

VANDO JOSÉ MEDEIROS DE MIRANDA

**DEGRADAÇÃO DE NAFTALENO, FENANTRENO E
BENZO(A)PIRENO EM SOLOS E SEDIMENTOS DE AMBIENTES
COSTEIROS, OCEÂNICOS E ANTÁRTICOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

VANDO JOSÉ MEDEIROS DE MIRANDA

**DEGRADAÇÃO DE NAFTALENO, FENANTRENO E BENZO(A)PIRENO EM
SOLOS E SEDIMENTOS DE AMBIENTES COSTEIROS, OCEÂNICOS E
ANTÁRTICOS**

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

APROVADA: 30 de julho de 2008

Prof. Miriam A. Albuquerque
(Co-Orientadora)

Prof. Marcos Rogério Tótola
(Co-Orientador)

Pesq. Paulo Negrais C. Seabra

Prof. Eduardo de Sá Mendonça

Prof. Carlos Ernesto G.R. Schaefer
(Orientador)

Ao meu pai, **Raimundo Borgia de Miranda**,
pelo exemplo de superação e
carinho de todo dia

À minha mãe, **Eva do Carmo de Miranda**,
pelos cuidados,
pela vida

À minha irmã, **Valéria**
À **Liz Maria**

Dedico

"Como seria satisfatório viver sem remorsos, poder a cada instante enfrentar a própria mente e trazer à memória o bem que se fez aos semelhantes, não achando na própria conduta senão objetos agradáveis e plausíveis."

Paul Henri Dietrich Holbahr

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Solos, pela oportunidade de realização deste curso.

Ao professor Carlos Ernesto Gonçalves Reynaud Schaefer, mais do que um orientador, pela orientação, oportunidade e confiança.

À professora Miriam Abreu Albuquerque, pela co-orientação, compreensão, ensinamentos, constante apoio e incentivo durante a execução deste trabalho.

Ao povo brasileiro que, por meio de impostos, permitiu o auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

Ao professor Marcos Rogério Tótola, pela co-orientação, colaboração e sugestões apresentadas.

Aos professores Paulo Negrais Carneiro Seabra e Eduardo de Sa Mendonça, que participaram da banca de defesa desta dissertação, pelas sugestões e atenção.

À minha irmã Valéria, pela dedicação e confiança.

Aos “irmãos” André e Giovane.

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

Ao Caio e José João pelo auxílio na execução deste trabalho.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Solos, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Vando José Medeiros de Miranda, filho de Raimundo Borgia de Miranda e Eva do Carmo de Miranda, nasceu em 28 de dezembro de 1979, na cidade de Viçosa, Minas Gerais.

Formou-se Engenheiro Agrônomo pela Universidade Federal de Viçosa, MG, em outubro de 2006. No mesmo ano, iniciou o Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas pela Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	03
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
3.1 Hidrocarbonetos (HCs) e composição química do petróleo.....	04
3.2.1 Naftaleno.....	04
3.2.2 Fenantreno.....	05
3.2.3 Benzo(a)pireno.....	06
3.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e biodegradação.....	07
3.3 Fatores ambientais que influenciam a degradação de hidrocarbonetos.....	09
3.3.1 Concentração e estado físico do poluente.....	09
3.3.2 Temperatura.....	09
3.3.3 Oxigênio.....	10
3.3.4 Nutrientes.....	10
3.3.5 Salinidade	11
3.3.6 Atividade da água.....	11
3.3.7 pH.....	11
3.3.8 Matéria orgânica	12
3.4 Uso de microrganismos em processos de remediação de áreas impactadas por hidrocarbonetos.....	12
3.5 Metabolismo aeróbico de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs)....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Locais de coleta das amostras de solo.....	21
4.2 Amostragem de solos.....	23
4.3 Caracterização física e química dos solos.....	24
4.4 Reagentes químicos	24
4.5 Experimento de degradação de [C ¹⁴] naftaleno, [C ¹⁴] fenantreno e [C ¹⁴] Benzo(a)pireno.....	25
4.5.1 Aparato respirométrico.....	25
4.5.2 Experimento de degradação	25

4.5.3 Coleta e análise de amostras contendo $^{14}\text{CO}_2$	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Caracterização química e física.....	28
5.2 Degradação de Naftaleno.....	32
5.2.1 Solos do Brasil.....	32
5.2.2 Solos da Antártica.....	33
5.3 Degradação de Fenantreno.....	36
5.4 Degradação de Benzo(a)pireno.....	39
6. COMENTÁRIOS FINAIS.....	42
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRAFIAS.....	43

RESUMO

MIRANDA, Vando José Medeiros de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2008. **Degradação de Naftaleno, Fenantreno e Benzo(a)pireno em Solos e Sedimentos de Ambientes Costeiros, Oceânicos e Antárticos.** Orientador: Carlos Ernesto G. Reynaud Schaefer. Co-orientadores: Miriam Abreu Albuquerque e Marcos Rogério Tótola.

O petróleo representa a principal fonte de combustível da humanidade, e as operações de exploração, transporte, refino e distribuição representam fontes potenciais de poluição ambiental. Em ambientes contaminados, a degradação dos HPAs (Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos) depende de fatores climáticos, dos tipos de solo e das populações microbianas presentes. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de degradação dos hidrocarbonetos naftaleno, fenantreno e benzo(a)pireno em diferentes solos e sedimentos provenientes de regiões costeiras, oceânicas tropicais e polares (Antárticas). As amostras foram coletadas em três regiões, sendo (1) na ilha principal do Arquipélago de Fernando de Noronha, (2) no litoral do Prado, no sul da Bahia, e (3) nas Ilhas do Arquipélago Shetlands do Sul, Antártica. Após a obtenção das amostras de TFSA (Terra Fina Seca ao Ar), os solos foram submetidos a análises químicas e físicas, e foram montados experimentos de degradação através de respirometria, sendo testados os HPAs naftaleno, fenantreno e benzo(a)pireno. A maior degradação de naftaleno foi observada em solo contaminado por hidrocarbonetos derivados de petróleo, em Fildes (Antártica), a qual foi atribuída à seleção de populações microbianas eficientes na utilização desse HC. A maior degradação do fenantreno e do benzo(a)pireno nos solos do Brasil ocorreu na area P5 (Manguezal de Cumuruxatiba), sendo neste caso atribuído à maior disponibilidade de nutrientes. As taxas de degradação de fenantreno e benzo(a)pireno foram menores em comparação do que a do naftaleno, que possui menor peso molecular e maior solubilidade. Os resultados deste trabalho demonstram que os microrganismos presentes nos solos em estudo, onde não houve impacto conhecido de derramamento de óleo, não foram capazes de degradar eficientemente os hidrocarbonetos naftaleno, fenantreno e benzo(a)pireno, nas condições experimentais testadas. Nestes ambientes, as diferenças entre as taxas de degradação dos hidrocarbonetos se relacionam com os teores de COT (Carbono Orgânico Total) e NT (Nitrogênio Total).

ABSTRACT

MIRANDA, Vando José Medeiros de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July of 2008. **Degradation of Naphthalene, Phenanthrene e Benzo(a)pyrene in Soil and Sediments of Coastal, Oceanic and Antarctic Environments.** Adviser: Carlos Ernesto G. Reynaud Schaefer. Co-advisers: Miriam Abreu Albuquerque and Marcos Rogério Tótola.

Petroleum is the main source of fuel, and the operations of exploration, transportation, refining and distribution are potential sources of environmental pollution. In contaminated environments, the degradation of PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) depends on climatic factors, soil and microbial population. This study aimed to assess the potential for degradation of naphthalene, phenanthrene and benzo (a) pyrene hydrocarbons in different soils and sediments from coastal regions, both tropical and polar (Antarctica). The samples were collected in three regions, and (1) main island in the archipelago of Fernando de Noronha, (2) in the Prado coast, in southern Bahia, and (3) Islands in the South Shetlands archipelago, Antarctica. After obtaining samples of TFSA (Earth Thin Air Dried), the soils were submitted to physical and chemical analysis, and experiments were set to evaluate the degradation through respirometry, and tested the PAHs naphthalene, phenanthrene and benzo (a) pyrene. Most degradation of naphthalene was observed in soil contaminated by oil derived from oil, in Fildes (Antarctica), which was attributed to the selection of microbial populations in the efficient use of HC. The rates of degradation of phenanthrene and benzo (a) pyrene were lesser in comparison to naphthalene, which have lower molecular weight and greater solubility. The results of this study suggest that the microorganisms present in these soils, wherever there was no impact of oil spill, were not able to efficiently degrade the oil naphthalene, phenanthrene and benzo (a) pyrene, in experimental conditions tested. That would, after selection, the use of these microorganisms (adapted), the remediation of contaminants soluble in other similar areas of Antarctica. The differences between the rates of degradation of hidrocarbons relate to the levels of TOC (Total Organic Carbon) and TN (Total Nitrogen) soil of local non-contaminated.

1. INTRODUÇÃO

As preocupações com a conservação do meio ambiente têm crescido nos últimos anos, principalmente em países industrializados, em razão da consciência que tem sido construída nessas sociedades sobre a importância da qualidade ambiental como base para a preservação da vida. O petróleo representa a principal fonte de combustível da humanidade, e as operações de exploração, transporte, refino e distribuição representam fontes potenciais de poluição ambiental (Geraldes-Kataoka, 2001). A contaminação e a exploração contínua dos recursos hídricos têm sido o foco de atenção dos governos nas últimas duas décadas (Lopes, 2005), e a contaminação por derivados de petróleo é uma das mais significativas.

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos (HCs) e outros compostos orgânicos, incluindo alguns constituintes organometálicos que complexam vanádio e níquel, de forma particular (Van Hamme *et al.*, 2003). Atividades legais (e.g. produção e transporte de petróleo), assim como ações ilegais ou acidentais (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 aporte anual global de petróleo nos oceanos estava entre 1,7 a 8,8 milhões de toneladas métricas (Leahy & Colwell, 1990). Na última década, este aporte cresceu consideravelmente em função do grande aumento da produção de petróleo e derivados e de seu transporte. Em números, os petroleiros transportam anualmente cerca de 1.800 milhões de toneladas de óleo cru pelo mundo (IMO, 2004). Em termos percentuais, o petróleo e seus derivados respondem por cerca de 40% do comércio marítimo mundial (Intertanko, 2003).

São muitos os relatos de acidentes com derramamento de petróleo nas últimas décadas. O maior evento de contaminação ocorreu durante a Guerra do Golfo, em 1991, com o derramamento de seis milhões de barris de petróleo no Golfo Arábico (UNEP, 1991); como consequência, grande parte das comunidades animais e vegetais que habitavam a faixa costeira de 770 Km entre o sul do Kuwait até a Arábia Saudita, foram extintas (Barth, 2003).

Desde o início do século XX são conhecidas espécies de bactérias e fungos capazes de utilizar HCs como a única fonte de carbono na presença de oxigênio. Somente no fim da década de 80 foram identificados organismos que utilizam HCs em condições estritamente anaeróbias (Widdel & Rabus, 2001).

A capacidade metabólica que certos organismos possuem de transformar ou mineralizar contaminantes orgânicos em formas menos tóxicas, as quais passam a ser integradas aos ciclos biogeoquímicos naturais, é chamada de biodegradação. A biodegradação é o mecanismo primário através do qual petróleo e outros poluentes de natureza semelhante são eliminados do ambiente, sendo as populações indígenas de microrganismos as principais responsáveis pelo processo (Leahy & Colwell, 1990). Ao entrar em contato com o ambiente, o produto derramado começa a sofrer contínuos processos físicos e químicos decorrentes das condições ambientais locais como ventos, temperatura, intensidade luminosa, ondas e correntes (ITOPF, 2003). Dependendo da natureza do produto derramado, este tenderá a desaparecer ao longo do tempo ou a persistir no ambiente.

Em pesquisas relacionadas à remediação natural, estudos detalhados das condições do meio, da contaminação e do fluxo são fatores relevantes para a compreensão da migração de compostos orgânicos derivados de hidrocarbonetos no subsolo (Ramos *et al.*, 2003). Entre os ambientes mais afetados pela contaminação de HC, estão as praias e faixas costeiras de ilhas oceânicas tropicais e polares, onde se esperam encontrar variações no potencial de degradação em função de características do meio impactado e do ambiente (temperatura e umidade).

Como técnica derivada, a biorremediação é uma tecnologia de grande efetividade, de baixo custo e, algumas vezes, logisticamente favorável, que visa acelerar o processo natural de biodegradação de contaminantes pela otimização dos fatores que limitam este fenômeno (Allard & Neilson, 1997; Bhupathiraju *et al.*, 2002; D'annibale *et al.*, 2006; Mariano *et al.*, 2007).

O enriquecimento da biosfera e geosfera com poluentes orgânicos, como os HCs, em decorrência da atividade humana, torna necessário o desenvolvimento de: 1) programas de biomonitoramento, que através da identificação do potencial de degradação de diferentes compostos em diferentes ambientes, que nos permitam perceber 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.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi o de avaliar de forma exploratória o potencial de degradação dos hidrocarbonetos naftaleno, fenantreno e benzo(a)pireno em diferentes solos e sedimentos provenientes de diferentes regiões costeiras, oceânicas tropicais e polares (Antártica). Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a degradação de naftaleno, fenantreno e benzo(a)pireno, marcado com ^{14}C nos solos utilizando medida de evolução de $^{14}\text{CO}_2$.
- Correlacionar as características químicas e físicas dos diferentes solos com os dados de evolução de $^{14}\text{CO}_2$.

4. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Hidrocarbonetos e composição química do petróleo

Compostos que se constituem exclusivamente de carbono e hidrogênio são chamados hidrocarbonetos. 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 π) determinam a reatividade dos HCs (Widdel & Rabus, 2001).

A utilização de HCs como combustíveis e a síntese de uma grande variedade de outros compostos a partir destes, os tornam de grande importância para as sociedades industrializadas. Os HCs são naturalmente formados por processos geoquímicos de longa duração ou quimicamente sintetizados (Tissot & Welte, 1984).

O petróleo é uma mistura complexa de HCs e outros compostos orgânicos, incluindo alguns constituintes organometálicos que complexam vanádio e níquel, de forma particular (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).

3.2.1 Naftaleno

É um hidrocarboneto aromático dicíclico, cujas 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⁻¹, densidade de 1,14 g.cm⁻³ e solubilidade muito baixa em água (31,7 mg.L⁻¹). O naftaleno sublima facilmente à temperatura ambiente (HSDB, 1999).

O naftaleno 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 antiséptico de uso tópico veterinário (NTP, 2000).

Foi considerado, em conjunto com outros HPAs, 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 (Chichester *et al.*, 1994; Stohs *et al.*, 2002). 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 e formação de catarata, e danos seletivos às 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).

