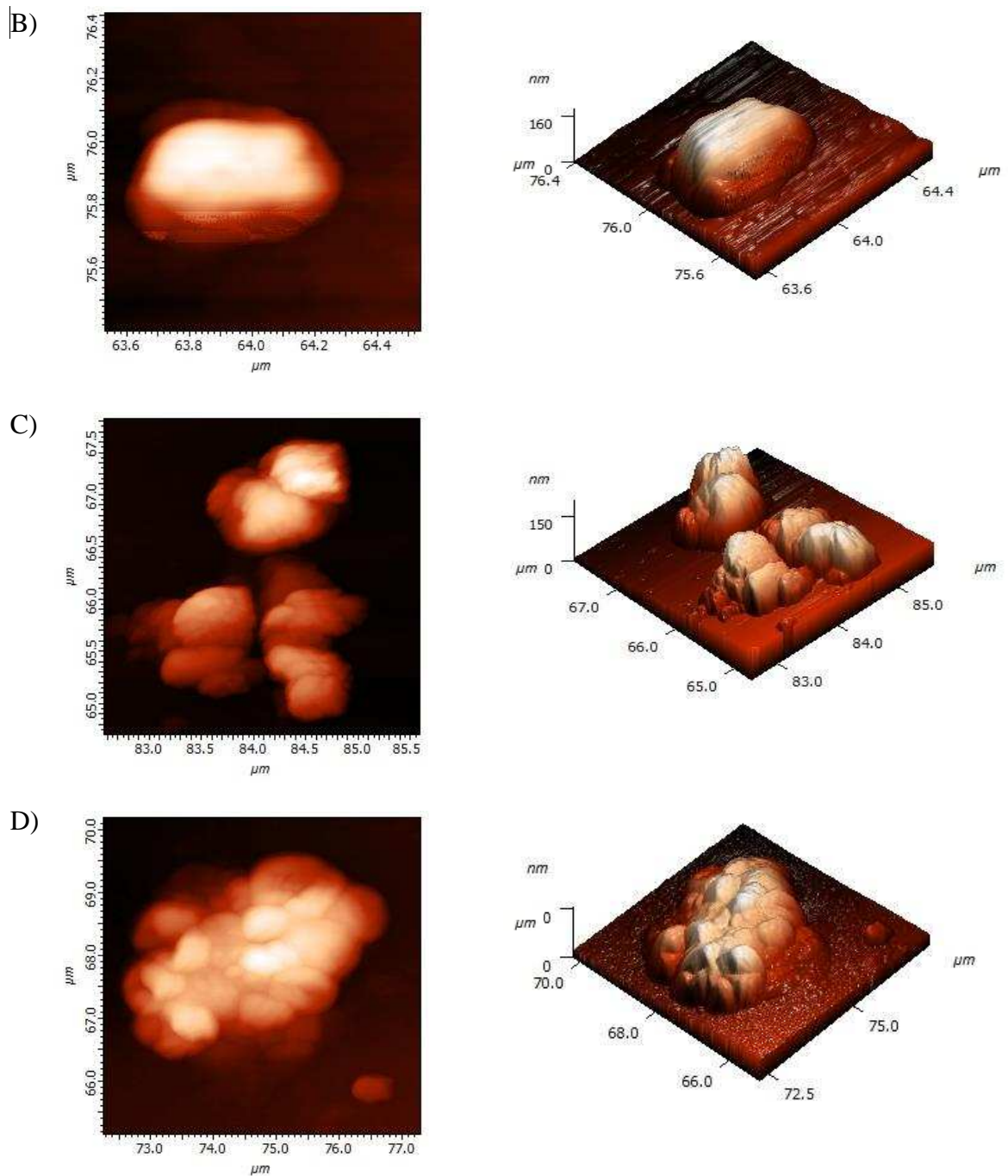
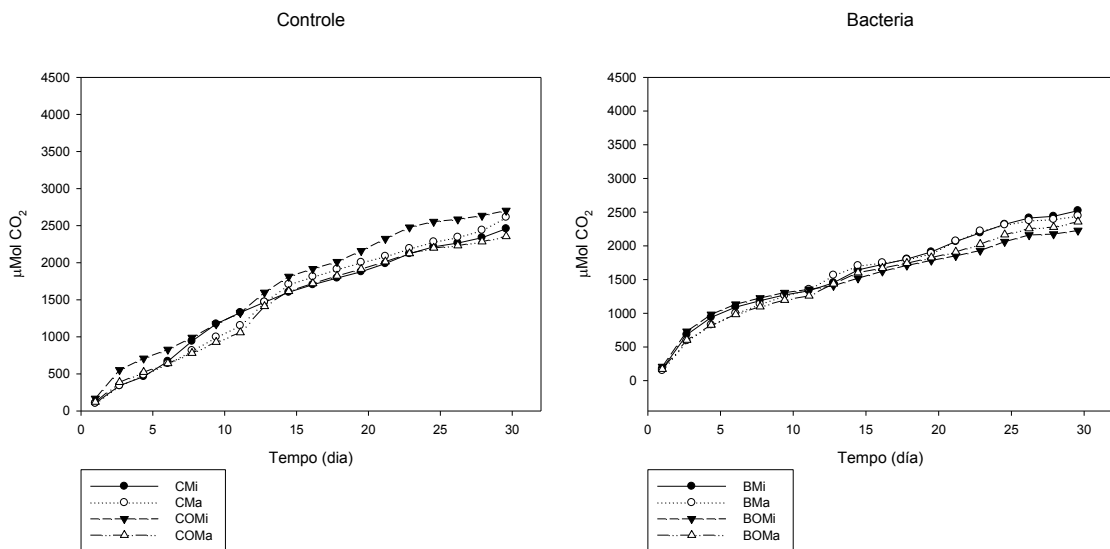


Figura 1. Imagens em 2D e 3D obtidas a partir de Microscopia de Força Atômica das ultramicrocélulas (UMCs) das diferentes culturas bacterianas, após 60 dias de incubação em condições de desnutrição (200 rpm e 14 °C). A) Duas células de *Acinetobacter baumannii* LBBMA 04; B) *Acinetobacter baumannii* LBBMA ES11; C) aglomerado de células de *Ochrobactrum anthropi* LBBMA 88b; D) aglomerado de células de *Pseudomonas aeruginosa* LBBMA 58.

6.2 Atividade microbiana (produção de CO₂)

A produção acumulada de CO₂ nos diferentes tratamentos variou entre 2.377 a 4.216 μmol ao longo de 30 dias (Figura 2 e Tabela 3). Segundo o modelo de contrastes, significância estatística foi encontrada na comparação da produção de CO₂ acumulado nos tratamentos com e sem petróleo (Figura 3, C1).

A inoculação com protozoários elevou significativamente a emissão de CO₂ nos tratamentos sem petróleo, dentro dos dois diferentes tipos de agregados, com e sem bactéria (Tabela 4 e Figura 3: C4; C5; C8; C9). Houve maior atividade microbiana nos microcosmos não-contaminados formados por microagregados inoculados com protozoários e nos microcosmos não-contaminados formados por macroagregados inoculados com bactérias e protozoários do que nos seus respectivos tratamentos com petróleo (Tabela 4 e Figura 3: C13; C21).



