

**DÉBORA MACHADO CORRÊA**

**POTENCIAL DE CIANOBACTÉRIAS NA BIOINDICAÇÃO E  
BIODEGRADAÇÃO DE AMBIENTES CONTAMINADOS POR NAFTALENO  
NO BRASIL E NA ANTÁRTICA.**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2007**

**DÉBORA MACHADO CORRÊA**

**POTENCIAL DE CIANOBACTÉRIAS NA BIOINDICAÇÃO E  
BIODEGRADAÇÃO DE AMBIENTES CONTAMINADOS POR NAFTALENO  
NO BRASIL E NA ANTÁRTICA.**

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

APROVADA: 28 de março de 2007.

---

Prof. Carlos Ernesto G. R. Schaefer  
(Co-orientador)

---

Prof<sup>ª</sup>. Míriam Abreu Albuquerque  
(Co-orientadora)

---

Prof. Juraci Alves Oliveira

---

Prof. Antônio Galvão do Nascimento

---

Rosane Maria de Aguiar Euclides  
(Orientadora)

**“Gostaríamos de ser sábios, mas teríamos certeza de nossa sabedoria enquanto acreditássemos que os loucos são mais felizes e até mais alegres do que nós?”**

**(Eliphas Levi)**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me deu força e inspiração para vencer os obstáculos que encontrei em meus caminhos.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Botânica, pela oportunidade de me tornar um ser humano melhor, através do estudo.

Ao Programa Antártico Brasileiro, por me permitir conhecer e fazer parte dos brasileiros que vêm na Antártica, a possibilidade de uma história harmoniosa de ocupação humana.

Aos meus pais, meus amores, que sempre me apoiaram e muitas vezes, abriram mão de seu próprio conforto para poder me dar uma vida melhor. Por terem cultivado em mim, valores como caráter, respeito ao próximo, honestidade, fidelidade e senso de justiça.

Aos meus irmãos queridos, Juliano e Antônio, que me ensinaram a dividir o pouco que temos, e a multiplicar o muito que somos. Aos que também considero meus irmãos, Marcus Vinícius, Samuel, José Antônio e Márcio, presentes nas minhas lembranças mais distantes.

Aos meus familiares, que acreditaram na minha capacidade e sempre oraram pelo meu sucesso.

Aos amigos, Rodrigo Amaral e Juliana Ribeiro, que me presentearam com a certeza da compreensão.

Às amigas, Paula Werneck, Daniela e Nathália Von Rondow, por desculparem minha ausência e por manterem viva nossa amizade através de todos estes anos.

Às companheiras de república, Déborah, Eliane e Clarissa, pela amizade e convivência fraterna.

Às amigas Karina Lucas e Jack Carlos, companheiras no mestrado, na festa e no choro.

A Adelon Ansaloni, pelo amor e apoio, pelo olhar de confiança e conforto nas horas difíceis.

À Professora Rosane Aguiar, por me contagiar com o amor à ficologia. Pela compreensão, afeto e orientação.

Ao Professor Carlos Ernesto Schaefer, por acreditar no meu potencial e por ter me dado a oportunidade de participar do “Criossolos”.

À Míriam Albuquerque, pelo companheirismo durante a OPERANTAR XXII e pelas instruções valiosas durante a produção da dissertação.

Ao Professor Juraci Alves, pela generosidade e por deixar o Laboratório de Radioisótopos à minha disposição.

A Rogério Gomide e João Bosco, pelo suporte técnico e boa vontade.

A todos os amigos do Laboratório de Ficologia e da Unidade de Crescimento de Plantas. Em especial à amiga Eliane, pelo riso, mesmo na hora do sufoco e aos amigos, Cláudio e Eduardo, que me receberam com um sorriso sincero, e vão me deixar muitas saudades.

## **BIOGRAFIA**

Débora Machado Corrêa, filha de Mizael Machado da Silva e Elaine Corrêa Machado, nasceu em 25 de janeiro de 1982, na cidade de Caratinga, Minas Gerais. Completou o ensino médio em sua cidade de nascimento, em 1999.

Formou-se Bióloga pela Universidade Federal de Viçosa, MG, em janeiro de 2005. No mesmo ano, iniciou o Mestrado em Botânica pela Universidade Federal de Viçosa.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1. Hidrocarbonetos (HCs) e composição química do petróleo.....	6
2.1.1. Naftaleno.....	6
2.2. Uso de microrganismos em processos de remediação de áreas impactadas por hidrocarbonetos.....	7
2.3. Cianobactérias.....	9
2.3.1. Aspectos Gerais.....	9
2.3.2. Tolerância a condições extremas.....	10
2.4. Tolerância a hidrocarbonetos.....	11
2.4.1. Ocorrência de Cyanophyta em ambientes contaminados por hidrocarbonetos.....	11
2.4.2. Atuação das Cyanophyta na degradação de hidrocarbonetos.....	12
2.5. Metabolismo aeróbico de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs).....	13
2.6. Fatores ambientais que influenciam a degradação de hidrocarbonetos.....	15
2.6.1. Concentração e estado físico do poluente.....	15
2.6.2. Temperatura.....	16
2.6.3. Oxigênio.....	16
2.6.4. Nutrientes.....	17
2.6.5. Salinidade.....	17
2.6.6. Atividade de água.....	18
2.6.7. pH.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Local de coleta das amostras.....	19
3.2. Descrição dos biofilmes.....	19

3.3. Condições de crescimento e isolamento de cianobactérias.....	19
3.4. Experimento de degradação de [C <sup>14</sup> ] naftaleno.....	20
3.4.1. Reagentes químicos.....	20
3.4.2. Experimento de biodegradação com biofilmes de cianobactérias.....	20
3.4.3. Coleta e análise de amostras contendo <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> .....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Descrição dos biofilmes.....	22
4.2. Seleção de cianobactérias.....	23
4.3. Experimento de degradação de [C <sup>14</sup> ] naftaleno.....	23
5. DISCUSSÃO.....	26
5.1. Seleção de Cianobactérias.....	26
5.2. Biodegradação de [C <sup>14</sup> ] naftaleno.....	26
CAPÍTULO II.....	30
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	32
2.1. Ocorrência de Cyanophyta em ambientes antárticos.....	32
2.2. Principais fatores de estresse no ambiente antártico.....	33
2.2.1. Baixas temperaturas e congelamento.....	33
2.2.2. Radiação ultravioleta (UV).....	34
2.2.3. Salinidade.....	35
2.3. Atuação das Cyanophyta como bioindicadores de impactos ambientais..	35
2.4. Efeito de hidrocarbonetos de petróleo sobre os microrganismos.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1. Isolamento de Cianobactérias.....	38
3.1.1. Local de coleta das amostras.....	38
3.1.2. Análise das amostras de solo, isolamento e seleção de cianobactérias..	38
3.2. Experimento de degradação de [C <sup>14</sup> ]naftaleno.....	38
3.2.1. Reagentes químicos.....	39
3.2.2. Experimento de biodegradação com culturas monoclonais de cianobactérias.....	39
3.2.3. Coleta e análise de amostras contendo <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> .....	39
3.3. Efeito do naftaleno sobre as taxas de crescimento de cianobactérias.....	40

3.3.1. Condições.....	40
3.3.2. Procedimentos de amostragem e de avaliação de crescimento de cianobactérias.....	41
3.3.3. Cálculo do valor inibitório de crescimento de amostras expostas ao naftaleno.....	41
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Seleção de cianobactérias.....	43
4.2. Biodegradação de naftaleno por <i>Phormidium</i> sp. ANT 01.....	44
5. DISCUSSÃO.....	47
5.1. Biodegradação de naftaleno por <i>Phormidium</i> sp. ANT 01.....	47
5.2. Efeito do naftaleno sobre o crescimento de <i>Phormidium</i> sp. ANT 01.....	48
CONCLUSÕES GERAIS.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXO I.....	66
ANEXO II.....	68
ANEXO III.....	70

## RESUMO

CORRÊA, Débora Machado, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, Março de 2007.

**Potencial de cianobactérias na bioindicação e de biodegradação de ambientes contaminados por naftaleno no Brasil e na Antártica.** Orientadora: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Co-orientadores: Míriam Abreu Albuquerque e Carlos Ernesto G. R. Schaefer.

Cianobactérias foram isoladas de ambientes com diferentes históricos de contaminação por hidrocarbonetos. Dois biofilmes de cianobactérias foram coletados em uma calha de escoamento, num posto de gasolina na cidade de Viçosa, MG, expostos a doses de hidrocarbonetos. Destes biofilmes, foi selecionado para enriquecimento, em meio AA4 líquido, aquele que apresentou a maior diversidade de organismos. Tanto o biofilme integral (tratamento misto), como a cultura monoclonal de *Phormidium* sp. (tratamento monoclonal), isolada a partir do biofilme integral, foram testados quanto a capacidade de biodegradação de [C<sup>14</sup>] naftaleno, em condições fotoautotróficas e à temperatura de 20 ± 1°C. Tanto o tratamento misto, quanto o monoclonal mostraram-se capazes de mineralizar prontamente o naftaleno, nas proporções de 28 e 22,5%, respectivamente, num período de quinze dias. Para ambos os tratamentos, o platô de degradação cumulativa do naftaleno foi atingido em torno do quarto dia de tratamento. Duas hipóteses foram consideradas como as mais prováveis para explicar o alcance prematuro do platô de degradação: a primeira, seria por exaustão de naftaleno, em função de perdas não registradas de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> pelo aparato respirométrico, de caráter rústico, utilizado no experimento; a segunda, seria por depleção de nutrientes, já que não houve correção do solo utilizado no experimento, e a única fonte de nutrientes inorgânicos consistiu no meio de cultura utilizado para ressuspender o inóculo (1 mL). Tanto o biofilme integral, quanto a cultura monoclonal de *Phormidium* sp. foram considerados potencialmente capazes de biodegradar naftaleno, e indicados para a realização de futuros experimentos de biorremediação de áreas impactadas por hidrocarbonetos. Por outro lado, a cianobactéria *Phormidium* sp. ANT 01 foi isolada de solos antárticos, sem histórico de contaminação por hidrocarbonetos, e selecionada para a condução de um novo experimento de biodegradação de [C<sup>14</sup>] naftaleno, sob condições fotoautotróficas, à temperatura de 15 ± 1°C. Sob as condições testadas, a cultura monoclonal de *Phormidium* sp. ANT 01 não se mostrou capaz de degradar naftaleno, quando comparada ao tratamento abiótico (controle). Um segundo experimento foi conduzido a fim de monitorar o crescimento de *Phormidium* sp. ANT

01 sob a presença de naftaleno. A exposição de *Phormidium* sp. ANT 01 a uma concentração de naftaleno igual a  $66,67 \mu\text{g.L}^{-1}$  provocou um efeito inibitório sobre o crescimento dos organismos na ordem de 37%. Por apresentar grande distribuição e abundância em solos da Baía do Almirantado, Antártica, e sensibilidade a baixas concentrações de naftaleno, *Phormidium* sp. ANT 01 possui potencial para ser utilizado como bioindicador de solos contaminados com derivados do petróleo, nesta região.

## ABSTRACT

CORRÊA, Débora Machado, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2007.  
**Cyanobacterial potencial on naphthalene bioindication and biodegradation in brasillian and antarctic contaminated environments.** Adviser: Rosane Maria de Aguiar Euclides. Co-advisers: Míriam Abreu Albuquerque and Carlos Ernesto G. R. Schaefer.

Cyanobacteria were isolated from two sites with a different hydrocarbon contamination history. In the first case, biofilms of cyanobacteria were collected in a drainage system, from a gas station of Viçosa City, MG. From these biofilms, the one presenting the greater cyanobacterial diversity was selected to be enriched (using the AA4 liquid medium). Both the integral biofilm (mixed treatment), and a monoclonal culture of *Phormidium* sp. (monoclonal treatment), which was isolated from the integral biofilm, were tested for [ $C^{14}$ ] naphthalene biodegradation ability, under photoautotrophic conditions, and at temperature of  $20 \pm 1^\circ C$ . Mixed treatment as well as monoclonal treatment showed to be able to readily mineralize naphthalene, in the ratio of 28 and 22,5%, respectively, during a experimental period of fifteen days. For both, the cumulative naphthalene degradation *plateau* was reached around the fourth day of the experiment. Two hypotheses were considered trying to explain the premature *plateau* degradation: (1) by naphthalene exhaustion, since  $^{14}CO_2$  losses were not registered by the respirometric system used in the test; (2) by nutrient depletion, since there was no soil correction in the experiment. In that case, the only inorganic nutrient source applied was provided by the culture medium (1 mL) used to resuspend the inoculum. The integral biofilm and the monoclonal culture of *Phormidium* sp. were considered to have potencial to degrade naphthalene. It was suggested that they could be indicated for future biorremediation experiments of hydrocarbon contaminated sites. On the second case, a cyanobacteria from the genus *Phormidium* sp. ANT 01 was collected and isolated from antarctic soils without a hydrocarbon contamination history. *Phormidium* sp. ANT 01 was selected for another experiment using [ $C^{14}$ ] naphthalene biodegradation, under photoautotrophic conditions, and at temperature of  $15 \pm 1^\circ C$ . The results showed that the monoclonal culture of *Phormidium* sp. ANT 01 were not able to degrade naphthalene, when compared with the abiotic treatment (control). A second experiment was carried out to test the biomass production of *Phormidium* sp. ANT 01 under naphthalene conditions. The exposure of *Phormidium* sp. ANT 01 to the

naphthalene at concentration of  $66,67 \mu\text{g.L}^{-1}$  caused a inhibitory effect on the growth of the organisms around 37%. By reason of its great distribution and abundance in soils of Admiralty Bay, Antarctic, and its sensibility under low naphthalene concentrations, *Phormidium* sp. ANT 01 showed potential to be used as a bioindicator of hydrocarbon contaminated soils of this region.

## INTRODUÇÃO GERAL

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos (HCs) e outros compostos orgânicos, incluindo alguns constituintes organometálicos que, notavelmente, complexam vanádio e níquel (Van Hamme *et al.*, 2003).

Atividades legais (e.g. produção e transporte de petróleo), assim como ações ilegais (e.g. despejo de resíduos líquidos contaminados com petróleo e derivados) têm levado à contaminação de diversos compartimentos ambientais por HCs (Al-Hasan *et al.*, 2001).

Na década de 80, estimava-se que o *input* anual global de petróleo estava entre 1,7 a 8,8 milhões de toneladas métricas, dos quais a maior parte era proveniente de fontes antropogênicas (Leahy & Colwell, 1990). Na última década este *input* provavelmente deve ter crescido consideravelmente em função do grande aumento da produção de petróleo e derivados e de seu transporte.

A crescente ocupação do globo terrestre pelo homem tem causado incidentes até mesmo em áreas mais frágeis ecologicamente, como em regiões de clima ártico. Nestas regiões, podemos destacar o episódio ocorrido no Alasca, no qual o navio-tanque *Exxon Valdez* despejou mais de 200.000 barris de petróleo ao longo da região costeira (Leahy & Colwell, 1990) e o derramamento ocorrido na Baía Paraíso, na Antártica (Kennicutt & Sweet, 1992), ambos ocorridos no início dos anos 90.

Regiões impactadas por derramamentos de petróleo e derivados, geralmente, sofrem alterações na estrutura de suas comunidades microbianas, sendo que espécies sensíveis a HCs são, muitas vezes, eliminadas e substituídas por outras tolerantes ou consumidoras de HCs (Gerdes, *et al.*, 2005).

Biofilmes são comunidades microbianas organizadas espacialmente em lâminas sobrepostas resultantes de gradientes físico-químicos (Sánchez *et al.*, 2006). Durante as últimas décadas, reatores biológicos como os biofilmes microbianos têm se tornado um foco de interesse de pesquisadores no campo da biorremediação de compostos xenobióticos, como é o caso dos HCs (Grötzschel *et al.*, 2002).

Biofilmes compostos predominantemente por cianobactérias, em termos de biomassa, frequentemente, são observados recolonizando tais áreas, indicando um possível papel destas comunidades na biodegradação dos HCs (Höpner *et al.*, 1996; Radwan *et al.*, 2001; Barth, 2003). Podem também ser relacionadas à bioindicação de

ambientes contaminados com HCs, sendo que espécies sensíveis a estes poluentes podem ser utilizadas como bioindicadoras da presença de HCs no ambiente.

As cianobactérias são organismos procariontes que realizam fotossíntese oxigênica e podem possuir a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, transformando-o em formas assimiláveis para outros organismos (Tandeau de Marsac & Houmard, 1993). Algumas espécies são capazes de crescimento heterotrófico, além do fotoautotrófico (Bold & Wayne, 1985).

A capacidade metabólica que certos organismos possuem de transformar ou mineralizar contaminantes orgânicos em formas menos tóxicas, as quais são então integradas aos ciclos biogeoquímicos naturais é chamada de biodegradação (Margesin & Schinner, 2001).

A biorremediação é uma tecnologia não destrutiva, de grande efetividade, de baixo custo e, algumas vezes, operacionalmente favorável que visa acelerar o processo natural de biodegradação de contaminantes pela otimização dos fatores que limitam este fenômeno (Allard & Neilson, 1997). O uso de organismos capazes de degradar compostos como os HC, nos processos de biorremediação, é de extrema importância por se tratar de uma alternativa de baixo custo, de alta efetividade e de caráter menos invasivo, sob o ponto de vista ecológico (Allard & Neilson, 1997).

Os bioindicadores são organismos capazes de gerar respostas, chamadas de biomarcadores, mensuráveis que possam ser relacionadas à sua exposição à baixas concentrações de poluentes ambientais.

O enriquecimento da biosfera com poluentes orgânicos, como os HCs, em decorrência da atividade humana, torna extremamente necessário o desenvolvimento de: 1) programas de biomonitoramento, que através da identificação de bioindicadores, nos permitam perceber rapidamente mudanças no meio causadas pelos HCs, prevenindo impactos de grandes dimensões ambientais; e 2) técnicas efetivas de biorremediação, que possam atenuar os impactos causados ao ambiente por estes contaminantes.

# CAPÍTULO I

## **Avaliação do Potencial de Biofilmes de Cianobactérias na Biodegradação de Naftaleno**

### **1 – INTRODUÇÃO**

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são uma grande classe de poluentes ambientais que exibem propriedades tóxicas, carcinogênicas ou mutagênicas (Struble & Harmon, 1983). Os HAPs estão presentes no petróleo e em seus derivados e também podem ser formados no processo de combustão incompleta de combustíveis fósseis. Tais compostos raramente são encontrados como produto de vias biossintéticas e possuem alta persistência no ambiente (Martins *et al.*, 2004). Os HAPs são recalcitrantes no ambiente e, sob condições naturais, geralmente são resistentes ao ataque microbiano (Xu & Obbard, 2004).

O naftaleno, um hidrocarboneto aromático dicíclico, e seus derivativos metilados são considerados os compostos mais tóxicos da fração solúvel do petróleo (Anderson *et al.*, 1974). A exposição diária de ratos ao naftaleno por inalação provou ser claramente carcinogênica e causou decréscimo das concentrações sanguíneas de hemoglobina (NTP, 2000). Existem relatos de intoxicações letais por naftaleno em humanos, a maioria dos casos está associada ao desenvolvimento de anemia hemolítica (Dawson *et al.*, 1958; Chun *et al.*, 1998; Santucci & Shah, 2000).

A presença de hidrocarbonetos (HCs) na biosfera, ao longo da história da vida, pode explicar por que muitos organismos têm adquirido vias para fazer uso destes compostos como substratos de crescimento (Widdel & Rabus, 2001).

Cianobactérias são organismos procariontes capazes de realizar fotossíntese oxigênica, possuindo ampla distribuição no globo terrestre, desenvolvendo-se com sucesso em vários tipos de ambientes que apresentam condições extremas, inclusive, em ambientes poluídos (Stal, 1995; Abed & Köster, 2005).

Algumas cianobactérias são também capazes de crescimento autotrófico facultativo; estas em geral, apresentam organização filamentosa, muitas das quais são capazes de diferenciarem heterocitos (Flores & Wolk, 1985). São capazes de utilizar alguns compostos orgânicos, como uréia e aminoácidos, até mesmo em altas taxas

(Montesinos *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 2002; Zubkov *et al.*, 2003). Existem estudos que demonstram a capacidade das cianobactérias em degradar pesticidas orgânicos como  $\gamma$ -hexaclorociclohexano, um organoclorado alifático (Kuritz & Wolk, 1995).

Recentemente, um notável desenvolvimento de biofilmes, predominantemente compostos por cianobactérias, tem sido observado sobre áreas poluídas com grandes quantidades de petróleo e, tais biofilmes, aparentemente, estão envolvidos na degradação de HCs (Abed *et al.*, 2002;). Muitas pesquisas na área da microbiologia do petróleo têm voltado atenção para tais reatores biológicos (Grötzschel *et al.*, 2002; Al-Awadhi *et al.*, 2003; Chaillan *et al.*, 2006).

Narro *et al.* (1992 a) demonstraram a capacidade de isolados da cianobactéria marinha *Agmenellum quadruplicatum* em oxidar o fenantreno, possivelmente pela ação catalítica de uma monoxigenase, sob condições fotoautotróficas. Narro *et al.* (1992 b) também demonstraram a capacidade, sob condições fotoautotróficas, de isolados de *Oscillatoria* sp. em oxidar o naftaleno a 1-naftol, via formação do intermediário naftaleno 1,2-óxido, à semelhança de vias utilizadas por bactérias heterotróficas como *Bacillus cereus* (Cerniglia *et al.*, 1984).