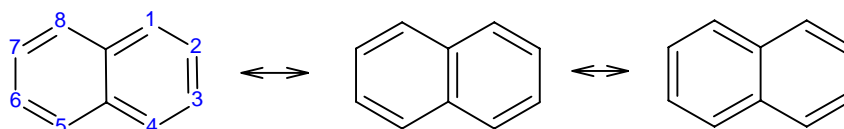


Figura 1. Estrutura química do naftaleno e suas estruturas de ressonância. As posições 1,4,5 e 8 indicadas na figura são chamadas posições *alpha* e as posições 2,3,6 e 7 são denominadas posições *beta*.

3.2.2 Fenantreno

Fenantreno é um hidrocarboneto aromático polinuclear, cristalino, isômero do antraceno, obtido principalmente da fração de óleo de antraceno do alcatrão de hulha e também sinteticamente (**Figura 2**). Pertence à classe dos compostos orgânicos semi-voláteis, formados por anéis benzênicos ligados de forma linear, angular ou agrupados, contendo somente carbono e hidrogênio (Lundstedt, 2003). Considerado um poluente prioritário devido à sua toxicidade, persistência e predominância no meio ambiente (U.S. EPA, 2008).

Entre os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, o antraceno e o fenantreno são os menos reativos e, apesar de apresentarem o mesmo número de anéis, possuem energia de ressonância de 84 e 91 Kcal/mol, respectivamente (Wade, 1995).

O naftaleno e o fenantreno, que ainda não têm efeito carcinogênico comprovado, se ingeridos, são facilmente absorvidos no intestino e extensivamente transformados em fenóis, di-hidrodióis e ácidos mercaptúricos (Costa, 2001).

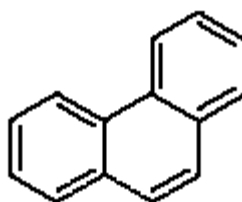


Figura 2. Estrutura química do fenantreno.

De acordo com Moody *et al.* (2001), o antraceno e o fenantreno não oferecem risco ao homem como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de maior peso molecular, porém podem ser tóxicos aos peixes e algas. São considerados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos típicos e indicadores da presença de outros mais perigosos, como o benzo(a)pireno. Por isso, são largamente utilizados para a verificação dos fatores que afetam a biodisponibilidade, a biodegradabilidade potencial e a taxa de biodegradação no meio ambiente.

Bactérias, fungos e clorófitas podem degradar compostos xenobióticos como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Loibner *et al.*, 2003). As *Sphingomonas sp.* conseguem degradar o fenantreno, assim como as *Mycobacterium sp.* e as *Nocardia sp.* (Loibner *et al.*, 2003).

3.2.3 Benzo(a)pireno

O benzo(a)pireno ao contrário do benzeno, é um composto pouco volátil (**Figura 3**). Quando presente no solo, apresenta mobilidade baixa. Quando presente na água, é pouco solúvel e adsorve aos sólidos suspensos e ao sedimento na coluna d'água. Poucos gêneros de microrganismos foram identificados como degradadores deste composto. Estudos mostraram que o tempo de meia vida para a mineralização por meio da biodegradação variou entre 200 e 300 semanas (HSDB, 2003b). É considerado o composto mais carcinogênico dentre os HPAs. Em alguns estudos de toxicidade em ratos, mostrou-se embriotóxico, teratogênico e causou diminuição na fertilidade

(Cheminfo, 2004). Dentre os HPAs, é o composto mais resistente à foto-oxidação, enquanto o benzo(a)antraceno, o mais sensível.

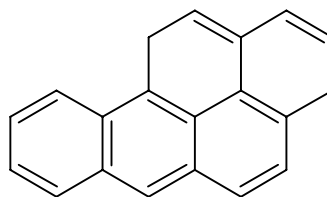


Figura 3. Estrutura química do benzo(a)pireno.

3.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e biodegradação

Os hidrocarbonetos diferem quanto à susceptibilidade ao ataque de microrganismos. As taxas de biodegradação de HCs têm se mostrado mais altas para os saturados, seguidas pelos aromáticos de baixo peso molecular e pelos aromáticos de alto peso molecular, sendo que os compostos polares exibem as menores taxas de biodegradação (Leahy & Colwell, 1990).

Os HPAs são compostos por anéis aromáticos com ou sem ramificações saturadas, que configuram um classe importante de compostos orgânicos presentes no petróleo, apesar de sua baixa concentração em relação aos outros hidrocarbonetos. Sua importância recai no fato de serem compostos com menor susceptibilidade à degradação no meio ambiente, constituindo assim uma classe de marcadores geoquímicos ambientais extensamente utilizada nos estudos científicos, permitindo sua aplicação em investigações forenses (Meniconi & Barbanti, 2007).

Os HPAs podem provocar alterações nos organismos, na ressuspensão, na porosidade, na mineralização, no aumento da concentração de matéria orgânica e potencial redox do sedimento (Berge *et al.*, 1987). A extensão destes efeitos será função da quantidade de hidrocarbonetos presente e das características do sedimento e da água subjacente ao mesmo.

A intensidade de biodegradação dos HPAs é influenciada por diversos fatores como disponibilidade de nutrientes, oxigênio, pH, composição, concentração, biodisponibilidade do poluente, características físico-químicas e do histórico de contaminação da área (Margesin & Schinner, 2001). A degradação dos HPAs no solo pode ser limitada ainda pela incapacidade dos microrganismos autóctones em

metabolizar eficientemente esses compostos, dado a sorção do contaminante à fase sólida mineral e orgânica do solo (Johnsen *et al.*, 2005).

A biodegradação de áreas contaminadas com HCs pode ser estimulada pela fertilização com nitrogênio, fósforo e fontes de ferro, já que nas áreas poluídas ocorre um desbalanço na proporção de carbono orgânico em relação a outros nutrientes (Leahy & Colwell, 1990; Ericksson *et al.*, 2003; Coulon *et al.*, 2005).

Regiões impactadas por derramamentos de petróleo e derivados são colonizadas, geralmente, por biofilmes compostos predominantemente por cianobactérias, em termos de biomassa (Höpner *et al.*, 1996; Radwan *et al.*, 2001; Barth, 2003). Biofilmes são comunidades microbianas organizadas espacialmente em lâminas sobrepostas resultantes de gradientes físico-químicos (Sánchez *et al.*, 2006). O fato de que as células ficam imobilizadas no biofilme permite um contato direto dos microrganismos com o poluente, o que é um dos requisitos essenciais para a biodegradação (Grötzschel *et al.*, 2002). O papel das cianobactérias em criar um microclima rico em oxigênio e nutrientes, nas proximidades da porção externa da parede celular, é de grande importância para a sustentação de outras comunidades de bactérias heterotróficas, já que nutrientes como o nitrogênio e o oxigênio são pré-requisitos para o sucesso do processo de degradação aeróbia dos HCs (Rosenberg *et al.*, 1992; Safonova *et al.*, 1999; Abed & Köster, 2005). Biofilmes de cianobactérias são extremamente desenvolvidas nos solos costeiros da Antártica (Corrêa, 2007).

Os manguezais desenvolvem-se sobre um substrato formado a partir do transporte de sedimentos oriundos dos rios e oceanos. Segundo Almeida *et al.* (2001), o encontro de águas doces e salgadas, na região estuarina, faz com que os sedimentos transportados percam velocidade e se unam através de processos físico-químicos formando grumos, o que implica em aumento do peso das partículas que decantam, formando um sedimento composto basicamente por silte, argila e matéria orgânica. Este ecossistema desempenha diversas funções naturais de grande importância ecológica e econômica. Eles são agentes depuradores, funcionando como filtro biológico em que bactérias aeróbias e anaeróbias condicionam a matéria orgânica e o solo, promovendo a fixação e a neutralização de partículas contaminantes (Ramos *et al.*, 2003).

3.3 Fatores ambientais que influenciam a degradação de hidrocarbonetos

3.3.1 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. Nessas 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 biossurfactantes 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 fenantreno, as taxas de mineralização devem ser relativas à fração solubilizada e não às concentrações totais do poluente (Thomas *et al.*, 1986).

3.3.2 Temperatura

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

A biodisponibilidade e solubilidade dos HCs menos solúveis, como os alifáticos e HPAs, 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, dado o aumento da fluidez das membranas celulares.

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.*, 2005; Coulon *et al.*, 2006; Delille *et al.*, 1998; Eriksson *et al.*, 2003; Ruberto *et al.*, 2005), além de solos altas montanhas

(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).

3.3.3 Oxigênio

As etapas iniciais do catabolismo de alcanos, HCs cíclicos e HPAs 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, cuja degradação pode levar à depleção do O₂ (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 anaeróbias, tem sido identificado (Widdel & Rabus, 2001; Van Hamme *et al.*, 2003). 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 β -oxidações modificadas transformam o benzilsuccinato em benzil-CoA, que é o intermediário central na via de degradação anaeróbia 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).

3.3.4 Nutrientes

A liberação de HCs no ambiente geralmente leva a um aumento da razão carbono/nitrogênio e/ou carbono/fósforo. 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[®], estimulam a degradação de petróleo e HCs individuais em ambientes aquáticos e terrestres (Leahy & Colwell, 1990; Coulon *et al.*, 2005). Entretanto, resultados conflitantes podem aparecer, o que provavelmente se deve às especificidades de cada ambiente, no que se refere a teores de nutrientes no solo, tipo de contaminante e população microbiana (Leys *et al.*, 2005).

3.3.5 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 HPAs (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 totalmente 0,1 g.L⁻¹ de fenol, utilizando-o como única fonte de carbono, num período de treze horas em presença de 1-14% (p/v) de NaCl.

3.3.6 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 com 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 microbianos (Leahy & Colwell, 1990).

3.3.7 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). Muitas espécies de fungos desenvolvem-se em amplas faixas de pH. Bactérias e actinomicetos são dominantes em

solo de pH próximo ao neutro, já os fungos geralmente dominam as áreas com baixo pH (Alexander, 1980).

3.3.8 Matéria orgânica (MO)

A atividade microbiana depende principalmente da disponibilidade de substratos orgânicos do solo. Portanto, altas taxas de degradação são esperadas em solos com altos teores de MO (Hurle & Walker, 1980). Os grupamentos carboxílicos (-COOH), fenólicos (-OH), metoxílicos (-OCH₃) e amino, são distribuídos pela superfície da matéria orgânica, fornecendo sítios ativos para ligações de transferência de carga, partição hidrofóbica em adição à troca iônica, pontes de hidrogênio e adsorção por forças de Van der Waals. A qualidade da matéria orgânica é mais importante para a atividade microbiana do que a quantidade presente no solo.

3.4 Uso de microrganismos em processos de remediação de áreas impactadas por hidrocarbonetos

Desde o início 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 seqüência de degradação de hidrocarbonetos no solo é determinada por uma sucessão de microrganismos. Microrganismos degradadores de alcanos, com rápidas taxas de crescimento, competem com os decompositores de lento crescimento de hidrocarbonetos mais recalcitrantes pelos recursos nutricionais até a exaustão dos primeiros (Heely *et al.*, 1992). Estes organismos são então substituídos por microrganismos com lenta taxa de crescimento, mas grande flexibilidade metabólica para degradar os hidrocarbonetos mais recalcitrantes. A relativa biodegradabilidade dos hidrocarbonetos tem sido reportada (em ordem de decréscimo de degradabilidade): alcanos lineares (C10 a C19), gases (C2 a C4), alcanos (C5 a C9), alcanos ramificados com até 12 carbonos, alcenos (C3 a C11), alcenos ramificados, aromáticos e cicloalcanos. A tendência é encontrar menos microrganismos com o aumento da dificuldade de degradação (Heely *et al.*, 1992).

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).

A biodegradação pode não ser eficiente se estiverem presentes substratos facilmente degradáveis no solo contaminado, pois estes serão utilizados preferencialmente, impedindo a indução das enzimas capazes de degradar o poluente mais complexo (Corseuil & Alvarez, 1996). Porém, em proporções adequadas, um substrato de fácil degradação pode servir de fonte de energia principal para os microrganismos, sendo o de difícil degradação co-metabolizado (Phlippi, 2001).

Dentre as bactérias, os gêneros que possuem maquinaria enzimática capaz de degradar HCs aerobicamente são: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Burkholderia* e *Sphingomonas*, entre outros (Jacques *et al.* 2007). 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 ceticum* (Van Hamme *et al.*, 2003). Dentre os fungos, são citados: *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-se isolados com potencial para serem usados em processos de biorremediação (Heitkamp *et al.*, 1987). Heitkamp *et al.* (1987), analisando a capacidade de degradação do [C¹⁴] naftaleno por microrganismos de três amostras de solos, com diferentes históricos de contaminação, obtiveram uma 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 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 aeróbia 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).

Bossert *et al.* (1984) estudaram o destino dos hidrocarbonetos durante a disposição de borra oleosa no solo. Concluíram que a aplicação de borra oleosa é rapidamente seguida por um aumento na atividade de biodegradação dos hidrocarbonetos e que a mineralização é o mecanismo predominante durante a fase ativa do processo de *landfarming* (uso de técnicas agrícolas para aumentar a atividade decompositora e tratar resíduos *in situ* em condições aeróbias).

Novotný *et al.* (2000) investigaram a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos pelos fungos *Irpex lacteus*, pertencentes ao grupo de espécies de fungos da podridão branca, os quais removeram eficientemente hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de três e quatro anéis, presentes em meio líquido e no solo. Em três meses, os fungos *Irpex lacteus* degradaram 37% de fenantreno, 49% de antraceno, 25% de fluoranteno e 52% de pireno, presentes numa concentração de 400 µg de HPA em 6g de solo, contendo 0,8% de carbono orgânico e 0,08% de nitrogênio total.

3.5 Metabolismo aeróbio de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

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

O metabolismo microbiano de muitos HCs já foi elucidado em nível de vias metabólicas e de controle dos processos enzimáticos e genéticos envolvidos em sua utilização. Esses estudos têm se concentrado no papel degradativo de bactérias (Kiyohara *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2002) e fungos (Cerniglia, 1997).

A degradação bacteriana de HPAs normalmente inclui a formação de um diol, seguida da clivagem do anel, e da formação de um diácido como o ácido mucônico (**Figura 4**) (Ensley & Gibson, 1983). Em contraste, a oxidação de compostos aromáticos em eucariotos leva à formação de um *trans*-diol (Cerniglia & Gibson, 1977).

Narro *et al.* (1992a) 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 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 5**).

