

## **SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Aplicação de Ensaio Biológicos na Avaliação da Biodisponibilidade de Hidrocarbonetos de Petróleo em Solos Impactados**

## **PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA**

**Dilma Vana Rousseff**

Presidente

**Michel Miguel Elias Temer Lulia**

Vice-Presidente

## **MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO**

**Clelio Campolina Diniz**

Ministro de Estado da Ciência, Tecnologia e Inovação

**Alvaro Toubes Prata**

Secretário-Executivo

**Kayo Julio Cesar Pereira**

Coordenação-Geral das Unidades de Pesquisa

## **CETEM – CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL**

**Fernando Antonio Freitas Lins**

Diretor

**Arnaldo Alcover Neto**

Coordenador de Análises Minerais

**Claudio Luiz Schneider**

Coordenador de Processos Minerais

**Cosme Antônio de Moraes Regly**

Coordenador de Administração

**Francisco Wilson Hollanda Vidal**

Coordenador de Apoio Tecnológico às Micro e Pequenas Empresas

**Jackson de Figueiredo Neto**

Coordenador de Planejamento, Gestão e Inovação

**Ronaldo Luiz Correa dos Santos**

Coordenador de Processos Metalúrgicos e Ambientais

# SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL

ISSN 0103-7374

ISBN 978-85-8261-022-0

STA - 73

## **Aplicação de Ensaios Biológicos na Avaliação da Biodisponibilidade de Hidrocarbonetos de Petróleo em Solos Impactados**

**Andréa Camardella de Lima Rizzo**

Engenheira Química, D.Sc., CETEM/MCTI.

**Cristina Lúcia Silveira Sisinno**

Bióloga, D.Sc., SOLOTOX.

**Cláudia Duarte Cunha**

Engenheira Química, D.Sc., CETEM/MCTI.

**Andréa Medeiros Salgado**

Química, D.Sc., EQ/UFRJ.

**Paulo Rubens Guimarães Barrocas**

Oceanógrafo, D.Sc., ENSP/FIOCRUZ.

**Rodrigo Gouvêa Taketani**

Microbiologista, D.Sc. EMBRAPA MEIO AMBIENTE.

**Ellen Cristine Giese**

Química, D. Sc., Tecnologista Pleno do CETEM/MCTI.

**CETEM/MCTI**

2014

## **SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Luis Gonzaga Santos Sobral**

Editor

**Andréa Camardella de Lima Rizzo**

Subeditora

### **CONSELHO EDITORIAL**

Mariza Bezerra de M. Monte (CETEM), Paulo Sergio M. Soares (CETEM), Saulo Rodrigues P. Filho (CETEM), Sílvia Gonçalves Egler (CETEM), Vicente Paulo de Souza (CETEM), Antonio Carlos A. da Costa (UERJ), Fátima Maria Z. Zotin (UERJ), Jorge Rubio (UFRGS), José Ribeiro Aires (CENPES), Luis Enrique Sánches (EPUSP) e Virginia S. Ciminelli (UFMG).

A Série Tecnologia Ambiental divulga trabalhos relacionados ao setor minerometalúrgico, nas áreas de tratamento e recuperação ambiental, que tenham sido desenvolvidos, ao menos em parte, no CETEM.

O conteúdo desse trabalho é de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

**Valéria Cristina de Souza**

Coordenação Editorial

**Larissa Ribeiro de Souza**

Editoração Eletrônica

**Andreza Milheiro**

Revisão

---

Rizzo, Andrea Camardella de Lima

Aplicação de ensaios biológicos na avaliação da biodisponibilidade de hidrocarbonetos de petróleo em solos impactado/Rizzo, Andrea Camardella de Lima [*et al.*]. — Rio de Janeiro: CETEM/MCTI, 2014.

55p. (Série Tecnologia Ambiental, 73)

1. Hidrocarbonetos de petróleo. 2. Solos contaminados. 3. Biodisponibilidade I. Centro de Tecnologia Mineral. II. Sisino, Cristina L. Silveira. III. Cunha, Cláudia Duarte. IV. Salgado, Andréa Medeiros. V. Barocas, Paulo R. Guimarães. VI. Taketani, Rodrigo Gouvêa. VII. Giese, Ellen Cristine. VIII. Série.

# SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1   INTRODUÇÃO	9
2   ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS	14
2.1   Minhocas e Nematóides	15
2.2   Plantas	16
2.3   Ensaio Ecotoxicológicos Normalizados	17
3   ENSAIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	19
4   ENSAIOS COM BIOSSENSORES	26
5   ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS	32
5.1   Contagem da População Microbiana	33
5.2   Respirometria	34
5.3   Atividades Enzimáticas	35
6   CONCLUSÕES	38
7   AGRADECIMENTOS	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40



## **RESUMO**

Atualmente, várias substâncias químicas têm sido liberadas no meio ambiente, causando impactos no solo que precisam ser remediados. As diferentes estruturas químicas dessas substâncias determinam propriedades físicas e químicas específicas, que definem seu transporte, ciclagem e biodisponibilidade no meio. Para as análises das espécies químicas se utilizam, tradicionalmente, técnicas analíticas sofisticadas. Entretanto, esses métodos, extremamente sensíveis e específicos, não conseguem distinguir as espécies que são assimiláveis pela biota (biodisponíveis), das formas inertes, que não causam efeitos tóxicos aos organismos presentes no ambiente. Uma vez que a biorremediação é uma alternativa atraente no tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, a biodisponibilidade dos contaminantes deve ser bem avaliada, a fim de que todo o processo possa ser monitorado de forma eficaz. Neste contexto, a aplicação de diferentes ensaios biológicos para a avaliação da biodisponibilidade dos contaminantes tem se configurado como um importante instrumento no monitoramento e comprovação da eficiência do processo de biorremediação de solos impactados por hidrocarbonetos de petróleo.

### **Palavras-chave**

Biodisponibilidade, solos impactados, hidrocarbonetos de petróleo, ensaios biológicos.

## **ABSTRACT**

Currently, several chemicals have been released into the environment, causing soil impacts that need to be remedied. The different forms of chemicals have physical and chemical properties that determine transport, cycling and bioavailability. For the analysis of chemical species sophisticated analytical techniques are traditionally used. However, these methods, highly sensitive and specific, can not distinguish the species that are assimilated by biota (bioavailable) from inert forms, which do not cause toxic effects to organisms in the environment. Since the bioremediation is an attractive alternative for the treatment of soils contaminated with petroleum hydrocarbons, the bioavailability of contaminants should be thoroughly evaluated, so that the whole process can be monitored efficiently and achieve success. In this context, the use of different biological essays to evaluate the bioavailability of the contaminants has emerged as an important assessment tool in bioremediation of soils impacted by petroleum hydrocarbons.

### **Keywords**

Bioavailability, impacted soils, petroleum hydrocarbons, biological essays.



## 1 | INTRODUÇÃO

Frequentes derramamentos de petróleo nos solos brasileiros vêm motivando o desenvolvimento de novas técnicas para o tratamento de solos impactados por hidrocarbonetos.

Muitas vezes, os resultados obtidos por meio de análises químicas tradicionais são operacionalmente definidos e não se correlacionam com os resultados de bioensaios, que refletem, de maneira mais acurada, os efeitos tóxicos de poluentes. Isto é extremamente relevante no caso de contaminações ambientais por metais ou hidrocarbonetos (SELIFONOVA *et al.*, 1993; URE e DAVIDSON, 1995; CAROLI, 1996; TECON e VAN DER MEER, 2008) e tem influência direta no caso de processos de tratamento naturais do solo, como a biorremediação.

A biorremediação é uma alternativa atraente no tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos de petróleo; porém, a efetividade dos processos biológicos é frequentemente governada pela habilidade da população microbiana nativa em assimilar e metabolizar o contaminante. No entanto, na prática, é comum se observar taxas de biodegradação menores do que aquelas estimadas em ensaios laboratoriais (HAWS *et al.*, 2006). De uma forma geral, o problema reside tanto na diferença da atividade microbiana encontrada quando da ampliação de escala, quanto na queda da biodisponibilidade dos contaminantes ao longo do tempo. Conseqüentemente, a determinação da biodisponibilidade dos substratos, e não apenas do potencial intrínseco de biodegradação, é um fator importante na estimativa da máxima biodegradação passível de ser atingida em uma área impactada.

Geralmente, a confirmação da eficácia da aplicação de um processo de biorremediação ocorre por meio da avaliação de resultados obtidos na quantificação de parâmetros químicos e/ou físico-químicos pré-estabelecidos em leis e regulamentos como, por exemplo, concentração residual de hidrocarbonetos e/ou metais. No entanto, as metodologias analíticas associadas à quantificação desses valores envolvem, em sua maioria, pelo menos uma etapa de extração química intensiva para que o composto passe para uma fase líquida e nessa seja quantificado. Esse processo pelo qual a amostra sólida, ou semi-sólida, é submetido frequentemente não representa a real condição de extração (lixiviação e/ou solubilização) a que aquela amostra será submetida no ambiente. Quando avaliado dessa forma, um processo de biorremediação muitas vezes não é considerado eficiente, uma vez que a concentração residual do poluente pode vir a permanecer acima dos valores de referência estabelecidos na legislação ambiental pertinente. Por outro lado, essa concentração residual pode representar apenas a fração não biodisponível do contaminante, isto é, a fração recalcitrante de difícil eliminação por processo biológico.