Al-Awadhi *et al.* (2003) demonstraram a capacidade de biofilmes de cianobactérias em degradar HCs, sugerindo a aplicação de biofilmes artificiais de cianobactérias (produzidos em laboratório), como filtros, nos processos de remediação de rejeitos líquidos contaminados com compostos derivados de petróleo, antes dos mesmos serem liberados no ambiente. Nestes biofilmes artificiais, os autores destacam o papel das cianobactérias como colonizadoras primárias, aderindo-se eficientemente à superfície sólida artificial e imobilizando as bactérias biodegradadoras.

Grötzschel *et al.* (2002) demonstraram a degradação de quatro HCs por um biofilme composto por cianobactérias e bactérias heterotróficas. As técnicas moleculares empregadas (PCR e DGGE) não demonstraram diferenças significativas na composição dos biofilmes, durante o período de exposição aos HCs, bem como, não foram detectadas alterações fisiológicas nos organismos no decorrer do experimento.

Por outro lado, Sánchez *et al.* (2006) relataram a degradação de HCs alifáticos e aromáticos, num sistema do tipo cultura contínua, por um consórcio de cianobactérias e bactérias heterotróficas e através das técnicas moléculas PCR-DGGE, demonstraram alterações na composição do biofilme. Ao final do experimento não foram detectadas cianobactérias no sistema, indicando que estes organismos não foram capazes de utilizar os HCs como a única fonte de carbono.

Abed & Köster (2005) também apontam as bactérias heterotróficas como os organismos diretamente ligados ao processo de degradação, mas reconhecem que o papel de cianobactérias na sustentação destas comunidades de bactérias seja de grande importância.

O objetivo deste trabalho é investigar o potencial de degradação do naftaleno, por um biofilme de cianobactérias, exposto continuamente a doses de HCs, apontando organismos com potencial para serem utilizados em experimentos futuros de biorremediação.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – Hidrocarbonetos (HCs) e composição química do petróleo

Compostos que se constituem exclusivamente de carbono e hidrogênio são chamados hidrocarbonetos (HCs). Por não exibirem grupos funcionais são extremamente apolares e exibem baixa reatividade química à temperatura ambiente. A ocorrência, o tipo e o arranjo de ligações insaturadas (ligações  $\pi$ ) determinam a reatividade dos HCs (Widdel & Rabus, 2001).

A disponibilidade de HCs como combustíveis e para a síntese de uma grande variedade de outros compostos é de grande importância para a nossa civilização industrializada. Os HCs são naturalmente formados por processos geoquímicos de longa duração ou quimicamente sintetizados a partir destes (Tissot & Welte, 1984).

O petróleo é uma mistura complexa de HCs e outros compostos orgânicos, incluindo alguns organometalo constituintes que, notavelmente, complexam vanádio e níquel (Van Hamme *et al.*, 2003). Os HCs do petróleo podem ser divididos em quatro classes: saturados, aromáticos, asfaltenos (fenóis, ácidos graxos, cetonas, ésteres e porfirinas) e resinas (piridinas, quinolinas, carbazóis, sulfóxidos e amidas) (Leahy & Colwell, 1990).

#### 2.1.1 – Naftaleno

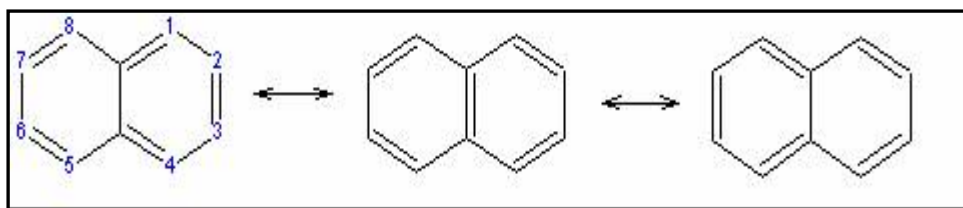
O naftaleno é um hidrocarboneto aromático dicíclico, suas moléculas são constituídas de dois anéis benzênicos fundidos. Possui três estruturas de ressonância (Figura 1). À diferença do benzeno, as ligações carbono-carbono do naftaleno não possuem o mesmo comprimento, sendo que as pontes C1-C2, C3-C4, C5-C6 e C7-C8 possuem cerca de 1,36 Å, enquanto as demais pontes possuem cerca de 1,42 Å. Possui massa molecular igual a 128,17 g. mol<sup>-1</sup>, densidade de 1,14 g.cm<sup>-3</sup> e solubilidade muito baixa em água (31,7 mg.L<sup>-1</sup>). O naftaleno sublima facilmente à temperatura ambiente (HSDB, 1999).

É usado como intermediário na síntese do ácido antranílico, naftóis, naftilaminas, ácido sulfônico, resinas sintéticas e hidronaftalenos; é também utilizado na preparação de ácido salicílico, antraquinona, índigo e do inseticida 1-naftil-N-metilcarbamato. O naftaleno é muito utilizado como repelente de insetos, em desodorantes para sanitários e como antisséptico de uso tópico veterinário (NTP, 2000).

Foi considerado, em conjunto com outros HAPs, como a classe de poluentes de maior contribuição na toxicidade total de amostras de sedimentos e rejeitos líquidos, passando a ser enquadrado na lista prioritária de contaminantes orgânicos persistentes (Eljarrat & Barceló, 2003).

A exposição ao naftaleno está associada com várias manifestações de toxicidade, em seres humanos e em animais de laboratório. Existem comprovações claras de que o naftaleno passa pelo metabolismo enzimático oxidativo do citocromo P450, resultando na produção de metabólitos reativos, que levam à depleção da glutatona e conseqüente formação de estresse oxidativo. Além disso, o naftaleno e seus metabólitos induzem a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como o ânion superóxido e radicais hidroxil (Chichester *et al.*, 1994; Stohs *et al.*, 2002).

O estresse oxidativo resultante produz efeitos danosos em tecidos, incluindo opacificação do cristalino, formação de catarata e danos seletivos às células da Clara (células do epitélio bronquiolar não ciliadas). Podem ocorrer peroxidação de lipídios, danos ao DNA e aumento na fluidez de membrana dos tecidos hepáticos e cerebrais (Germansky & Jamall, 1988; Bagchi *et al.*, 1998).



**Figura 1:** Estrutura química do naftaleno e suas estruturas de ressonância. As posições 1,4,5 e 8 indicadas na figura são chamadas posições *alpha* e as posições 2,3,6 e 7 são denominadas posições *beta*.

## 2.2 – Uso de microrganismos em processos de remediação de áreas impactadas por hidrocarbonetos

Desde meados do século XX são conhecidas espécies de bactérias e fungos capazes de utilizar HCs como a única fonte de carbono em presença de oxigênio. Em 1946, Claude E. ZoBell publicou uma revisão sobre a ação de microrganismos, de distribuição ampla na natureza, na decomposição de HCs.

A biodegradação é o mecanismo primário através do qual petróleo e outros poluentes de mesma natureza são eliminados do ambiente, sendo as populações

indígenas de microrganismos as principais responsáveis pelo processo (Leahy & Colwell, 1990).

A biorremediação de áreas impactadas por hidrocarbonetos é uma alternativa não destrutiva, mais barata e ecologicamente correta do que outros processos como tratamento químico (surfactantes e dispersantes), incineração, armazenamento e lavagem do solo (Eriksson *et al.*, 2003).

Dentre as bactérias, os gêneros que possuem aparato enzimático capaz de degradar aerobicamente HCs estão: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Burkholderia* e *Sphingomonas*, entre outros. Outras bactérias podem degradar HCs sob condições anaeróbicas: *Blastochloris sulfoviridis*, *Azoarcus* sp., *Dechloromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Thauera aromatica*, *Vibrio* sp., *Geobacter grbiciae*, *Geobacter metallireducens*, *Desulfobacula toluolica* e *Desulfobacterium cetonicum* (Van Hamme *et al.*, 2003).

Dentre os fungos podemos citar: *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Trichoderma*, *Mortierella*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Corollospora*, *Dendryphiella*, *Lulworthia* e *Varicosporina* (Leahy & Colwell, 1990).

Um grande número de trabalhos tem usado microrganismos na biodegradação de HCs, com sucesso, sob condições de laboratório, identificando isolados com potencial para serem usados em processos de biorremediação. Heitkamp *et al.* (1987) analisando a capacidade de degradação do [C<sup>14</sup>] naftaleno por microrganismos de três amostras de solos, com diferentes históricos de contaminação, obtiveram meia vida de mineralização variando de 2,4 a 4,4 semanas.

Chaillan *et al.* (2004) isolaram 33 organismos, entre fungos e bactérias, capazes de degradar HCs a partir de solos contaminados da Indonésia. Foram testados treze parâmetros que refletem o tipo de capacidade degradativa apresentado por estes microrganismos, sendo que a capacidade máxima de degradação foi obtida para os HCs saturados, enquanto que para os aromáticos um baixo nível de degradação foi observado.

Muitos trabalhos têm se focado nas bactérias heterotróficas e nos fungos que crescem aderidos à bainha mucilaginosa de cianobactérias constituintes dos chamados biofilmes, em áreas profundamente afetadas por petróleo (Al-Awadhi *et al.*, 2002; Abed *et al.*, 2002; Grötzschel *et al.*, 2002; Al-Awadhi *et al.*, 2003). Nestes trabalhos, o papel direto das bactérias heterotróficas e fungos na degradação aeróbica de HCs é

reconhecido; e a maioria dos autores considera que, exclusivamente, estes organismos participem do ataque às moléculas de HCs (Sorkhoh *et al.*, 1995; Abed & Köster, 2005; Sánchez *et al.*, 2006; Chaillan *et al.*, 2006).

## **2.3 – Cianobactérias**

### **2.3.1 - Aspectos Gerais**

Cyanophyta é um dos grupos de organismos vivos mais antigos da Terra, existindo a mais de 2,8 bilhões de anos (Knoll, 1999). Existem registros fósseis de organismos de morfologia semelhante a das cianobactérias que datam de 3,5 bilhões de anos (Schopf & Walter, 1982). Esta longa história evolutiva na Terra explica, parcialmente, a adaptação do grupo a uma grande diversidade de ambientes, incluindo desde ambientes aquáticos (marinhos e de água doce), em diferentes zonas fóticas (organismos planctônicos ou bênticos), terrestres (colonizando até mesmo o interior de rochas), até ambientes extremos (de regiões de clima próximo ao ponto de congelamento da água a fontes termais) (Tamagnini *et al.*, 2002).

Em relação à taxonomia de Cyanophyta, existem duas abordagens distintas: sob o ponto de vista botânico (Anagnostidis & Komárek, 1999) e sob o ponto de vista bacteriológico (Stanier *et al.*, 1978; Ripka *et al.*, 1992). Apesar das diferentes abordagens, ambos dividem as cianobactérias em quatro ou cinco subgrupos principais, baseados em características morfológicas e em padrões de divisão celular.

As cianobactérias são um grupo de procariotos que realizam fotossíntese oxigênica (característica que as diferencia de outras bactérias fotossintetizantes), podendo ainda apresentar crescimento heterotrófico facultativo (Flores & Wolk, 1985). Algumas cianobactérias são capazes de realizar fotossíntese anoxigênica, usando sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) como doador de elétrons. Apresentam clorofila *a* e ficobiliproteínas distribuídos em invaginações da membrana plasmática (tilacóides) arrançadas, na maioria das vezes, de forma concêntrica no citoplasma das células. As ficobiliproteínas permitem às cianobactérias ocupar uma grande variedade de ambientes graças ao amplo espectro de absorção de energia luminosa que possuem (Lemason *et al.*, 1973).

A maioria das cianobactérias é capaz de fixar nitrogênio atmosférico em amônia, disponibilizando-a para outros organismos. Esta reação catalisada pela nitrogenase é altamente endergônica, requerendo energia na forma de ATP (Tamagnini *et al.*, 2002).

As cianobactérias formam um grupo muito diverso em termos morfológicos, existindo espécies unicelulares, coloniais e filamentosas. O Phylum Cyanophyta possui um grau de diferenciação celular maior que o apresentado por outros grupos de bactérias. Células vegetativas, de certas ordens com morfologia filamentosa, podem se desenvolver em células modificadas estruturalmente e funcionalmente especializadas, como os acinetos (estruturas de resistência) e os heterocitos (células especializadas na fixação de nitrogênio) (Bold & Wynne, 1985).

### **2.3.2 – Tolerância a condições extremas**

Biofilmes de cianobactérias se desenvolvem bem sob condições extremas de pH, salinidade ou temperatura, nas quais a abundância e atividade de organismos pastadores e de organismos que revolvem a superfície dos sedimentos são baixas ou ausentes (Vincent *et al.*, 1993a; Barth, 2003).

Existem relatos da ocorrência de biofilmes predominantemente compostos por cianobactérias em temperaturas próximas do ponto de congelamento da água e expostas à altas intensidades de radiação ultravioleta, como nas regiões Árticas e Antárticas (Broady & Kibblewhite, 1991; Vincent *et al.*, 1993b; Tang *et al.*, 1997; Vincent *et al.*, 2004).

Cianobactérias podem também ser dominantes em desertos (Chen *et al.*, 2003; Harel *et al.*, 2004), fontes termais e gêiseres (Ward *et al.*, 1998; Fernandez-Turiel *et al.*, 2005), em salinas (Fourçans *et al.*, 2004; Mouné *et al.*, 2003) e às vezes, em situações nas quais existe uma combinação de vários fatores de estresse (Moorhead *et al.*, 2005).

Várias espécies de cianobactérias têm sido identificadas em ambientes contaminados com metais pesados, como cádmio e arsênio, e por serem capazes de capturar e armazenar os poluentes em componentes intracelulares são consideradas organismos potencialmente biorremediadores (Fiore *et al.*, 1998).

Alguns autores relacionam a capacidade de adaptação das Cyanophyta à longa história evolutiva do grupo na Terra. Mudanças drásticas na temperatura, na salinidade, na disponibilidade de íons e o surgimento de uma atmosfera oxigênica, possivelmente, estão ligados ao surgimento de mecanismos de tolerância nas cianobactérias ancestrais, os quais foram conservados pelos organismos da atualidade (Knauth, 2005).

## 2.4 – Tolerância a hidrocarbonetos

### 2.4.1 – Ocorrência de Cyanophyta em ambientes contaminados por hidrocarbonetos

Em 1991, durante a Guerra do Golfo, ocorreu o maior incidente com derramamento de petróleo da história (UNEP, 1991). Seis milhões de barris de petróleo foram derramados no Golfo Árabe, impactando severamente a faixa costeira que se estende do sul do Kuwait até a Ilha de Abu Ali, na Arábia Saudita (cerca de 770 Km) (Barth, 2003).

Apesar da poluição ter afetado a composição dos biofilmes de cianobactérias que existiam na região, estas comunidades foram as primeiras a recolonizar a área (Sorkhoh *et al.*, 1992). Meses depois do petróleo ter se depositado na faixa litorânea, as cianobactérias começaram a crescer sobre os sedimentos poluídos, colonizando até mesmo locais onde não habitavam antes do incidente (Barth, 2003).

Um grande número de trabalhos tiveram o foco voltado para as comunidades de cianobactérias da região do Golfo da Arábia Saudita expostas a HCs (Al-Hasan *et al.*, 2001; Abed & Köster, 2005; Al-Thukair *et al.*, 2007). Al-Thukair *et al.* (2007) avaliaram amostras provenientes da faixa costeira da Ilha de Abu Ali afetada pelo derramamento e identificaram vários gêneros de cianobactérias que colonizam a região. Gêneros como *Phormidium*, *Microcoleus*, *Oscillatoria*, *Scytonema*, *Lyngbya*, *Schizothrix* e *Halotheca* colonizaram esta área, estando submetidos a períodos de dessecação, a temperaturas elevadas (55 °C, no verão) e salinidades altas (de 40-60 ppt), além do petróleo residual.

Abed *et al.* (2002) relatam a dominância de Cyanophyta numa comunidade bêntica de um corpo de água poluído com HCs (principalmente, pelos constituintes do diesel) na faixa de Gaza, Palestina. *Phormidium*, *Leptolyngbya*, *Oscillatoria* e *Plectonema* foram os principais gêneros identificados na região.

Na Indonésia, numa região produtora de petróleo, um biofilme de cianobactérias constituído, predominantemente de *Phormidium animale* recobriu parcialmente o delta de um rio e o solo adjacente, ambos com altos níveis de contaminação (Chaillan *et al.*, 2006).

#### 2.4.2 - Atuação das Cyanophyta na degradação de hidrocarbonetos

Embora as cianobactérias sejam encontradas numa grande quantidade de ambientes poluídos com petróleo e seus derivados, existem poucos estudos conclusivos sobre o papel direto destes microrganismos na biodegradação de HCs. A dificuldade de obtenção de culturas comprovadamente axênicas é um dos desafios encontrados pelos pesquisadores, já que um grande número de bactérias crescem aderidas à bainha mucilagínosa das cianofíceas. Além disso, o número de repicagens sucessivas necessárias para se conseguir um inóculo axênico, prolonga o tempo de manutenção do isolado em condições de laboratório, podendo causar atenuação de certas características apresentadas pelo tipo selvagem (Van Hamme *et al.*, 2003).

A capacidade de oxidação de hidrocarbonetos já foi demonstrada em algumas espécies de cianobactérias. *Agmenellum quadruplicatum* é capaz de oxidar naftaleno e fenantreno (Cerniglia *et al.*, 1979; Narro *et al.*, 1992 b); *Oscillatoria* sp. JCM é capaz de oxidar naftaleno e bifenil (Cerniglia *et al.*, 1980 ab).

Apesar de alguns autores atribuírem às cianobactérias que compõem os biofilmes uma participação direta na degradação de HCs (Abed *et al.*, 2002; Grötzschel *et al.*, 2002), outros autores, somente atribuem a elas um papel indireto, seja imobilizando as bactérias heterotróficas (por adesão à bainha mucilagínosa), impedindo-as de serem lavadas e promovendo um contato prolongado das mesmas com o HC, ou por fornecerem a elas oxigênio, nitrogênio e nutrientes, como aminoácidos e vitaminas (Abed & Köster, 2005; Sánchez *et al.*, 2006; Chaillan *et al.*, 2006).

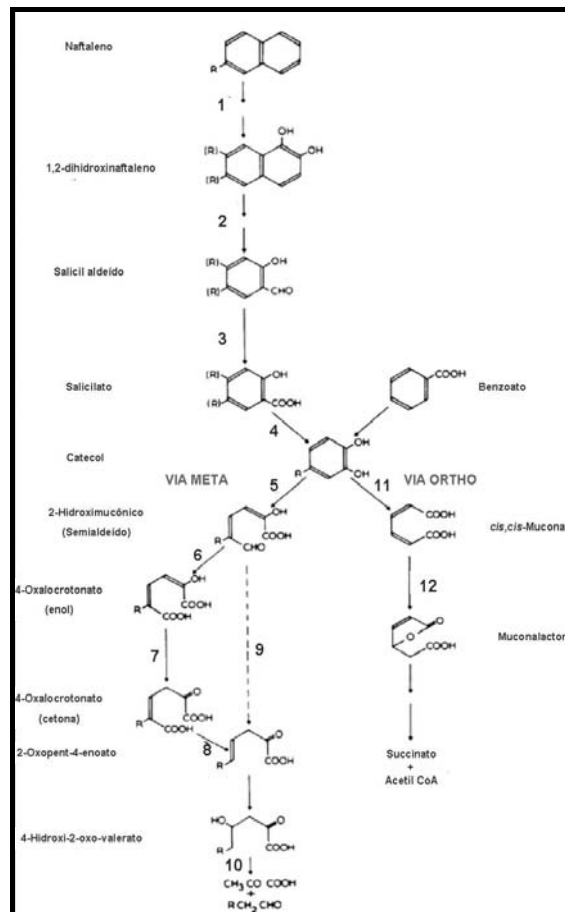
Independentemente da natureza (direta ou indireta) da contribuição das cianobactérias na degradação de HCs, é importante lembrar que estas possuem um papel chave na estrutura do biofilme, e que, este tipo de consórcio microbiano pode aumentar a tolerância de seus componentes a uma grande variedade de fatores de estresse (Grötzschel *et al.*, 2002). Al-Awadhi *et al.* (2003) demonstraram que para o estabelecimento artificial de biofilmes em placas de vidro, as cianobactérias são fundamentais, atuando como colonizadoras primárias, aderindo-se eficientemente à superfície sólida artificial, e permitindo o subsequente estabelecimento das bactérias biodegradadoras. Sofonova *et al.* (1999) demonstraram que a associação entre isolados axênicos de cianobactérias e bactérias alcanotróficas aumenta o número de gêneros de cianobactérias resistentes a concentrações de até 1% de HCs em meio de cultura. Os autores ainda demonstraram que consórcio entre isolados de cianobactérias e bactérias

alcanotróficas foi mais eficiente na degradação do petróleo que culturas puras das bactérias alcanotróficas.