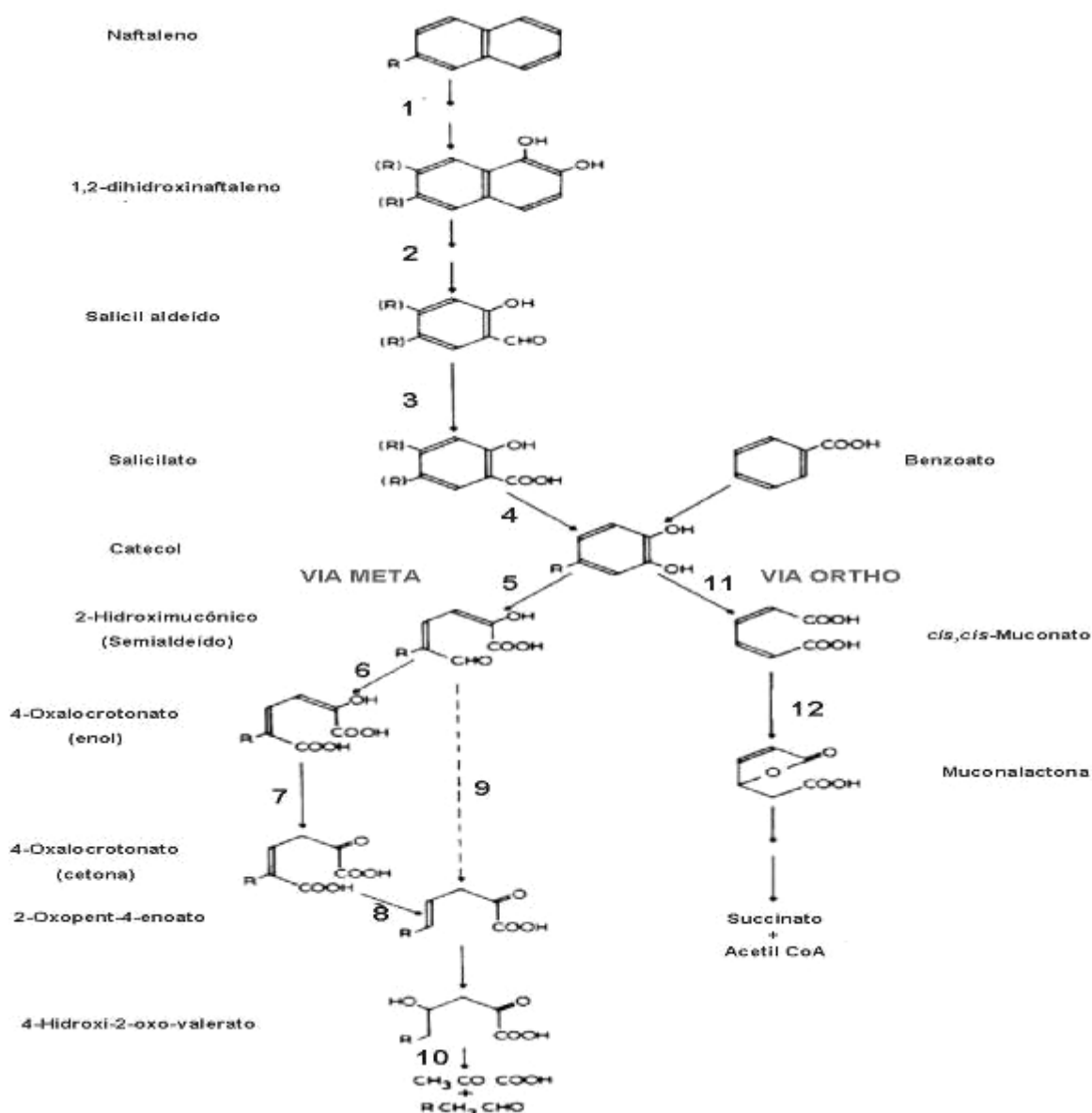


Figura 4. Esquema das duas vias metabólicas principais do naftaleno em *Pseudomonas* sp. PG. Para o naftaleno R = H (Adaptado de Williams *et al.*, 1975).

Até recentemente, a maior parte do que se conhecia sobre a regulação gênica do processo de degradação de HPAs 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 HPAs, 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 *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, *nagRAaGHAbAcAdBFCQEDJ* (Jeon *et al.*, 2006).

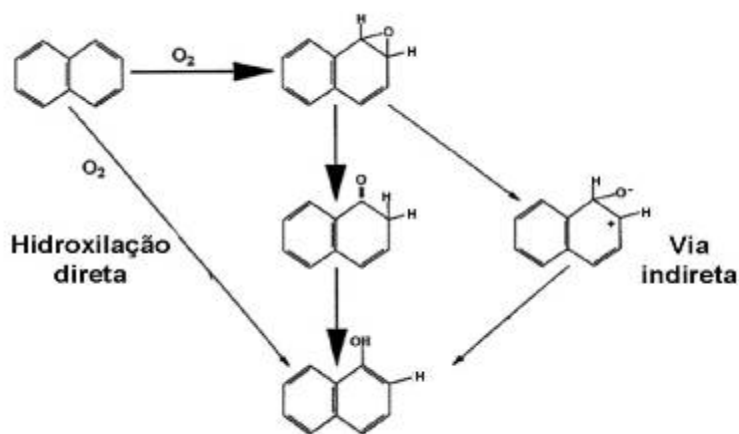


Figura 5. Mecanismos postulados para a formação de 1-naftol a partir do naftaleno pela cianobactéria marinha *Oscillatoria* sp. JCM (Adaptado de Narro *et al.*, 1992 b).

De acordo com Ouyang (2004), o fenantreno pode ser degradado por bactérias presentes no solo através de duas rotas metabólicas. Numa delas, o ácido 1-hidroxi-2-

naftóico é oxidado a 1,2-dihidroxi-naftaleno, que é degradado via rota metabólica do naftaleno até salicilato. Na outra rota, o anel do ácido 1-hidroxi-2-naftóico é clivado e metabolizado via rota metabólica do ftalato. Isso demonstra que o naftaleno e o fenantreno têm rotas metabólicas em comum durante sua degradação.

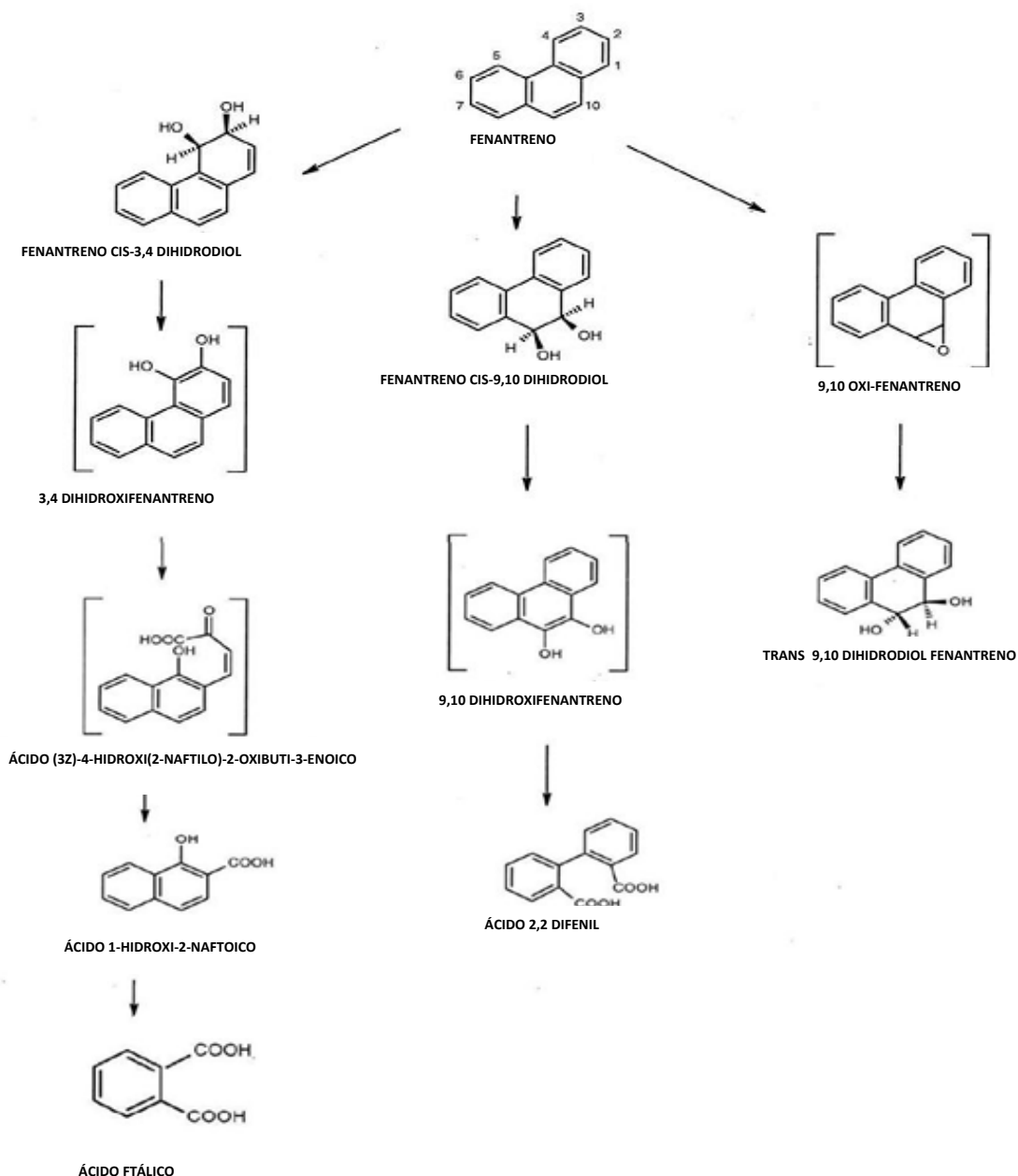


Figura 6. Rota metabólica da biodegradação do fenantreno por bactérias *mycobacterium sp.*, isoladas de sedimento estuarino contaminado por óleo (Moody *et al.*, 2001).

A rota metabólica da biodegradação do fenantreno por bactérias *Mycobacterium sp.*, isoladas de sedimento estuarino contaminado por óleo, foi identificada por Moody *et al.* (2001). Após 14 dias, houve biodegradação de 90% do fenantreno, inicialmente presente numa concentração de 0,2 µg/mL. Foram identificados os seguintes metabólitos: cis-3,4-dihidroxi-3,4-dihidroxifenantreno e cis-9,10-dihidroxi-9,10-dihidroxifenantreno (**Figura 6**), que tiveram seu teor aumentado entre 4 e 8 horas de incubação e que entre 8 e 32 horas foram degradados totalmente. Após 8 horas de incubação, o ácido 2,2-difenílico começou a se acumular e permaneceu após 96 horas. Mais dois produtos da fissão dos anéis aromáticos foram identificados: os ácidos 1-hidroxinaftol e ftálico.

Loibner *et al.* (2003) investigaram a taxa de biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em dois tipos de solo, com e sem adição de microrganismos, durante vinte e três semanas. As amostras de solo foram contaminadas com uma mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos contendo naftaleno, fenantreno, fluoreno, pireno e perileno. Num solo siltoso, rico em matéria orgânica e com alta atividade microbiana, ocorreu degradação de certos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos pelos microrganismos nativos. Já num solo arenoso ácido, com diferentes tamanhos de partículas de areia e baixo teor de matéria orgânica, não houve degradação pelos microrganismos nativos no período de 23 semanas. Nos dois casos, a adição de 2% de lodo ativado possibilitou a quase total biodegradação do fenantreno, do fluoreno e do pireno (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com até quatro anéis) e decaimento do perileno (cinco anéis). A redução do naftaleno ocorreu por volatilização do contaminante, pois os resultados para as amostras de solo com microrganismos nativos e exógenos foram iguais aos obtidos para as amostras com solo esterilizado.

Boyd & Montgomery (2003) investigaram os fatores O₂ dissolvido, temperatura, concentração e matéria orgânica na biodegradação do naftaleno, do fenantreno e do fluoranteno, por microrganismos indígenas, em sedimentos de mangue contaminado. Os autores concluíram que até concentrações de 200 µg g⁻¹ de mistura desses hidrocarbonetos e 40 µg g⁻¹ de fenantreno, não houve inibição na biodegradação.

Ouyang & Fitzgerald (2003) verificaram o metabolismo do fenantreno por fungos. O *Phanerochaete chrysosporium* metabolizou o fenantreno em trans-3,4 e 9,10-dihidrodióis e o *Cunninghamella elegans*, em trans-1,2 e 3,4-dihidrodióis, resultantes da ação sucessiva das monoxigenases e epóxi-hidrolases. Os trans-dihidrodióis sofreram desidratação e formaram os fenantróis. Os produtos finais resultantes da detoxificação

do fenantreno por *Phanerochaete chrysosporium* e *Cunninghamella elegans* foram 9-fenantril-beta-D-glucopiranoside e 1-fenantril-beta-D-glucopiranoside, respectivamente.

O metabolismo benzo(a)pireno, tal como dos outros HPAs, ocorre em todos os tecidos e envolve várias vias metabólicas com vários graus de atividade enzimática. As atividades e as afinidades das enzimas num dado tecido determinam qual a via metabólica que prevalece.

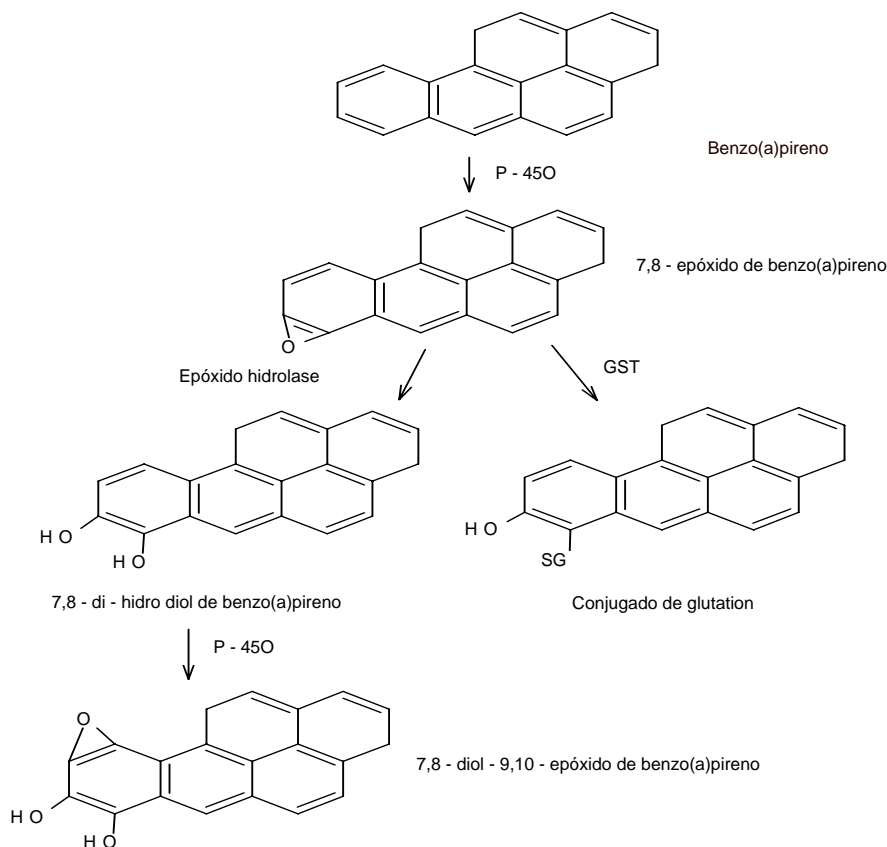


Figura 7. Representação esquemática simplificada do metabolismo do benzo(a)pireno.