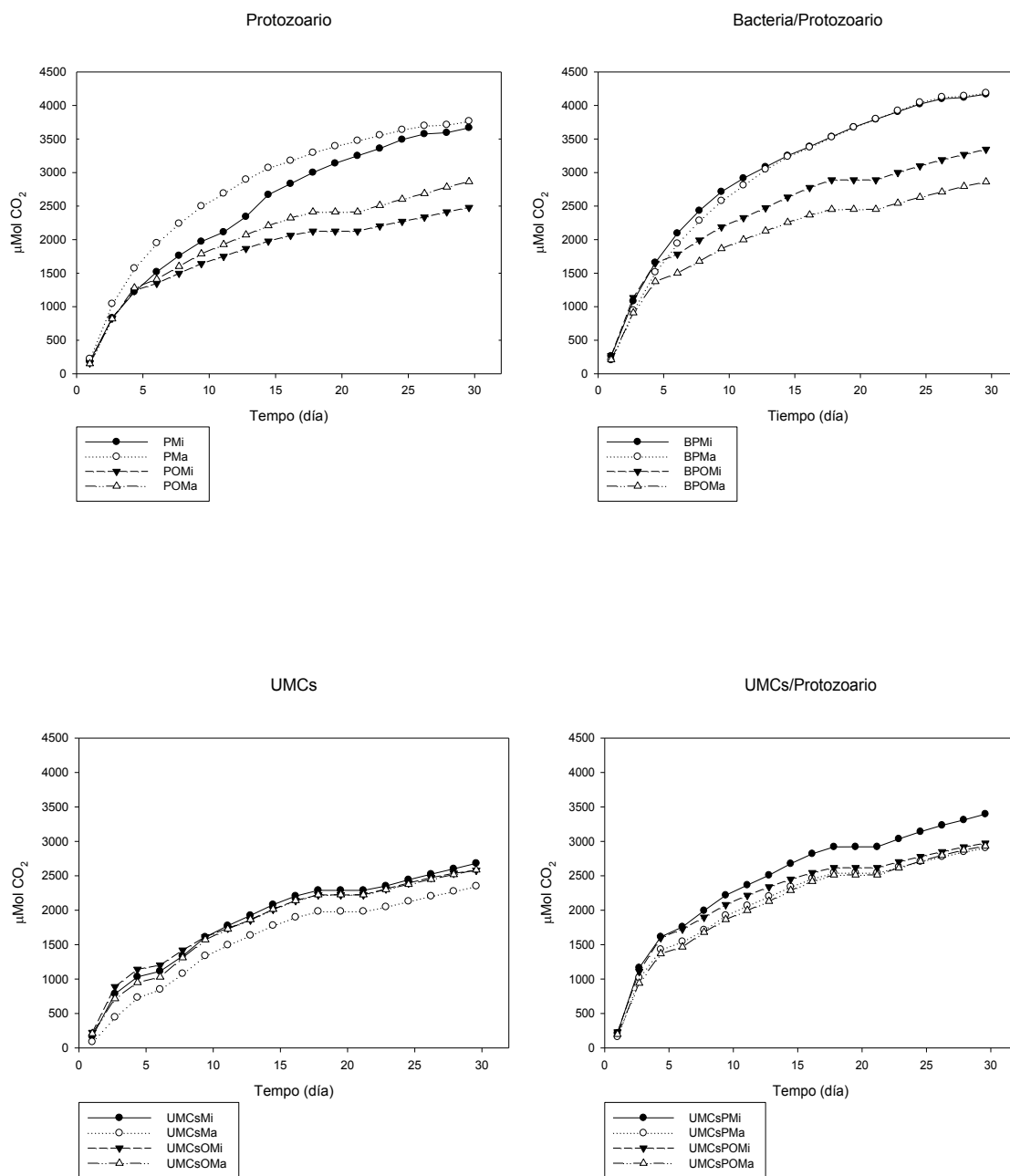


Figura 2. Curvas de emissão de CO₂ ao longo de 30 dias de ensaio para a determinação da atividade metabólica nos diferentes tratamentos. Consórcio de bactérias (B); ultramicrocélulas bacterianas (UMCs); protozoários (P); bactérias+protozoários (BP); ultramicrocélulas bacterianas+protozoários (UMCsP) em microcosmos contendo microagregados (Mi) e macroagregados (Ma) com petróleo (O) e sem petróleo.

Tabela 3. Médias da produção acumulada de CO₂ após 30 dias de ensaio, considerando-se a ausência e a presença de petróleo (O₀ e O_P), o tamanho dos agregados (M_i: microagregados, M_a: macroagregados), a ausência ou a presença de bactérias (B₀: ausência; B_P: presença de bactérias de dimensão normal; UMC: presença de ultramicrocélulas bacterianas) e a ausência ou presença de protozoários (P₀ e P_P)

Tratamento	CO2 acumulado μMol/30 dias
O ₀ MiB ₀ P ₀	2561
O ₀ MiB ₀ P _P	3703
O ₀ MiB _P P ₀	2568
O ₀ MiB _P P _P	4202
O ₀ MiUMC _S P ₀	2709
O ₀ MiUMC _S P _P	3425
O ₀ MaB ₀ P ₀	2682
O ₀ MaB ₀ P _P	3795
O ₀ MaB _P P ₀	2480
O ₀ MaB _P P _P	4216
O ₀ MaUMC _S P ₀	2377
O ₀ MaUMC _S P _P	2928
O _P MiB ₀ P ₀	2776
O _P MiB ₀ P _P	3736
O _P MiB _P P ₀	2263
O _P MiB _P P _P	3370
O _P MiUMC _S P ₀	2596
O _P MiUMC _S P _P	2990
O _P MaB ₀ P ₀	2428
O _P MaB ₀ P _P	2890
O _P MaB _P P ₀	2406
O _P MaB _P P _P	2883
O _P MaUMC _S P ₀	2606
O _P MaUMC _S P _P	2950

Tabela 4. Contrastes da emissão acumulada de CO₂ dos tratamentos após 30 dias de ensaio. Codificação conforme a tabela 3.

Contraste	Contraste
C1: O ₀ vs O _P	C13: O ₀ vs O _P d/P _P d/B ₀ d/M _i
C2: M _i vs M _a d/ O ₀	C14: O ₀ vs O _P d/P ₀ d/B _P d/M _i
C3: M _i vs M _a d/ O _P	C15: O ₀ vs O _P d/P _P d/B _P d/M _i
C4: [(2 B ₀ + B _{P+} UMC _s) d/P ₀ vs (2 B ₀ + B _{P+} UMC _s) d/P _P] d/M _i d/O ₀	C16: O ₀ vs O _P d/P ₀ d/UMC _s d/M _i
C5: [(2 B ₀ + B _{P+} UMC _s) d/P ₀ vs (2 B ₀ + B _{P+} UMC _s) d/P _P] d/M _a d/O ₀	C17: O ₀ vs O _P d/P ₀ d/UMC _s d/M _i
C6: [(2 B ₀ + B _{P+} UMC _s) d/P ₀ vs (2 B ₀ + B _{P+} UMC _s) d/P _P] d/M _i d/O _P	C18: O ₀ vs O _P d/P ₀ d/B ₀ d/M _a
C7: [(2 B ₀ + B _{P+} UMC _s) d/P ₀ vs (2 B ₀ + B _{P+} UMC _s) d/P _P] d/M _a d/O _P	C19: O ₀ vs O _P d/P _P d/B ₀ d/M _a
C8: [(B _{P+} UMC _s) d/P ₀ vs (B _{P+} UMC _s) d/P _P] d/M _i d/O ₀	C20: O ₀ vs O _P d/P ₀ d/B _P d/M _a
C9: [(B _{P+} UMC _s) d/P ₀ vs (B _{P+} UMC _s) d/P _P] d/M _a d/O ₀	C21: O ₀ vs O _P d/P _P d/B _P d/M _a
C10: [(B _{P+} UMC _s) d/P ₀ vs (B _{P+} UMC _s) d/P _P] d/M _i d/O _P	C22: O ₀ vs O _P d/P ₀ d/UMC _s d/M _a
C11: [(B _{P+} UMC _s) d/P ₀ vs (B _{P+} UMC _s) d/P _P] d/M _a d/O _P	C23: O ₀ vs O _P d/P ₀ d/UMC _s d/M _a
C12: O ₀ vs O _P d/P ₀ d/B ₀ d/M _i	