## 2.5 – Metabolismo aeróbico de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs)

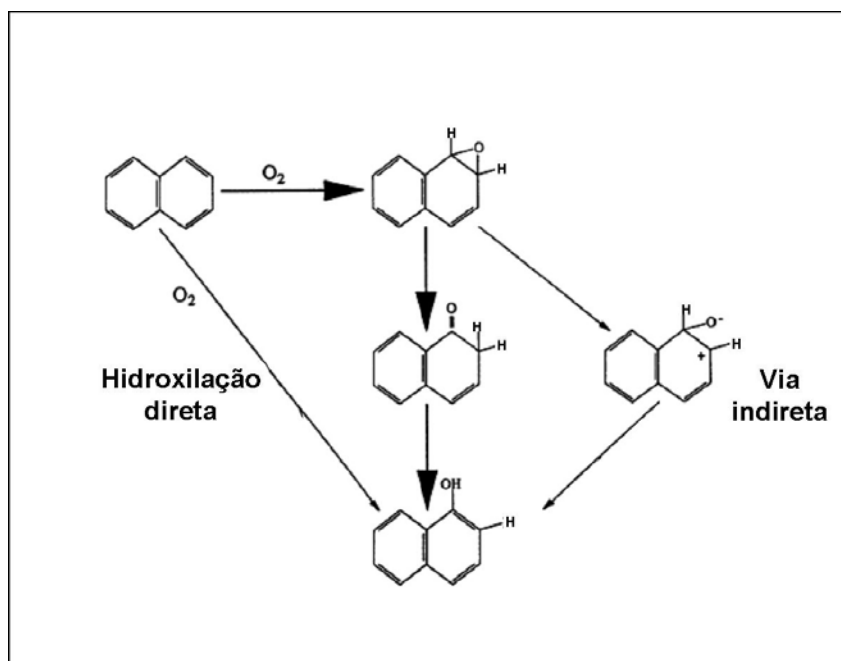
A baixa solubilidade em água e a alta adsorção dos HAPs, geralmente influenciam muito a sua biodegradação, mas a produção de metabólitos tóxicos e de metabólitos com taxas quase nulas de degradação, a repressão metabólica, a disponibilidade de substratos preferenciais são fatores que também devem ser considerados quando se fala da persistência destes compostos (Juhasz *et al.*, 2002).

A degradação bacteriana normalmente inclui a formação de um diol, seguida da clivagem do anel, e da formação de um diácido como o ácido mucônico (Figura 2) (Ensley & Gibson, 1983). Em contraste, a oxidação de compostos aromáticos em eucariotos leva a formação de um *trans*-diol (Cerniglia & Gibson, 1977).



**Figura 2:** Esquema das duas vias metabólicas principais do naftaleno em *Pseudomonas* sp. P<sub>G</sub>. Para o naftaleno R = H (Williams *et al.*, 1975).

Narro *et al.* (1980 a) demonstraram a capacidade da cianobactéria *Oscillatoria* sp. JCM em oxidar o naftaleno a 1-naftol, primariamente pela oxidação do naftaleno a naftaleno 1,2-óxido, que sofre uma isomerização, por um mecanismo chamado substituição NIH, formando um ceto intermediário, que através de uma enolização forma o 1-naftol (via indireta), à semelhança de outros microrganismos como *Bacillus cereus* (Cerniglia *et al.*, 1984). Os autores não descartam a possibilidade de ocorrência de hidroxilação direta em taxas menores (Figura 3).



**Figura 3:** Mecanismos postulados para a formação de 1-naftol a partir do naftaleno pela cianobactéria marinha *Oscillatoria* sp. JCM (Narro *et al.*, 1992 b).

Até recentemente, a maior parte do que se conhecia sobre a regulação gênica do processo de degradação de HAPs era referente aos estudos de plasmídios que catabolizam o naftaleno, como NAH7 (em *Pseudomonas putida* G7) e pDTG1 (em *P. putida* NCIB9816-4). Nestes sistemas já bem caracterizados, um primeiro operon (*nahAaAbAcAdBFCEd*) codifica a via de conversão do naftaleno em salicilato (via *ortho*), um segundo operon (*nahGTHINLOMKJ*) codifica a conversão de salicilato via *meta*-clivagem do catecol em piruvato e acetil coenzima A (via *meta*). O regulador de ambos operons é codificado por um terceiro operon contendo *nahR*, que é induzido por salicilato (Simon *et al.*, 1993). Em *P. putida*, o oxigênio molecular é introduzido no núcleo aromático por um complexo multienzimático chamado naftaleno dioxigenase

(Ensley & Gibson, 1983). Hoje, sabe-se que este complexo é muito versátil e é capaz de catalisar uma grande diversidade de reações (Van Hamme *et al.*, 2003).

Com respeito ao metabolismo de HAPs, novas seqüências gênicas têm sido identificadas em uma grande variedade de isolados, que incluem *Burkholderia* sp. RP007, *phnFECDACAdB* (Laurie & Lloyd-Jones, 1999); *Pseudomonas* sp. U2, *nagAaGHAbAcAdBF* (Fuenmayor *et al.*, 1998); *Rhodococcus* sp. I24, *nidABCD* (Treadway *et al.*, 1999); *Mycobacterium* sp. PYR1, *nidDBA* (Khan *et al.*, 2001); e *Palaromonas naphthalenivorans* CJ2, *nagRAaGHAbAcAdBFCQEDJ* (Jeon *et al.*, 2006).

Recentemente, o mapeamento genético de certas cianobactérias tem demonstrado a presença de genes que atuam na oxidação de HCs: *Synechocystis* sp. PCC 6803 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) possui uma dioxigenase em seu genoma (Abed *et al.*, 2002). Esta oxigenase que catalisa a adição de dois átomos de uma molécula de oxigênio a um composto aromático, gerando dihidrodióis, é a mesma utilizada por microrganismos (como os pseudomonados) na etapa inicial de degradação de hidrocarbonetos aromáticos (Ensley & Gibson, 1983).

## **2.6 – Fatores ambientais que influenciam a degradação de hidrocarbonetos**

### **2.6.1 – Concentração e estado físico do poluente**

Em pequenas concentrações, os hidrocarbonetos são solúveis em água, mas na maioria dos incidentes de derramamento de petróleo, estes poluentes são liberados em concentrações muito acima do limite de solubilidade (Atlas, 1981).

O petróleo em sistemas aquáticos, tende a formar emulsões. Nestas emulsões a proporção de petróleo em relação à água determina a área superficial de HCs disponível para o ataque microbiano, em geral, quanto maior a proporção de petróleo, menor a susceptibilidade à degradação (Davis & Gibbs, 1975).

A formação de emulsões por intermédio de produtos microbianos e a liberação de biosurfactantes são processos importantes para a disponibilização de HCs para a utilização microbiana (Leahy & Colwell, 1990).

As taxas de utilização e mineralização de muitos compostos orgânicos em ambientes aquáticos são proporcionais às concentrações do poluente, como é o caso do tolueno, que possui solubilidade relativamente alta em água. Contudo, é importante ressaltar que para HCs menos solúveis, como os hidrocarbonetos aromáticos com mais

de dois anéis aromáticos, como o naftaleno e fenantreno, as taxas de mineralização devem ser relativas à fração solubilizada e não às concentrações totais do poluente (Thomas *et al.*, 1986).

### **2.6.2 – Temperatura**

A temperatura afeta a biodegradação de HCs pelo seu efeito sobre a natureza física e composição química do petróleo e derivados, afetando a taxa metabólica e a composição da comunidade microbiana (Leahy & Colwell, 1990).

A biodisponibilidade e solubilidade dos HCs menos solúveis, como os alifáticos e HAPs, é dependente de temperatura. A elevação da temperatura leva à diminuição da viscosidade, afetando o grau de distribuição e aumentando as taxas de difusão de compostos orgânicos; por outro lado, a diminuição da temperatura provoca um efeito contrário. Além disso, o aumento da temperatura eleva a ocorrência de reações devido ao aumento da fluidez das membranas celulares. O aumento (decréscimo) da volatilização e da solubilidade de alguns HCs em temperaturas elevadas (baixas) afeta a toxicidade e permite as biotransformações com altas (baixas) concentrações de substratos (Margesin & Schinner, 2001).

A biodegradação de HCs tem sido relatada em uma grande variedade de ambientes com baixas temperaturas, incluindo ambientes aquáticos e terrestres de regiões Árticas e Antárticas (Coulon *et al.*, 2007; Eriksson *et al.*, 2003; Delille *et al.*, 1998; Coulon *et al.*, 2005; Ruberto *et al.*, 2005), além de solos alpinos (Margesin, 2000). Em contraste, após a Guerra do Golfo, surgiram vários relatos de microrganismos que habitam as regiões desérticas poluídas na região do Golfo Árabe, capazes de degradar HCs, onde a temperatura pode exceder a 50°C (Sorkhoh *et al.*, 1993).

### **2.6.3 – Oxigênio**

As etapas iniciais do catabolismo de alcanos, HCs cíclicos e HAPs por microrganismos envolvem a oxidação do substrato por oxigenases, o que requer a presença de oxigênio molecular (Atlas, 1981).

Condições limitantes de oxigênio, normalmente, não ocorrem na região mais superficial da coluna de água de ambientes marinhos e de água doce. Contudo, sedimentos aquáticos apresentam condições de anoxia, com exceção de uma pequena camada na porção superficial dos sedimentos (Leahy & Colwell, 1990).

A disponibilidade de oxigênio em solos é dependente das taxas microbianas de consumo, do tipo de solo e das condições de drenagem, além da presença de compostos utilizáveis por microrganismos que poderiam levar à depleção do O<sub>2</sub> (Kaspar & Tiedje, 1994). A concentração de oxigênio tem sido considerada um fator limitante para degradação de petróleo no solo e de gasolina no lençol freático (von Wedel *et al.*, 1988; Jamison *et al.*, 1975).

A partir do fim da década de 80, um grande número de microrganismos capazes de utilizar HCs saturados e aromáticos, estritamente em condições anaeróbicas, têm sido identificados. Nestes organismos, uma das enzimas chave identificadas no processo de degradação de HCs é a benzilsuccinato sintase, que catalisa a adição de uma molécula de fumarato a uma molécula de benzeno, formando benzilsuccinato. Em seguida, uma série de  $\beta$ -oxidações modificadas transformam o benzilsuccinato em benzil-CoA, que é o intermediário central na via de degradação anaeróbica de HCs. A benzilsuccinato sintase também catalisa a adição de uma molécula de fumarato ao tolueno e pode ainda estar envolvida no metabolismo de xilenos, alquilnaftalenos, *n*-hexadecanos e *n*-dodecanos (Widdel & Rabus, 2001; Van Hamme *et al.*, 2003).

#### **2.6.4 – Nutrientes**

A liberação de HCs no ambiente, geralmente leva a um aumento da razão carbono/nitrogênio e/ou carbono/fósforo, fator desfavorável ao crescimento microbiano. O ajuste da razão carbono/nitrogênio/fósforo pela adição de nitrogênio e fósforo na forma de fertilizantes oleofílicos, incluindo a uréia parafinada, octil fosfato, octoato férrico, além de fórmulas comerciais como Inipol EAP 22<sup>®</sup> estimulam a degradação de petróleo e HCs individuais em ambientes aquáticos e terrestres (Leahy & Colwell, 1990; Coulon *et al.*, 2005).

#### **2.6.5 – Salinidade**

Um grande número de poluentes orgânicos pode ser mineralizado ou transformado por microrganismos que crescem na presença de sal (Margesin & Schinner, 2001). Existe uma relação inversamente proporcional entre a concentração de sais e a solubilidade de HAPs (Whitehouse, 1984).

Foi observado que o efeito inibitório da salinidade sob concentrações acima de 2.4% (p/v) de NaCl, é maior sobre a degradação das frações aromáticas e polares do que sobre a fração saturada do petróleo (Mille *et al.*, 1991). Contudo, Hinteregger &

Streichsbier (1997) demonstraram que *Halomonas* sp. é capaz de degradar completamente 0,1 g.L<sup>-1</sup> de fenol, utilizando-o como única fonte de carbono, num período de treze horas em presença de 1–14% (p/v) de NaCl.

#### **2.6.6 – Atividade de água**

A atividade de água ou potencial de água ( $a_w$ ) dos solos pode variar entre 0.0 a 0.99, em contraste a ambientes aquáticos, nos quais a atividade de água é estável, num valor próximo a 0,98. A degradação de HCs em ambientes terrestres pode ser limitada pela disponibilidade de água para o crescimento e o metabolismo microbiano (Leahy & Colwell, 1990).

#### **2.6.7 – pH**

A mineralização de HCs é favorecida em valores de pH próximos à neutralidade. Contudo, existem relatos de processos de biodegradação em aquíferos com pH de 4.5 a 5.0 e de organismos capazes de degradar HCs em solos ácidos de florestas tropicais, com pH variando de 4.0 a 6.0 (Amadi *et al.*, 1996).

### **3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 - Local de coleta das amostras**

Amostras de biofilmes bacterianos foram coletadas numa calha de escoamento de rejeitos de um posto de gasolina da cidade de Viçosa, MG. A amostragem foi feita através de raspagens das paredes da calha, com a ajuda de uma lâmina de aço, de maneira suave, para que a estrutura do biofilme mantivesse, ao máximo, as características apresentadas *in situ*. A coleta foi realizada em dois pontos da calha: o primeiro localizado em sua desembocadura, e o segundo, localizado a uma distância de aproximadamente dois metros do primeiro ponto. Após a coleta, os fragmentos dos biofilmes foram imediatamente acomodados em placas de Petri, e conduzidos para o Laboratório de Ficologia na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP) do Departamento de Biologia Vegetal (DBV), da Universidade Federal de Viçosa (UFV) para análise e enriquecimento em meio AA4 líquido (modificado por Corrêa, 2007), descrito no anexo I.

#### **3.2 – Descrição dos biofilmes**

Fragmentos do biofilme foram hidratados em meio AA4 líquido e examinados sob microscópio óptico (Axiostar plus, Zeiss, Alemanha) para a identificação e registro fotográfico das cianobactérias dominantes nas amostras do biofilme. Após esta primeira análise, foi realizado o rompimento do biofilme, a fim de se observar melhor características celulares das Cyanophyta presentes.

#### **3.3 – Condições de crescimento e isolamento de cianobactérias**

Pequenos fragmentos do biofilme foram diretamente enriquecidos em meio AA4 líquido (com e sem adição de nitrogênio combinado) e incubados sob condições fotoautotróficas, à temperatura de  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro) e de intensidade luminosa igual a  $80 \mu\text{mols.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , conforme descrito por Aguiar (2000). A cada cinco dias, parte da biomassa do biofilme foi transferida para meio de cultivo novo e as mudanças na composição do biofilme foram monitoradas. O isolamento dos gêneros de cianobactérias foi realizado através das técnicas de espalhamento e estriamento em meio sólido AA4 (suplementado com ágar a 1,2%), em pH 7,1. Também foram empregadas durante o isolamento, técnicas de diluição e micropipetagem, seguidas de repicagens sucessivas descrita por Kugrens *et al.* (2000),

em meio AA4 líquido (com e sem adição de nitrogênio combinado). As amostras enriquecidas em meio líquido foram mantidas nas condições fotoautotróficas já mencionadas e mantidas sem agitação e sob agitação constante (90 rpm) em salas de cultivo.

### **3.4 – Experimento de degradação de [C<sup>14</sup>] naftaleno**

O aparato respirométrico e o solo utilizado como substrato para a condução do experimento de degradação de [C<sup>14</sup>] naftaleno foram descrito no anexo II.

#### **3.4.1 – Reagentes químicos**

A solução metanólica de [C<sup>14</sup>] naftaleno-benzeno (uniformemente marcada), com atividade específica de 31,3 mCi.mmol<sup>-1</sup>, o coquetel de contagem em cintilação líquida (Sigma High Performance LSC Cocktail) e o hidróxido de sódio (KOH) foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA.

#### **3.4.2 – Experimento de biodegradação com biofilmes de cianobactérias**

Os experimentos de degradação foram conduzidos em erlenmeyers com capacidade para 50 mL, aos quais foram adicionados 7 g de solo autoclavado como substrato para crescimento.

Dois inóculos foram preparados, o primeiro a partir de uma cultura monoclonal de *Phormidium* sp. (isolado do biofilme de cianobactérias, que apresentou maior produção visual de biomassa), com dez dias de idade; e o segundo, a partir do biofilme de cianobactérias integral, com dez dias de idade (após o quarto ciclo de repicagem). Para a preparação do inóculo, as culturas foram concentradas através de centrifugação (12000 xg, durante dez minutos), sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi colocado sobre uma folha de papel filtro, estéril, a fim de retirar o excesso de umidade. Posteriormente, o precipitado foi transferido para um tubo de centrífuga e pesado em balança analítica. O volume do tubo de ensaio foi completado com meio AA4 líquido (suplementado com 0,15% KNO<sub>3</sub> p/v), pH 7.1, para a obtenção de um inóculo inicial com a concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup> de matéria fresca.

Foram testados três tratamentos, com três réplicas cada um. Os tratamentos consistiram em um controle abiótico (1) e dois tratamentos bióticos (2 e 3): (1) tratamento abiótico contendo o solo + 175 ηCi de [C<sup>14</sup>] naftaleno (equivalente a 0,7 μg de naftaleno) + 1mL de meio AA4 estéril; (2) tratamento monoclonal, contendo o solo +

175  $\eta\text{Ci}$  de  $[\text{C}^{14}]$  naftaleno + 1mL do inóculo proveniente da cultura de *Phormidium* sp. ( $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ); e (3) tratamento misto, contendo o solo + 175  $\eta\text{Ci}$  de  $[\text{C}^{14}]$  naftaleno + 1mL do inóculo proveniente da cultura do biofilme integral de cianobactérias ( $50 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Os frascos contendo os tratamentos foram conectados ao sistema respirométrico, anteriormente descrito, e mantidos em uma câmara de crescimento (B.O.D, Eletrolab, Brasil) por quinze dias, sob condições fotoautotróficas de crescimento, com temperatura constante ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ), fotoperíodo de 16 horas de luz para 8 horas de escuro, e intensidade luminosa de  $80 \mu\text{mols}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

### 3.4.3 – Coleta e análise de amostras contendo $^{14}\text{CO}_2$

Diariamente, coletas de amostras líquidas dos sistemas de captura de  $^{14}\text{CO}_2$  foram realizadas. A cada ponto de amostragem, 1mL da solução contida no sistema de captura de  $^{14}\text{CO}_2$  de cada tratamento (cada sistema possuía 14 mL ao todo), previamente homogeneizada através de fluxos contínuos com micropipeta, era recolhida e acomodada em um *vial* de contagem do contador de cintilação líquida, que era hermeticamente fechado. O volume do sistema de captura de  $^{14}\text{CO}_2$  era completado para 14 mL (com solução de KOH 0,5 M) e novamente ligado à sua respectiva amostra de solo no sistema respirométrico. A cada 48 horas a solução de cada sistema de captura de  $^{14}\text{CO}_2$  era totalmente renovada (14 mL de KOH 0,5 M) e a cada 120 horas, o sistema de armadilhamento de  $\text{CO}_2$  era renovado (1L de NaOH 4 M).

No primeiro dia de experimento, foram realizadas duas coletadas de amostras, num intervalo de 05 horas e 20 minutos, e uma terceira coleta 12 horas depois (destas, 08 horas correspondem ao período de ausência de luz na câmara de crescimento). No decorrer dos quinze dias de experimento, os intervalos foram sendo aumentados progressivamente para 08, 12 e 24 horas, conforme a intensidade de degradação observada.

Para a contagem das amostras radioativas, a cada ponto de amostragem (1mL da solução de KOH 0,5 M coletada de cada sistema de captura de  $^{14}\text{CO}_2$ ) foram adicionados 5 mL do coquetel de cintilação líquida (Sigma High Performance LSC Cocktail). A contagem foi realizada em um contador de cintilação líquida (LS 6800, Beckman, EUA). Os resultados foram corrigidos para a eficiência de contagem (97,5%) e *background* do aparelho.

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 – Descrição dos biofilmes

A análise de fragmentos dos biofilmes, sob microscópio óptico, revelou a dominância de cianofíceas da ordem Oscillatoriales, porém, foram observadas diferenças estruturais nas comunidades microbianas que compõem os biofilmes. Na região mais próxima à calha de escoamento da qual os mesmos foram coletados, o biofilme apresentava-se como uma lâmina espessa (aproximadamente 3 mm) que podia ser facilmente removida, sem grandes alterações em sua estrutura. Neste biofilme, a biomassa predominante era constituída pelo gênero *Oscillatoria* sp., seguida por *Phormidium* sp., outros gêneros de Cyanophyta tais como *Geitlerinema* sp. e *Pseudoanabaena* sp.. Membros de Chlorophyta, da ordem Chlorococcales, também foram encontrados em número menor. O outro tipo de biofilme coletado, localizado a aproximadamente dois metros da calha de escoamento, possuía uma aparência ressecada e crostosa, fragmentando-se por inteiro no momento da coleta. A análise dos fragmentos, ao microscópio óptico, revelou a dominância do gênero *Phormidium* sp. e de outras clorofíceas cocóides. O primeiro tipo de biofilme foi selecionado para enriquecimento, em função da maior diversidade de cianofíceas. A Tabela 1 apresenta os gêneros identificados e suas respectivas características celulares.

**Tabela 1:** Gêneros de Cyanophyta identificados nos biofilmes e suas respectivas características celulares.

Gênero	Morfologia e Diâmetro ( $\mu\text{m}$ )	Presença de Caliptra	Constricção nas paredes transversas	Aparência do Biofilme
<i>Oscillatoria</i> sp.	Filamentosa, 4-6 $\mu\text{m}$	presente	indistinta	Laminar
<i>Phormidium</i> sp.	Filamentosa, 2,7-3,2 $\mu\text{m}$	ausente	indistinta	laminar crostoso
<i>Geitlerinema</i> sp.	Filamentosa, 0,8-1,0 $\mu\text{m}$	ausente	indistinta	Laminar
<i>Pseudoanabaena</i> sp.	Filamentosa, 0,7-0,9 $\mu\text{m}$	ausente	distinta	Laminar

## 4.2 – Seleção de cianobactérias

O meio AA4 líquido suplementado com nitrogênio (nitrato) se mostrou adequado ao cultivo do biofilme e das cianobactérias separadamente.