O benzo(a)pireno é metabolizado inicialmente pelo citocromo P450 a óxidos de areno (**Figura 7**). Uma vez formados, estes podem sofrer rearranjo espontâneo e dar fenóis, suportando hidratação até aos correspondentes trans-dihidrodióis numa reação catalizada pela epóxido hidrolase microsossomal, ou reagir covalentemente com a glutatona, quer espontaneamente ou numa reação catalizada pela glutatona S-transferase citosólica. O citocromo P-450 metaboliza o 4,5-di-hidrodiol de benzo(a)pireno a um número de metabólitos não caracterizados, enquanto o 9,10-dihidrodiol é metabolizado predominantemente ao seu derivado 1- e/ou 3-fenol com apenas pequenas quantidades formadas de 7,8-diol-9,10-epóxido. Em contraste com o

9,10-diol, o 7,8-diol de benzopireno é metabolizado a 7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido, e a via de formação fenol-diol é menor. Os diol epóxidos podem ser conjugados com glutathione quer espontaneamente quer por uma reação catalizada por glutathione S-transferase. Também podem hidrolisar espontaneamente a tetraois (ATSDR, 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Locais de coleta das amostras de solo

As amostras foram coletadas em três regiões, sendo uma na ilha principal do Arquipélago de Fernando de Noronha, uma em praia da região do Prado, no sul da Bahia, e uma nas Ilhas do Arquipélago Shetlands do Sul, Península Antártica. Em Noronha (**Figura 8**), foram selecionadas quatro áreas: Praia do Leão (P-1): ($3^{\circ} 52' 10''$ S/ $32^{\circ} 26' 16''$ W), área de proteção e local de desova de tartaruga marinha; Baía Sueste (P-2): ($3^{\circ} 52' 51''$ S/ $32^{\circ} 25' 26''$ W), área de proteção de manguezal arenoso; Praia de Atalaia (P-3): ($3^{\circ} 51' 20''$ S/ $32^{\circ} 25' 33''$ W), área de proteção com controle rigoroso permanente; Baía e Porto de Santo Antônio (P-4): ($3^{\circ} 50' 48''$ S/ $32^{\circ} 24' 01''$ W), principal porto da ilha.

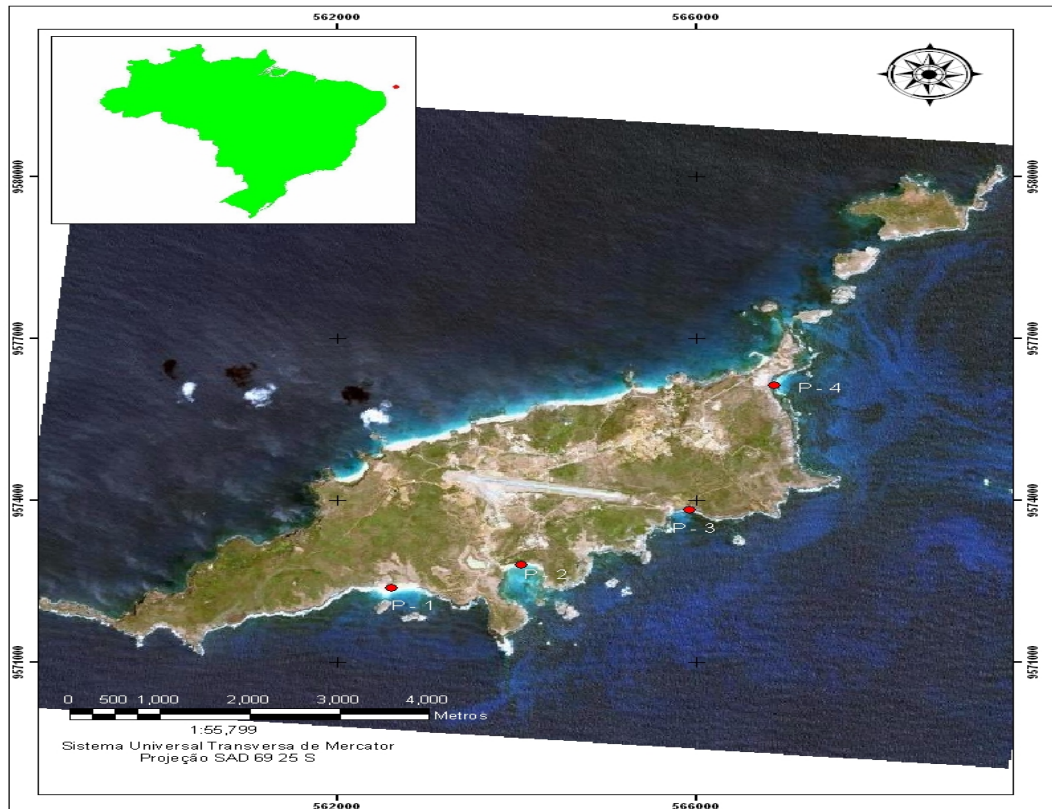


Figura 8. Mapa de localização geográfica das amostras da ilha principal do Arquipélago de Fernando de Noronha.

No Prado (Cumuruxatiba), foi coletada uma amostra de mangue (P-5), ($17^{\circ} 07' 11,68''$ S/ $39^{\circ} 11' 13,41''$ W) e uma no cordão arenoso (P-6), ($17^{\circ} 07' 01,15''$ S/ $39^{\circ} 11' 06,04''$ W) (**Figura 9**).

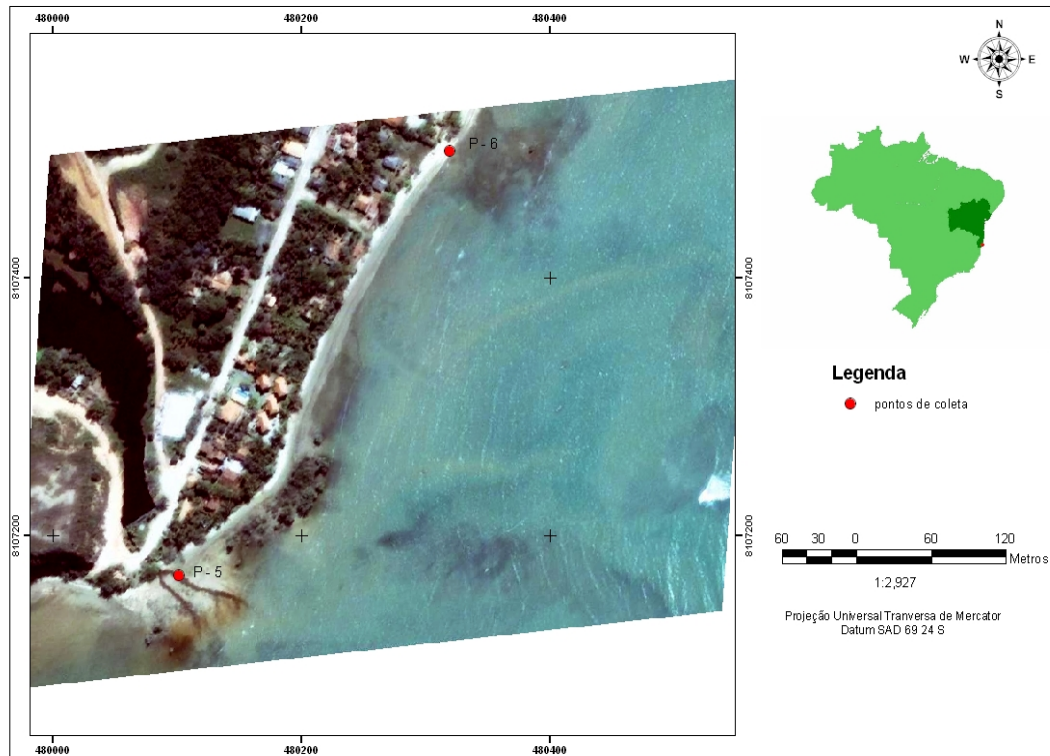


Figura 9. Mapa de localização geográfica das amostras de Prado (Cumuruxatiba).

Na Antártica, as amostras de solo foram coletadas durante as Operações Antárticas Brasileiras XXV (janeiro/fevereiro de 2007) e XXVI (fevereiro/março de 2008) nas regiões das Penínsulas Byers e Ponta Telefon; e Potter e Fildes, respectivamente (**Figura 10**). Em Potter, foram coletadas três amostras, a saber: amostra P-7, correspondente a um solo ornitogênico antigo em Ponta Stranger, ($62^{\circ}15'35.03''$ S/ $58^{\circ}36'59.04''$ W); amostra P-8, correspondente a um Regossolo coberto por algas na praia/terraço marinho atual, ($62^{\circ}15'24.08''$ S/ $58^{\circ}36'54.65''$ W); amostra P-9, correspondente a um Regossolo ornitogênico de basalto/terraço soerguido, ($62^{\circ}15'24.38''$ S/ $58^{\circ}37'23.14''$ W). Na Península Byers, coletou-se uma amostra em Regossolo Gélico com algas na Ilha Livingstone (P-10), ($62^{\circ}39'37.82''$ S/ $61^{\circ}05'34.98''$ W). Em Ponta Telefon, a amostra (P-11) foi coletada em área caracterizada pela presença de um solo ornitogênico que recebe sprays marinhos, ($62^{\circ}15'26.62''$ S/ $58^{\circ}37'32.70''$ W) e, em Fildes (P-12), a coleta foi realizada em local de armazenamento de combustível da Estação Antártica de Pesquisa China, fortemente impactado, ($62^{\circ}13'11.32''$ S/ $58^{\circ}57'22.55''$ W).

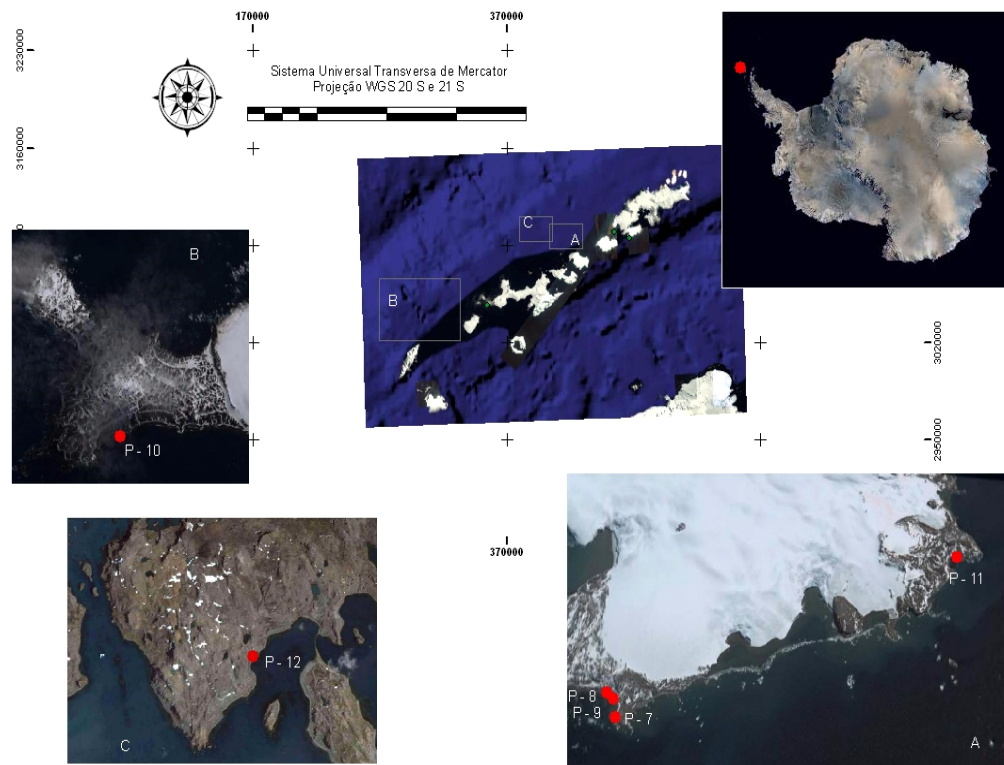


Figura 10. Mapa de localização geográfica das amostras nas Ilhas do Arquipélago Shetlands do Sul, Península Antártica

4.2 Amostragem de Solos

Após a seleção e identificação das áreas de amostragens, os solos foram coletados em tubos de PVC (10 cm de diâmetro x 15 cm de altura) em Fernando de Noronha e Cumuruxatiba e em recipientes plásticos na Antártica. Após a coleta, as amostras foram imediatamente levadas ao laboratório para estocagem em condições ambiente. As análises químicas, físicas e respirométricas, foram realizadas a partir das amostras compostas obtidas de quatro amostras simples para os solos de Fernando de Noronha e Cumuruxatiba, e amostras simples para os solos da Antártica. Para as análises respirométricas e de solo, de Fernando de Noronha e Cumuruxatiba, as profundidades das amostragens foram de 2 a 5 cm e 5 a 10 cm do tubo, respectivamente. Já para os solos Antárticos, as profundidades para as análises foram de 0 a 10 cm para os pontos 7, 8, 9 e 12, 0 a 3 e 10 a 20 cm para os pontos 10 e 11, respectivamente. A população de microrganismos psicrófilos da Antártica deve ter sofrido alguma redução durante a sua manipulação no ambiente de 25°C.

4.3 Caracterização química e física

Após a coleta, as amostras dos solos (TFSA) foram acondicionadas em recipientes plásticos, e conduzidas ao laboratório de análises de solos da Universidade Federal de Viçosa onde foram submetidas à caracterização química e física.

Foram determinados pH em água (1:2,5) por potenciometria, e acidez trocável (Al^{3+}), extraído com KCl $1\ mol\ L^{-1}$ e quantificado por titulometria com hidróxido de sódio $0,025\ mol\ L^{-1}$ padronizado com biftalato de potássio (EMBRAPA, 1997). O fósforo, sódio e potássio foram extraídos com o extrator Mehlich -1 e determinados por colorimetria para fósforo (Braga & Defelipo, 1974) e fotometria de chama para sódio e potássio. Cálcio e magnésio foram extraídos com KCl $1\ mol\ L^{-1}$ e determinados por espectrofotometria de absorção atômica (Embrapa, 1997).

Na determinação dos teores de COT (Carbono e Nitrogênio Total), as amostras de solo foram trituradas em almofariz e passadas em peneira de malha de 0,21 mm. COT foi quantificado por oxidação úmida, empregando-se a solução de dicromato de potássio em meio ácido, com fonte externa de calor (Yeomans & Bremner, 1988). O nitrogênio foi determinado por meio da digestão sulfúrica, seguida de destilação Kjeldahl (Bremner & Mulvaney, 1982). A granulometria do solo foi determinada pelo método da pipeta, com dispersão do solo promovida pela agitação mecânica em alta rotação e meio alcalino ($NaOH$ $0,1\ mol\ L^{-1}$), sem proceder a destruição prévia da matéria orgânica. As densidades do solo e das partículas foram determinadas pelo método do anel volumétrico e balão volumétrico, respectivamente, e a umidade equivalente pelo método da centrífuga (Embrapa, 1997).