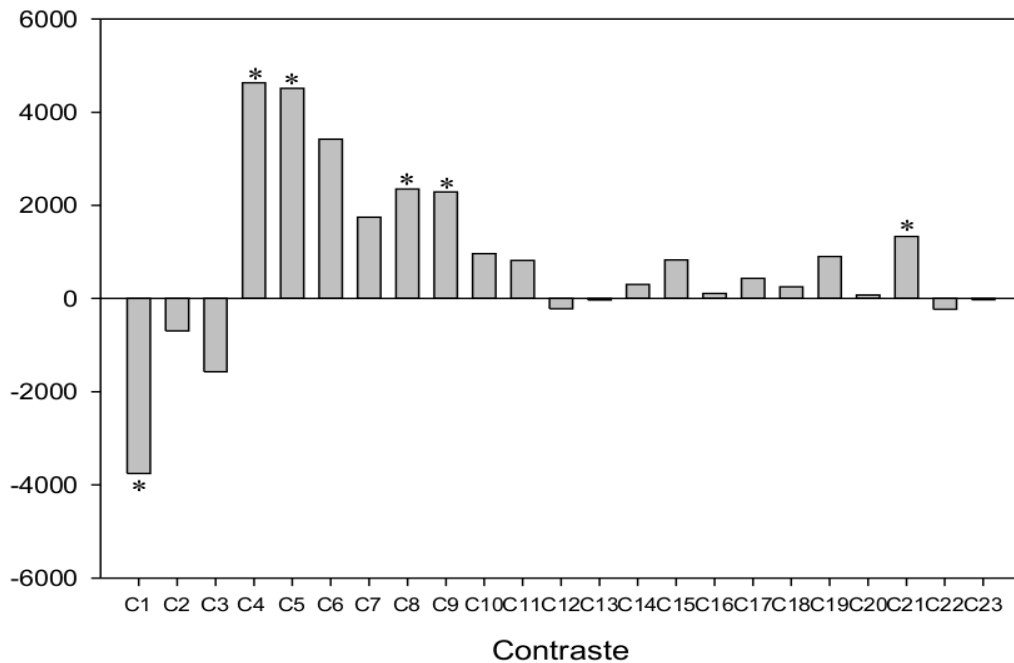


Figura 3. Histogramas representando os contrastes analisados da produção acumulada de CO₂ após 30 dias de ensaio. *Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

6.3 Hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH)

Os microcosmos não-inoculados (controle) contendo microagregados apresentou maior degradação de TPH em comparação com os tratamentos inoculados com bactérias hidrocarbonoclásticas e com protozoários (Tabela 5 e Figura 4: C2; C6). O tratamento com macroagregados e UMCs com petróleo também apresentou menor concentração de TPH em comparação com o tratamento com macroagregados inoculados com UMCs junto com protozoários (Tabela 6 e Figura 4: C11), no qual não se observou alteração na concentração de TPH durante os 30 dias incubação (M_aUMCsP_P, Tabela 6).

Tabela 5. Hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) em microcosmos contendo agregados de solo que receberam petróleo, considerando o tamanho dos agregados (M_i: microagregados; M_a: macroagregados), a ausência ou a presença de bactérias (B₀: ausência; B_P: presença de bactérias de dimensão normal; UMCs: presença de ultramicrocélulas bacterianas) e a ausência e presença de protozoários (P₀ e P_P)

Tratamento	TPH mg/kg
M _i B ₀ P ₀	1099
M _i B ₀ P _P	2222
M _i B _P P ₀	1857
M _i B _P P _P	2336
M _i UMCs P ₀	2171
M _i B _P P _P	2006
M _a B ₀ P ₀	1429
M _a B ₀ P _P	2083
M _a B _P P ₀	1585
M _a B _P P _P	2226
M _a UMCs P ₀	1645
M _a UMCs P _P	2181

Tabela 6. Contrastes entre os resultados dos teores residuais de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) em microcosmos que receberam a aplicação de petróleo (2.072 mg/Kg), considerando-se o tamanho dos agregados (Mi: microagregados; Ma: macroagregados), a ausência ou a presença de bactérias (B₀: ausência; B_P: presença de bactérias de dimensão normal; UMC_s: presença de ultramicrocélulas bacterianas) e a ausência e presença de protozoários (P₀ e P_P). O primeiro termo do contraste é sempre precedido do sinal negativo

Contrastes
C1: M _i vs M _a
C2: 2 B ₀ vs (B _P + UMC _s) d/M _i
C3: 2 B ₀ vs (B _P + UMC _s) d/M _a
C4: B _P vs UMC _s d/M _i
C5: B _P vs UMC _s d/M _a
C6: P ₀ vs P _P d/B ₀ d/M _i
C7: P ₀ vs P _P d/B _P d/M _i
C8: P ₀ vs P _P d/UMC _s d/M _i
C9: P ₀ vs P _P d/B ₀ d/M _a
C10: P ₀ vs P _P d/B _P d/M _a
C11: P ₀ vs P _P d/UMC _s d/M _a

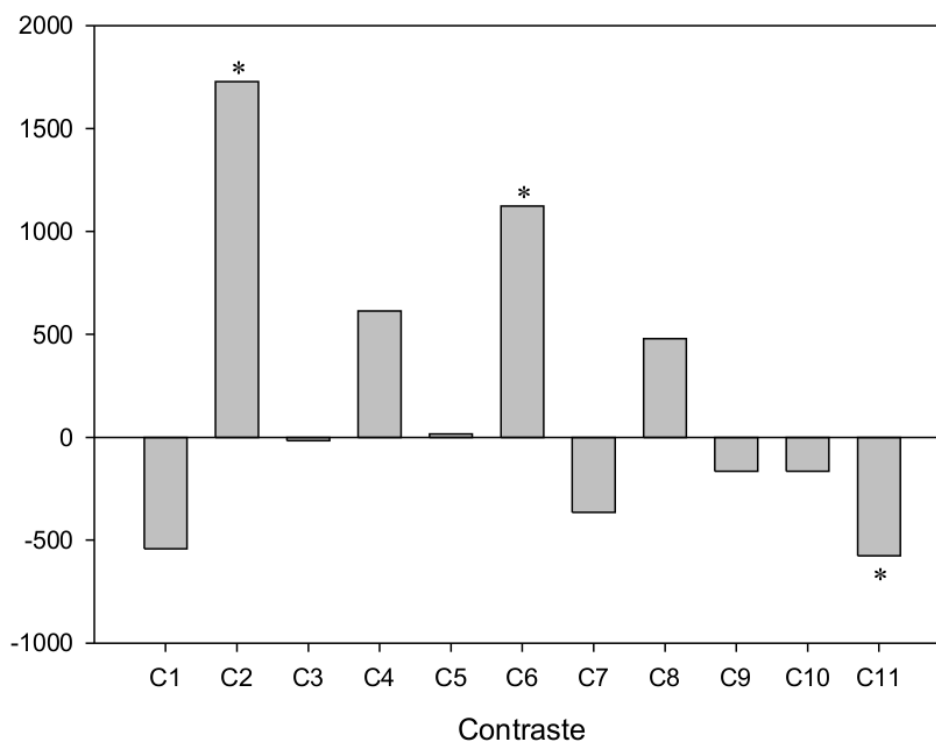


Figura 4. Contrastes analisados do teor residual de hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH) após 30 dias de ensaio. * Significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