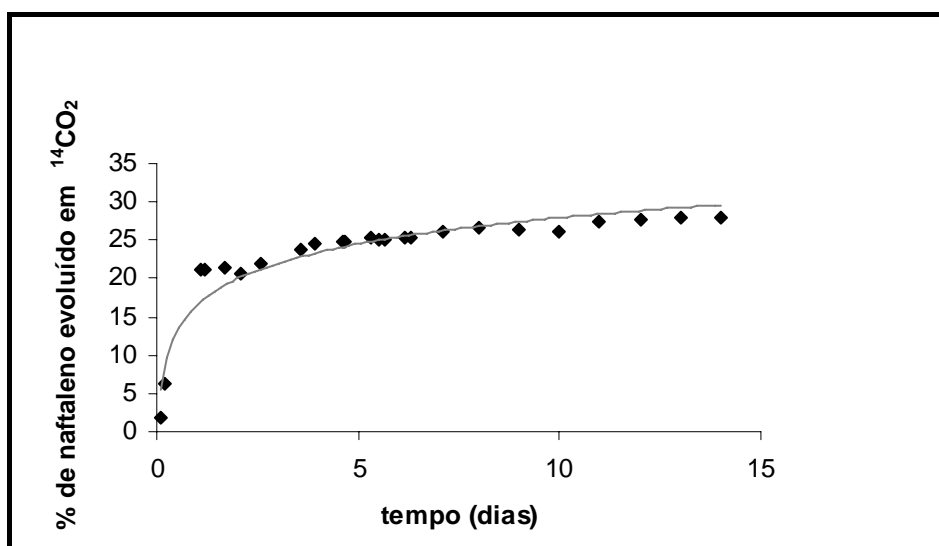
Após quatro ciclos de repicagem do biofilme sob agitação constante (90 rpm), foi obtida biomassa de cianobactérias para a realização do experimento de degradação do naftaleno, porém o processo de enriquecimento resultou na alteração da composição do biofilme nas condições de laboratório. Observou-se que o gênero *Phormidium* sp. tornou-se dominante no biofilme enriquecido, enquanto *Oscillatoria* sp. foi suprimida.

*Phormidium* sp. foi selecionado para ser utilizado no experimento de biodegradação do [C<sup>14</sup>] naftaleno em culturas monoclonais, devido a uma produção visualmente superior de biomassa em relação aos outros gêneros cultivados e também devido ao fato de que os filamentos dos gêneros *Geitlerinema* sp. e *Pseudoanabaena* sp. formam emaranhados, e possuem bainha mucilaginosa espessa, dificultando o processo de isolamento.

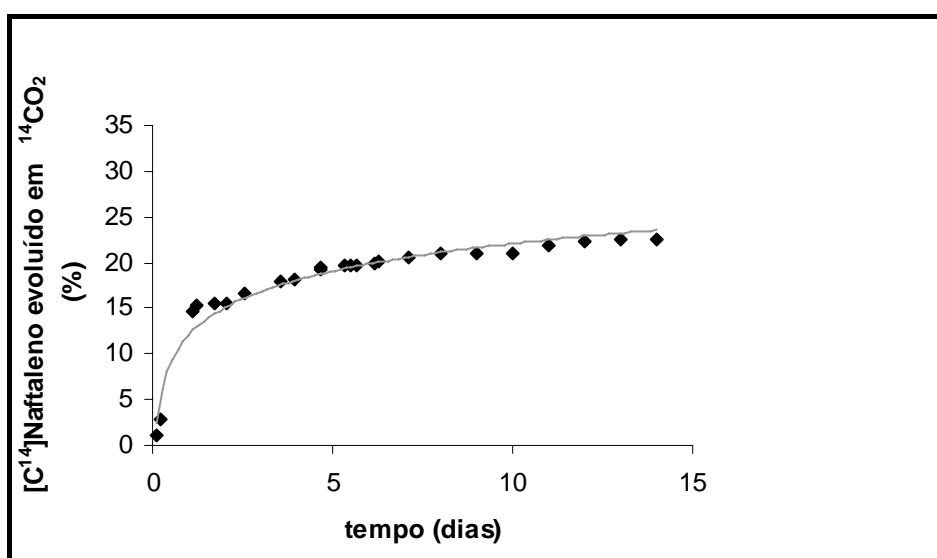
## 4.3 – Experimento de degradação de [C<sup>14</sup>] naftaleno

O naftaleno foi prontamente degradado a CO<sub>2</sub> pelos microrganismos presentes nos dois tratamentos bióticos, sem uma fase de adaptação bem distinta (Figuras 5 e 6). Em quinze dias, cerca de 28% do naftaleno adicionado, inicialmente, foi mineralizado pelo tratamento misto (Figura 5) e cerca de 22,5% foi mineralizado pelo tratamento monoclonal (Figura 6). É interessante ressaltar que em ambos os tratamentos, o platô de mineralização foi atingido em torno do quarto dia de tratamento, com 19-25% do naftaleno sendo degradado. Cerca de 0,60% do naftaleno foi perdido abioticamente, devido à volatilização deste HAP (Figura 7).

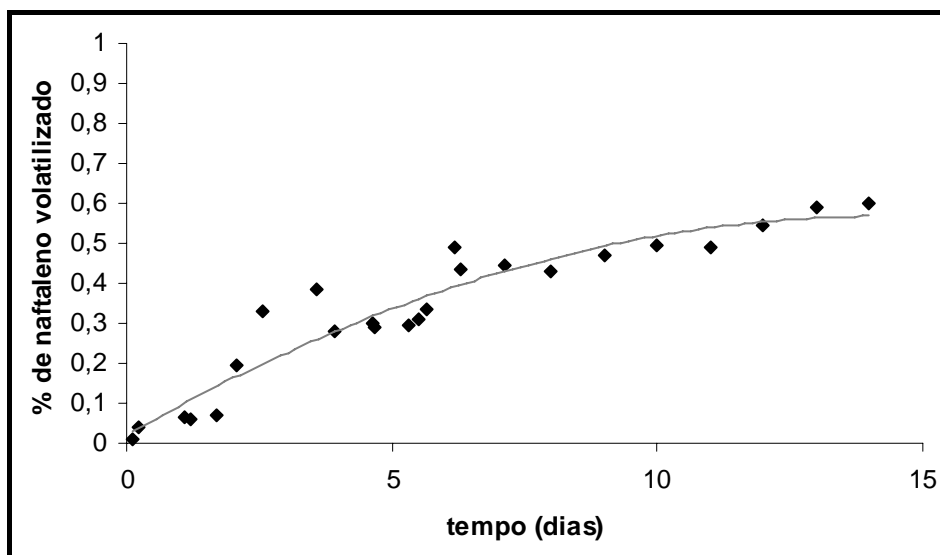
As análises de regressão linear e não linear foram utilizadas para a modelagem da degradação do naftaleno pelos tratamentos realizados. Os maiores coeficientes de correlação foram obtidos em modelos de cinética não linear ( $r^2$  de 0,78 a 0,99).



**Figura 5:** Mineralização de [C<sup>14</sup>] naftaleno, em porcentagem (%), por um biofilme de cianobactérias (cultura mista) em função do tempo (em dias). Os pontos representam a média de três repetições, descontadas as médias do controle abiótico.



**Figura 6:** Mineralização de [C<sup>14</sup>] naftaleno, em porcentagem (%), por uma cultura monoclonal de *Phormodium* sp. em função do tempo (dias). Os pontos representam a média de três repetições, descontadas as médias do controle abiótico.



**Figura 7:** Tendência de perda de naftaleno por volatilização exibida pelo controle abiótico. Os pontos representam a média de três repetições.

A ANOVA (fatorial) revelou um efeito altamente distinto do inóculo sobre a taxa de mineralização do naftaleno ( $p \leq 0,0001$ ), sendo as médias dos três tratamentos consideradas diferentes pelo teste de Tukey (Tabela 2). A mineralização do naftaleno foi significativamente maior para o tratamento misto que para o tratamento monoclonal de *Phormidium* sp..

**Tabela 2:** Teste de médias para a eficiência de degradação do  $[C^{14}]$  naftaleno, em desintegrações por minuto (dpm), nos diferentes tratamentos (a 5% de significância).

Tratamento	Média (dpm)	Comparação (5% signif.)
Misto	90175,49	A
<i>Phormidium</i> sp. (monoclonal)	69743,54	B
Controle abiótico	1242,44	C

Nota: Letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas entre as médias. A letra “A” é atribuída ao tratamento que apresenta maiores médias.

## 5 – DISCUSSÃO

### 5.1 – Seleção de Cianobactérias

Apesar do meio AA4 ter se mostrado adequado para o isolamento das cianobactérias componentes do biofilme selecionado, não foi possível a obtenção de culturas monoclonais dos gêneros *Geitlerinema* sp., *Pseudoanabaena* sp. e *Oscillatoria* sp.. No caso dos dois primeiros gêneros, houve uma limitação física, já que ambos apresentam bainha mucilaginosa espessa e formam um emaranhado de filamentos que dificulta o isolamento dos indivíduos. Já para *Oscillatoria* sp. houve dificuldade em seu isolamento logo após o enriquecimento do biofilme, pois o gênero tende a ser suprimido em cultura, já que as várias espécies presentes no biofilme apresentam taxas de crescimento intrínsecas e de adaptação às condições de laboratório diferentes, e tendem a competir pelos recursos contidos no meio de cultura. A impossibilidade de se isolar todos os componentes do biofilme ou de manter a estrutura da comunidade, sob condições de laboratório, é a maior limitação das técnicas dependentes de cultura na investigação de organismos indígenas capazes de degradar hidrocarbonetos (Van Hamme *et al.*, 2003).

### 5.2 - Biodegradação de [C<sup>14</sup>] naftaleno

O biofilme presente na calha de escoamento de um posto de gasolina, na região de Viçosa (MG), possui um forte potencial para degradação de hidrocarbonetos aromáticos, como o naftaleno. Isto corrobora com resultados de outros estudos que indicam que a exposição crônica a HCs resulta na adaptação das comunidades microbianas à utilização destes poluentes como fonte de carbono para o crescimento (Spain *et al.*, 1980; Spain & van Veld, 1983; Heitkamp *et al.*, 1987).

Os tratamentos monoclonal e misto não apresentaram uma fase de adaptação notável à exposição ao naftaleno, degradando-o prontamente. Cinco horas e vinte minutos após a exposição ao naftaleno, ambos os tratamentos já exibiam valores de mineralização do naftaleno, estatisticamente superiores aos valores obtidos para o controle abiótico. Dados semelhantes são relatados por Narro *et al.* (1992) que demonstraram que culturas puras de *Anagmenellum quadruplicatum* PR6 são capazes de metabolizar 2,2 % do [C<sup>14</sup>] fenantreno (hidrocarboneto aromático tricíclico), adicionado ao meio líquido, sob condições fotoautotróficas e à temperatura de 30°C, no período de 12 horas. Neste trabalho, utilizando-se o mesmo período de tempo, o

tratamento misto testado, mostrou-se capaz de degradar 13% do naftaleno (um hidrocarboneto aromático dicíclico) enquanto que o tratamento monoclonal de *Phormidium* sp. mineralizou 9% do naftaleno, ambos submetidos a temperatura de  $20\pm 1^\circ\text{C}$ . Contudo, podemos atribuir esta diferença nas taxas de degradação ao fato de que, quanto maior o número de anéis aromáticos apresentados pelo HAP, menos susceptíveis estarão ao ataque microbiano (Atlas, 1981).

As porcentagens de naftaleno mineralizado neste experimento, que corresponderam a 28% para o tratamento misto e 22,5% para o tratamento monoclonal, num período de duas semanas, estiveram um pouco abaixo de valores citados na literatura. Heitkamp *et al.* (1987) relataram que a meia vida de degradação do  $[\text{C}^{14}]$  naftaleno (tempo necessário para a mineralização de 50% do HAP adicionado) por amostras de sedimentos contendo bactérias heterotróficas foi de 4,4 semanas. Os autores observaram uma meia vida de degradação menor (2,4 semanas) para amostras provenientes de áreas com históricos de contaminação muito elevados. Wyndham & Costerton (1981) obtiveram uma taxa média de degradação de  $[\text{C}^{14}]$  naftaleno igual a  $77\pm 7\%$ , em oito semanas, para bactérias provenientes de sedimentos de uma região adjacente a um depósito natural de petróleo.

É importante ressaltar que os experimentos conduzidos no Laboratório de Ficologia do DBV/UFV foram realizados em uma temperatura amena ( $20\pm 1^\circ\text{C}$ ), considerada inferior à temperatura ótima de crescimento da maioria das cianobactérias tropicais. Existem várias revisões disponíveis na literatura, que demonstram que o aumento da temperatura leva a um incremento das taxas de degradação de HCs, tipicamente em faixas de temperatura de 30 a  $40^\circ\text{C}$ , acima das quais, a toxicidade aumenta em função da alteração na permeabilidade da membrana citoplasmática (Atlas, 1981; Leahy & Colwell, 1990). Possivelmente, um aumento da temperatura de trabalho poderia resultar num incremento das taxas de degradação do naftaleno obtidas, seja pelo aumento do metabolismo microbiano ou por alterações na natureza física do HAP, que resultariam numa maior disponibilidade do mesmo para o consumo microbiano.

Paradoxalmente, a porcentagem de naftaleno perdida por volatilização em nossos controles abióticos (0,6 %) está muito abaixo dos valores apresentados em experimentos similares. Heitkamp *et al.* (1987) relataram uma perda de 12 a 15% do naftaleno adicionado aos tratamentos por volatilização, durante as duas primeiras semanas de incubação. Este fato nos leva a cogitar a hipótese de que os dados obtidos

foram subestimados, em decorrência de perdas de  $^{14}\text{CO}_2$  para o ambiente, dado o caráter rústico do aparato respirométrico, utilizado na condução dos experimentos.

Em ambos os tratamentos bióticos testados, o platô de degradação cumulativa do naftaleno foi atingido em torno do quarto dia de experimento, com a degradação de 25% do naftaleno para o tratamento misto, e 19% para o tratamento monoclonal. Porém, o controle abiótico não apresentou a mesma tendência, exibindo contagens progressivamente maiores até atingir uma contagem correspondente a 0,6% do naftaleno adicionado às amostras. Tanto Heitkamp *et al.* (1987), quanto Wyndham & Costerton (1981) obtiveram um platô de degradação, somente, por volta da oitava semana de exposição das amostras ao naftaleno. Novamente, cogita-se a hipótese de que houve uma subestimação dos dados obtidos neste trabalho, em função de perdas de  $^{14}\text{CO}_2$  para o ambiente. Neste caso, possivelmente, o platô cumulativo de naftaleno mineralizado, observado nos experimentos, foi atingido por depleção de naftaleno (evoluído, volatilizado, incorporado à biomassa ou adsorvido ao solo).

Outras hipóteses podem ser levantadas para explicar o alcance prematuro do platô de degradação: (1) Depleção de nutrientes. Visto que o solo não foi corrigido para o experimento, as únicas fontes de nutrientes adicionadas, além do naftaleno, são aquelas contidas no meio AA4 usado para ressuspender o inóculo de cianobactérias (1 mL). Neste caso, provavelmente, o nitrogênio é o nutriente limitante, já que o solo utilizado para o experimento apresenta altos teores de fósforo. Existe na literatura grande número de trabalhos relacionando a bioestimulação, aplicação de nutrientes e fertilizantes oleofílicos, ao aumento das taxas de biodegradação de HCs (Coulon *et al.*, 2006; Gallego *et al.*, 2006). (2) Formação de compostos tóxicos, que inibem o metabolismo microbiano. (3) Formação de intermediários que não podem ser degradados (*dead end metabolites*) pelos microrganismos e que tendem a ser adsorvidos ao solo.

No experimento de degradação realizado neste trabalho, o tratamento misto apresentou melhores taxas de degradação do naftaleno que o tratamento monoclonal, cerca de 20% maior. Isto sugere que, apesar da dominância de *Phormidium* sp., outros organismos que não estão associados a ele podem ter uma participação importante na degradação de naftaleno, ou que os microambientes condicionados pelo biofilme constituam um ambiente mais favorável à biodegradação. Para Grötzschel *et al.*, 2002, a formação de biofilmes possibilita que vários organismos adaptados a condições de crescimento diferenciadas estejam em proximidade (*e.g.*, regiões saturadas de  $\text{O}_2$  em

proximidade com regiões anóxicas), de maneira que poderiam atuar em sinergia na degradação de compostos derivados do petróleo.

Embora os tratamentos bióticos tenham se mostrado capazes de degradar o naftaleno, o fato de que não tenham sido testados isolados axênicos de cianobactérias neste trabalho, não nos permite afirmar ao certo, se as cianobactérias presentes nos biofilmes investigados, possuem um papel direto na degradação de HCs. Porém, alguns trabalhos têm indicado que organismos fotossintéticos, particularmente cianobactérias, podem atuar diretamente na degradação de compostos aromáticos (Cerniglia *et al.*, 1980; Narro *et al.*, 1992 ab; Kuritz & Wolk, 1995; Safonova *et al.*, 1999).

Os resultados deste trabalho endossam o reconhecimento de que biofilmes de cianobactérias estão relacionados a processos de biodegradação e atenuação das concentrações de naftaleno, em condições experimentais. As cianobactérias parecem ter participação crucial para a efetividade do processo de degradação, seja de forma direta, oxidando/consumindo os HCs, ou indireta, impedindo que bactérias heterotróficas aderidas à bainha mucilaginosa sejam dispersas, mantendo-as imobilizadas e colocando-as em contato prolongado com os HCs. Além disso, as cianobactérias suprem tais bactérias com nutrientes, nitrogênio e oxigênio, necessários para a atividade de degradação (Abed *et al.*, 2002; Grötzschel *et al.*, 2002; Al-Awadhi *et al.*, 2002; Al-Awadhi *et al.*, 2003; Abed & Köster, 2005; Chaillan *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006).

Independentemente de uma participação direta das cianobactérias na degradação de HCs, tanto o tratamento monoclonal quanto o misto devem ser considerados como reatores biológicos, capazes de degradar o naftaleno. Estudos complementares envolvendo as cianobactérias tropicais precisam ser implementados para que se possa esclarecer o grau de envolvimento das mesmas como componentes do biofilme e agentes de biodegradação de naftaleno. A identificação e seleção de microrganismos com potencial para atuar nos processos de HCs torna-se recomendável para o desenvolvimento de estratégias que otimizem a biorremediação *in situ*.

## CAPÍTULO II

### **Potencial de *Phormidium* sp. ANT 01 (Cyanophyta), Isolado de Solos da Antártica, na Bioindicação de Áreas Contaminadas por Naftaleno**

#### **1 – INTRODUÇÃO**

A atividade científica, logística e o turismo na Antártica dependem, em grande parte, do petróleo para a geração de energia e transporte. Estima-se que aproximadamente 90 milhões de litros de combustível são gastos anualmente por estações de pesquisa na Antártica (Cripps & Shears, 1997).

Apesar da atividade antropogênica não ter introduzido os hidrocarbonetos (HCs) como uma nova classe de compostos no ambiente, esta elevou o seu acúmulo na biosfera, o que pode ser extremamente deletério para o ambiente no caso de um derramamento (Widdel & Rabus, 2001).

Os solos próximos às estações de pesquisa da Antártica estão sujeitos à contaminação pelos hidrocarbonetos, já que óleo diesel e outros derivados do petróleo são intensamente utilizados como combustíveis nestas áreas, aumentando o risco de derramamentos durante seu processo de transporte, armazenamento e manipulação (Ruberto *et al.*, 2005). O número de relatos de áreas próximas as estações antárticas contaminadas com hidrocarbonetos vem aumentando nos últimos anos (Gore *et al.*, 1999; Mazzera *et al.*, 1999).

Áreas impactadas por hidrocarbonetos sofrem alterações, geralmente, drásticas na composição das comunidades de organismos que as colonizam. Os HCs podem servir como substrato de crescimento para alguns organismos vivos, bem como podem ser tóxicos para outros (Gerdes, *et al.*, 2005).

Regiões com histórico de contaminação com petróleo, como a região do Golfo da Arábia, gravemente impactada por incidentes ocorridos durante a Guerra do Golfo (1991), apresentam comunidades microbianas extremamente modificadas, nas quais hoje em dia, dominam espécies tolerantes ou consumidoras de HCs, enquanto que, espécies sensíveis (outrora dominantes) foram extintas (Barth, 2003).

Em função da fragilidade dos ecossistemas antárticos, existe grande preocupação com o impacto causado pela presença do homem, e estudos se concentram nas

proximidades das estações de pesquisa da região (Martins *et al.*, 2000; Saul, *et al.*, 2005). Trabalhos recentes têm demonstrado alterações na composição bacteriana de ambientes aquáticos e terrestres da Antártica em função da contaminação por HCs (Yakimov *et al.*, 2004; Saul, *et al.*, 2005).

Apesar de HAPs, como o naftaleno, terem sido enquadrados na lista prioritária de poluentes orgânicos, devido a sua natureza altamente tóxica (Eljarrat & Barceló, 2003), existem poucos trabalhos que investigam organismos que possam ser utilizados como bioindicadores de ambientes impactados por estes poluentes. O grande número de trabalhos na área de biorremediação de áreas impactadas por HCs (Abed *et al.*, 2002; Grötzschel *et al.*, 2002; Al-Awadhi *et al.*, 2002; Al-Awadhi *et al.*, 2003; Abed & Köster, 2005; Chaillan *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2006), revela uma maior preocupação, por parte dos autores, em remediar áreas já impactadas, que em desenvolver programas de biomonitoramento, buscando selecionar e identificar organismos sensíveis a pequenas mudanças ambientais (*e.g.* concentração do poluente), antes que estas alterações tenham impacto sobre a comunidade como um todo.

Em várias regiões da Antártica, biofilmes compostos predominantemente por cianobactérias da ordem Oscillatoriales ocorrem em lagos, canais de degelo, tanques temporários e em vales secos (Broady & Kibblewhite, 1991; Vincent *et al.*, 1993; Nadeau & Castenholz, 2000; Casamatta *et al.*, 2005).

A Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica, apresenta ecossistemas terrestres ricos em cianobactérias, independentemente da disponibilidade de nutrientes, como por exemplo, o nitrogênio. Nesta região, as Cyanophyta representam um dos grupos de organismos que oferecem maior contribuição para a formação dos solos e a incorporação de carbono e nitrogênio nos ciclos biogeoquímicos.

Neste trabalho, investigou-se a resposta de *Phormidium* sp. ANT 01, a cianobactéria mais abundante em 16 amostras de solos provenientes da Baía do Almirantado, à exposição ao naftaleno (um hidrocarboneto aromático dicíclico), considerado um dos compostos mais acentuadamente tóxico da fração solúvel do petróleo. Os objetivos foram: 1) Obter isolados monoclonais de *Phormidium* sp., a partir de amostras de solos da Antártica; 2) Testar a capacidade de mineralização do naftaleno pelas culturas monoclonais de *Phormidium* sp.; e 3) Verificar o efeito do naftaleno sobre o crescimento de *Phormidium* sp..

## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – Ocorrência de Cyanophyta em ambientes antárticos

Desde o início do século XX, com as primeiras expedições de pesquisa na Antártica, uma espetacular abundância de cianofíceas foi observada pelos pesquisadores na região (Broady & Kibblewhite, 1991).

O Phylum Cyanophyta, geralmente, constitui o grupo fotoautotrófico de maior contribuição, em termos de biomassa e produtividade, nos ecossistemas bênticos de água doce e terrestres da Antártica. Sua dominância é atribuída tanto a uma alta tolerância ao ambiente extremo, quanto à escassez de predadores e espécies competidoras, eliminadas pelo efeito da baixa temperatura e do congelamento (Nadeau & Castenholz, 2000).

Grobbelaar (1978) observou na Ilha Marion, uma alta taxa de produtividade fitoplanctônica e de algas bênticas, principalmente em corpos de água mais eutrofizados, onde predominavam as cianofíceas. Entretanto, em ambientes mais oligotróficos foi observado o predomínio de algas verdes filamentosas.

Mataloni *et al.* (2005) aponta as cianofíceas *Chamaesiphon subglobosus* e *Leptolyngbya* sp. como dominantes em comunidades epilíticas de dois ambientes lóticos da Península Antártica.

Em Victoria Land, foi observada a formação de grandes depressões onde se desenvolve uma abundante biomassa de cianobactérias do gênero *Nostoc* sp.. Nesta região, apesar da alta disponibilidade de nitrogênio, o desenvolvimento da cobertura vegetal é limitado por uma alta salinidade (Schofield & Ahmadjian, 1970). McKnight *et al.* (1998) relatam a ocorrência de várias espécies de cianobactérias até mesmo nos vales secos de McMurdo, um dos ecossistemas mais extremos da Terra, nos quais estes microrganismos são encontrados em solos secos e solos próximos aos efêmeros lagos de degelo e lagos congelados. Friedmann e Kibler (1980) observaram uma ampla distribuição de cianobactérias endolíticas em rochas da região.

Nas regiões marginais de sete lagos de Victoria Land, observou-se que o táxon dominante é Cyanophyta (representada por *Phormidium frigidum* e *Lyngbya martensiana*), junto com vários representantes do Phylum Bacillariophyta. Neste ambiente *P. frigidum* é capaz de crescer mesmo em condições de anaerobiose (Parker & Simmons, 1985).

Na Ilha Marion, uma significativa fixação biológica de nitrogênio devida à presença de cianobactérias de vida livre e cianobactérias epifíticas associadas a 14 espécies de briófitas foi constatada, sob temperaturas que variaram entre 10 e 20 °C (Croome, 1973). Possivelmente, as cianobactérias epifíticas obtêm proteção nesta associação; sendo em alguns casos, uma associação tão íntima, que se torna possível observar filamentos dos microrganismos crescendo aderidos, externamente, à parede de protonemas dos musgos (Matsuda, 1968). Na Antártica continental, Davey (1983) identificou *Nostoc commune* como sendo o principal organismo fixador de nitrogênio presente nos solos.

Aparentemente, a ordem Oscillatoriales, de organismos filamentosos e não heterocitados, é dominante em muitas regiões da Antártica. Membros desta ordem tendem a formar extensivos agregados bênticos em lagos permanentes e temporários, canais de degelo e em solos úmidos (Broady & Kibblewhite, 1991).

## **2.2 – Principais fatores de estresse no ambiente antártico**

Organismos que habitam o ambiente antártico estão expostos a uma combinação de fatores de estresse como: baixa temperatura, pH elevado, congelamento sazonal, dessecação, salinidade alta, irradiação contínua (alta ou baixa) e longos períodos de escuridão (Vincent *et al.*, 2004; Moorhead *et al.*, 2005).

Entre as estratégias fisiológicas que garantem a tolerância de cianofíceas a tais adversidades podem ser destacadas a excreção de polissacarídeos extracelulares (EPS) que estão envolvidos numa série de funções, incluindo tolerância à dessecação, ao congelamento e à radiação ultravioleta, adesão a diferentes substratos, bem como motilidade (Phillipis & Vincenzini, 1998; Tamaru *et al.*, 2005).

### **2.2.1 – Baixas temperaturas e congelamento**

A baixa temperatura é um fator limitante para o crescimento de Cyanophyta no ambiente Antártico. Pequena parte dessas cianobactérias são psicofílicas, ou seja, geneticamente adaptadas ao crescimento sob baixas temperaturas. A maioria das cianobactérias que habitam esta região são psicotolerantes, ou seja, possuem ótimo e máximo de crescimento em torno de 15°C e 20°C, respectivamente, mas toleram temperaturas próximas a 0°C (Roos & Vincent, 1998).

A ausência de crescimento ou a baixa taxa de crescimento às temperaturas menores que 5°C, sugerem que uma das estratégias apresentadas por estes

microrganismos é acumular biomassa durante os meses quentes do verão (Tang *et al.*, 1997). Isto reforça a hipótese de que as cianobactérias antárticas se originaram e se adaptaram em ambientes mais quentes e posteriormente colonizaram ambientes frios (Vincent, 2000).

Davey (1989) demonstrou a capacidade de *Phormidium* sp. recuperar-se do congelamento, recobrando imediatamente a atividade respiratória e fotossintética após o descongelamento. A sobrevivência dessa cianobactéria durante o longo inverno garante a existência de inóculo viável para a próxima estação de crescimento.

Desta maneira, a dominância do Phylum Cyanophyta pode, primeiramente estar relacionada a um crescimento lento persistente e à sobrevivência a uma variedade de condições severas (ciclos de congelamento e descongelamento, dessecação, altas doses de UV e irradiação prolongada), do que propriamente à adaptação térmica (Tang *et al.*, 1997).

### **2.2.2 – Radiação ultravioleta (UV)**

As doses elevadas de radiação ultravioleta (UV) a que comunidades de cianobactérias que habitam altas latitudes, como nas regiões Árticas e Antárticas, estão expostas são extremamente danosas aos seres vivos, podendo causar danos ao DNA, às proteínas e ao aparato fotossintético (George *et al.*, 2001).

Dentre os mecanismos utilizados pelas cianobactérias para evitar ou atenuar os efeitos da radiação UV podemos destacar: a síntese de substâncias que absorvem a radiação UV (como sitoneminas e aminoácidos semelhantes a micosporinas) (Garcia-Pichel & Castenholz, 1993; Wright *et al.*, 2005); incremento das concentrações de carotenóides para diminuir danos causados por espécies reativas de oxigênio (Vincent & Quesada, 1994; George *et al.*, 2001); e a modulação da quantidade de exposição a UV que atinge fisicamente na comunidade, alterando a posição dos organismos na coluna de água, ou desenvolvendo-se sob outros organismos (Donkor & Häder, 1995; Quesada *et al.*, 1999).

Outras espécies de cianobactérias possuem mecanismos de reparo que lhe permitem reconstruir moléculas como enzimas e DNA, tais como: fotorreativação de DNA danificado pela radiação UV (Levine & Thiel, 1987; Van Baalen, 1968; Tang & Asato, 1978; Singh, 1975); reparo por excisão de DNA danificado (O'Brien & Houghton, 1982); e mais recentemente, têm sido relatadas evidências de que as

cianobactérias seriam capazes de síntese translesão (reparo de DNA com baixa fidelidade) (Liu & Yang, 2003).

### **2.2.3 – Salinidade**

A salinidade é um dos fatores mais limitantes para o desenvolvimento de muitos organismos na Antártica, sobretudo na Antártica marítima, onde *sprays* oceânicos promovem o aporte de sal no ambiente terrestre. Existem vários relatos de depressões, em vales secos e em ilhas da Antártica, habitadas por grandes massas monoespecíficas de cianobactérias, isto se deve sobretudo à capacidade de tais organismos crescerem em presença de altas concentrações de NaCl (Schofield & Ahmadjian, 1970; Davey, 1983).

Em cianobactérias, uma das respostas imediatas à hipersalinidade é a extrusão de  $\text{Na}^+$  por ação de uma bomba do íon  $\text{Na}^+$ , mediada por uma  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  ATPase e auxiliada pela fosforilação oxidativa na troca pelo  $\text{K}^+$  extracelular (Apte *et al.*, 1987). A produção de substâncias osmorreguladoras também é uma das respostas frequentemente relatadas em cianobactérias em decorrência da exposição a altas salinidades (Miller *et al.*, 1973).

A alta salinidade pode provocar estresse oxidativo, diminuindo a fixação de  $\text{CO}_2$ , e reduzindo o transporte de elétrons através da cadeia fotossintética, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (Osmond *et al.*, 1995).

### **2.3 – Atuação das Cyanophyta como bioindicadores de impactos ambientais**

As algas, incluindo as cianobactérias, são os microrganismos mais comumente citados que respondem rapidamente a variações ambientais. Microalgas e cianobactérias planctônicas e perifíticas têm sido usadas para inferir sobre as condições encontradas em um ecossistema. Estas apresentam respostas que funcionam como prognóstico da presença de poluentes e são, frequentemente, usadas em sistemas de prevenção, sendo consideradas bioindicadoras (Whitton & Kelly, 1995).

Um organismo com potencial para ser usado em processos de bioindicação deve apresentar atributos como: ser sensível a mudanças nas condições ambientais; possuir distribuição abundante e cosmopolita; ser fácil e rapidamente amostrado; e apresentar uma grande variedade de biomarcadores que possam ser quantitativamente mensuráveis (Steinman & McIntire, 1990). Biomarcadores são definidos como uma resposta biológica que pode ser relacionada à exposição, ou ao efeito tóxico, de um contaminante ambiental (Peakall & Shugart, 1998).

Apesar do termo biomarcador, geralmente, referir-se à respostas em níveis inferiores ao orgânico, num contexto mais amplo, pode também incluir respostas em todos os níveis de organização biológica, incluindo desde mudanças de padrões moleculares e bioquímicos, até alterações no comportamento e na estrutura de populações/comunidades (Wu *et al.*, 2005).

Pouca atenção tem sido dispensada ao Phylum Cyanophyta como bioindicadores de áreas impactadas por HCs. A exposição aos HCs, geralmente leva ao decréscimo da diversidade de espécies de cianobactérias, sendo que as mais sensíveis sucumbem, dando lugar às espécies tolerantes (Díez *et al.*, 1999; Kostel *et al.*, 1999). Apesar de existir um grande número de trabalhos que revelam alterações na estrutura de comunidades de cianobactérias expostas a HCs e a outros poluentes orgânicos, maior destaque é dado ao potencial, de espécies tolerantes, na biodegradação de tais contaminantes (Abed *et al.*, 2002; Abed & Köster, 2005; Sánchez *et al.*, 2006).

Al-Thukair, (2002) relatou um decréscimo substancial no número de cianobactérias euendolíticas na região do Golfo da Arábia, após 1991. De 1989 a 1992, um decréscimo de 5,05 a 15,08% no número de cianobactérias euendolíticas ativas na área foi constatado, e uma redução similar foi observada em termos do número de colônias por oóide (grânulos esféricos de carbonato de cálcio que se formam ao redor de um núcleo em rochas de ambientes marinhos rasos, nos trópicos).

Megharaj *et al.* (2000) comparando a composição da microflora de solos com um longo histórico de contaminação por DDT (1,1,1-tricloro-2,2-di( *p*-chlorophenyl)etano), um pesticida organoclorado, e de solos não contaminados, observou um declínio nas contagens de cianobactérias com o aumento da concentração de DDT remanescente nos solos, sendo que estas desapareceram totalmente dos solos com maiores doses do contaminante (34 mg de DDT por Kg de solo). Além da redução de biomassa nos solos contaminados, os autores também observaram, diminuição na biodiversidade e queda da atividade enzimática da desidrogenase. Estes resultados levaram os autores a apontar as cianobactérias dos gêneros *Nostoc* sp. e *Anabaena* sp. como bioindicadores de áreas poluídas por DDT.

#### **2.4 – Efeito de hidrocarbonetos de petróleo sobre os microrganismos**

O petróleo e seus derivados, variam muito em termos da composição de HCs, e por isso, apresentam toxicidades variáveis. Quanto maior a porcentagem de constituintes voláteis, como compostos aromáticos de baixo peso molecular, em sua

composição, maior será a toxicidade para organismos fotoautotróficos (Reddin & Prendeville, 1981).

Fabregas *et al.* (1984) observaram que baixas concentrações de petróleo ao meio de cultura têm efeito positivo sobre o crescimento e as taxas fotossintéticas da microalga marinha *Tetraselmis suecica*, contudo concentrações de petróleo acima de 200 ppm, provocaram uma extensão da fase *lag* de crescimento e uma diminuição da densidade óptica durante a fase estacionária nesse organismo, além de uma diminuição do conteúdo celular de clorofila *a*.

Abed & Köster (2005) relatam perda de pigmentação e morte subsequente da cianobactéria *Halomicronema exentricum* exposta a uma combinação de HCs de diversas classes. Bott & Rogenmuser (1978) observaram mudanças nas concentrações de clorofila *a* de diatomáceas, que diminuiram em função da exposição a frações de petróleo. Além disso, observaram redução da incorporação fotossintética de CO<sub>2</sub> em *Vaucheria* sp. (Chrysophyceae), exposta por curtos períodos às altas concentrações de uma fração de petróleo.

### **3 – MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 – Isolamento de Cianobactérias**

##### **3.1.1 - Local de coleta das amostras**

As amostras de solo foram coletadas durante a XXII Operação Antártica Brasileira (2003/2004), nas regiões da Península Keller e de Arctowski, Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica. Foram coletadas amostras de solo, sedimentos de canais de degelo e de regiões marginais de lagos, livres de contaminação por HCs, a uma profundidade de 0-10 cm. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas sob refrigeração a -10°C.

##### **3.1.2 – Análise das amostras de solo, isolamento e seleção de cianobactérias**

As amostras de solo foram diluídas e observadas sob microscópio óptico, para a identificação dos gêneros presentes. As amostras foram enriquecidas em meio AA4 líquido (com e sem adição de nitrogênio combinado) (anexo I) e incubadas sob condições fotoautotróficas, à temperatura de  $15 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 16:8 horas (luz:escuro) e de intensidade luminosa igual a  $80 \mu\text{mols.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , conforme descrito por Aguiar (2000). Os gêneros de cianobactéria de maior distribuição nas amostras de solo foram selecionados para o isolamento. O isolamento dos gêneros foi realizado através das técnicas de espalhamento e estriamento em meio sólido AA4 (suplementado com ágar a 1,2%), em pH 7,1. Também foram empregadas as técnicas de diluição e micropipetagem, seguidas de repicagens sucessivas descrita por Kugrens *et al.* (2000), em meio AA4 líquido (suplementado ou não com nitrogênio). As amostras enriquecidas em meio líquido foram mantidas em condições fotoautotróficas, em câmaras de crescimento (B.O.D. com fotoperíodo, Eletrolab, Brasil). O registro fotográfico foi realizado no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal/UFV, em microscópio óptico (AX70, Olympus, EUA) com câmera acoplada.

#### **3.2 – Experimento de degradação de [C<sup>14</sup>] naftaleno**

O aparato respirométrico e o solo utilizado como substrato para a condução do experimento de degradação de [C<sup>14</sup>] naftaleno foram descrito no anexo II.

### 3.2.1 – Reagentes químicos

A solução metanólica de  $[C^{14}]$ naftaleno-benzeno (uniformemente marcada), com atividade específica de  $31,3 \text{ mCi.mmol}^{-1}$ , o coquetel de contagem em cintilação líquida (Sigma High Performance LSC Cocktail) e o hidróxido de sódio (KOH) foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA.

### 3.2.2 – Experimento de biodegradação com culturas monoclonais de cianobactérias

Os experimentos de degradação foram conduzidos em Erlenmeyers com capacidade para 50 mL, nos quais foram adicionados 7 g de solo autoclavado como substrato para crescimento. Selecionou-se para o experimento as espécies de cianobactérias de maior distribuição nas amostras de solo analisadas.

O inóculo foi preparado a partir de culturas monoclonais do gênero *Phormidium* sp., com vinte dias de idade. Para a preparação do inóculo, a cultura foi concentrada através de centrifugação ( $12000 \text{ xg}$ , durante dez minutos), sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi colocado sobre uma folha de papel filtro, estéril, a fim de retirar o excesso de umidade. Posteriormente, o precipitado foi transferido para um tubo de centrífuga e pesado em balança analítica. O volume do tubo de ensaio foi completado com meio AA4 líquido (suplementado com 0,15%  $\text{KNO}_3$  p/v), pH 7,1, para a obtenção de um inóculo inicial com concentração de  $90 \text{ mg.mL}^{-1}$  de matéria fresca.

Foram testados dois tratamentos, com três réplicas cada um. Os tratamentos consistiram em um controle abiótico (1) e um tratamentos biótico (2): (1) tratamento abiótico contendo o solo +  $140 \text{ } \eta\text{Ci}$  de  $[C^{14}]$ naftaleno (correspondente a  $0,56 \text{ } \mu\text{g}$  de naftaleno) + 1mL de meio AA4 estéril; e (2) tratamento contendo o solo +  $140 \text{ } \eta\text{Ci}$  de  $[C^{14}]$ naftaleno + 1mL do inóculo proveniente da cultura de *Phormidium* sp. ( $90 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Os frascos contendo os tratamentos foram conectados ao sistema respirométrico, anteriormente descrito, e mantidos em uma câmara de crescimento (B.O.D. com fotoperíodo, Eletrolab, Brasil) por quinze dias, sob condições fotoautotróficas de crescimento descritas anteriormente no Laboratório de Ficologia do Departamento de Biologia Vegetal/UFV.

### 3.2.3 – Coleta e análise de amostras contendo $^{14}\text{CO}_2$

Diariamente, coletas de amostras líquidas dos sistemas de captura de  $^{14}\text{CO}_2$  foram realizadas. A cada ponto de amostragem, 1mL da solução contida no sistema de captura de  $^{14}\text{CO}_2$  de cada tratamento (cada sistema possuía 14 mL ao todo), previamente

homogeneizada através de fluxos contínuos com micropipeta, era recolhida e acomodada em um *vial* de contagem do contador de cintilação líquida, que era hermeticamente fechado. O volume do sistema de captura de  $^{14}\text{CO}_2$  era completado para 14 mL (com solução de KOH 0,5 M) e novamente ligado à sua respectiva amostra de solo no sistema respirométrico. A cada 48 horas a solução de cada sistema de captura de  $^{14}\text{CO}_2$  era totalmente renovada (14 mL de KOH 0,5 M) e a cada 120 horas, o sistema de armadilhamento de  $\text{CO}_2$  era renovado (1L de NaOH 4 M).

No primeiro dia de experimento, foram realizadas duas coletas de amostras, num intervalo de 06 horas, e uma terceira coleta 12 horas depois (destas, 08 horas correspondem ao período de ausência de luz na câmara de crescimento). No decorrer dos quinze dias de experimento, os intervalos foram sendo aumentados progressivamente para 08, 12 e 24 horas, conforme a intensidade de degradação observada.

Para a contagem das amostras radioativas, a cada ponto de amostragem (1mL da solução de KOH 0,5 M coletada de cada sistema de captura de  $^{14}\text{CO}_2$ ) foram adicionados 5 mL do coquetel de cintilação líquida (Sigma High Performance LSC Cocktail). A contagem foi realizada em um contador de cintilação líquida (LS 6800, Beckman, EUA). Os resultados foram corrigidos para a eficiência de contagem (97,5%) e *background* do aparelho.

### **3.3 – Efeito do naftaleno sobre as taxas de crescimento de cianobactérias**

#### **3.3.1 – Condições**

O experimento foi conduzido em tubos de ensaio com capacidade para 20 mL, aos quais foram adicionados 14 mL de meio AA4 líquido (1,5 % p/v de  $\text{KNO}_3$ ) e 1 mL do inóculo de *Phormidium* sp. A preparação do inóculo foi realizada conforme anteriormente descrito para o experimento de biodegradação de naftaleno.

Dois blocos, contendo dezoito tubos cada, foram delimitados: o primeiro bloco, tratamento controle, recebeu 100  $\mu\text{L}$  de metanol (P.A) puro; e o segundo bloco, tratamento com naftaleno, recebeu 100  $\mu\text{L}$  de metanol, nos quais estava dissolvido 1  $\mu\text{g}$  de naftaleno (concentração final 66,67  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de meio). A concentração final de metanol nos tubos foi igual a 0,66 % (v/v). Os tubos foram colocados em um suporte metálico e incubados em uma câmara de crescimento, sob condições fotoautotróficas de

crescimento. Como a posição do tubo no suporte pode deixá-lo exposto a diferentes intensidades luminosas, interferindo no crescimento do inóculo, adotou-se, dentro da câmara de crescimento, um sistema de rodízio de tubos de ensaio, de maneira que diariamente, a posição dos frascos era trocada no suporte para tubos, tornando a exposição luminosa mais homogênea entre os tubos.