4.4 Reagentes químicos

Soluções metanólicas de $[C^{14}]$ naftaleno-benzeno, $[C^{14}]$ fenantreno e $[C^{14}]$ benzo(a)pireno (uniformemente marcado), com atividade específica de 31,3, 26,6 e 8,2 $mCi\ mL^{-1}$, respectivamente, o coquetel de contagem em cintilação líquida (Sigma High Performance LSC Cocktail) e o hidróxido de potássio (KOH) foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA).

4.5 Experimento de degradação de [C¹⁴] naftaleno, [C¹⁴] fenantreno e [C¹⁴] benzo(a)pireno

4.5.1 Aparato respirométrico

Os experimentos de degradação de [C¹⁴] naftaleno, [C¹⁴] fenantreno e [C¹⁴] benzo(a)pireno foram conduzidos num sistema respirométrico, previamente descrito por Albuquerque (1995). O aparato consiste de: (1) uma fonte de ar comprimido; (2) um sistema de captura de CO₂, que visa tornar o ar que entra no sistema livre de CO₂, composto de uma armadilha seca (500 g de soda *lime*), (3) o compartimento das amostras de solo, dotado de uma entrada de ar (livre de CO₂) e uma saída de ar (por onde o ¹⁴CO₂ liberado pode escapar e ser capturado em (4)); e (4) um sistema de captura de ¹⁴CO₂, composto por armadilhas (uma para cada amostra de solo) contendo 25 mL de solução de KOH 0,5 M, as quais capturam o ¹⁴CO₂ mineralizado de cada amostra de solo. Abaixo, ilustra-se o esquema simplificado do aparato utilizado (**Figura 11**).

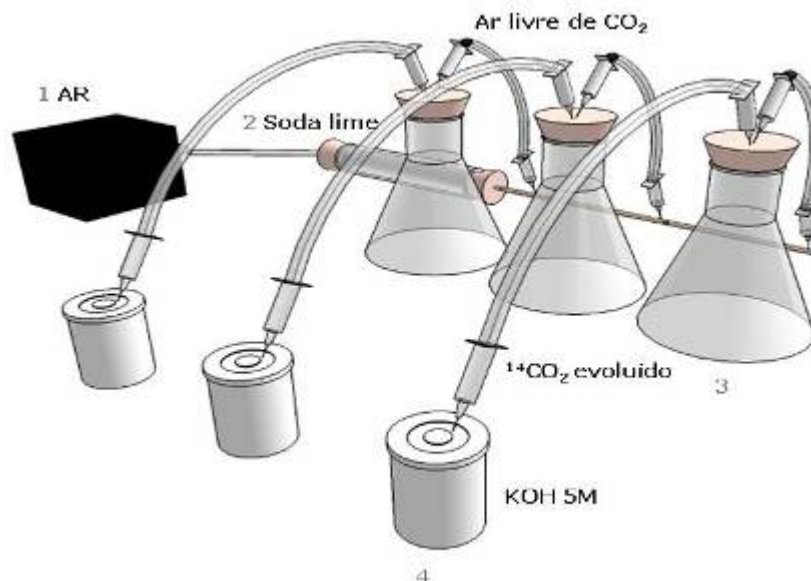


Figura 11. Esquema simplificado do aparato respirométrico.

4.5.2 Experimento de degradação

O experimento de degradação foi realizado no Laboratório de Geoquímica do Departamento de Solos da Universidade Federal de Viçosa, em Erlenmeyers autoclavados com capacidade para 125 mL para os solos de Fernando de Noronha e Cumuruxatiba, e 25 mL para os solos da Antártica, aos quais foram adicionados 10 g de solo.

Foram testados seis tratamentos, com três repetições de laboratório cada um. Os tratamentos consistiram de três controles sem solo (1, 2 e 3) e três tratamentos com solo (4, 5 e 6): (1) tratamento contendo 0,175 μCi de [C^{14}] naftaleno + 50 μL de diesel + 3 mL de água esterilizada; (2) tratamento contendo 0,25 μCi de [C^{14}] fenantreno + 50 μL de diesel + 3 mL de água esterilizada; (3) tratamento contendo 0,5 μCi de [C^{14}] benzo(a)pireno + 50 μL de diesel + 3 mL de água esterilizada; (4) tratamento contendo o solo + 0,175 μCi de [C^{14}] naftaleno + 50 μL de diesel + 3 mL de água esterilizada; (5) tratamento contendo o solo + 0,25 μCi de [C^{14}] fenantreno + 50 μL de diesel + 3 mL de água esterilizada; (6) tratamento contendo o solo + 0,5 μCi de [C^{14}] benzo(a)pireno + 50 μL de diesel + 3 mL de água esterilizada. Os frascos contendo os tratamentos foram conectados ao sistema respirométrico anteriormente descrito, e mantidos em temperatura ambiente ($22 \pm 3^\circ\text{C}$) para os solos de Fernando de Noronha e Cumuruxatiba, e em atmosfera fria ($5 \pm 1^\circ\text{C}$), visando refletir as condições do ambiente antártico, para os solos da Antártica. O experimento foi conduzido separadamente para cada hidrocarboneto. A adição do diesel é indispensável para ativação da comunidade microbiana, que o usa como fonte de energia principal, uma vez que a quantidade de substrato (contaminante) é insuficiente, sendo este, co-metabilizado.

4.5.3 Coleta e análise das soluções armadilhas de $^{14}\text{CO}_2$

Um mL da solução contida no sistema de captura de $^{14}\text{CO}_2$ de cada tratamento, previamente homogeneizada através de fluxos contínuos com micropipeta, foi recolhida e acomodada em um *vial* de contagem do contador de cintilação líquida, (LS 6800, Beckman, EUA), hermeticamente fechado. O volume do sistema de captura de $^{14}\text{CO}_2$ foi completado para 25 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 $^{14}\text{CO}_2$ foi totalmente renovada (25 mL de KOH 0,5 M) e a cada 120 horas, o sistema de armadilhamento de CO_2 foi renovado (500 g de soda *lime*).

No decorrer dos quinze dias de experimento, os intervalos foram aumentados progressivamente 12 e 24 horas, conforme a intensidade de degradação observada. Para a contagem das amostras radioativas, a cada ponto de amostragem (1 mL 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), e a contagem foi realizada no contador de cintilação líquida (LS 6800, Beckman, EUA). Os resultados foram corrigidos para a eficiência de contagem (97,5%) e *background* do aparelho.

Os resultados das curvas de percentagem de ^{14}C evoluído como $^{14}\text{CO}_2$ foram usados para interpretação dos potenciais de degradação dos diferentes solos e contaminantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química e física

Em relação à textura, os solos arenosos de Noronha mostraram predominância de areia grossa sobre as demais frações (**Tabela 1**), exceto em P2 (Praia de Sueste), em que ocorre o único manguezal em ilha oceânica Brasileira, com ambiente mais calmo, de menor energia das ondas, onde se constatou maior porcentagem de areia fina, como reportado por Marques *et al.*, (2007). Os dados relativos ao equivalente de umidade (EU) apresentaram relação com os teores de argila e COT, sendo maior nos solos da Antártica (0,082 a 0,260 kg kg⁻¹).

Tabela 1. Características físicas dos solos

Profun- didade	AG	AF	Silte	Argila	Textura	DS	DP	Equiv. Umidade
cm % kg dm ⁻³ ..		kg kg ⁻¹
P 1 - Praia do Leão (Fernando de Noronha)								
2 - 0 5	77	21	0	2	Areia	1,59	2,66	0,035
P 2 - Baía Sueste (Fernando de Noronha)								
2 - 0 5	46	52	0	2	Areia	1,41	2,66	0,059
P 3 - Praia Atalaia (Fernando de Noronha)								
2 - 0 5	93	5	0	2	Areia	1,73	2,94	0,023
P 4 - Baía e Porto Santo Antônio (Fernando de Noronha)								
2 - 0 5	56	43	0	1	Areia	1,53	2,73	0,035
P 5 - Manguezal Arenoso (Cumuruxatiba - BA)								
5 - 10	0	95	2	3	Areia	1,33	2,63	0,054
P 6 - Cordão arenoso (Cumuruxatiba - BA)								
5 - 10	6	92	0	2	Areia	1,44	2,66	0,040
P 7 - Regossolo Ornitogênico antigo (Potter - Antártica)								
0 - 10	54	18	14	14	Franco arenoso	1,51	2,56	0,114
P 8 - Regossolo coberto por algas (Potter - Antártica)								
0 - 10	66	28	2	4	Areia	1,28	2,7	0,151
P 9 - Regossolo Ornitogênico (Potter - Antártica)								
0 - 10	65	24	1	10	Areia franca	1,11	2,63	0,120
P 10 - Regossolo Gélido coberto por algas (Byers- Antártica)								
0 - 03	49	14	22	15	Franco arenoso	1,25	2,46	0,260
P 11 - Ponta Telefon - Antártica								
10 - 20	78	4	7	11	Areia franca	1,52	2,7	0,082
P 12 - Estação Chinesa (Fildes - Antártica)								
0 - 10	51	8	28	13	Franco arenoso	1,33	2,81	0,153

AG = areia grossa; AF = areia fina; DS = densidade do solo; DP = densidade da partícula

A quantidade de água retida no solo determinada pelo equivalente umidade aproxima-se da capacidade de campo, em solos de regiões temperadas, com presença predominante de argilas de atividade alta (Cassel & Nielsen, 1986). Nos solos característicos das regiões tropicais e úmidas, o critério clássico, que fixa o potencial matricial da capacidade de campo em -33 kPa, deve ser alterado para potenciais maiores, da ordem de -10 a -6 kPa (Reichardt, 1988). Em função da proximidade de fontes de água doce (Antártica, Cumuruxatiba) e do regime de chuva (Noronha), não são esperadas limitações hídricas ao crescimento microbiano em nenhum dos ambientes.

Nos solos do litoral da Bahia, a areia fina predominou com mais de 92 % das frações, diferenciando-se assim dos solos costeiros de Noronha. Apenas no manguezal arenoso (Cumuruxatiba, foz do Rio do Peixe) foi constatada a ocorrência de silte, mas não de areia grossa, corroborando com ambiente mais acumulador, de menor energia.

Nos solos da Antártica, foi constatada grande variação das frações granulométricas, com teores de argila variando de 4 a 15 %, silte de 1 a 28 % (**Tabela 1**) e grande predomínio de areia grossa, característica típica dos solos antárticos, que são normalmente muito cascalhentos e arenosos (Simas *et al*, 2007). A maior parte da fração areia, neste caso, é constituída de minerais primários, ricos em nutrientes, em função da origem vulcânica dos locais amostrados no estudo (Schaefer *et al.*, 2004).

Tabela 2. Características químicas dos solos

Profun- didade	pH	P	K	Na	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	(t)	(T)	V	m	ISNa	P-rem	COT	NT
cm	H ₂ O	----- mg dm ⁻³ -----			----- cmol _c dm ⁻³ -----				----- % -----		----- mg dm ⁻³ -----		----- dag kg ⁻¹ -----				
P 1 - Praia do Leão (Fernando de Noronha)																	
2 - 0,5	8,60	21,0	67	1899,2	0,91	0,97	0,0	0,0	10,31	10,31	10,31	100,0	0,0	80,09	49,50	0,13	0,04
P 2 - Baía Sueste (Fernando de Noronha)																	
2 - 0,5	8,39	22,0	125	3285,1	1,56	1,80	0,0	0,0	17,99	17,99	17,99	100,0	0,0	79,39	40,60	0,26	0,01
P 3 - Praia Atalaia (Fernando de Noronha)																	
2 - 0,5	8,44	16,1	118	1825,9	1,16	1,57	0,0	0,0	10,97	10,97	10,97	100,0	0,0	72,37	38,10	0,26	0,01
P 4 - Baía e Porto Santo Antônio (Fernando de Noronha)																	
2 - 0,5	8,30	21,9	60	1758,8	0,79	0,65	0,0	0,0	9,24	9,24	9,24	100,0	0,0	82,76	28,00	0,26	0,01
P 5 - Manguezal Arenoso (Cumuruxatiba - BA)																	
5 - 10	8,34	16,6	176	1901,1	2,85	3,35	0,0	0,0	14,92	14,92	14,92	100,0	0,0	55,40	49,40	0,38	0,06
P 6 - Cordão Arenoso (Cumuruxatiba - BA)																	
5 - 10	8,43	17,4	144	4159,5	1,58	2,25	0,0	0,0	22,28	22,28	22,28	100,0	0,0	81,17	39,70	0,26	0,02
P 7 - Regossolo Ornitológico antigo (Potter - Antártica)																	
0 - 10	5,7	599,6	185	355,1	4,96	4,73	0,6	9,9	11,7	12,28	21,6	54,2	4,7	12,57	30,5	1,61	0,07
P 8 - Regossolo coberto por algas (Potter - Antártica)																	
0 - 10	5,18	237,7	615	387,3	3,98	3,52	0,0	3,2	10,75	10,75	13,95	77,1	0,0	15,66	51,10	3,23	0,05
P 9 - Regossolo Ornitológico (Potter - Antártica)																	
0 - 10	5,35	55,8	108	391,3	0,63	0,44	2,0	9,1	3,05	5,07	12,15	25,1	39,8	33,56	20,70	4,52	0,72
P 10 - Regossolo Gélico coberto por algas (Byers- Antártica)																	
0 - 03	7,43	12662	455	435,5	0,95	10,40	0,0	4,3	14,4	14,4	18,7	77,0	0,0	13,15	-	6,85	0,12
P 11 - Ponta Telefon - Antártica																	
10 - 20	5,39	93,8	625	439,5	2,55	3,00	2,6	7,0	9,06	11,66	16,06	56,4	22,3	16,39	38,10	0,65	0,03
P 12 - Estação Chinesa (Fildes - Antártica)																	
0 - 10	8,11	56,1	134	284,8	16,79	3,66	0,0	0,0	22,03	22,03	22,03	100	0,0	5,62	34,20	0,52	0,01

† pH em água - 1:2,5. P e K: extrator Mehlich 1. H+Al: extrator acetato de Cálcio 0,5 M, pH 7,0. Ca e Mg, extraídos com KCl 1 mol L⁻¹. SB: soma de bases. CTC_t: Capacidade de Troca Catiônica Efetiva. CTC_r: Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0. V: índice de saturação de bases. m: índice de saturação de Al. COT: Carbono Orgânico Total. NT: Nitrogênio total por destilação Kjeldahl. P-rem: Fósforo remanescente. ISNa: Índice de saturação de sódio.

Os solos de Noronha mostraram acentuada similaridade em suas características químicas (**Tabela 2**), com pH elevado (8,30 - 8,60) e com teores de Na trocável elevados, fato atribuído à proximidade do mar e ao aporte de sais. Os teores de COT (Carbono Orgânico Total) foram baixos em relação à solos de ambientes arenosos (0,13 - 0,26 dag kg⁻¹), como reflexo do ambiente de praia, onde não ocorre colonização vegetal, sendo a matéria orgânica possivelmente proveniente de restos decompostos de algas e zooplâncton, que são rapidamente mineralizados. Os teores de fósforo disponível foram relativamente altos em relação a solos tropicais, na faixa de 16 - 22 mg dm⁻³, e os de Nitrogênio Total foram baixos para todos os solos estudados.