6.4 Número mais provável de protozoários (NMP)

Dentro do grupo de microcosmos que receberam aplicação de petróleo, apenas os microagregados inoculados com UMCs apresentaram número significativamente maior de protozoários em relação aos microagregados inoculados com bactérias de tamanho normal (Tabela 7 e Figura 5: C4). A comparação entre o grupo com e sem petróleo mostrou que os microcosmos contendo macroagregados sem petróleo apresentaram maior densidade populacional de protozoários do que o mesmo tratamento na ausência de petróleo (Tabela 8 e Figura 5: C9).

Tabela 7. Número mais provável (NMP) de protozoários nos microcosmos, considerando-se a ausência e presença de petróleo (O_0 e O_P), o tamanho dos agregados (M_i : microagregados; M_a : macroagregados) e a ausência ou a presença de bactérias (B_0 : ausência; B_P : presença de bactérias de dimensão normal; UMC_s : presença de ultramicrocélulas bacterianas)

Tratamento	NMP protozoários/g ⁻¹ de solo
$O_0 M_i B_0$	4516
$O_0 M_i B_P$	3074
$O_0 M_i UMC_s$	22989
$O_0 M_a B_0$	23067
$O_0 M_a B_P$	3834
$O_0 M_a UMC_s$	23351
$O_P M_i B_0$	1884
$O_P M_i B_P$	13923
$O_P M_i UMC_s$	7997118
$O_P M_a B_0$	1574
$O_P M_a B_P$	12570
$O_P M_a UMC_s$	3181631

Tabela 8. Contrastes do número mais provável (NMP) de protozoários nos tratamentos onde foram inoculados, considerando-se a ausência e presença de petróleo (O_0 e O_P), o tamanho dos agregados (M_i : microagregados; M_a : macroagregados) e a ausência ou a presença de bactérias (B_0 : ausência; B_P : presença de bactérias de dimensão normal; UMC_s : presença de ultramicrocélulas bacterianas). O primeiro termo do contraste é sempre precedido do sinal negativo

Contrastes
C1: $(2B_0 \text{ d}/M_i \text{ d}/O_0 + 2B_0 \text{ d}/M_a \text{ d}/O_0 + 2B_0 \text{ d}/M_i \text{ d}/O_P + 2B_0 \text{ d}/M_a \text{ d}/O_P)$ vs $[(B_P + UMC_s) \text{ d}/M_i \text{ d}/O_0 + (B_P + UMC_s) \text{ d}/M_a \text{ d}/O_0 + (B_P + UMC_s) \text{ d}/M_i \text{ d}/O_P + [(B_P + B_M) \text{ d}/M_a \text{ d}/O_P]$
C2: B_P vs $UMC_s \text{ d}/M_i \text{ d}/O_0$
C3: B_P vs $UMC_s \text{ d}/M_a \text{ d}/O_0$
C4: B_P vs $UMC_s \text{ d}/M_i \text{ d}/O_P$
C5: B_P vs $UMC_s \text{ d}/M_a \text{ d}/O_P$
C6: O_0 vs $O_P \text{ d}/B_0 \text{ d}/M_i$
C7: O_0 vs $O_P \text{ d}/B_P \text{ d}/M_i$
C8: O_0 vs $O_P \text{ d}/UMC_s \text{ d}/M_i$
C9: O_0 vs $O_P \text{ d}/B_0 \text{ d}/M_a$
C10: O_0 vs $O_P \text{ d}/B_P \text{ d}/M_a$
C11: O_0 vs $O_P \text{ d}/UMC_s \text{ d}/M_a$

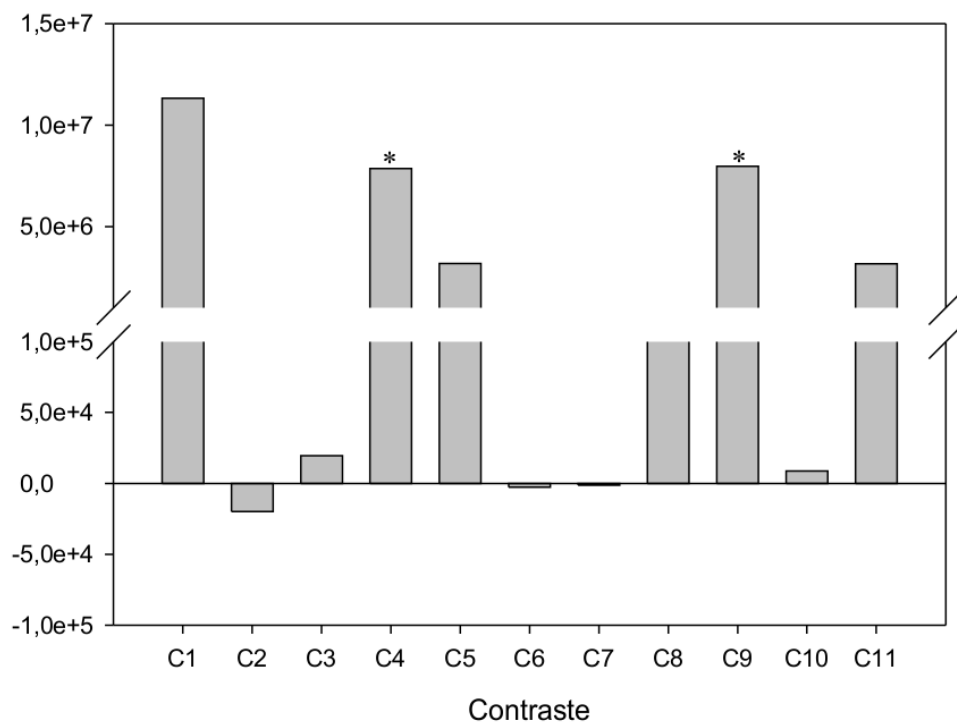


Figura 5. Contrastes do NMP de protozoários após 30 dias de ensaio. *Significativo a 5% pelo teste F.

7 DISCUSSÃO

Durante a incubação de microcosmos contendo macro ou microagregados de solo, contaminados ou não com hidrocarbonetos de petróleo, em que se avaliou o efeito da inoculação com protozoários e bactérias hidrocarbonoclásticas (de dimensão normal ou induzidas a UMCs por desnutrição), observou-se maior produção de CO₂ nos tratamentos sem petróleo e inoculados com protozoários. Esse resultado demonstra que os hidrocarbonetos de petróleo não representaram a fonte principal de carbono para os micro-organismos e que a maior atividade metabólica esteve associada à ação de predação sobre as populações bacterianas e à recomposição dessas populações, corroborando o estudo realizado por Rónn e colaboradores (2001). Eles mostraram que a atividade microbiana num sistema predador-presa dependeu da ação predatória, mas foi independente da quantidade de carbono adicionada na forma de presas bacterianas, sugerindo que existe seletividade de presas bacterianas pelos protozoários (WRIGHT et al., 1995; RATSACK et al., 1996).