### **3.3.2 – Procedimentos de amostragem e de avaliação de crescimento de cianobactérias**

Durante o período de dezesseis dias, foram realizados seis pontos de amostragem: o primeiro foi realizado imediatamente após a aplicação de cada tratamento (tempo 0), e os outros pontos foram coletados nos períodos de 72, 144, 216, 288 e 384 horas, após o primeiro ponto. Em cada ponto de amostragem, três tubos eram aleatoriamente escolhidos, dentro de cada um dos blocos. Após a homogeneização do conteúdo de cada tubo, com a ajuda de um agitador mecânico (Potter S, B. Braun Biotech International, Alemanha), uma alíquota de 2 mL foi recolhida e fixada em 2mL de formol (4%).

O monitoramento da produção de biomassa foi realizado no Laboratório de Ficologia DBV/UFV, através de contagens de células de cianobactérias, utilizando-se uma câmara do tipo Fuchs-Rosenthal (Bright line, Boeco, Alemanha), sob microscópio óptico (Axiostar Plus, Zeiss, Alemanha).

### **3.3.3 – Cálculo do valor inibitório de crescimento de amostras expostas ao naftaleno**

A inibição do crescimento de cianobactérias foi obtida pela média de diminuição no número de células, após a exposição ao naftaleno, durante o período experimental, em comparação com o controle. A avaliação foi feita baseando-se na comparação das áreas abaixo das curvas de crescimento, conforme a metodologia descrita por Djomo *et al.* (2004). A área (A) delimitada pela curva é calculada de acordo com a fórmula:

$$A = [(N_1 + N_0) \cdot t_1] / 2 + \{[(N_1 + N_2) - (2 \cdot N_0)] \cdot (t_2 - t_1)\} / 2 + \dots + \dots + \{[(N_{n-1} + N_n) - (2 \cdot N_0)] \cdot (t_n - t_{n-1})\} / 2$$

Onde  $N_0$  é o número de células por mL ao tempo  $t_0$  (inóculo);  $N_1$  é o número de células por mL no tempo  $t_1$ , que é o tempo decorrente até a primeira contagem, após o

início do experimento; e  $N_n$  é o número de células por mL no tempo  $t_n$ , que é o tempo decorrido entre a  $n$ ésima contagem e o início do experimento.

A inibição do crescimento celular ( $I_A$ ) foi obtida através da equação:

$$I_A = [(A_c - A_t) \cdot 100] / A_c$$

Onde  $A_c$  é a área abaixo da curva do tratamento controle, e  $A_t$  é a área abaixo da curva do tratamento (exposição ao poluente).

## 4 – RESULTADOS

### 4.1 – Seleção de cianobactérias

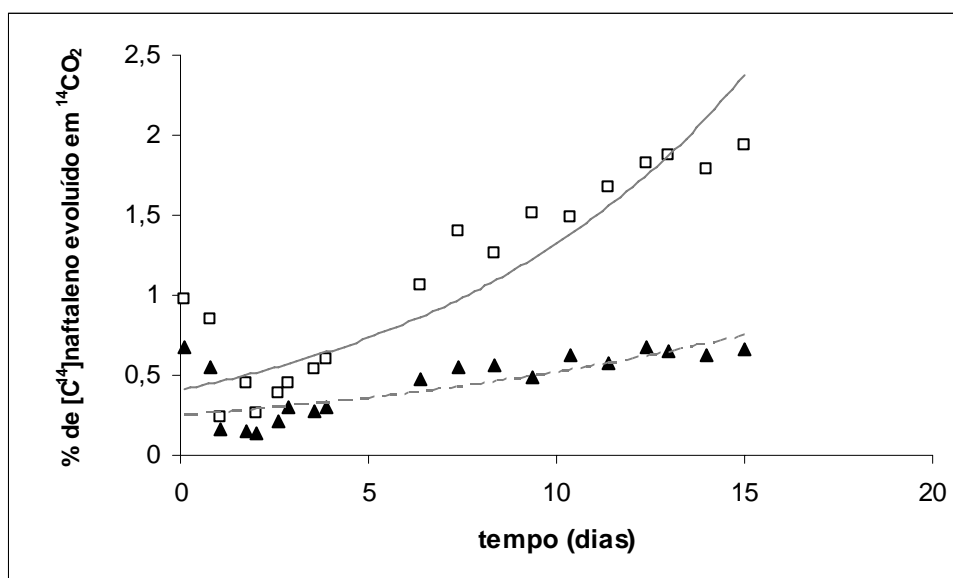
O meio AA4 (com e sem adição de fonte de nitrogênio) foi adequado para o isolamento das cianobactérias a partir de amostras de solo da Baía do Almirantado. Foi selecionado para os experimentos, o gênero *Phormidium* sp. ANT 01 (Anexo III, Figuras 1 e 2), que apresentou maior distribuição e abundância nas amostras observadas. A Tabela 1 apresenta as principais características do gênero *Phormidium* sp. ANT 01.

**Tabela 1:** Características de *Phormidium* sp. ANT 01:

	<b>Características</b>	
<b>Phylum</b>	<b>Morfologia</b>	Filamentosa
<b>Cyanophyta</b>	<b>Nº de filamentos por bainha</b>	01
<b>Ordem</b>	<b>Forma do filamento</b>	Reto, extremidades levemente encurvadas
<b>Oscillatoriales</b>	<b>Atenuação das extremidades</b>	Sim, de 2-6 células
	<b>Presença de caliptra</b>	Sim
<b>Gênero</b>	<b>Forma da célula apical</b>	Arredondada a cônica
<b><i>Phormidium</i> sp.</b>	<b>Constrição nas paredes terminais</b>	Não
	<b>Variação do diâmetro celular</b>	2,8 – 4,1 µm
	<b>Coloração</b>	Azul-esverdeado a alaranjado

#### 4.2 – Biodegradação de naftaleno por *Phormidium* sp. ANT 01

Não houve diferença significativa entre as quantidades de naftaleno mineralizado a  $^{14}\text{CO}_2$ , pelo controle abiótico e pelo tratamento monoclonal de *Phormidium* sp., à temperatura de  $15^\circ\text{C}$ , durante o período de 15 dias ( $p > 0,05$ ) (Figura 1). Os microrganismos presentes na cultura monoclonal de *Phormidium* sp. não foram considerados capazes de biodegradar naftaleno nas condições testadas.



**Figura 1:** Mineralização de [C<sup>14</sup>] naftaleno, em porcentagem (%) pelo tratamento monoclonal de *Phormidium* sp. ANT 01 (□) e pelo controle abiótico (▲) em função do tempo, em dias. Os pontos representam as médias de três repetições.

#### 4.3 – Efeito do naftaleno sobre o crescimento de *Phormidium* sp. ANT 01

A ANOVA revelou uma redução na produção de biomassa, em consequência da exposição ao naftaleno em solução ( $p \leq 0,05$ ). Houve uma diferença significativa entre as médias de contagens de células do controle em relação ao tratamento (exposição ao naftaleno), conforme apresentado na Tabela 2.

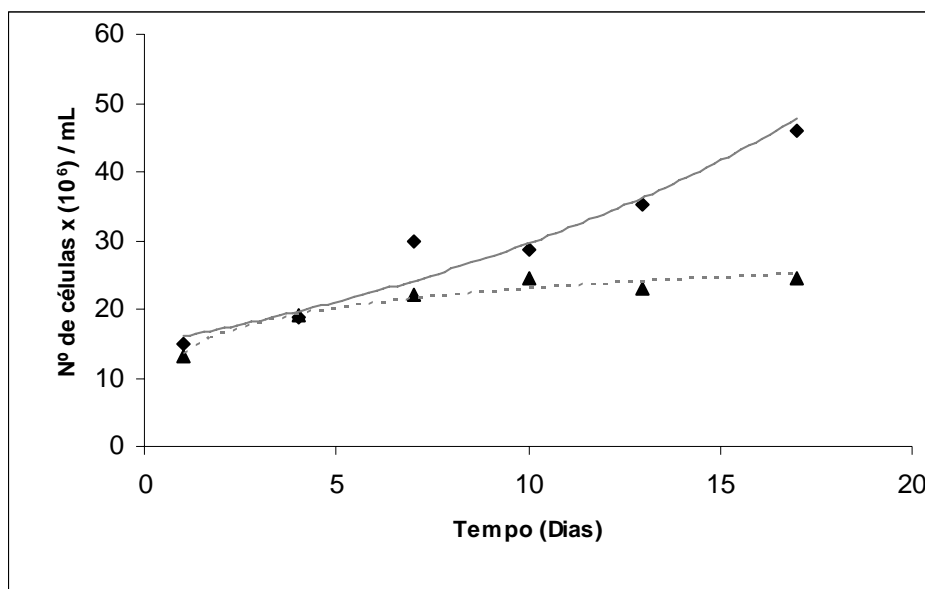
O controle exibiu uma fase de adaptação longa, entrando as células na fase logarítmica ou exponencial de crescimento por volta do sétimo dia de incubação, não atingindo a fase estacionária após dezesseis dias de experimento (Figura 2). As análises de regressão simples e múltipla foram utilizadas para a modelagem das curvas de crescimento das cianobactérias, sendo o ajustamento ( $r^2$ ) obtido para o modelo exponencial igual 0,94.

O tratamento de exposição ao naftaleno, produziu uma quantidade de biomassa menor que o tratamento controle, apresentando uma curva de crescimento atenuada em comparação ao controle (Figura 2). A fase logarítmica não foi pronunciada, e após o sétimo dia de experimento, o número de células se manteve estável. O ajuste ( $r^2$ ) ao modelo logarítmico foi igual 0,77. A Tabela 3 apresenta a comparação entre médias para interação tratamento x tempo (dias).

**Tabela 2:** Comparação entre médias das contagens de células entre o controle e o tratamento, pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

Tratamento	Médias de contagens de células ( $\times 10^6$ ). mL <sup>-1</sup>	Comparação entre médias (5 %)
Controle	28,06	A
Naftaleno (66,67 $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	21,50	B

Nota: Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes. A letra “A” é atribuída ao tratamento considerado mais eficaz.



**Figura 2:** Curvas de crescimento de *Phormidium* sp. ANT 01 (controle) (♦) e de *Phormidium* sp. ANT 01 na presença de naftaleno igual a 66,67  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (▲). Os pontos representam a média de contagem de células referentes às três repetições.

**Tabela 3:** Comparação entre médias das contagens de células para a interação tratamento x tempo de exposição, pelo teste de Duncan, a 5% de significância.

Tratamento	Contagens de células ( $\times 10^6$ ). mL <sup>-1</sup> por dias de amostragem (médias)					
	1	4	7	10	13	17
<b>Controle</b>	14,77 d	18,87 cd	29,85 bc	28,78 bc	35,26 bc	45,99 a
<b>Naftaleno (66,67 <math>\mu\text{g.L}^{-1}</math>)</b>	13,12 c	19,32 abc	22,01 abc	24,38 ab	25,87 ab	24,41 ab

Nota: Letras diferentes representam médias estatisticamente diferentes. A letra "A" é atribuída à média de tratamento considerada mais eficaz.

A inibição do crescimento celular foi igual a 37 %, obtida através do cálculo de comparação da área abaixo das curvas, para a cultura monoclonal de *Phormidium* sp. ANT 01, exposta à concentração de naftaleno de 66,67  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .

## 5 – DISCUSSÃO

### 5.1 – Biodegradação de naftaleno por *Phormidium* sp. ANT 01

Os microrganismos presentes na cultura monoclonal de *Phormidium* sp. ANT 01 não se mostraram capazes de degradar o naftaleno, nas condições experimentais testadas, não havendo uma diferença significativa entre as contagens de material radioativo presentes nas amostras coletadas durante o período de exposição ao [C<sup>14</sup>] naftaleno.

O fato de que *Phormidium* sp. ANT 01 foi isolado de solos que não apresentam histórico de contaminação com HCs, pode refletir a ausência de estratégias metabólicas que permitam, a estes organismos e a bactérias heterotróficas a eles associadas, utilizarem o naftaleno como fonte de carbono para o crescimento. Aislabie *et al.* (2001) relataram que solos não contaminados por HCs da Ilha Ross, tipicamente exibem um número baixo, ou mesmo abaixo do limite de detecção, de bactérias capazes de utilizar estes poluentes como fonte nutricional.

As culturas monoclonais de *Phormidium* sp. ANT 01 foram expostas ao naftaleno por um período de tempo relativamente curto. Em teoria, o prolongamento deste período de exposição, poderia resultar num incremento das taxas de degradação do naftaleno, em função do aumento do período de adaptação, permitindo a seleção e multiplicação de microrganismos capazes de utilizar o contaminante. Kanaly *et al.* (1997) utilizando amostras de solo, sem histórico de contaminação, que foram artificialmente contaminados com uma mistura de [C<sup>14</sup>] benzo[ $\alpha$ ]pireno e petróleo, observaram que durante os primeiros cinquenta dias de incubação, não houve mineralização do HAP em <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>, sendo que somente nos cem dias seguintes de exposição foi verificada atividade de biodegradação, com 50% do material radioativo mineralizado no final de cento e cinquenta dias. No referido trabalho, apesar de não ter sido requerida uma pré-exposição das amostras aos HCs, para a obtenção de taxas de degradação altas, um período maior de adaptação dos microrganismos foi necessário.

## 5.2 – Efeito do naftaleno sobre o crescimento de *Phormidium* sp. ANT 01

A exposição ao naftaleno possui efeito inibitório sobre a produção de biomassa de *Phormidium* sp. ANT 01, indicando a sensibilidade deste organismo à presença deste contaminante. Existem na literatura, trabalhos que correlacionam a exposição a HCs com a diminuição na produção de biomassa de diversos microrganismos. Griffin & Calder (1977) relatam que a exposição de *Serratia marinorubra*, uma bactéria marinha, à frações solúveis de petróleo refinado reduz as taxas de crescimento, bem como a densidade celular máxima do organismo. Bott & Rogenmuser (1978), relataram uma diminuição da biomassa de algas perifíticas, expostas a frações solúveis de petróleo. Contudo, propõem que alterações na estrutura destas comunidades perifíticas sejam marcadores biológicos mais sensíveis à poluição por HCs, do que a produção de biomassa.

A concentração de naftaleno testada ( $66,67 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) foi suficiente para causar um efeito inibitório sobre o crescimento da cianobactéria isolada para este estudo, na ordem de 37%. A concentração testada neste experimento está abaixo das concentrações mínimas de naftaleno, necessárias para causar inibição de crescimento em vários outros organismos modelos descritos na literatura. Djmo *et al.* (2004) obtiveram, durante a exposição de *Scenedesmus subspicatus* ao naftaleno, em sete dias de experimento, uma  $\text{EC}_{10}$  (concentração inibitória do crescimento em 10%) igual a  $7,27 \text{ mg.L}^{-1}$  e não observaram efeito inibitório sobre o crescimento do organismo em concentrações de naftaleno inferiores a  $4,15 \text{ mg.L}^{-1}$ . Olmstead & LeBlanc (2005) relataram que são necessárias concentrações de naftaleno maiores que  $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$  para inibir o crescimento de *Daphnia magna* (microcrustáceo planctônico de águas doces e salgadas).

Contudo, para *Mysidopsis bahia*, um microcrustáceo considerado um dos organismos mais sensíveis à exposição à HCs, foi relatado efeito inibitório sobre as taxas de crescimento, em concentrações de naftaleno menores que a testada no presente experimento. Barron *et al.* (1999) obtiveram um  $\text{EC}_{20}$  para este microcrustáceo, quando os mesmos foram submetidos às concentrações de naftaleno que variavam de  $0,29$  a  $4,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

É importante destacar que em solução, a toxicidade de HAPs pouco solúveis, como o naftaleno, é determinada pela quantidade do contaminante solubilizada, que pode ser menor que a concentração total do poluente (Leahy & Colwell, 1990). Dessa

maneira, como neste experimento os tubos contendo os tratamentos não foram mantidos em agitação constante, uma concentração menor de naftaleno, do que aquela adicionada aos tratamentos, pode estar solubilizada e a resposta inibitória de 37 % obtida, pode ser relacionada a uma concentração de naftaleno menor que  $66,67 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

A concentração de naftaleno utilizada neste experimento é considerada baixa, estando abaixo dos valores máximos permitidos em águas para consumo humano, pela legislação federal dos EUA ( $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), por exemplo (HSDB, 1999).

Embora Oliveira (2005) não tenha detectado concentrações de naftaleno superiores a  $1,19 \text{ ng.g}^{-1}$  de solo seco, nos ambientes terrestres do entorno da Estação Antártica Comandante Ferraz, existem trabalhos que mostram que o *input* de HCs na área tem aumentado consideravelmente. Martins *et al.* (2000) obteve concentrações de naftaleno de até  $42,8 \text{ ng.g}^{-1}$  (matéria seca), analisando amostras de sedimento provenientes da Baía do Almirantado. Isto indica que o crescimento da atividade de pesquisa na área, pode levar a alterações ambientais que comprometem as comunidades de organismos presentes na área. A busca por bioindicadores de áreas impactadas com HCs e o estabelecimento de programas de biomonitoramento na região, tornam-se de grande importância para a preservação do ecossistema existente na Baía do Almirantado.

Fatores como uma ampla distribuição temporal e espacial e biomassa abundante em solos da Baía do Almirantado, associados à sensibilidade a concentrações baixas de naftaleno, um dos hidrocarbonetos mais tóxicos da fração solúvel do petróleo e seus derivados, fazem da cianobactéria *Phormidium* sp. ANT 01, um organismo com forte potencial para ser empregado em processos de bioindicação de solos poluídos por HCs, na Antártica. Alterações na população de *Phormidium* sp. ANT 01, nos solos da região, podem atuar como biomarcadores que funcionam como um sinal de alerta para as mudanças nas concentrações de HCs nestes solos. Tais informações são fundamentais e permitirão a adoção de medidas preventivas capazes de minimizar os prejuízos causados ao meio ambiente pelo recente *input* de HCs nos solos da Baía do Almirantado.

## CONCLUSÕES GERAIS

O biofilme coletado da calha de escoamento de um posto de gasolina, na região de Viçosa (MG), exposto a doses de HCs, apresentam um forte potencial para ser utilizado em processos de degradação de hidrocarbonetos aromáticos, como o naftaleno, e constitui-se numa fonte natural de microrganismos que podem ser utilizados em experimentos de biorremediação.

Por outro lado, a cianobactéria *Phormidium* sp. ANT 01, isolada de solos não contaminados por HCs da Baía do Almirantado, Antártica, não se mostrou capaz de biodegradar o naftaleno, à temperatura de 15°C, no período de quinze dias, e seu crescimento celular foi afetado quando exposta a concentrações baixas de naftaleno. Fatores como ampla distribuição e abundância celulares em solos da Baía do Almirantado, associado à sensibilidade em presença de concentrações baixas de naftaleno, sugerem que *Phormidium* sp. ANT 01 seja um organismo com potencial para ser empregado em processos de bioindicação de solos poluídos por HCs, na Antártica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**ABED, R. M. M. & KÖSTER, J.** (2005). The direct hole of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. *International Biodeterioration & Degradation*. **55**: 29-37.

**ABED, R. M. M.; SAFI, N. M. D.; KÖSTER, J.; DE BEER, D.; EL-NAHHAL, Y.; RULLKÖTTER, J. & GARCIA-PICHEL, F.** (2002). Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. **64** (4): 1674-1683.

**AGUIAR, R.** (2000). **Systematics and ultrastructure of new and rare Chrysophytes from Colorado and Wyoming lakes.** Ph.D. Dissertation (Botany) - Colorado State University, Colorado, E.U.A., 2000.

**AISLABIE, J.; FRASER, R.; DUNCAN, S. & FARRELL, R. L.** (2001). Effects of oil spills on microbial heterotrophs in Antarctic soils. *Polar Biology*. **24**: 308–313.

**AL-AWADHI, H.; AL-HASAN, R. H.; SORKHOH, N. A.; SALAMAH, S. & RADWAN, S. S.** (2003). Establishing oil-degrading biofilms on gravel particles and glass plates. *International Biodeterioration & Degradation*. **51**: 181-185.

**AL-AWADHI, H.; AL-HASAN, R. H.; & RADWAN, S. S.** (2002). Comparison of the potential of coastal materials loaded with bacteria for bioremediating oily sea water in batch culture. *Microbiological Research*. **157**: 331–336.

**ALBUQUERQUE, M. A.** (1995). **Degradation of Atrazine in soil and subsurface..** Ph.D. Dissertation (Soil Science) - University of Reading: UR, Inglaterra. 1995.

**AL-HASAN, R. H; KHANAFER, M.; ELIYAS, M. & RADWAN, S. S.** (2001). Hydrocarbon accumulation by picocyanobacteria from the Arabian Gulf. *Journal of Applied Microbiology*. **91**: 533-540.

**ALLARD, A. S. & NEILSON, A. H.** (1997). Bioremediation of organic waste sites: a critical review of microbiological aspects. *International Biodeterioration & Degradation*. **39**: 253-285.

**ALLEN, M. B. & ARNON, D. I.** (1955). Studies on nitrogen-fixing blue-green algae. I – Growth and nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica* Lemm. *Plant Physiology*. **30**: 366-372.

**AL-THUKAIR, A. A.; ABED, R. M. M. & MOHAMED, L.** (2007). Microbial community of cyanobacteria mats in the intertidal zone of oil-polluted coast of Saudi Arabia. *Marine Pollution Bulletin*. **54**: 173–179.