Os solos de ambiente costeiro do sul da Bahia (Cumuruxatiba) apresentaram características semelhantes aos solos de Noronha, com teores elevados de Na, o que contribui para dispersão das argilas (Corrêa *et al.*, 2003), e teores de P disponível entre 16,6 - 17,4 mg dm⁻³, mas com teores de K mais elevados que os de Noronha. Esse resultado é condizente com a maior riqueza em Feldspatos Potássicos e Micas nos sedimentos costeiros do litoral brasileiro, minerais raros ou ausentes em Noronha, caracterizado pela presença de praias cujos sedimentos têm origem vulcânica. Os teores de COT do litoral da Bahia foram baixos, mas o solo de mangue arenoso, ambiente mais conservado e com menor energia das ondas, apresentou valor maior que os demais (Noronha).

Os solos da Antártica apresentaram ampla variação de pH (5,18 - 8,11), como reflexo de sua formação e dos aportes biogênicos (**Tabela 2**). Na área de solo derivado de rocha vulcânica, em Fildes, próxima à Estação Chinesa, os teores de nutrientes são elevados, mas com valores de P que não indicam aportes ornitogênicos. Nos solos desta área, foram observados sinais visíveis de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo originados dos tanques de armazenamento de diesel.

No outro extremo, um solo arenoso e ácido (P8), com forte contribuição orgânica de algas (3,23 % COT) e pH ácido (5,18), associa-se a forte cheiro de enxofre, indicando oxidação de sulfetos, proveniente de algas marinhas, gerando ácido sulfúrico e levando à acidificação do solo. Neste solo, assim como em todos os demais da Antártica, não há limitação de nutrientes, com teores de P elevados (com ampla variação - 55 a 1260), com destaque para a área P10, fortemente ornitogênico. Os teores de K e Na são também elevados, mas não indicam salinidade. O Al trocável variou desde nulo até valores (2 a 2,6 cmol_c dm⁻³), acompanhando a acidez ativa dos solos. Os

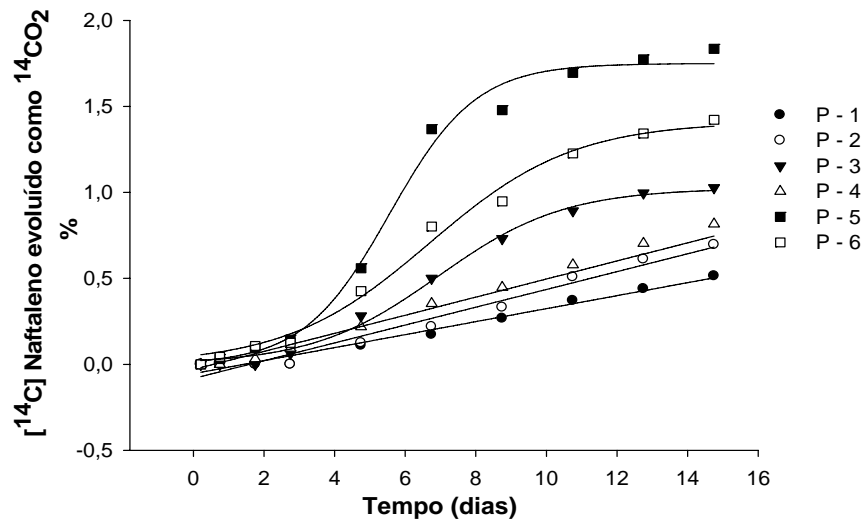
teores de COT foram altamente variáveis, desde baixos e típicos da Antártica (0,52 dag kg⁻¹ em P12, solo contaminado de Fildes) até 6,85 dag kg⁻¹ em solo orgânico de Byers.

5.2 Degradação de Naftaleno

5.2.1 Solos do Brasil

Os experimentos de degradação foram realizados com a camada superficial dos solos, onde é esperada maior atividade microbiana e o impacto de um derramamento é mais pronunciado. Todos os tratamentos foram mantidos em condições ótimas de umidade.

Os pontos P5 e P6 (Cumuruxatiba) representam solos típicos do litoral brasileiro (Neossolo Quartzarênico Marinho), onde se esperam que os impactos de derramamentos de óleo no mar e deriva litorânea sejam bem mais frequentes e significativos que em Noronha, onde as praias são abertas ao oceano, com maior dispersão (**Figura 12**). Isso pode explicar as maiores taxas de degradação nestes pontos, com destaque para P5, que apresenta também menor Índice de Saturação por Sódio e maior Nitrogênio Total e Carbono Orgânico Total entre os solos do litoral brasileiro objeto deste estudo. Esses fatores possivelmente favorecem a manutenção de uma comunidade microbiana mais ativa e apta a responder mais prontamente à presença de compostos orgânicos, incluindo HPA's. Reconhece-se que a degradação de hidrocarbonetos, incluindo a que ocorre em ambientes costeiros, é limitada pela disponibilidade de nutrientes minerais, principalmente N e P (Leahy & Colwell, 1990).



$$P1 = P2 = P4 = y_0 + a^{**}x$$

$$R_1^2 = 0,978; R_2^2 = 0,972; R_4^2 = 0,988$$

$$P3 = P5 = P6 = a^{**}/(1 + \exp(-(x-x_0)/b^{**}))$$

$$R_3^2 = 0,99; R_5^2 = 0,996; R_6^2 = 0,990$$

Figura 12. Mineralização de $[C^{14}]$ naftaleno nos solos da Praia do Leão (P1), Baía Sueste (P2), Praia Atalaia (P3) e Porto de Santo Antônio (P4), de Fernando de Noronha, Manguezal (P5) e Cordão Arenoso (P6), de Cumuruxatiba-BA, contaminados com $[C^{14}]$ naftaleno e diesel, durante incubação a temperatura ambiente (18 a 25° C) durante 15 dias. Os pontos representam as médias de três repetições, descontadas as médias do controle sem solo (substrato). **: $p < 0,01$.

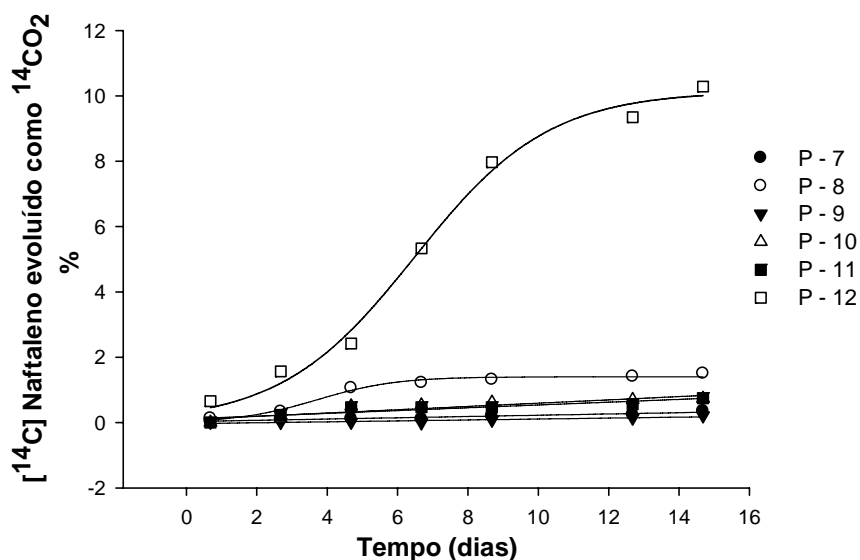
Mesmo apresentando características químicas semelhantes, nos solos de Noronha, a degradação de naftaleno foi maior em P6. Esse dado pode indicar diferença na comunidade microbiana entre os solos. Podemos inferir que a contaminação em Cumuruxatiba é mais recorrente que em Noronha, o que leva ao estabelecimento de uma comunidade mais adaptada a degradar os hidrocarbonetos. Ainda que lentamente algumas populações aptas a degradarem naftaleno se estabeleçam, isso não significa que essas populações são as mais aptas em degradar esse contaminante. No caso de Cumuruxatiba, área marinha rasa, mais sujeita à contaminação recorrente, levou possivelmente ao estabelecimento de uma comunidade contendo, entre outros membros, aqueles com maior potencial de mineralização desses contaminantes.

5.2.2 Solos da Antártica

Houve diferença significativa entre a taxa de degradação do do ^{14}C -naftaleno no solo do ponto P12 - Fildes (10,28 % do ^{14}C -naftaleno adicionado) e as dos demais pontos de amostragem. Nos solos dessas áreas a degradação variou entre 0 e 1% do ^{14}C -naftaleno adicionado (**Figura 13**). A maior degradação em P12 (solo próximo à

Estação Chinesa) não pode ser explicada pela maior disponibilidade de C ou nutrientes, já que este foi o solo que apresentou os menores valores de COT e de P em comparação com os demais solos da Antártica, e o pH mais elevado (8,11) (**Tabela 2**). Este solo foi selecionado por apresentar contaminação por combustíveis derivados de petróleo, onde estão presentes os tanques de combustíveis da Estação Chinesa. Infere-se portanto que a maior degradação de naftaleno no solo P12 está relacionada com o processo de seleção de populações microbianas eficientes em utilizar essa fonte de carbono e, possivelmente, outros hidrocarbonetos, sendo as mesmas potenciais candidatas para a remediação de outros ambientes similares da Antártica, à exemplo dos resultados obtidos por Albuquerque *et al* (2006) e Luz *et al.* (2006).

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 fontes de energia nestas áreas, aumentando o risco de derramamentos durante seu processo de transporte, armazenamento e manipulação (Ruberto *et al.*, 2005).



$$P7 = P9 = P10 = P11 = y_0 + a^{**x} \quad P8 = P12 = a^{**}/(1 + \exp(-(x-x_0)/b^{**}))$$

$$R_7^2 = 0,909; R_9^2 = 0,817; R_{10}^2 = 0,813; R_{11}^2 = 0,812 \quad R_8^2 = 0,980; R_{12}^2 = 0,992$$

Figura 13. Mineralização de $[C^{14}]$ naftaleno nos solos de Potter (P7, P8 e P9), Byers (P10), Ponta Telefon (P11) e Fildes (P12) - área contaminada com diesel, da Antártica, contaminados com $[C^{14}]$ naftaleno e diesel, durante incubação a 5° C durante 15 dias. Os pontos representam as médias de três repetições, descontadas as médias do controle sem solo (substrato). **: $p < 0,01$.

A contaminação por HCs no ambiente antártico ainda é pouco conhecida e controversa. Embora Oliveira *et al.* (2007) não tenha detectado concentrações de naftaleno superiores a $1,19 \text{ ng.g}^{-1}$ de solo seco nos ambientes terrestres da Baía do Almirantado, outros trabalhos mostram que os aportes HCs na área parecem ter aumentado consideravelmente. Martins *et al.* (2004) detectaram naftaleno em concentrações de até $42,8 \text{ ng.g}^{-1}$ (matéria seca) em 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 ali presentes. O estudo do potencial de degradação de áreas impactadas com HCs e o estabelecimento de programas de monitoramento na região, tornam-se, portanto, de grande importância para a preservação do ecossistema existente na Baía do Almirantado.

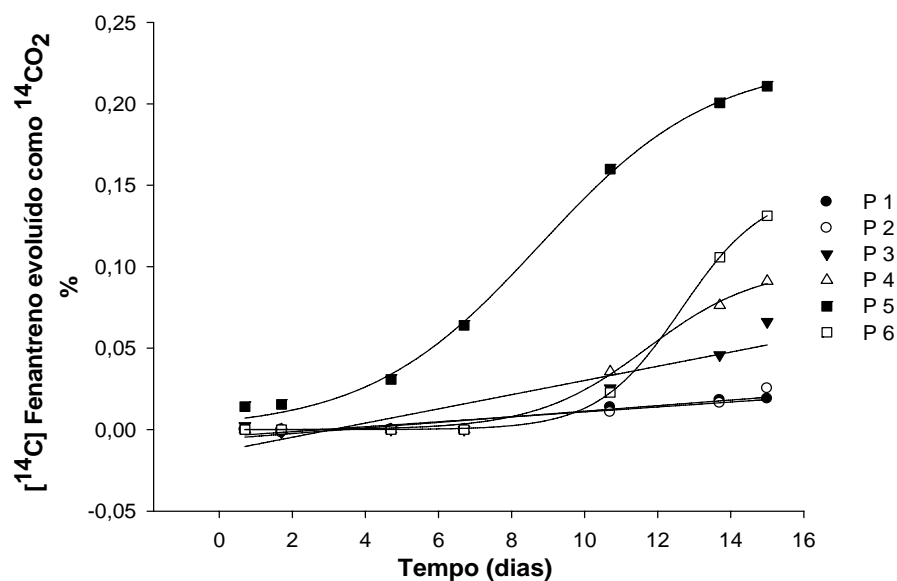
A capacidade de adaptação dos microrganismos a ambientes sob condições extremas, como baixa temperatura, pH elevado, congelamento sazonal, dessecação, salinidade alta, irradiação contínua (alta ou baixa) e longos períodos de escuridão (Vincent *et al.*, 2004; Moorhead *et al.*, 2005), torna-os de grande importância para o homem, dado a sua potencial aplicação biotecnológica no tratamento de resíduos gerados por atividades antrópicas. Tais informações são fundamentais e permitirão a adoção de medidas preventivas capazes de minimizar os prejuízos causados ao meio ambiente pelo aporte de HCs nos solos antárticos.

Foi observada degradação baixa ou negligível nas demais amostras, ou seja, não houve diferença entre as contagens de material radioativo presente nas amostras coletadas durante o período de incubação do experimento. As contagens (desintegrações por minuto) das amostras que apresentaram valores acima do valor de referência do equipamento de medição, foram atribuídas a alguma perda do composto por volatilização (1,59 %), as quais foram subtraídas pelo frasco controle (sem solo). Nestes locais, assim como nos demais do Continente Antártico, o impacto causado pelo homem é baixo, o que confere menor exposição aos HCs e, conseqüentemente, a ausência de pressão de seleção de populações microbianas aptas a degradarem esse grupo de contaminantes. Mesmo não havendo limitação de nutrientes minerais nos solos da Antártica (**Tabela 2**), a degradação foi baixa ou negligível. Estes resultados demonstram inequivocadamente que a degradação de naftaleno, nesses ambientes, depende não apenas da disponibilidade de nutrientes minerais, mas também da existência de populações microbianas efetivas em utilizar o contaminante.

Neste sentido, estudos de Aislabie *et al.* (2001) relataram que solos não contaminados por HCs da Ilha James Ross exibiram número baixo de bactérias capazes de utilizar estes poluentes como fonte nutricional, resultados que não foram comparados ao presente estudo, mas que corroboram com os resultados que demonstram baixa degradação de naftaleno em solos antárticos prístinos incluídos neste estudo. Já Albuquerque *et al.* (2006) relataram aumento de degradação com inóculos de material isolado de solos antárticos onde se evidenciou potencial de degradação.