Em relação aos microcosmos contaminados com petróleo, a ausência de diferenças significativas de emissão de CO₂ entre os tratamentos indica que a demanda das populações microbianas por carbono foi suprida primariamente pela matéria orgânica do solo e cuja disponibilidade foi aumentada com a morte dos micro-organismos após a autoclavagem (van VEEN et al., 1997; EVANS et al., 2004). Portanto, os micro-organismos preferiram usar o carbono da matéria orgânica do solo aos hidrocarbonetos de petróleo, cujo catabolismo, além de envolver maior gasto energético, também demanda a ação conjunta de diferentes estirpes microbianas em cooperação metabólica (van HAMME et al., 2003; HEAD et al., 2006). Ressalta-se ainda que a concentração total de hidrocarbonetos de petróleo aplicada aos solos (cerca de 2.000 mg/kg) é muito inferior ao teor de carbono orgânico presente na matéria orgânica do solo (cerca de 35.100 mg/kg, Tabela 1), o que pode explicar a degradação preferencial da matéria orgânica do solo. Além disso, dada a alta afinidade dos hidrocarbonetos de petróleo pelas substâncias húmicas dos solos (BALDOCK e SKJEMSTAD, 2000), é possível que a baixa concentração de hidrocarbonetos adicionada tenha resultado na adsorção e retenção da maior parte das moléculas, tornando-as indisponíveis às populações microbianas.

Ainda que as bactérias utilizadas nesse estudo tenham sido isoladas de ambientes contaminados com hidrocarbonetos e anteriormente tenham apresentado eficiência na degradação de óleo diesel (alcanos) por cooperação metabólica (LOPES, 2009), neste trabalho as bactérias não puderam desempenhar de forma eficiente sua função

hidrocarbonoclástica e não conseguiram degradar de forma significativa os hidrocarbonetos de petróleo contidos no solo, possivelmente em razão do uso preferencial do carbono da matéria orgânica do solo, conforme anteriormente discutido.

Ainda que a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo não tenha sido significativa, a menor concentração de TPH detectada no grupo controle, apenas autoclavado (tratamentos MiB₀P₀ e MaB₀P₀, tabela 6) mostra a ocorrência de uma inesperada degradação dos hidrocarbonetos nesses tratamentos. A autoclavagem do solo contaminado com petróleo teve como objetivo eliminar a microbiota autóctone do solo e do petróleo, de modo a permitir a comparação dos efeitos da inoculação dos microcosmos com o consórcio bacteriano em dois estados fisiológicos (células normais e desnutridas com dimensão de UMCs) sobre a atividade de degradação do óleo. Portanto, conclui-se que a degradação dos hidrocarbonetos de petróleo nos tratamentos-controle foi resultado da ação de bactérias autóctones do solo ou presentes no petróleo que resistiram à autoclavagem e que foram estimuladas pelas condições de incubação, como também demonstrado por Gong et al. (2012).

Gong et al., (2012) observaram que bactérias formadoras e não formadoras de esporos no petróleo cru sobreviveram à autoclavagem e foram estimuladas apenas na presença de bactérias exógenas inoculadas durante o experimento. Neste estudo parece ter ocorrido uma situação diferente, e relações antagônicas entre a microbiota resistente à autoclavagem e os micro-organismos inoculados (bactérias e protozoários) evitaram o desenvolvimento das diferentes populações bacterianas e impediram a degradação do petróleo. Esse efeito também já foi descrito por outros autores (EI FANTROUSSI e AGATHOS, 2005; HEAD et al., 2006).

De forma geral, os tratamentos inoculados com bactérias hidrocarbonoclásticas apresentaram baixa mineralização do petróleo. Nos microcosmos contendo macroagregados, com exceção do tratamento UMCsPO, a concentração residual de TPH foi ligeiramente inferior à encontrada nos microcosmos com microagregados, o que nos faz deduzir que os microagregados interferiram em maior grau no processo de degradação do petróleo.

O solo, classificado como muito argiloso, apresenta elevada área superficial, favorecendo a adsorção de moléculas orgânicas, o que as mantém retidas na matriz argilosa, reduzindo assim sua disponibilidade e sua exposição à degradação biológica (BALDOCK e SKJEMSTAD, 2000; ROMANTSCHUK et al., 2000; SEMPLE et al., 2007). Essa baixa biodisponibilidade dos substratos, incluindo a dos hidrocarbonetos de petróleo dentro dos

tratamentos, possivelmente foi determinante para restringir o estabelecimento e desenvolvimento adequado do consórcio bacteriano inoculado.

Dentro dos solos com predominância de microagregados, a distribuição da água e do oxigênio pode ser limitada. A água pode ficar retida nos microporos e exibir uma distribuição mais homogênea no solo. Porém, a pequena dimensão dos poros pode dificultar a passagem de água e oxigênio, ficando o fluxo de oxigênio restrito aos pontos desocupados pela água e acarretando em locais anóxicos (BALDOCK e SKJEMSTAD, 2000; ROMANTSCHUK et al., 2000). De igual maneira, nos solos com maior proporção de agregados menores, os níveis de mineralização de carbono geralmente são inferiores, uma vez que o transporte das moléculas de hidrocarbonetos é limitado e os micro-organismos não podem atingi-las dentro dos microporos (BALDOCK e SKJEMSTAD, 2000; LABUD et al., 2007). Levando-se isso em consideração, esperava-se que a degradação de petróleo fosse menor nos tratamentos MiB_PP₀ e MiB_PP_P, comparativamente aos tratamentos MiUMCsP₀ e MiUMCsP_P, dada a restrição à movimentação das bactérias de diâmetro maior de 3 µm nos poros de menor tamanho (BALDOCK e SKJEMSTAD, 2000). Esperava-se também maior efeito da inoculação com UMCs (versus inoculação com células de dimensão normal) nos microcosmos contendo microagregados, em comparação com os microcosmos contendo macroagregados. No entanto, os resultados obtidos não demonstraram maior benefício da inoculação com UMCs, tanto nos microagregados quanto nos macroagregados.

Assim, aparentemente as UMCs não puderam colonizar os poros menores nem no momento da inoculação no solo, nem durante o tempo deixado para a colonização e estabelecimento dentro dos microporos. O sucesso da distribuição bacteriana dentro dos microcosmos depende principalmente do espaço poroso disponível, como observado por Postma et al., (1990). Esses autores mostraram uma diferença na distribuição das bactérias no espaço poroso do solo dependente das características de umidade do solo no momento da inoculação. A inoculação de uma suspensão bacteriana em solo seco permitiu a distribuição das bactérias dentro dos poros pequenos; no entanto, em solo úmido, as bactérias localizaram-se principalmente nos poros maiores. Os autores concluíram que a água presente antes da inoculação ocupou os poros menores, impedindo a entrada das células bacterianas. No presente trabalho, a inoculação do solo ocorreu juntamente com a adição de água para elevar o conteúdo de água para 60% da CRA, o que pode ter contribuído para a baixa transferência de células para os microporos. Desse modo, o hipotético efeito positivo do uso de UMCs sobre a biodegradação de moléculas de hidrocarbonetos de petróleo que tenham

migrado para o interior de microporos pode ter sido anulado pela baixa eficiência de transporte dessas células para esses sítios.