O entendimento das limitações associadas à biodisponibilidade dos contaminantes em solos impactados é hoje considerado como uma etapa essencial na determinação da eficácia da aplicação de um processo de biorremediação (HAWS *et al.*, 2006) e no entendimento das limitações relacionadas à degradação do poluente ao longo do tempo. Vários autores têm destacado a importância de estimativas práticas da fração biodisponível do contaminante como parte integrante de estudos preliminares à etapa de aplicação de um processo de biorremediação. Tais estimativas são úteis não só na

quantificação da fração do contaminante que realmente estará susceptível ao ataque microbiano, mas também como ferramenta a ser associada a estudos de avaliação de risco (HARMS e BOSMA, 1997 *apud* HAWS *et al.*, 2006).

Conceitualmente entende-se que para que um processo biológico seja aceito como uma alternativa atrativa de tratamento de solos impactados, os contaminantes precisam, por um lado, estar suficientemente bem aderidos à matriz do solo – não disponíveis – de forma a apresentar o mínimo risco ecológico associado e, por outro, estar suficientemente biodisponíveis para suportar a atividade microbiana que deverá ser responsável pela rápida detoxificação dos mesmos (NAMAZI *et al.*, 2012; SEMPLE *et al.*, 2004). No momento em que esses contaminantes se encontram menos biodisponíveis para os micro-organismos, eles tendem a ter, também, a sua disponibilidade reduzida para outros receptores, incluindo os seres humanos. Consequentemente, a queda da biodisponibilidade ao longo do tempo não é necessariamente uma desvantagem. Dessa forma, pode-se considerar que a redução da biodisponibilidade, mais do que a queda da concentração do composto, seja talvez o objetivo mais apropriado a ser atingido no final de um processo de tratamento (SEMPLE *et al.*, 2004; HAWS *et al.*, 2006).

Sabe-se que, em se tratando de amostras sólidas, a biodisponibilidade pode ser influenciada por uma variedade de fatores, incluindo as características físico-químicas da matriz à qual o contaminante está associado (formas e tamanhos de partículas, porosidade interna), propriedades químicas da matriz e do contaminante, além de fatores biológicos como densidade microbiana e afinidade dessa população pelo

contaminante. Além disso, pode ser limitada por fatores como sorção, transferência de massa e potencial de biodegradação intrínseca, podendo também ser alterada pela presença de outros compostos.

Segundo HAWS *et al.*, (2006) alguns autores utilizam, como ferramentas para a estimativa da biodisponibilidade de diversos tipos de contaminantes, índices adimensionais que representam uma forma simplista de identificação dos fatores limitantes envolvidos na biodegradação de um determinado composto poluente, relacionados às limitações de transferência de massa ou às taxas de biodegradação. Os autores baseiam-se na premissa de que valores excessivamente baixos ou altos representam um indicativo da presença de mecanismos limitantes ao processo de biorremediação que podem vir a ser contornados quando da aplicação das tecnologias de tratamento biológico disponíveis. Esses índices de biodisponibilidade são potencialmente úteis como guias práticos para estimativa da efetividade da biorremediação e como valores de referência em processos de remoção dos contaminantes orgânicos, no caso específico do referido trabalho, o tolueno e o tricloroetileno (HAWS *et al.*, 2006). No entanto, esses mesmos índices apresentam como principal limitação o fato de que, por serem coeficientes adimensionais simples, conduzem a estimativas de taxas relativas e não de taxas absolutas. Consequentemente, a análise de um índice de biodisponibilidade sozinho não leva à distinção entre uma situação onde as taxas de transferência de massa e de biodegradação são simultaneamente rápidas/elevadas de uma situação inversa, em que ambas são reduzidas. Em ambas as situações os índices obtidos podem, teoricamente, ser iguais.