5.3 Degradação de Fenantreno

O solo do Manguezal Arenoso de Cumuruxatiba-Ba (P5) apresentou uma fase lag (fase de adaptação metabólica da curva de emissão de $^{14}\text{CO}_2$) muito curta (3 dias), comparativamente à solos do Porto de Santo Antônio (P4) e do Cordão Arenoso de Cumuruxatiba (P6), de quase 11 dias (**Figura 14**). O solo P5 foi também o que apresentou maior degradação de naftaleno nos solos do Brasil (**Figura 12**), sendo ambos os resultados atribuídos ao menor valor de Índice de Saturação por Sódio e aos maiores teores de Nitrogênio Total e Carbono Orgânico Total. A maior degradação em P6, comparativamente às áreas P1, P2 e P3 não parece ser devida a fatores nutricionais (**Tabela 2**), mas sim à seleção de populações com potencial para usar esse contaminante, já que a incidência de contaminação com HC's em Cumuruxatiba deve ser muito maior que em F. de Noronha. Um novo ensaio inoculando-se os solos de Fernando de Noronha com o solo de P6 de Cumuruxatiba deve contribuir para se confirmar essa hipótese.



$$P1 = P2 = P3 = y_0 + a^{**}x$$

$$R_1^2 = 0,877; R_2^2 = 0,858; R_3^2 = 0,831$$

$$P4 = P5 = P6 = a^{**}/(1 + \exp(-(x-x_0)/b^{**}))$$

$$R_4^2 = 0,997; R_5^2 = 0,999; R_6^2 = 1,000$$

Figura 14. Mineralização de $[C^{14}]$ fenantreno nos solos da Praia do Leão (P1), Baía Sueste (P2), Praia Atalaia (P3) e Porto de Santo Antônio (P4), de Fernando de Noronha, Manguezal (P5) e Cordão Arenoso (P6), de Cumuruxatiba-BA, contaminados com $[C^{14}]$ fenantreno e diesel, durante incubação a temperatura ambiente (18 a 25° C) durante 15 dias. Os pontos representam as médias de três repetições, descontadas as médias do controle sem solo (substrato). **: $p < 0,01$.

Não houve diferença no comportamento degradativo dos solos de Potter (P7 e P8) e Ponta Telefon (P11), e suas taxas foram baixas (**Figura 15**). Esses solos apresentam pH ácido e NT baixo, acompanhado de uma exposição supostamente inexistente aos HCs, o que diminui a possibilidade de uma adaptação microbiana.

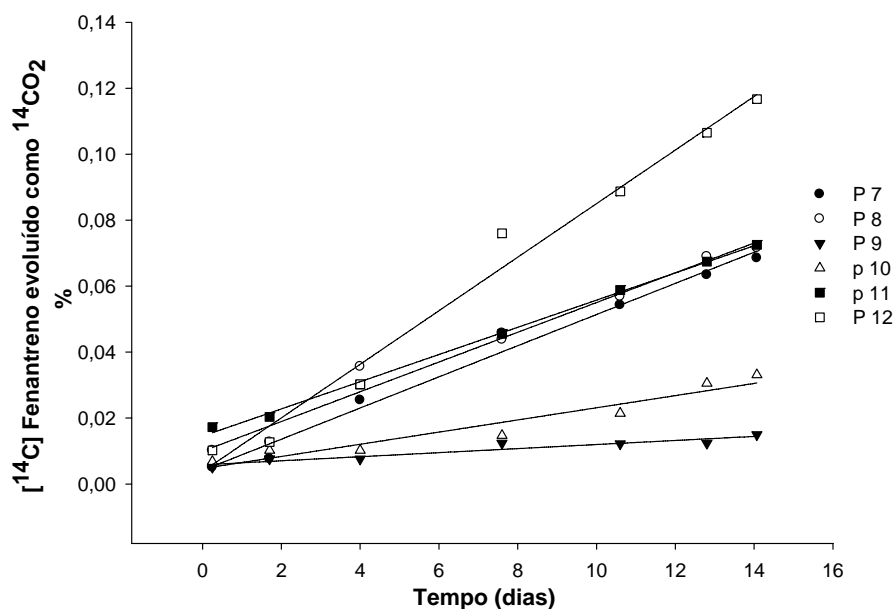
As taxas de degradação de fenantreno foram em geral maiores nos solos do Brasil do que nos da Antártica. Como não há limitação de nutrientes minerais nos solos estudados da Antártica e as condições climáticas não afetaram a degradação de Naftaleno, poder-se-ia especular que populações microbianas aptas a degradar esse contaminante sejam representadas por poucos indivíduos, ou por indivíduos cuja capacidade catalítica seja intrinsicamente baixa. Tal explicação é plausível para o comportamento de P12, que mostrou a maior taxa de degradação de naftaleno, mas não de fenantreno.

Tabela 3. Massa molecular e propriedades físico-químicas dos contaminantes (adaptado de Lima (2001)).

HPAs	Nº de anéis	M.M.	P.F. (°C)	P.E. (°C)	C ^s (mg.L-1)	Log Kow	Carc.	P (Torr a 20°C)
Naftaleno	2	128	80	218	30	3,37	NC	4,92 x 10 ⁻²
Fenantreno	3	178	101	340	1,29	4,46	NC	6,8 x 10 ⁻⁴
Benzo(a)pireno	5	252	179	496	3,8 x 10 ⁻³	6,04	FC	5,0 x 10 ⁻⁷

M.M. - massa molecular; P.F. - ponto de fusão; P.E. - ponto de ebulição; C^s - solubilidade em água; K_{ow} - coeficiente de partição octanol-água; P. - pressão de vapor; NC - não carcinogênico; FC - fortemente carcinogênico.

As taxas de degradação de fenantreno foram menores em comparação às do naftaleno, que possui menor peso molecular e maior solubilidade (**Tabela 3**). A menor solubilidade das moléculas afeta a biodisponibilidade e, conseqüentemente, a degradação de fenantreno, tanto em solos do Brasil quanto nos solos antárticos em particular. Além disso, o fenantreno possui maior número de anéis aromáticos (três) do que o naftaleno (dois), sendo que a taxa de degradação de HPA's é inversamente proporcional ao número de anéis da molécula (Nishigima, 1999).



$$P7 = P8 = P9 = y_0 + a \cdot x$$

$$R_7^2 = 0,983; R_8^2 = 0,817; R_9^2 = 0,976$$

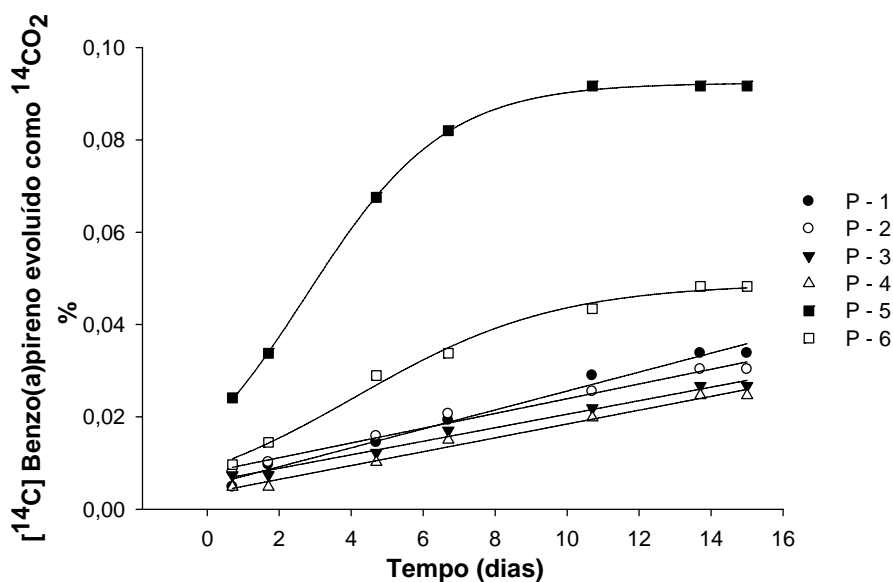
$$P10 = P11 = P12 = a \cdot x / (1 + \exp(-(x-x_0)/b))$$

$$R_{10}^2 = 0,928; R_{11}^2 = 0,998; R_{12}^2 = 0,983$$

Figura 15. Mineralização de [C¹⁴] fenantreno nos solos de Potter (P7, P8 e P9), Byers (P10), Ponta Telefón (P11) e Fildes (P12) - área contaminada com diesel, da Antártica, contaminados com [C¹⁴] fenantreno e diesel, durante incubação a 5° C durante 15 dias. Os pontos representam as médias de três repetições, descontadas as médias do controle sem solo (substrato). **: p < 0,01.

5.4 Degradação de Benzo(a)pireno

À semelhança do fenantreno, a maior degradação de benzo(a)pireno nos solos do Brasil ocorreu na área P5 (Manguezal de Cumuruxatiba), fato que reforça a hipótese nutricional, onde, possivelmente, a escassez de nutrientes minerais desfavorece o crescimento microbiano e, conseqüentemente, a biodegradação nos solos das demais áreas (**Figura 16**). Novamente, a maior degradação em P6 (Cumuruxatiba), comparativamente às áreas P1, P2, P3 e P4 (Fernando de Noronha), não pode ser atribuída a fatores nutricionais (**Tabela 2**). Esse resultado é um indício da presença de populações mais eficientes em utilizar esse contaminante na área que possivelmente recebe contaminação mais freqüente por combustíveis (P6-Cumuruxatiba) do que as áreas mais pristinas de Fernando de Noronha.



$$P1 = P2 = P3 = P4 = y0 + a \cdot x$$

$$R_1^2 = 0,984; R_2^2 = 0,982; R_3^2 = 0,987; R_4^2 = 0,986$$

$$P5 = P6 = a \cdot x / (1 + \exp(-(x-x0)/b))$$

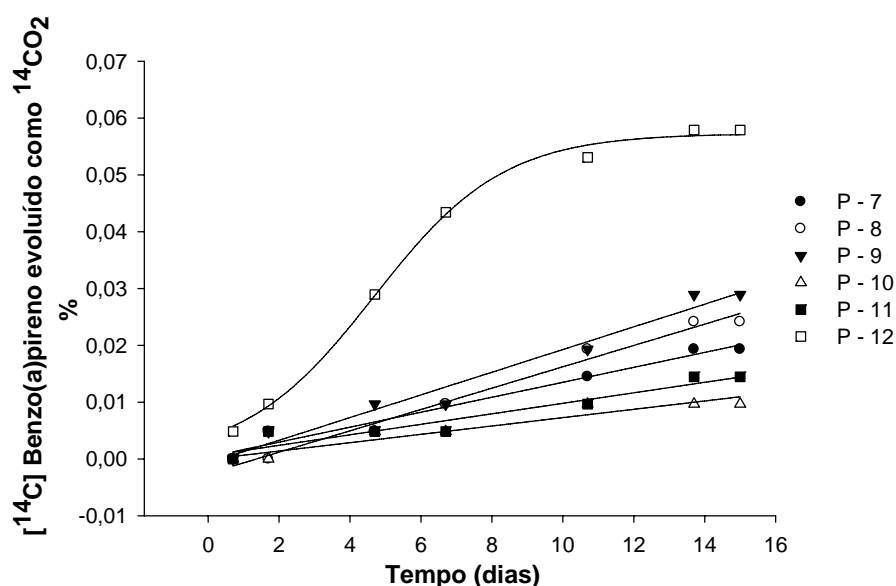
$$R_5^2 = 0,999; R_6^2 = 0,993$$

Figura 16. Mineralização de $[C^{14}]$ benzo(a)pireno nos solos da Praia do Leão (P1), Baía Sueste (P2), Praia Atalaia (P3) e Porto de Santo Antônio (P4), de Fernando de Noronha, Manguezal (P5) e Cordão Arenoso (P6), de Cumuruxatiba-BA, contaminados com $[C^{14}]$ benzo(a)pireno e diesel, durante incubação a temperatura ambiente (18 a 25° C) durante 15 dias. Os pontos representam as médias de três repetições, descontadas as médias do controle sem solo (substrato). **: $p < 0,01$.

As taxas de degradação de benzo(a)pireno seguiram o mesmo comportamento de fenantreno, porém em menor escala, pois o benzo(a)pireno é ainda menos solúvel do que o fenantreno, e possui maior peso molecular. Corroborando com a hipótese de uma

baixa população microbiana apta a degradar este contaminante nas áreas pristinas da Antártica, a amostra P12, contaminada óleo diesel, novamente apresentou os valores mais elevados de degradação de benzo(a)pireno, assim como também observado com naftaleno (Fig. 13) e fenantreno (Fig. 15).

As amostras foram incubadas por um período de tempo relativamente curto. Em teoria, o prolongamento deste período de exposição poderia resultar num incremento da degradação dos HCs, 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 mistura de $[C^{14}]$ benzo(a)pireno e petróleo, observaram que durante os primeiros cinquenta dias de incubação não houve mineralização do HPA, sendo que somente nos cem dias seguintes de exposição foi verificada atividade de biodegradação, com 50% do material radiativo mineralizado no final de cento e cinquenta dias.



$$P7 = P8 = P9 = P10 = P11 = y_0 + a \cdot x \quad P12 = a^{**} / (1 + \exp(-(x-x_0)/b^{**}))$$

$$R_7^2 = 0,967; R_8^2 = 0,985; R_9^2 = 0,971; R_{10}^2 = 0,921; R_{11}^2 = 0,918; R_{12}^2 = 0,997$$

Figura 17. Mineralização de $[C^{14}]$ benzo(a)pireno nos solos de Potter (P7, P8 e P9), Byers (P10), Ponta Telefon (P11) e Fildes (P12) - área contaminada com diesel, da Antártica, contaminados com $[C^{14}]$ benzo(a)pireno e diesel, durante incubação a $5^{\circ}C$ durante 15 dias. Os pontos representam as médias de três repetições, descontadas as médias do controle sem solo (substrato). **: $p < 0,01$.

Guardadas as devidas precauções quanto às diferenças climáticas e de dinâmicas costeiras em cada localidade, fatores que interferem diretamente na velocidade de

degradação dos compostos orgânicos em ambientes marinhos e, conseqüentemente, na concentração dos mesmos em sedimentos, os resultados analíticos obtidos para as regiões estudadas podem ser comparadas com as demais regiões do planeta. As taxas de degradação de fenantreno e benzo(a)pireno foram menores do que a do naftaleno, que possui menor peso molecular e maior solubilidade. A menor solubilidade das moléculas afeta a sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, a degradação de fenantreno e benzo(a)pireno no solos antárticos.

A volatilização do naftaleno foi, como esperado, maior do que a do fenantreno e do benzo(a)pireno (1,59% nos solos da Antártica e 1,69% nos solos de Cumuruxatiba e Noronha). Naftaleno sublima facilmente à temperatura ambiente (HSDB, 1999), seguida de fenantreno (0,22% nos solos da Antártica e 0,58% nos solos de Cumuruxatiba e Noronha) e benzo(a)pireno (0,15% no solos da Antártica e 0,41% nos solos de Cumuruxatiba e Noronha), determinados pelos respectivos brancos.