Por outro lado, deve-se considerar que as mudanças fisiológicas e morfológicas das células produzidas sob condições de estresse também podem ter interferido na colonização e estabelecimento inicial das UMCs nos agregados de solo.

As respostas celulares sob condições de estresse variam de acordo com a espécie e com a estirpe bacterianas (KJELLEBERG et al., 1985; CHEN et al., 2009). Algumas bactérias morrem em poucas horas, enquanto outras conseguem sobreviver e manter a população durante um tempo mais prolongado. As culturas bacterianas submetidas a estresse nutricional nesse trabalho conseguiram sobreviver e diminuir sua dimensão celular. No entanto, cada cultura apresentou diferenças quanto à magnitude de redução da área celular e quanto às alterações de morfologia. Destaca-se a formação de aglomerados de células por *O. anthropi* LBBMA 88b e *P. aeruginosa* LBBMA 58 sob condição de estresse nutricional, a qual sugere alterações na superfície celular que favoreceram a aglomeração e a sobrevivência das células. KJELLEBERG et al. (1985) reportaram um incremento na taxa de adesão celular em espécies do gênero *Pseudomonas* em resposta ao incremento do tempo de incubação em condições de desnutrição (carbono e nitrogênio). De igual forma, Saini et al. (2011) observaram maior agrupamento celular após manterem *Pseudomonas* sp. em condições de desnutrição (carbono e nitrogênio). Neste trabalho, a formação desses agregados de células deve ter dificultado a dispersão das células desses isolados bacterianos no solo e sua penetração nos microporos. Portanto, os diferentes isolados bacterianos podem ter sofrido separação espacial dentro dos agregados, limitando, como consequência, a cooperação metabólica entre os membros do consórcio bacteriano para melhor utilização dos hidrocarbonetos de petróleo.

A distribuição bacteriana dentro do solo parece seguir um padrão de locais de alta densidade bacteriana e agrupamento celular e outros que apresentam densidade celular reduzida, sugerindo que existem locais de maior disponibilidade de nutrientes e de aceptores de elétrons que favorecem o estabelecimento bacteriano e interação dentro e entre espécies. Nesses locais, os produtos do metabolismo das diferentes populações podem promover estímulo recíproco ou alterar as condições físicas e químicas do microhabitat, favorecendo a sobrevivência e o crescimento bacteriano (van VEEN et al., 1997).

Em relação aos dados de densidade populacional de protozoários, poucos tratamentos diferiram entre si. Concluiu-se que tanto a adição de petróleo, quanto a dimensão dos

agregados e, conseqüentemente, o diâmetro dos poros, não interferiram no crescimento da comunidade de protozoários. Nossos resultados corroboram o trabalho de Hassink et al. (1993), os quais não encontraram diferenças significativas na biomassa de protozoários entre solos com diferentes texturas. As UMCs representaram presas bacterianas mais susceptíveis para a predação pelos protozoários, resultando em maior densidade populacional de protozoários nos microcosmos inoculados com UMCs, independentemente da adição de petróleo. Esse resultado reforça a observação anterior de que as populações bacterianas conseguiram se manter e se reproduzir usando a matéria orgânica do solo, e não os hidrocarbonetos de petróleo, como fonte primária de carbono e energia.

A privação de alimento aos protozoários antes de sua inoculação no solo pode ter um efeito indireto sobre sua atividade predatória, estimulando-a quando presas potenciais estão novamente disponíveis e predando imediatamente as bactérias inoculadas. Mesmo que a inoculação bacteriana tenha sido feita 24 h antes da inoculação dos protozoários, esse intervalo de tempo parece não ter sido suficiente para que as UMCs colonizassem os microporos e se mantivessem protegidas da predação. Dadas a mudança celular que apresentaram as UMCs em resposta ao estresse fisiológico imposto (CHEN et al., 2009) e a possível dificuldade das mesmas em colonizar os microporos, as UMCs podem ter sofrido um retardo em sua recuperação metabólica e adaptação ao novo ambiente, o que aparentemente as deixou mais susceptíveis e expostas à predação pelos protozoários.

8 CONCLUSÕES

As características intrínsecas do solo concomitante à adição de petróleo cru impediram o desenvolvimento adequado dos consórcios bacterianos nos dois diferentes estados fisiológicos, impedindo sua atividade hidrocarbonoclástica e conseqüentemente a degradação de TPH.

O estado fisiológico das UMCs, resultante da desnutrição, levou a uma menor capacidade de proteger-se da predação por protozoários, favorecendo a proliferação desses predadores no solo.

A dimensão celular das estirpes de bactérias hidrocarbonoclásticas inoculadas no solo contaminado com petróleo não influenciou a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, independentemente da dimensão dos agregados de solo.

9 REFERÊNCIAS

- ADAMS, O. G., FUFEYIN, T. P., ERUKE, O. S., Ehinomen, I. (2015) Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**. 3 (1): 28-39.
- ADL, S. M., COLEMAN, D. C. (2005) Dynamics of soil protozoa using a direct count method. **Biol. Fertil Soils**. 42: 168-171.
- ALMEIDA, A. J., AUGUSTO, F., SALES, F. J. I. C (2010). Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Ecl. Quím**. 35(3): 43. 2010
- BALBA, M. T., AL-AWADHI, N., AL-DAHER, R. (1998) Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **J Microbiol. Meth**. 32:155-164.
- BALDOCK, J. A. SKJEMSTAD, J. O. (2000) Role of the soil matrix and minerals in protecting natural organic materials against biological attack. **Org. Geochem**. 31: 697-710.
- BAMFORTH, S. (1985) Symposium on protozoan ecology: the role of protozoa in litters and soils. **J. Protozool**. 32 (3): 404-409.
- BAMFORTH, S. S. (1992) Sampling and enumerating soil protozoa. *Protocols in Protozoology*. **Society of Protozoology**. B-5.k.
- BEAUDOIN, D., CARMICHAEL, C. A., NELSON, R. K., REDDY, C. M., TESKE, A. P., EDGCOMB, V. (2014) Impact of protists on a hydrocarbon-degrading bacterial community from deep-sea Gulf of Mexico sediments: A microcosms study. **Deep-Sea Res. II**.
- BONKOWSKI, M. (2004) Protozoa and plant growth: the microbial loop in soil revisited. **New Phytol**. 162: 617–631.
- CHAÎNEAU, C. H., YEPREMIAN, C., VIDALIE, J. F., DUCREUX, J. BALLERINI, D. (2003) Biorremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. **Water Air Soil Poll**. 144: 419-440.
- CHEN, M., XU, P., ZENG, G., YANG, C., HUANG, D., ZHANG, J. (2015) Biorremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. **Biotechnol. Adv**. 33: 745-755.
- CHEN, S.-Y., JANE, W.-N., CHEN, Y.-S. WONG, H.-C. (2009) Morphological changes of *Vibrio parahaemolyticus* under cold and starvation stresses. **Int. J. Food Microbiol**. 129: 157-165.