**AMADI. A.; ABBEY, S.D. & NMA, A.** (1996). Chronic effects of oil spill on soil properties and microflora of a rainforest ecosystem in Nigeria. *Water, Air, and Soil Pollution*. **86**: 1–11.

- ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J.** (1999). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1- Introduction. *Algological Studies*. **38-39**: 291-302.
- ANDERSON, J. W.; NEFF, J. M.; COX, B. A.; TATEM, H. E. & HIGHTOWER, G. M.** (1974). Characteristics of dispersions and watersoluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. *Marine Biology* (Berlin). **27**:75-88.
- APTE, S. K.; REDDY, B. R. & THOMAS, J.** (1987). Relationship between sodium influx and salt tolerance of nitrogen-fixing cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**: 1934-1939.
- ATLAS, R. M.** (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*. **45**: 180-209.
- BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; BALMOORI, J.; VUCHETICH, P. J. & STOHS, S. J.** (1998). Induction of oxidative stress and DNA damage by chronic administration of naphthalene to rats. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **101**: 249-257.
- BARRON, M. G.; PODRABSKY, T.; OGLE, S. & RICKER, R. W.** (1999). Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms? *Aquatic Toxicology*. **46**: 253–268.
- BARTH, H.** (2003). The influence of cyanobacteria on oil polluted intertidal at the Saudi Arabian Gulf shores. *Marine Pollution Bulletin*. **46**: 1245-1252.
- BOLD, H. C. & WYNNE, J. W.** (1985). **Introduction to the algae**. 2 ed. Prentice – Hall, Englewood Cliffs, NJ. 707 pp.
- BOTT, T. L. & ROGENMUSER, K.** (1978). Effects of no. 2 fuel oil, nigerian crude oil, and used crankcase oil on attached algal communities: acute and chronic toxicity of water-soluble constituents. *Applied and Environmental Microbiology*. **36** (5): 673-682.
- BROADY, P. A.** (1979). The Signy Island terrestrial reference sites: IX. The ecology of the algae site 2 – a moss carpet. *Bull Br Antarct Surv.* **47**: 13-29.
- BROADY, P. A. & KIBBLEWHITE, A. L.** (1991). Morphological characterization of Oscillatoriales (Cyanobacteria) from Ross Island and southern Victoria Land, Antarctica. *Antarctic Science*. **3** (1): 35-45.
- CASAMATTA, D. A.; JOHANSEN, J. R.; VIS. M. L. & BROADWATER, S. T.** (2005). Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*. **41**: 421–438.
- CERNIGLIA, C. E.** (1997). Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **19**:324–333.

**CERNIGLIA, C. E.; FREEMAN, J. P. & EVANS, F. E.** (1984). Evidence for an arene oxide-NIH shift pathway in the transformation of naphthalene to 1-naphthol by *Bacillus cereus*. *Archives of Microbiology*. **138**:283-286.

**CERNIGLIA, C. E. & GIBSON, D. T.** (1977). Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*. *Applied Environmental Microbiology*. **34**: 363-370.

**CERNIGLIA, C. E.; GIBSON, D. T. & VAN BAALEN, C.** (1979). Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum* strain PR-6. *Biochemical Biophysical Research Communications*. **88**: 50-58.

**CERNIGLIA, C. E.; VAN BAALEN, C. & GIBSON, D. T.** (1980a). Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium *Oscillatoria* sp., strain JCM, *Journal of General Microbiology*. **116**: 485-494.

**CERNIGLIA, C. E.; VAN BAALEN, C. & GIBSON, D. T.** (1980b). Oxidation of biphenyl by the cyanobacterium *Oscillatoria* sp., strain JCM. *Archives in Microbiology*. **125**: 203-207.

**CHAILLAN, F.; GUGGER, M.; SALIOT, A.; COUTÉ, A. & OUDOT, J.** (2006). Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat. *Chemosphere*. **62**: 1574-1582.

**CHAILLAN, F.; LE FLÈCHE, A.; BURY, E.; PHANTAVONG, Y.; GRIMONT, P.; SALIOT, A. & OUDOT, J.** (2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology*. **155**: 587-595.

**CHEN, L.; LI, D. & LIU, Y.** (2003). Salt tolerance of *Microcoleus vaginatus* Gom., a cyanobacterium isolated from desert algal crust, was enhanced by exogenous carbohydrates. *Journal of Arid Environments*. **55**: 645-656.

**CHICHESTER, C. H.; BUCKPITT, A. R.; CHANG, A. & PLOPPER, C. G.** (1994). Metabolism and cytotoxicity of naphthalene and its metabolites in isolated murine Clara cells. *Molecular Pharmacology*. **45**: 664-672.

**CHUN, T.; PERRONE, J.; OSTERHOUD, T. K.; UGUR, S. & HENRETIG, F.** (1998). Mothball blues: confusion in naphthalene toxicities and treatment. *Clinical Toxicology*. **36**: 465.

**COULON, F.; MCKEW, B. A.; OSBORN, A. M.; T. MCGENITY J. & TIMMIS, K. N.** (2006). Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environmental Microbiology*. **9** (1): 177-186.

**COULON, F.; PELLETIER, E.; GOURHANT, L. & DELLILE, D.** (2005). Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. *Chemosphere*. **58**: 1434-1448.

- CRIPPS, G.C. & SHEARS, J.** (1997). The fate in the marine environment of a minor diesel fuel spill from an Antarctic research station. *Environmental Monitoring and Assessment*. **46**: 221–232.
- CROOME, R. L.** (1973). Nitrogen fixation in the algal mats on Marion Islands. *South African Journal of Antarctic Research*. **3**: 64-67.
- DAVEY, A.** (1983). Effects of abiotic factors on nitrogen fixation by bluegreen algae in Antarctica. *Polar Biology*. **2**: 95-100.
- DAVEY, M. C.** (1989). The effects of freezing and dissection on photosynthesis and survival of terrestrial Antarctic algae and cyanobacteria. *Polar Biology*. **10**: 29-36.
- DAVIS, S. J. & GIBBS, C. F.** (1975). The effect of weathering on crude oil residue exposed at sea. *Water Research*. **9**: 275-285.
- DAWSON, J. P.; THAYER, W. W. & DESFOGES, J. F.** (1958). Acute haemolytic anaemia in the newborn infant due to naphthalene poisoning. *Blood*. **13**: 1113-1125.
- DELILLE, D.; BASSÈRES, A. & DESSOMMESS, A.** (1998) Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic seawater. *Polar Biology*. **19**: 237–241.
- DÍEZ, I.; SECILLA, A.; SANTOLARIA, A. & GOROSTIAGA, J.M.** (1999). Phytobenthic intertidal community structure along an environmental pollution gradient. *Marine Pollution Bulletin*. **38** (6): 463-472.
- DJOMO, J. E.; DAUTA, A.; FERRIER, V.; NARBONNE, J. F.; MONKIEDJE, A.; NJINE, T.; GARRIGUES, P.** (2004). Toxic effects of some major polyaromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediments on *Scenedesmus subspicatus*. *Water Research*. **38**: 1817–1821.
- DONKOR, V. A. & HÄDER, D. P.** (1995). Protective strategies for several cyanobacteria against solar radiation. *Journal of Plant Physiology*. **145**: 750-755.
- ELJARRAT, E. & BARCELÓ, D.** (2003). Priority lists for persistent organic pollutants and emerging contaminants based on their relative toxic potency in environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*. **22** (10): 655-665.
- ENSLEY, B. D. & GIBSON, D. T.** (1983). Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component. *Journal of Bacteriology*. **155** (2): 505-511.
- ENSLEY, B. D.; GIBSON, D. T. & LABORDE, A. L.** (1982). Oxidation of naphthalene by a multicomponent enzyme system from *Pseudomonas* sp. Strain NCIB 9816. *Journal of Bacteriology*. **149** (3): 948-954.
- ERIKSSON, M.; SODERSTEN, E.; YU, Z.; DALHAMMER, G. & MOHN, W. W.** (2003). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from Northern soils. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 275–284.

- FABREGAS, J.; HERRERO, C. & VEIGA, M.** (1984). Effect of oil and dispersant on growth and chlorophyll *a* content of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Applied and Environmental Microbiology*. **47** (2): 445-447.
- FERNANDEZ-TURIEL, J. L.; GARCIA-VALLES, M.; GIMENO-TORRENTE, D.; SAAVEDRA-ALONSO, J. & MARTINEZ-MANENT, S.** (2005). The hot spring and geyser sinters of El Tatio, Northern Chile. *Sedimentary Geology*. **180**: 125–147.
- FIORE, M. F. ; MOON, D. H. ; TREVORS, J. T.** (1998). **Metal resistance and accumulation in cyanobacteria.** In: WONG, Y.-S.; TAM, N. F. Y.. (Eds.). Wastewater treatment with algae. Georgetown: Springer-Verlag/Landes Bioscience. p. 111-124.
- FLORES, E. & C. WOLK, P.** (1985). Identification of facultatively heterotrophic, N<sub>2</sub>-fixing cyanobacteria able to receive plasmid vectors from *Escherichia coli* by conjugation. *Journal of Bacteriology*. **162** (3): 1339-1341.
- FOURÇANS, A.; DE OTEYZA, T. G.; WIELAND, A.; SOLÉ, A.; DIESTRA, E.; VAN BLEIJSWIJK, J.; GRIMALT, J. O.; KÜHL, M.; ESTEVE, I.; MUYZER, G.; CAUMETTE, P. & DURAN, R.** (2004). Characterization of functional bacterial groups in a hypersaline microbial mat community (Salins-de-Giraud, Camargue, France). *FEMS Microbiology Ecology*. **51**: 55–70.
- FRIEDMANN, E. L. & KIBLER, A. P.** (1980). Nitrogen economy of endolithic microbial communities in hot and cold deserts. *Microbial Ecology*. **6**: 95-108.
- FUENMAYOR, S. L.; WILD, M.; BOYES, A. L. & WILLIAMS, P. A.** (1998). A gene cluster encoding steps in conversion of naphthalene to gentisate in *Pseudomonas* sp. strain U2. *Journal of Bacteriology*. **180**: 2522–2530.
- GALLEGO, J. R.; GONZÁLEZ-ROJAS, E.; PELÁEZ, A. I.; SÁNCHEZ, J.; GARCÍA-MARTÍNEZ, M. J.; ORTIZ, J. E.; TORRES, T.; & LLAMAS, J.F.** (2006). Natural attenuation and bioremediation of *Prestige* fuel oil along the Atlantic coast of Galicia (Spain). *Organic Geochemistry*. **37**: 1869–1884.
- GARCIA-PICHEL, F. & CASTENHOLZ, R.W.** (1993) Occurrence of UV absorbing, mycosporine-like compounds among cyanobacterial isolates and an estimate of their screening capacity. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 163-169.
- GEORGE, A. L.; MURRAY, A. W. & MONTIEL, P. O.** (2001). Tolerance of Antarctic cyanobacterial mats to enhanced UV radiation. *FEMS Microbiology Ecology*. **37**: 91-101.
- GERDES, B.; BRINKMEYER, R.; DIECKMANN, G. & HELMKE, E.** (2005). Influence of crude oil on changes of bacterial communities in Arctic sea-ice. *FEMS Microbiology Ecology*. **53**: 129–139.
- GERMANSKY, M. & JAMALL, I. S.** (1988). Organ-specific effects of naphthalene on tissue peroxidation, glutathione peroxidases and superoxide dismutase in the rat. *Archives in Toxicology*. **61**: 480-483.

- GORE, D.B.; REVILL, A.T. & GUILLE, D.** (1999). Petroleum hydrocarbons ten years after spillage at a helipad in Bunger Hills, East Antarctica. *Antarctic Science*. **11**: 427–429.
- GRIFFIN, L. F. & CALDER, J. A.** (1977). Toxic effect of water-soluble fractions of crude, refined, and weathered oils on the growth of a marine bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. **33** (5): 1092-1096.
- GROBBELAAR, J. U.** (1978). Factors limiting algal growth on the sub-Antarctic island Marion. *Verh Int Verein Limnol*. **20**: 1159-1164.
- GRÖTZSCHEL, S.; KÖSTER, J.; ABED, R. M. M.; DE BEER, D.** (2002). Degradation of petroleum compounds immobilized on clay by a hypersaline mat. *Biodegradation*. **13**: 273–283.
- HAREL, Y.; OHAD, I. & KAPLAN, A.** (2004). Activation of photosynthesis and resistance to photoinhibition in cyanobacteria within biological desert crust. *Plant Physiology*. **136**: 3070–3079.
- HEITKAMP, M. A.; FREEMAN, J. P. & CERNIGLIA, C. E.** (1987). Naphthalene biodegradation in environmental microcosms: estimates of degradation rates and characterization of metabolites. *Applied and Environmental Microbiology*. **53** (1): 129-136.
- HINTEREGGER, C. & STREICHSBIER, F.** (1997). *Halomonas* sp., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic waste-water. *Biotechnology Letters*. **19**: 1099–1102.
- HÖPNER, T.; YOUSEF, M.; BERTHE-CORTI, L.; FELZMANN, H.; STRUCK, H. & AL-THUKAIR, A.** (1996). **Cyanobacterial mats on oil-polluted sediments-start of a promising self-remediation process?** In: Krupp F, Abuzinada AH, Nader I (Eds) A Marine Wildlife Sanctuary for the Arabian Gulf. NCWCD, Riyadh and Senckenberg Research Institute, Frankfurt. 85–95.
- HSDB.** (1999). Hazardous Substances Data Bank. Available online at <http://sis.nlm.nih.gov>. Maryland, USA. Accessed on 12/11/2006 02:30 p.m.
- JAMISON, V. M.; RAYMOND, R. L. & HUDSON, J. O. Jr.** (1975). Biodegradation of high-octane gasoline in groundwater. *Developments in Industrial Microbiology*. **16**: 305-312.
- JEON, C. O.; PARK, M.; RO, H.; PARK, W. & MADSEN, E. L.** (2006). The naphthalene catabolic (*nag*) genes of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2: evolutionary implications for two gene clusters and novel regulatory control. *Applied and Environmental Microbiology*. **72** (2): 1086–1095.
- JUHASZ, A. L.; STANLEY, G. A. & BRITZ, M. L.** (2002). Metabolite repression inhibits degradation of benzo[*a*]pyrene and dibenz[*a*]anthracene by *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10003. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **28**: 88–96.

**JURTEHUK, P. & CARDINI, G. E.** (1971). The mechanism of hydrocarbon oxidation by a corynebacterium species. *Critical Reviews in Microbiology*. **1**:239-289.

**KANALY, R.; BARTHA, R.; FOGEL, S. & FINDLAY, M.** (1997). Biodegradation of [<sup>14</sup>C] benzo[*a*]pyrene added in crude oil to uncontaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **63** (11): 4511–4515.

**KASPAR, H. F. & TIEDJE, J. M.** (1994). Anaerobic bacteria and processes. In R. W. WEAVER *et al.* (ed.) **Methods of Soil Analyses, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties**. SSSA, Madison. 223-243.

**KENNICUTT II, M.C. & SWEET, S.T.** (1992). Hydrocarbon contamination on the Antarctic Peninsula. III. The *Bahia Paraiso* – two years after the spill. *Marine Pollution Bulletin*. **24**: 303–306.

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

**KIM, I. S.; FOGHT, J. M. & GRAY, M. R.** (2002). Selective transport and accumulation of alkanes by *Rhodococcus erythropolis* S<sub>14</sub>He. *Biotechnology and Bioengineering*. **80**:650–659.

**KIYOHARA, H.; TORIGOE, S.; KAIDA, N.; ASAKI, T.; IIDA, T.; HAYASHI, H. & TAKIZAWA, N.** (1994). Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. *Journal of Bacteriology*. **176**:2439–2443.

**KOSTEL, J. A.; WANG, H.; ST. AMAND, A. L. & GRAY, K. A.** (1999). 1. Use of a novel laboratory stream system to study the ecological impact of pcb exposure in a periphytic biolayer. *Water Research*. **33** (18): 3735-3748.

**KNAUTH, L. P.** (2005). Temperature and salinity history of the Precambrian ocean: implications for the course of microbial evolution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. **219**: 53– 69.

**KNOLL, A.** (1999) A new molecular window on early life. *Science*. **285**: 1025–1030.

**KUGRENS, P.; CLAY, B. & AGUIAR, R.** (2000). Ultrastructure of *Lobocharacium coloradoense*, Gen. Et. SP. NOV. (Chlorophyta, Characiosiphnaceae), an unusual coenocyte from Colorado. *Journal of Phycology*. **36**: 421-432.

**KURITZ, T. & WOLK, C. P.** (1995). Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants. *Applied and Environmental Microbiology*. **61** (1): 234–238.

- LAURIE, A. D. & LLOYD-JONES, G.** (1999). The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. *Journal of Bacteriology*. **181**: 531–540.
- LEAHY, J. G. & COLWELL, R. R.** (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*. **54** (3): 305-315.
- LEMASSON, C.; TANDEAU DE MARSAC, N. & COHEN-BAZIRE, G.** 1973. Role of allophycocyanin as a light-harvesting pigment in cyanobacteria. *Proceedings of National Academy of Sciences. U.S.A.* **70**: 3130-3133.
- LEVINE, E. & THIEL, T.** (1987). UV-inducible DNA repair in the cyanobacteria *Anabaena* spp. *Journal of Bacteriology*. **169** (9):3988-3993.
- LIU, X. & YANG, J.** (2003). Split *dnaE* genes encoding multiple novel inteins in *Trichodesmium erythraeum*. *Journal of Biology Chemistry*. **278**: 26315-26318.
- MARGESIN, R.** (2000). Potential of cold-adapted microorganisms for bioremediation of oil-polluted alpine soils. *International Biodeterioration and Biodegradation*. **46**: 3–10.
- MARGESIN, R. & SCHINNER, F.** (2001). Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiological Biotechnology*. **56**: 650–663.
- MARKOVETZ, A. J.** (1971). Subterminal oxidation of aliphatic hydrocarbons by microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*. **1**: 225-237.
- MARTINS, C.C.; BÍCEGO, M.C.; TANIGUCHI, S. & MONTONE, R.C.** (2004). Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Antarctic Science*. **16** (2): 117-122.
- MATSUDA, T.** (1968). Ecological study of the moss community and microorganisms in the vicinity of Syowa Station, Antarctica. *JARE Scientific Reports.*, ser. E, **29**: 58 pp.
- MATALONI, G.; VINOCUR, A. & PINTO, P. de T.** (2005). Abiotic characterization and epilithic communities of a naturally enriched stream at Cierva Point, Antarctic Peninsula. *Antarctic Science*. **17** (2): 163–170.
- MAZZERA, D.; HAYES, T.; LOWENTHAL, D. & ZIELINSKA, B.** (1999). Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil at McMurdo station, Antarctica. *Science of the Total Environment*. **229**: 65–71.
- MCKNIGHT, D. M.; ALGER, A.; TATE, C. M.; SHUPE, G. & SPAULDING, S.** (1998). Longitudinal patterns in algal abundance and species distribution in meltwater streams in Taylor Valley, Southern Victoria Land, Antarctica. *Antarctic Research Series*. **72**: 109–128.

**MEGHARAJ, M.; KANTACHOTE, D.; SINGLETON, I. & NAIDU, R.** (2000). Effects of long-term contamination of DDT on soil microflora with special reference to soil algae and algal transformation of DDT. *Environmental Pollution*. **109**: 35-42.

**MILLE, G.; ALMALLAH, M.; BIANCHI, M.; WAMBEKE, F. VAN & BERTRAND, J. C.** (1991). Effect of salinity on petroleum biodegradation. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. **339**: 788–791.

**MILLER, D. M. O.; JONES, J. H.; YOPP, J. H.; TINDALL, D. R. & SCHMID, W. D.** (1976). Ion metabolism in a halophilic blue green alga, *Aphanothece halophytica*. *Archives in Microbiology*. **111**: 145-149.

**MONTESINOS, M. L.; HERRERO, A. & FLORES, E.** (1997). Amino acid transport in taxonomically diverse cyanobacteria and identification of two genes encoding elements of a neutral amino acid permease putatively involved in recapture of leaked hydrophobic amino acids. *Journal of Bacteriology*. **179**: 853–862.

**MOORE, L. R.; POST, A. F.; ROCAP, G. & CHISHOLM, S. W.** (2002). Utilization of different nitrogen sources by the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Limnology and Oceanography*. **47**:989–996.

**MOORHEAD, D.; SCHMELING, J. & HAWES, I.** (2005). Modelling the contribution of benthic microbial mats to net primary production in Lake Hoare, McMurdo Dry Valleys. *Antarctic Science*. **17** (1): 33–45.

**MOUNÉ, S.; CAUMETTE, P.; MATHERON, R. & WILLISON, J. C.** (2003). Molecular sequence analysis of prokaryotic diversity in the anoxic sediments underlying cyanobacterial mats of two hypersaline ponds in Mediterranean salterns. *FEMS Microbiology Ecology*. **44**: 117–130.

**NADEAU, T. - L. & CASTENHOLZ, W. F.** (2000). Characterization of psychrophilic oscillatorians (Cyanobacteria) from antarctic meltwater ponds. *Journal of Phycology*. **36**: 914-923.

**NARRO, M. L.; CERNIGLIA, C. E.; VAN BAALEN, C. & GIBSON, D. T.** (1992 a). Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. *Applied and Environmental Microbiology*. **58** (4): 1351-1359.

**NARRO, M. L.; CERNIGLIA, C. E.; VAN BAALEN, C. & GIBSON, D. T.** (1992 b). Evidence for an NIH shift in oxidation of naphthalene by the marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. strain JCM. *Applied and Environmental Microbiology*. **58** (4): 1360-1363.