Apesar dos solos da Antártica serem provenientes de áreas onde há acúmulo de neve no inverno e o experimento ter sido realizado à temperatura de $\pm 5^{\circ}\text{C}$, a degradação de naftaleno não só ocorreu, como revelou-se com maior valor entre os solos estudados. Esse resultado é atribuído, dentre outros fatores, à maior disponibilidade de nutrientes nos solos da Antártica e, no solo da área P12, à presença de populações microbianas capazes de utilizar os contaminantes estudados, representadas por maior número de indivíduos, resultante da contaminação recorrente por óleo diesel dos tanques de combustível da Estação Chinesa.

6. COMENTÁRIOS FINAIS

Os resultados deste trabalho demonstram que os microrganismos presentes nos solos em estudo, onde não houve impacto conhecido de derramamento de óleo, não foram capazes de degradar eficientemente os hidrocarbonetos naftaleno, fenantreno e benzo(a)pireno, nas condições experimentais testadas.

Experimentos conduzidos sem alteração da temperatura das amostras resfriadas, no momento da montagem dos experimentos, no caso dos solos da Antártica, poderiam representar a composição microbiana mais real, já que o curto período de preparo à temperatura ambiente deve ter suprimido a população psicrófila.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABED, R. M. M. & KÖSTER, J. (2005). The direct role 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.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. (2008). Available at <http://www.atsdr.cdc.gov>. Accessed on 17/04/08 10:45 a.m.

AILEY, G.W. & WHITE, J.L. (1970). Factors influencing the adsorption, desorption and movement of pesticide in soil. *Residue Reviews*, New York, **32**: 29-92.

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.; & 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.

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.

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

ALBUQUERQUE, M. A.; SCHAEFER, C. E. R.; PEREIRA, V. V.; ALVES, B. M. G. (2006). Degradation of Naphthalene-Benzene-UL-14C in Microbial-Inoculated Soils from Keller Peninsula, Antarctica. In: World Congress of Soil Science, Philadelphia, Pennsylvania, USA. 18th World Congress of Soil Science.

ALEXANDER, M. (1980) Introdução a la microbiologia del suelo. 2º. Ed. Planta Alta, México: libros y editoriales.

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.

ALMEIDA, B. M. de; HAMACHER, C.; ALVES, J. R. P.; SOARES, M. L. G.; PEREIRA FILHO, O. & NEHRER, R. (2001). Questões Sócioambientais. In

Manguezais: Educar para Proteger. Org. Jorge Rogério Pereira Alves. Rio de Janeiro: FEMAR - SEMADS, 96 p.

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.

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.

BARTH, H. (2003). The influence of cyanobacteria on oil polluted intertidal at the Saudi Arabian Gulf shores. *Marine Pollution Bulletin*. **46**: 1245-1252.

BERGE, J. A.; LICHTENTALER, R.G.; ORELD, F. (1987) Hydrocarbon depuration and abiotic changes in artificially oil contaminated sediment in the subtidal. Estuarine, *Coastal and Shelf Science*, **24**: 567 - 583.

BHUPATHIRAJU, V. K. et al. (2002) Assessment of in-situ bioremediation at a refinery waste-contaminated site and an aviation gasoline contaminated site. *Biodegradation*, **13**: 79-90.

BOSSERT, I.; KACHEL, W.M. & BARTHA, R. (1984). Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. **47**(4): 763-767.

BOYD, T.J. & MONTEGOMERY, M.T. (2003). PAH Biodegradation in an Intertidal Salt Marsh. US Nasal Research Laboratory. Available at <http://www.epa.gov/tio/tsp/download/boyd.pdf>. Accessed on 15/10/2007 03: 20 p.m.

BRAGA, J.M. & DEFELIPO, B.V. (1974). Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas. *R. Ceres*, **21**: 73-85.

BREMER, J.M. & MULVANEY, C.S. (1982). Nitrogen total. In: PAGE, A.L., ed. *Methods of soil analysis*. Madison: *American Society of Agronomy*. P.594-624.

CASSEL, D.K. & NIELSEN, D.R. (1986). Field capacity and available water capacity. In: KLUTTE, A., ed. *Methods of soil analysis*. Part 1. Physical and mineralogical methods. 2.ed. Madison, American Society of Agronomy, Soil Science Society of Agronomy. p.901-926.

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.

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.

CHEMICAL PROFILES. CANADIAN CENTRE FOR OCCUPATIONAL HEALTH AND SAFETY - CHEMINFO (2007). Available at <http://www.intox.org/databank/documents/chemical/benzopyr/cie698.htm>. Accessed on 20/10/07 08:10 a.m.

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.

CORRÊA, D. M. (2007). Potencial de cianobactérias na bioindicação e de biodegradação de ambientes contaminados por naftaleno no Brasil e na Antártica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG. (Dissertação de Mestrado).

CORRÊA, M.M.; KER, J.C.; MENDONÇA, E.S.; RUIZ, H.A. & BASTOS, R.S. (2003). Atributos físicos, químicos e mineralógicos de solos da região das Várzeas de Souza (PB). *R. Bras. Ci. Solo*, **27**: 311-324.

CORSEUIL, H.X. & ALVAREZ, P.J.J. (1996). Natural Biorremediation perspective for BTX – contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. *Water Science and Technology*, **34** (7-8): 311- 318.

COSTA, A. F. (2001). Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos: determinação de 1-hidroxipireno urinário. Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública. São Paulo. (Dissertação de Mestrado).

COULON, F.; MCKEW, B. A.; OSBORN, A. M.; T. MCGENTY 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.

D'ANNIBALE, A.; ROSETTO, F.; LEONARDI, V.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI M. (2006). Role of Autochthonous Filamentous Fungi in Bioremediation of a Soil Historically Contaminated with Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, **1** (72): 28-36.

DAVIS, S. J. & GIBBS, C. F. (1975). The effect of weathering on crude oil residue exposed at sea. *Water Research*. **9**: 275-285.

DELILLE, D.; BASSÈRES, A. & DESSOMMESS, A. (1998) Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic seawater. *Polar Biology*. **19**: 237-241.

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.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. (1997). Manual de métodos de análises de solo. 2.ed. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 212p.

ENSLEY, B. D. & GIBSON, D. T. (1983). Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase component. *Journal of Bacteriology*. **155** (2): 505-511.

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.

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.

GERALDES-KATAOKA, A. P. A. (2001). Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de "Landfarming". Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo. 202p.

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.

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.

HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK - HSDB. (1999). Available online at <http://sis.nlm.nih.gov>. Maryland, USA. Accessed on 12/11/2006 02:30 p.m.

HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK-HSDB. (2003). Benzo(a)pyrene. U.S. National Library of Medicine. Bethesda. Available at <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~SjsB66:1> . Accessed on 11/03/2008 03: 40 p.m.

HEELY, D.A.; WERK, E.S. & KOWALSKI, R.G. (1992). Bioremediation and Reuse of Soils Containing nº5 Fuel Oil in New England Using an Aboveground Treatment Cell: a Case Study. *Hydrocarbon Contaminated Soils VII*. Lewis Publishers, Chelsea.

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.

HINGA, K.R. (2005). Degradation rates of low molecular weight PAH correlate with sediment TOC in marine subtidal sediments. *Marine Pollution Bulletin*. **46**, 466-474.

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.

HURLE, K. & WALKER, A. (1980). Persistence and its prediction: In: HANCE, R.J. *Interaction between herbicides and the soil. Academic Press. Londres*. 83-113p.

IGNÁCIO, G. M. (2007). Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos em água, sedimento e ostras do complexo estuarino da Baía de Paranaguá (Paraná - Brasil). Rio Grande. (Dissertação de Mestrado).

INTERNATIONAL MARITIME ORGANIZATION - IMO. (2004). Available at <http://www.imo.org>. Accessed on 03/07/2007 04:30 a.m.

JACQUES, R.J.S. et al. (2007). Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. *Bioremediation Journal*, Philadelphia, **11** (1): 1-11.

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.

JOHNSEN, A.R. et al. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, Oxford, **133** (1) : 71-84.

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.

KANALY, R.; BARTHA, R.; FOGEL, S. & FINDLAY, M. (1997). Biodegradation of [¹⁴C] 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.

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* S₁₄He. *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.

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.

LEYS, N. M. et al. (2005). Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, New York, **66** (6): 726-736.

LIMA, E.F.A. (2001). Acumulação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e metais traço em invertebrados marinhos e avaliação do uso de biomarcadores celulares e bioquímicos no biomonitoramento. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 167 p. Tese de doutorado.

LOIBNER, A. P. et al. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) biodegradation in different soils. Available at <http://www.boku.ac.at/iam/ifa/pah.htm>. Accessed on 15/10/2007 06:20 a.m.

LOPES, P. R. M. & BIDOIA, E. D. (2005). Estudo da Biodegradação de Efluente Oleoso Automotivo de Diferentes Origens em Meio Aquoso. *Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo*, **72**(supl. 1): 47.

LUNDSTEDT, S. (2003). Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial process. Available at http://www.publications.uu.se/umu/fulltext/nbn_se_umu_diva-57.pdf. Accessed on 10/11/2007 05:30 p.m.

LUZ, A.P.; CIAPINA, E.M.P.; GAMBA, R.C., LAURETTO, M.S.; FARIAS, E.W.C.; BICEGO, M.C.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R.C & PELLIZARI, V.H. (2006). Potential for bioremediation of hydrocarbon polluted soils in the Maritime Antarctic. *Antarctic Science*, **18** (3): 335-343.

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.

MARIANO, A. P. et al. (2007). Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. *Brazilian Journal of Microbiology*, **38** (2): 346-353.

MARQUES, F. A.; RIBEIRO, M. R.; BITTAR, S. M. B.; FILHO, A. N. T. & LIMA, J. F. W. F. (2007). Caracterização e Classificação de Neossolos da Ilha de Fernando de Noronha (PE). *R. Bras. Ci. Solo*, **31**:1553-1562.

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.

MEHRA, O.P. & JACKSON, M.L. (1960). Iron oxide removal from soil and clays by a dothionite-citrate system buffered with sodium bicarbonate. *Clays and Clays Miner.* **7**: 317-327.

MENICONI, M. F. G.; BARBANTI, S.M. (2007). Case study evaluation of hydrocarbon sources in Guanabara Bay Brazil. In Wan, Hzend and Sout, Scout A. Oil spill Environmental Forensics - Fingerprinting and Souce Identification, San Diego, CA, EUA, Academic Press Elsevier.

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.

MOODY, J.D. et al. (2001). Degration of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of Mycobacterium sp. Strain PYR-1. *Applied and Environmental*

Microbiology. **67**(4): 1476-1486. Available online at <http://aem.asm.org/cgi/content/full/67/4/1476>. Accessed on 11/11/2007 03:20 a.m.

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.

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.

NISHIGIMA, F.N. (1999). Aplicação da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho (HPLC) na Purificação e Separação de Hidrocarbonetos de Sedimentos das Regiões de Santos e Cananéia - São Paulo, Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 89 p.

NOVOTNÝ, C. et al. (2000). *Irpex lacteus*, a white rot fungus applicable to water and soil biorremediation. *Applied Microbiology Biotechnology*, **54**: 850-853.

OLIVEIRA, L. M.; MENDONÇA, E. S.; JHAM, G.; SCHAEFER, C. E. G. R.; SILVA, I. R.; ALBUQUERQUE, M. A. (2007). Hidrocarbonetos de solos próximos à Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz. *Oecologia Brasiliensis*. **11**: 1.

OUYANG, J. (2004). Phenanthrene Pathway Map. Available at http://umbbd.ahc.umn.edu/pha/pha_map.html. Accessed on 04/09/2007 05:08 p.m.

OUYANG, J. & FITZGERALD, M. (2003). Phenanthrene (fungal9S,10S) Pathway Map. 2003. Available at http://umbbd.ahc.umn.edu/pha2/pha2_map.html. Accessed on 07/05/2007 06:40 p.m.

PHILIPPI, A. L. (2001). Biodiversidade e dispersão de genes catabólicos de microrganismos degradadores de compostos xenobióticos no solo. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo. (Tese de Doutorado).

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.

RAMOS, D.G.B.; FILHO, J.G.M. & POLIVANOV, H. (2003). Influência da matéria orgânica e argilominerais na migração de compostos derivados de hidrocarbonetos. 2º Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás. Rio de Janeiro.

REICHARDT, K. (1988). Capacidade de campo. R. Bras. Ci. Solo, **12**:211-216.

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.

SCHAEFER, C. E. G. R.; FRANCELINO, M. R. ; SIMAS, F. N. B.; ALBUQUERQUE FILHO, M. R.. (2004). Ecosistemas terrestres e solos da antártica marítima. 1. ed. VIÇOSA: NEPUT-UFV. **1**: 119.

SIMAS, F. N. B. ; SCHAEFER, C. E. G. R. ; MELO, V. F. ; ALBUQUERQUE FILHO, M. R. ; MICHEL, R. F. M. ; PEREIRA, V. V. ; GOMES, M. R. M. ; COSTA, L. M. (2007). Ornithogenic cryosols from maritime Antarctica: Phosphatization as a soil forming process. *Geoderma* (Amsterdam), **138**: 191-203.

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.

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.

STOHS, S. J.; OHIA, S. & BAGCHI, D. (2002). Naphthalene toxicity and antioxidant nutrients. *Toxicology*. **180**: 97-105.

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

TISSOT, B. P. & WELTE, D.H. (1984). Petroleum formation and occurrence. 2Ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

THE INTERNATIONAL ASSOCIATION OF INDEPENDENT TANKER OWNERS - INTERTANKO. (2003). Available at <http://www.intertanko.com>. Accessed on 05/05/2007 08:09 p.m.

THE INTERNATIONAL TANKER OWNERS POLLUTION FEDERATION LIMITED - ITOPF. (2003). Available at <http://www.itopf.com>. Accessed on 02/11/2007 09:20 a.m.

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.

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.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME - 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.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - U.S. EPA. (2008). Lista de Poluentes Prioritários. Available at http://oaspub.epa.gov/wqsdatabasa/wqsi_epacriteria.rep_parameter. Accessed on 30/04/2008 06:10 p.m.

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.; MUELLER, D. R. & BONILLA, S. (2004). Ecosystems on ice: the microbial ecology of Markham Ice Shelf in the high Arctic. *Cryobiology*. **48**: 103-112.

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.

WADE, L. G. (1995). Organic Chemistry. 3. ed. Prentice Hall.

WHITEHOUSE, B. G. (1984) The effects of temperature and salinity on the aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Marine Chemistry*. **14**: 319-332.

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* P_G: regulation of tangential pathways. *Journal of Bacteriology*. **124** (2): 679-685.

YEOMANS, J.C & BREMNER, J.M. (1988). A rapid and precise method for routine determination of carbon in soil. Commun. in *Soil Sci.Plant Anal.*, **19**:1467-1476.