- CORTES-PEREZ, S. RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S. MENDOZA-LOPEZ, M. R. (2014) Trophic structure of amoeba communities near roots of *Medicago sativa* after contamination with fuel oil No. 6. **Soil Ecol.** 67 (2): 430-442.
- DAS, N., CHANDRAN, P. (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. **Biotechnol. Res. Int.** 1-13.
- DARBYSHIRE, J. F., WHEATLY, R. E., GREAVES, M. P., INKSON, R. H. E. (1974) A rapid micromethod for estimating bacterial and protozoan populations in soil. **Rev. Ecol. Biol. Sol.** 11: 465-475.
- DUDA, V. I., SUZINA, N. E., POLIVTSEVA, V. N., BORONIN, A. M. (2012) Ultramicrobacteria: formation of the concept and contribution of ultramicrobacteria to biology. **Microbiol.** 81(4): 379-390.
- EI, FANTROUSSI S., AGATHOS, S. N. (2005) Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? **Curr. Opin. Microbiol.** 8: 268-275.
- EKELUND, F., FREDERIKSEN, H. B., RØNN, R. (2001) Population dynamics of active and total ciliate populations in arable soil amended with wheat. **Appl. Environ. Microbiol.** 68 (3): 1096-1101.
- ENGLAND, L. S., LEE, H., TREVORS, J. (1992) Bacterial survival in soil: effect of clays and protozoa. **Soil Biol. Biochem.** 25 (5): 525-531.
- EVANS, F. F., ROSADO, A. S., SEBASTIAN, G. V., CASELLA, R., MACHADO, P. L. O. A., HOLMSTROM, C., KJELLEBERG, S., van ELSAS, J. D., SELDIN, L. (2004) Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. **FEMS Microbiol. Ecol.** 49: 295-305.
- FARAHAT, L. A., EL-GENDY, N. SH. (2008) Biodegradation of baleym mix crude oil in soil microcosm by some locally isolated egyptian bacterial strains. **Soil Sediment Contam.** 17: 150-162.
- FOISSNER, W. (1999) Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples. **Agric, Ecosyst. and Environ.** 74: 95-112.
- GAN, S., LAU, E. V., NG, H. K. (2009) Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **J. Hard Mater.** 172: 532-549.
- GERTLER, C., NÄTHER, D., GERDTS, G., MALPAS, M. C., GOLYSHIN, P. N. (2010) A mesocosm study of the changes in marine flagellate and ciliate communities in a crude oil bioremediation trial. **Microb. Ecol.** 60: 180-191.

- GONG, X.C., LIU, Z. S., GUO, P., CHI, C. Q., CHEN, J., WANG, X., B. TANG, Y. Q., WU, X. L., LIU C. Z. (2012) Bacteria in crude oil survived autoclaving and stimulated differentially by exogenous bacteria. **PLoS One**. 7(9): 1-11.
- HAMAMURA, H., OLSON, S. H., WARD, D. M., INSKEEP, W. P. (2006) Microbial population dynamics associated with crude-oil biodegradation in diverse soils. **Appl. Environ. Microbiol.** 72 (9): 6316–6324.
- HASSINK, J., BOUWMAN, L. A., ZWART, K. B., BRUSSAARD, L (1993). Relationships between habitable pore space, soil biota and mineralization rates in grassland soils. **Soil Biol. Biochem.** 25 (1): 47-55.
- HEAD, I. M., JONES, D. M., RÖLING, W. F. M. (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. **Nat. Rev. Microbiol.** 4:173-182.
- HOLUBAR, P., GRUDKE, M. T., MOSER, A., STRENN, B., BRAUN, R. (2000) Effects of bacterivorous ciliated protozoans on degradation efficiency of a petrochemical activated sludge process. **Wat. Res.** 34 (7): 2051-2060.
- JOHNSEN, A. R., WICK, L. Y., HARMS H. (2005) Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environ. Pollut.** 133(1): 71-84.
- KINNER, N. E., HARVEY, R. W., SHAY, D. M., METGE, D. W., WARREN, A. (2002) Field evidence for a protistan role in an organically-contaminated aquifer. **Environ. Sci. Technol.** 36: 4312-4318.
- KJELLEBERG, S. (1985) Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. **Arch. Microbiol.** 142: 326-332.
- KLAMERUS-IWAN, A., BLONSKA, E., LASOTA, J., KALANDYK, A., WALIGORSKI, P. (2015) Influence of oil contamination on physical and biological properties of forest soil after chainsaw use. **Water Air Soil Pollut.** 226: 389.
- KOTA, S., BORDEN, R. C., BARLAZ, M. A. (1999) Influence of protozoan grazing on contaminant biodegradation. **FEMS Microbiol. Ecol.** 29: 179-189.
- LABUD, V., GARCIA, C., HERNANDEZ, T. (2007) Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a Sandy and a clay soil. **Chemosphere.** 66: 1863-1871.
- KYOUNGPHILE, N., ALEXANDER M. (1998) Role of nanoporosity and hydrophobicity in sequestration and bioavailability: tests with model solids. **Environ. Sci. Technol.** 32: 71-74.
- LAPPIN-SCOTT, H. M., CUSACK, F., COSTERTON, J. W. (1988) Nutrient resuscitation and growth of starved cells in sandstone cores: a novel approach to enhanced oil recovery.

Appl. Environ. Microbiol. 54 (6): 1373-1382.

LAPPIN-SCOTT, H. M., COSTERTON, W. (1990) Starvation and penetration of bacteria in soils and rocks. **Experientia.** 46 (8): 807-812.

LAPPIN-SCOTT, H. M., COSTERTON, W. (1992) Ultramicrobacteria and their biotechnological applications. **Curr. Opin. Biotech.**3: 283-285.

LARA, E., BERNEY, C., EKELUND, F., HARMS, H., CHATZINOTAS, A. (2007) Molecular comparison of cultivable protozoa from a pristine and a polycyclic aromatic hydrocarbon polluted site. **Soil Biol. Biochem.** 39: 139-148.

LOPES, L. P. Atividade e dinâmica populacional de um consórcio bacteriano durante biodegradação de óleo diesel no solo. Dissertação (tese de doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009. 84 pp.

MARDÉN, P., TUNLID, A., MALMCRONA-FRIBERG, K., ODHAM, G., KJELLEBERG S. (1985) Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. **Arch. Microbiol.** 142, 326–332.

MATTISON, R. G., TAKI, H., HARAYAMA S. (2005) The soil flagellate *Heteromita globosa* accelerates bacterial degradation of alkylbenzenes through grazing and acetate excretion in batch culture. **Microb. Ecol.** 3 (49):142–150.

MATTISON, R. G., HARAYAMA, S. (2001) The predatory soil flagellate *Heteromita globosa* stimulates toluene biodegradation by a *Pseudomonas* sp. **FEMS Microbiol. Lett.** 194: 39-45.

MATZ, C., KJELLEBERG, S. (2005) Off the hook-how bacteria survive protozoan grazing. **TRENDS Microbiol.** 13(7): 302-307.

MEGHARAJ, M., RAMAKRISHNAN, B., VENKATESWARLU, K., SETHUNATHAN, N., NAIDU, R. (2011) Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. **Environ. Int.** 37:1362-1375.

MROZIK, A., PIOTROWSKA-SEGET, Z., (2010) Bioaugmentation as a strategy for cleaning upon soils contaminated with aromatic compounds. **Microbiol. Res.** 165:363-375.