**NTP - Technical Reports: 500 N.** (2000). Toxicology and carcinogenesis studies of naftaleno - National Institute of Health Publication, No. 01-4434.

**O'BRIEN, P. A. & HOUGHTON, J. A.** (1982). Photoreactivation and excision repair on UV induced pyrimidine dimers.iff the unicellular cyanobacterium *Gleocapsa alpicola* (*Synechocystis* PCC 6803). *Photochemistry and Photobiology*. **35**: 359-364.

**OLIVEIRA, L. M. de** (2005). **Hidrocarbonetos de solos próximos à Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz**. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.

**OLMSTEAD, A. W. & LEBLANC, G. A.** (2005). Joint action of polycyclic aromatic hydrocarbons: predictive modeling of sublethal toxicity. *Aquatic Toxicology*. **75**: 253–262.

**OSMOND, C. B. & GRACE, S. C.** (1995). Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*. **46**: 1351–1362.

**PARKER, B. C. & SIMMONS, G. M. Jr.** (1985). Paucity of nutrient cycling and absence of food chains in the unique lakes of Southern Victoria Land. In SIEGFRIED, W. R., CONDY, P. R. & LAWS, R. M. (Eds.). **Antarctic Nutrient Cycles and Food Webs**. Berlin: Springer. 237-244.

**PEAKALL, D. B. & SHUGART, L. R.** (1998). Biomarkers. In: Meyers, R.A. (Ed.). **Environmental Analysis and Remediation**. John Wiley & Sons, New York, pp. 732–755.

**PERRY, J. J.** (1979). Microbial cooxidations involving hydrocarbons. *Microbiological Reviews*. **43**: 59-72.

**PHILLIPIS, R. & VINCENZINI, M.** (1998). Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*. **22**: 151–175.

**QUESADA, A.; VINCENT, W. F. & LEAN, D. R. S.** (1999). Community and pigment structure of Arctic cyanobacterial assemblages: the occurrence and distribution of UV-absorbing compounds. *FEMS Microbiology Ecology*. **28**: 315-323.

**RADWAN, S. S.; AL-AAWADI, H.A. & KHANAFER, M.** (2001). Effects of lipids on n-alkane attenuation in media supporting oil-utilizing microorganisms from the oily Arabian Gulf coasts. *FEMS Microbiology Letters*. **198**: 99-103.

**REDDIN, A. & PRENDEVILLE, G. N.** (1981). Effect of oils on the cell membrane permeability in *Fucus serratus* and *Laminaria digitata*. *Marine Pollution Bulletin*. **12**: 339-342.

**RIPPKA, R., & HERDMAN, M.** (1992). **Pasteur culture collection of cyanobacterial strains in axenic culture**. Catalogue & taxonomic handbook, vol. 1. Catalogue of strains. Institute Pasteur, Paris, France.

**ROOS, J. C. & VINCENT, W. F.** (1998). Temperature dependence of UV radiation effects on Antarctic cyanobacteria. *Journal of Phycology*. **34**: 118-125.

**ROSENBERG, E.; LEGMANN, R.; KUSHMARO, A.; TAUBE, R.; ADLER, E. & RON, E. Z.** (1992). Petroleum bioremediation – a multiphase problem. *Biodegradation*. **3**: 337–350.

**RUBERTO, L. A.M.; VAZQUEZ, S.; LOBALBO, A. & MAC CORMACK, W.P.** (2005). Psychrotolerant hydrocarbon-degrading *Rhodococcus* strains isolated from polluted Antarctic soils. *Antarctic Science*. **17** (1): 47–56.

**SAFONOVA, E. T.; DMITRIEVA, I. A. & KVITKO, K. V.** (1999). The interaction of algae with alcanotrophic bacteria in black oil decomposition. *Resources, Conservation and Recycling*. **27**:193–201.

**SÁNCHEZ, O.; FERRERA, I.; VIGUÉS, N.; OTEYZA, T. G.; GRIMALT, J. & MAS, J.** (2006). Role of cyanobacteria in oil biodegradation by microbial mats. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **64**: 659-664.

**SANTUCCI, K. & SHAH, B.** (2000). Association of naphthalene with acute hemolytic anemia. *Academic Emergence Medicine*. **7**: 42-47.

**SAUL, D. J.; AISLABIE, J. M.; BROWN, C. E.; HARRIS, L. & FOGHT J. M.** (2005). Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*. **53**: 141–155.

**SCHOFIELD, E. & AHMADJIAN, V.** (1971) *Field observations and laboratory studies of some antarctic cold desert cryptogams*. In M. W. Holdgate (Ed.), *Antarctic ecology*. Academic Press, New York. **2**: 97-142.

**SCHOPF, J. W. & WALTER, M. R.** (1982) Origin and early evolution of cyanobacteria: the geological evidence. In Carr, N. & Whitton, B. (eds) **The Biology of Cyanobacteria**. Vol 19. Blackwell Scientific Publications, Boston.

**SEMPLE, K. T.; CAIN, R. B. & SCHMIDT, S.** (1999). Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiology Letters*. **170**: 291-300.

**SIMON, M. J.; OSSLUND, T. D.; SAUNDERS, R.; ENSLEY, B. D.; SUGGS, S.; HARCOURT, A.; SUEN, W.C.; CRUDEN, D. L.; GIBSON, D. T.; & ZYLSTRA, G. J.** (1993). Sequences of genes encoding naphthalene dioxygenase in *Pseudomonas putida* strains G7 and NCIB9816-4. *Gene*. **127**: 31–37.

**SINGH, P. K.** (1975). Photoreactivation of UV-irradiated blue-green algae and algal virus LPP-1. *Archives in Microbiology*. **103**: 297- 302.

**SORKHOH, N. A.; AL-HASAN, R. H.; KHANAFER, M. & RADWAN, S. S. J.** (1995). Establishment of oil-degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil-polluted soil. *Applied Bacteriology*. **78** (2): 194-199.

**SORKHOH, N. A.; IBRAHIM, A. S.; GHANNOUM, M. A. & RADWAN, S. S.** (1993). High-temperature hydrocarbon degradation by *Bacillus stearothermophilus* from oil-polluted Kuwait desert. *Applied Environmental Microbiology*. **39**: 123–126.

- SORKHOH, N.; AL-HASAN, R. H.; RADWAN, S. S. & HÖPNER, T.** (1992). Selfcleaning of the Gulf. *Nature* **359**: 109.
- SPAIN, J. C.; PRITCHARD, P. H. & BOURQUIN, A. W.** (1980). Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/ water cores from estuarine and freshwater environments. *Applied Environmental Microbiology*. **40**: 726-734.
- SPAIN, J. C. & VAN VELD, P. A.** (1983). Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure. *Applied Environmental Microbiology*. **45**: 428-435.
- STAL, L.J.** (1995). Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytologist*. **131**: 1–32.
- STANIER, R. Y.; SISTROM, W. R.; HANSEN, T. A.; WHITTON, B. A.; CASTENHOLZ, R. W.; PFENNIG, N.; GORLENKO, V. N.; KONDRATIEVA, E. N.; EIMHJELLEN, K. E.; WHITTENBURY, R.; GHERNA, R. L. & TRÜPER, H. G.** (1978). Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **28**:335–336.
- STEINMAN, A. D. & MCINTIRE, C. D.** (1990) Recovery of lotic periphyton communities after disturbance. *Environmental Management*. **14**: 589–604.
- STOHS, S. J.; OHIA, S. & BAGCHI, D.** (2002). Naphthalene toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology*. **180**: 97-105.
- STRUBLE, V. G. & HARMON, H. J.** (1983). Molecular basis for inhibition of mitochondrial respiration by naphthalene. *Bulletin of Environmental Contam. Toxicology*. **31**:644-648.
- TAMAGNINI, P.; AXELSSON, R.; LINDBERG, P.; OXELFELT, F.; WÜNSCHERS, R. & LINDBLAD, P.** (2002). Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **66** (1): 1–20.
- TAMARU, Y.; TAKANI, Y.; YOSHIDA, T. & SAKAMOTO, T.** (2005). Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Applied and Environmental Microbiology*. **71** (11): 7327–7333.
- TANDEAU de MARSAC, N. & HOUMARD, J.** (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FMS Microbiology Reviews*. **104**: 119-190.
- TANG, E. P. Y.; TREMBLAY, R. & VINCENT, W. F.** (1997). Cyanobacterial dominance of polar freshwater ecosystems: are high-latitude mat-formers adapted to low temperatures? *Journal of Phycology*. **33**: 171-181.

- TANG, T. & ASATO, T.** (1978). Ultraviolet light induction and photoreactivation of thymine dimers in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Archives in Microbiology*. **118**:193-197.
- THOMAS, J. M.; YORDY, J. R.; AMADOR, J. A. & ALEXANDER, M.** (1986). Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds. *Applied Environmental Microbiology*. **52**: 290-296.
- TISSOT, B. P. & WELTE, D.H.** (1984). **Petroleum formation and occurrence**. 2Ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- TREADWAY, S. L.; YANAGIMACHI, K. S.; LANKENAU, E.; LESSARD, P. A.; STEPHANOPOULOS, G.; & SINSKEY, A. J.** (1999). Isolation and characterization of indene bioconversion genes from *Rhodococcus* strain I24. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **51**: 786–793.
- WARD, D. M.; FERRIS, M. J.; NOLD, S. C. & BATESON, M. M.** (1998). A natural view of microbial biodiversity within hot spring cyanobacterial mat communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **62** (4):1353–1370.
- WHITEHOUSE, B. G.** (1984) The effects of temperature and salinity on the aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Marine Chemistry*. **14**: 319–332.
- WHITTON, B. A. & KELLY, M. G.** (1995). Use of algae and other plants for monitoring rivers. *Australian Journal of Ecology*. **20**: 45–56.
- WIDDEL, F. & RABUS, R.** (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*. **12**: 259-276.
- WILLIAMS, P. A.; CATTERALL, F. A. & MURRAY, K.** (1975). Metabolism of naphthalene, 2-methylnaphthalene, salicylate, and benzoate by *Pseudomonas* PG: regulation of tangential pathways. *Journal of Bacteriology*. **124** (2): 679-685.
- WRIGHT, D. J.; SMITH, S. C.; JOARDAR, V.; SCHERER, S.; JERVIS, J.; WARREN, A.; HELM, R. F. & POTTS, M.** (2005). UV irradiation and desiccation modulate the three-dimensional extracellular matrix of *Nostoc commune* (Cyanobacteria). *The Journal of Biological Chemistry*. **280** (48): 40271–40281.
- WYNDHAM, R. C. & COSTERTON, J. W.** (1981). Heterotrophic potentials and hydrocarbon biodegradation potentials of sediment microorganisms within the Athabasca oil sands deposit. *Applied and Environmental Microbiology*. **41** (3): 783-790.
- WU, R. S. S.; SIU, W. H. L. & SHIN, P. K. S.** (2005). Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring. *Marine Pollution Bulletin*. **51**: 623–634.
- UNEP** (1991). **Report on the UN inter-agency plan of action for the ROPME Region, Phase I, initial survey and preliminary assessment**. Ocean and Coastal Area, Program Activity Center, United Nations Environmental Program, Nairobi.

- VAN BAALEN, C. (1968). The effects of ultraviolet irradiation on a coccoid blue-green alga: survival, photosynthesis, and photoreactivation. *Plant Physiology*. **43**: 1689-1695.
- VAN BEILEN, J. B.; PANKE, S.; LUCCHINI, S.; FRANCHINI, A. G.; RÖTHLISBERGER, M. & WITHOLT, B. (2001). Analysis of *Pseudomonas putida* alkane degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk* genes. *Microbiology*. **147**:1621–1630.
- VAN HAMME, J. D.; SINGH, A. & WARD, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67** (4): 503-549.
- VINCENT, W.F. (2000). Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Antarctic Science*. **12** (3): 374-385.
- VINCENT, W. F.; DOWNES, M. T.; CASTENHOLZ, R. W. & HOWARD-WILLIAMS, C. (1993 a). Community structure and pigment organisation of cyanobacteria-dominated microbial mats in Antarctica. *European Journal of Phycology*. **28**: 213–221.
- VINCENT, W. F.; CASTENHOLZ, R. W.; DOWNES, M. T. & HOWARD-WILLIAMS, C. (1993 b). Antarctic cyanobacteria: light, nutrients and photosynthesis in the microbial mat environment. *Journal of Phycology*. **29**: 745–755.
- VINCENT, W.F.; MUELLER, D. R. & BONILLA, S. (2004). Ecosystems on ice: the microbial ecology of Markham Ice Shelf in the high Arctic. *Cryobiology*. **48**: 103–112.
- VINCENT, W.F. AND QUESADA, A. (1994) Ultraviolet radiation effects on cyanobacteria: implications for Antarctic microbial communities. *Antarctic Research Series*. **62**: 111-124.
- VON WEDEL, R. J.; MOSQUERA, J. F.; GOLDSMITH, C. D.; HATER, G. R.; WONG, A.; FOX, T. A.; HUNT, W. T.; PAULES, M. S.; QUIROS, J. M. & WIEGAND, J. W. 1988. Bacterial biodegradation of petroleum hydrocarbons in groundwater: in situ augmented bioreclamation with enrichment isolates in California. *Water Science and Technology*. **20**: 501-503.
- XU, R. & OBBARD, J. P. (2003). Effect of nutrient amendments on indigenous hydrocarbon biodegradation in oil-contaminated beach sediments. *Journal of Environmental Quality*. **32**:1234–1243.
- YAKIMOV, M. M.; GENTILE, G.; BRUNI, V.; CAPPELLO, S.; D'AURIA, G.; GOLYSHIN, P. N. & GIULIANO, L. (2004). Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. **49**: 419–432.
- ZoBELL, C. E. (1946). Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriology Reviews*. **10**:1-49.

**ZUBKOV, M. V.; FUCHS, B. M. ; TARRAN, G. A.; BURKILL, P. H. & AMANN, R.** (2003). High rate of uptake of organic nitrogen compounds by *Prochlorococcus* cyanobacteria as a key to their dominance in oligotrophic oceanic waters. *Applied and Environmental Microbiology*. **69** (2): 1299–1304.

## ANEXO I

### 1 – Composição do meio de cultura AA4 (modificado por Corrêa, 2007)

O meio utilizado neste trabalho para o cultivo de cianobactérias é uma adaptação do meio AA4 (Allen & Arnon, 1955), na qual as soluções Fe-EDTA e solução de micronutrientes são substituídas pelas soluções de Fe-EDTA e A5 do meio BG-11 (Allen & Arnon, 1968).

<b>Solução A (- Pi)</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
NaCl	20 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	20 g
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	6 g
H <sub>2</sub> O (deionizada)	Completar p/ 1,5 L

<b>Solução B (+ Pi)</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 3H <sub>2</sub> O	28 g
H <sub>2</sub> O (deionizada)	Completar p/ 500 mL

<b>Solução A5 (Micronutrientes)</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g
MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	1,81 g
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,222 g
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,079 g
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,05 g
NaMoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O ou MoO <sub>3</sub> (85 %)	0,018 g
H <sub>2</sub> O (deionizada)	Completar p/ 1 L

<b>Solução Fe-EDTA</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Na<sub>2</sub> EDTA</b>	<b>0,1 g</b>
<b>Citrato férrico de amônia</b>	<b>0,6 g</b>
<b>Ácido cítrico. H<sub>2</sub>O</b>	<b>0,6 g</b>
<b>CaCl<sub>2</sub>. 2 H<sub>2</sub>O</b>	<b>3,6 g</b>
<b>H<sub>2</sub>O (deionizada)</b>	<b>Completar p/ 1 L</b>

Para preparar 1L de meio de cultura AA4 (modificado por Corrêa, 2007) devem ser utilizadas as seguintes alíquotas de cada solução estoque:

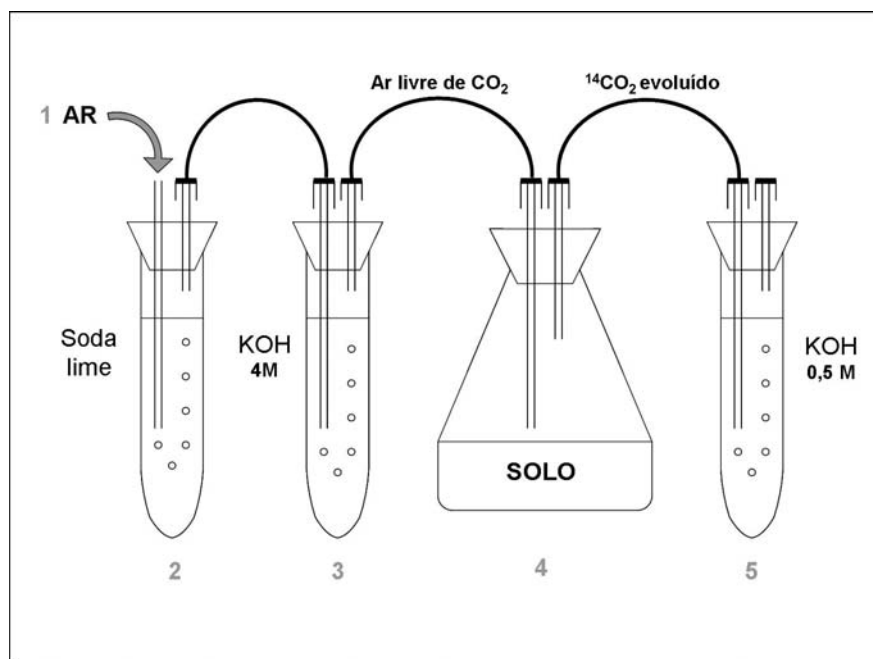
<b>Solução Estoque</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Solução A (- Fosfato)</b>	<b>25 mL</b>
<b>Solução B (+ Fosfato)</b>	<b>6,25 mL</b>
<b>Solução A5 (Micronutrientes)</b>	<b>1 mL</b>
<b>Solução Fe-EDTA</b>	<b>10 mL</b>
<b>H<sub>2</sub>O (deionizada)</b>	<b>Completar p/ 1 L</b>
<b>Para meio AA4 suplementado com nitrato</b>	
<b>KNO<sub>3</sub></b>	<b>0,256 g. L<sup>-1</sup></b>
<b>NaNO<sub>3</sub></b>	<b>0,212 g. L<sup>-1</sup></b>

Antes de autoclavado, o meio deve ter o pH ajustado para 7,2. O meio de cultura deve ser autoclavado à temperatura de 121°C, por vinte minutos. A solução B deve ser autoclavada separadamente dos demais componentes e, após a autoclavagem deve ser adicionada ao restante do meio, ainda quente, sob uma capela de fluxo laminar.

## ANEXO II

### 1 – Aparato respirométrico

O experimento de degradação de  $[C^{14}]$  naftaleno foi conduzido num sistema respirométrico, previamente descrito por Albuquerque (1995). O aparato consiste de: (1) uma fonte de ar comprimido; (2) um sistema de armadilhamento de  $CO_2$ , que visa tornar o ar que entra no sistema livre de  $CO_2$ , composto de uma armadilha seca (500 g de soda *lime*) e de (3) uma armadilha líquida (1 L de solução NaOH 4 M); (4) as amostras de solo que possuem uma entrada de ar (livre de  $CO_2$ ) e uma saída de ar (por onde o  $^{14}CO_2$  liberado pode escapar e ser capturado em (5)); e (5) um sistema de captura de  $^{14}CO_2$ , composto por armadilhas (uma para cada amostra de solo) contendo 14 mL de solução de KOH 0,5 M, as quais capturam o  $^{14}CO_2$  mineralizado de cada amostra de solo. A Figura 4 apresenta um esquema simplificado do aparato utilizado.



**Figura 4:** Esquema simplificado do aparato respirométrico.

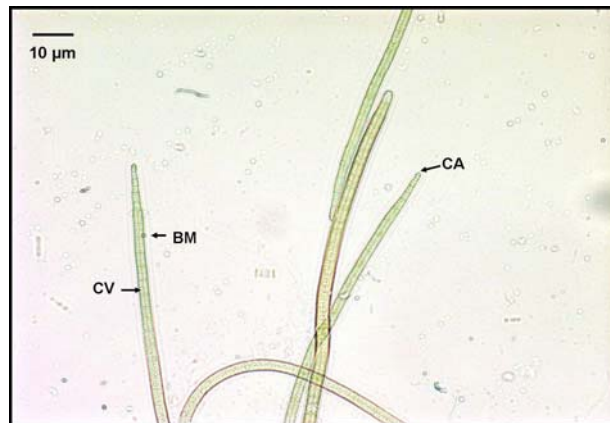
## **2 – Solo utilizado como substrato de crescimento em experimentos de biodegradação**

Foi utilizado nos experimentos de degradação, como substrato de crescimento para o biofilme de cianobactérias, o solo coletado próximo à Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), na Ilha Rei George, Antártica. O solo utilizado foi coletado à profundidade de 0-10 cm, e caracteriza-se por apresentar textura arenosa, baixa concentração de nitrogênio, alta concentração de fósforo e concentração natural de carbono orgânico total baixa. Um incidente durante a manipulação de diesel JP1, combustível comumente usado na geração de energia na EACF, levou à contaminação do solo no ponto amostrado, enriquecendo-o com carbono na forma de HCs. As concentrações máximas de naftaleno, encontradas na área amostrada, foram de 1,19 ng. g<sup>-1</sup> de solo seco (Oliveira, 2005).

### ANEXO III



**Figura 1:** Lago de degelo antártico, exibindo crostas formadas por biofilmes de cianobactérias e material sedimentado (à esquerda). E à direita, detalhes das bolhas de oxigênio formadas pela atividade das cianobactérias.



**Figura 2:** Filamentos de *Phormidium* sp. ANT 01. As setas indicam uma célula vegetativa (CV), uma célula apical (CA) e a bainha mucilaginosa (BM).