MULLIGAN, C. N., YONG, R. N. (2004) Natural attenuation of contaminated soils. **Environ. Int.** 30: 587-601.

MURASE, J., NOLL, M., FRENZEL, P. (2006) Impact of protists on the activity and structure of the bacterial community in a rice field soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 72(8): 5436–544.

- NUNAN, N., WU, K., YOUNG, I. M., CRAWFORD, J. W., RITZ, K. (2003) Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. **FEMS Microbiol. Ecol.** 44: 203-215.
- PERNTHALER, J. (2005) Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. **Nat. Rev. Microbiol.** 3: 537-546.
- PORTILLO, M. C., LEFF, J. W., LAUBER, C. L., FIERER, N. (2013) Cell size distributions of soil bacterial and archaeal taxa. **Appl. Environ. Microbiol.** 79 (24): 7610-7617.
- POSCH, T., SIMEK, K., VRBA, J., PERNTHALER, J., NEDOMA, J., SATTLER, B., SONNTAG, B., PSENNER, R. (1999) Predator-induced changes of bacterial size-structure and productivity studied on an experimental microbial community. **Aquat. Microb. Ecol.** 18: 235-246.
- POTSMA, J., HOK-A-HIN, C. H., VEEN, J. A. (1990) Role in microniches in protecting introduced *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* against competition and predation in soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 56 (2): 495-502.
- RATSAK, C. H., MAARSEN, K. A., KOOIJMAN, S. A. L. (1996) Effects of protozoa on carbon mineralization in activated sludge. **Wat. Res.** 30 (1): 1-12.
- RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S. (1994) Ecology of free-living amoebae. **Crit. Rev. Microbiol.** 20 (3): 225-241.
- RODRIGUEZ-ZARAGOZA, S., MAYAZLISH, E., STEINBERGER, Y. (2005) Vertical distribution of the free-living amoeba population in soil under desert shrubs in the Negev desert, Israel. **Appl. Environ. Microbiol.** 71(4): 2053–2060.
- ROGERSON, A., BERGER J. (1983) Enhancement of the microbial degradation of crude oil by the ciliate *Colpidium colpoda*. **J. Gen. App. Microbiol.** 29: 41-50.
- ROMANTSCHUK, M., SARAND, I., PETÄNEN, T., PELTOLA, R. JONSSON-VIHANNE, M., KOIVULA, T., YRJÄLÄ, K., HAAHTELA, K. (2000) Means to improve the effect of in situ biorremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. **Environ. Pollut.** 107: 179-185.
- RØNN, R., GRUNERT, J., EKELUND, F. (2001) Protozoan response to addition of the bacteria *Mycobacterium chlorophenicum* and *Pseudomonas chlororaphis* to soil microcosms. **Biol. Fertil Soils.**33: 126-131.
- RØNN, R., MCCAIG, A. E., GRIFFITHS, B. S., PROSSER, J. (2002) Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. **Appl. Environ. Microbiol.** 68 (12): 6094-6105.

ROSENBERG, K., BERTAUX, J., KROME, K., HARTMANN, A., SCHEU, S., BONKOWSKI, M. (2009) Soil amoeba rapidly change bacterial community composition in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. **ISME J.** 3: 675-684.

SAINI, G., NASHOLM, N., WOOD, D. B. (2011) Implications of growth and starvation conditions in bacterial adhesion and transport. **J. Adhesion Sci. Technol.** 25: 2281-2297.

SARMA, R. A., BARUAH, R., BORAH, M., KUMAR, S. A., DEKA, B. H. P., SAIKIA, N., DEKA, M., DUTTA, N., CHANDRA, B. T. (2014) Bioremediation potential of native hydrocarbon degrading bacterial strains in crude oil contaminated soil under microcosm study. **Int. Biodeterior. Biodegradation.** 94: 79-89.

SCHLEHECK, D., BARRAUD, N., KLEBENSBERGER, J., WEBB, J. S. McDOUGALD, D., RICE, S. A., KJELLEBERG, S. (2009) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 preferentially grows as aggregates in liquid batch cultures and disperses upon starvation. **PLoS ONE.** 4(5): e5513.

SEMPLE, K. T., DOICK, K. J., WICK, L. Y., HARMS, H. (2007) Microbial interactions with organic contaminants in soil: definitions, processes and measurement. **Environ. Pollut.** 150: 166-177.

SHERR, E. B., SHERR, B. F. (1992) Determination of phagotrophic protist feeding rates in situ. *Protocols in Protozoology*. **Society of Protozoology.** B-13.1.

TRUEX, M. J., BROCKMAN, F. J., JOHNSTONE, D. L., FREDRICKSON, J. K. (1992) Effect of starvation on induction of quinoline degradation for subsurface bacterium in a continuous-flow column. **Appl. Environ. Microbiol.** 58 (8): 2386-2392.

TSO, S-F., TAGHON, G. (2006) Protozoan grazing increases mineralization of naphthalene in marine sediment. **Microb. Ecol.** 51: 460-469.

VALENTIN, L., NOUSIAINEN, A., MIKKONEN, A. Introduction to organic contaminants in soil: Concepts and Risks. 24. p. 24: 1–30 Em VICENT T., CAMINAL G., ELJARRAT E. BARCELO D. (2013) *Emerging Organic Contaminants in Sludges Analysis, Fate and Biological Treatment*. *Hdb Env Chem*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 289 p.

van HAMME, J. D., SINGH, A., WARD O. P. (2003) Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 67 (4): 503-549.

van VEEN, J., OVERBEEK, L. S., ELSAS, J. D. (1997) Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 61 (2): 1212-135.

VARGAS, R., HATTORI, T. (1986) Protozoan predation of bacterial cells in soil aggregates. **FEMS Microbiol. Ecol.** 38: 233-242.

- VELIMIROV, B. (2001) Nanobaceteria, ultramicrobacteria and starvation forms: a search for the smallest metabolizing bacterium. **Microbes. Environ.** 16 (2): 67-77.
- VENKATA, M. S., KISA, T., OHKUMA, T., KANALY, R. A., SHIMIZU, Y. (2006) Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.** 5: 47-374.
- WELTER-TONINI, R. M. C., REZENDE, C. E., DAUDT, G. A. (2010) Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. **Oecologia Australis.** 14(4): 1010-10120.
- WRIGHT, D. A., KILLHAM, K., GLOVER, A. PROSSER, J. I. (1995) Role of pore size location in determining bacterial activity during predation by protozoa in soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 61 (10): 3537-543.
- YOUNG, D. K. (2006) The selective value of bacterial shape. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 70 (3): 660-703.
- ZARDA, B., MATTINSON, G., HESS, A., HAHN, D., HOHENER, P., ZEYER, J., (1988) Analysis of bacterial and protozoan communities in an aquifer contaminated with monoaromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiol. Ecol.** 27: 141-152.

10 APÊNDICE A- Análise de variância (ANOVA)

Produção de CO₂ acumulado

Fonte de variação	Grados de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio
Tratamentos	23	22664975	985434
Resíduo	71		
CV (%)	24		

*Significativo a 5%

Número mais provável de protozoários (NMP)

Fonte de variação	Grados de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio
Tratamentos	23	1.89719E+14	1.72E+13
Resíduo	48		
CV (%)	27819		

*Significativo a 5%

Hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH)

Fonte de variação	Grados de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio
Tratamentos	11	5290372	480943
Resíduo	24		
CV (%)	24		

*Significativo a 5%