Atualmente, diferentes metodologias vêm sendo estudadas visando à real estimativa da fração biodisponível de compostos orgânicos e/ou inorgânicos presentes em amostras de solos impactados (EHLERS e LUTHY, 2003; SABATÉ *et al.*, 2004; SABATÉ *et al.*, 2006; CUI *et al.*, 2013; CACHADA *et al.*, 2014). Algumas das metodologias avaliadas englobam a aplicação de testes químicos alternativos baseados em técnicas de extração não exaustivas (utilizando diferentes tipos de extratantes como, mistura de solventes, surfatantes, ciclodextrinas). Dentre os ensaios com bioindicadores pode-se destacar a aplicação de ensaios ecotoxicológicos, ensaios de biologia molecular, ensaios com biosensores e ensaios microbiológicos.

## 2 | ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

No Brasil ainda não há exigência dos órgãos ambientais sobre o uso de um indicador biológico para a avaliação de uma área contaminada ou para comprovação da eficiência de um processo de remediação. A avaliação da qualidade dos solos e o acompanhamento do processo de redução da concentração dos contaminantes nesse meio têm sido realizados apenas com o auxílio de parâmetros químicos, nos quais os contaminantes de interesse, de acordo com cada caso de contaminação, são comparados com os valores de investigação (de acordo com o uso da área, ou seja, agrícola, residencial ou industrial) da Resolução CONAMA nº 420, de 2009. Esta dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas (BRASIL, 2009).

Entretanto, por meio dos ensaios ecotoxicológicos são verificados os efeitos das variáveis ambientais que são capazes de afetar a toxicidade das substâncias aos componentes vivos de um ecossistema. Dessa forma, esses ensaios podem indicar uma resposta mais precisa da toxicidade dos contaminantes presentes nas amostras para os organismos vivos; o que apenas a análise química de cada composto, separadamente, não é capaz de avaliar.

Uma vantagem adicional dos ensaios ecotoxicológicos é que eles detectam apenas contaminantes biodisponíveis ou móveis, sendo úteis para integrar os efeitos de todos os contaminantes biodisponíveis (EOM *et al.*, 2007). É importante destacar, também, que estudos realizados após processo de remediação

de solos contaminados por hidrocarbonetos indicaram que ainda poderá existir uma toxicidade residual causada por baixas concentrações de contaminantes ou subprodutos, demonstrada apenas por meio dos ensaios ecotoxicológicos (GEISSEN *et al.*, 2008; HUBÁLEK *et al.*, 2007; HUND & TRAUNSPURGER, 1994; LORS *et al.*, 2006; NUNES-HALLDORSON *et al.*, 2004; PLAZA *et al.*, 2005).

Assim, indicadores biológicos têm se tornado cada vez mais importantes na avaliação de risco ecológico e na determinação de metas de remediação. Estudos relacionados com a avaliação de risco ecológico em solos contaminados com hidrocarbonetos têm combinado uma bateria de ensaios ecotoxicológicos, incluindo ensaios com micro-organismos até representantes da fauna e flora (AL-MUTAIRI *et al.*, 2008; DAWSON *et al.*, 2007; HUBÁLEK *et al.*, 2007; MANZO *et al.*, 2008).

## 2.1 | Minhocas e Nematóides

As minhocas (principalmente das espécies *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*) são os organismos-teste mais utilizados nos ensaios para avaliação do solo, uma vez que elas são um dos organismos mais representativos da fauna de solo, ocorrendo em vários tipos de solo, tendo alta abundância e biodiversidade e por estarem expostas a fatores de estresse via todas as três fases do solo (DAWSON *et al.*, 2007). As minhocas são utilizadas tanto para avaliação de efeitos ecotoxicológicos agudos (mortalidade) como crônicos (redução da taxa de reprodução) e têm se mostrado organismos sensíveis para avaliação da contaminação por hidrocarbonetos (GEISSEN *et al.*, 2008).

Ensaio expedito, como o de comportamento de fuga, também têm sido aplicados para uma avaliação rápida da contaminação de solo. Ensaio preliminares realizados com amostras contaminadas por óleo cru (SISINNO *et al.*, 2004 a e b) indicaram que o ensaio de comportamento de fuga com minhocas possui uma boa resposta na complementação da avaliação de solos impactados por hidrocarbonetos. Outro ensaio de comportamento de fuga, com o uso de colêmbolos (*Folsomia candida*), também tem sido usado na avaliação de solos contaminados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (LORS *et al.*, 2006).

Os nematóides podem ser parasitas de plantas, bacteriófagos, fungívoros, predadores e onívoros e, devido às diferenças no ciclo de vida, taxa de reprodução e capacidade de persistência no solo, também vêm sendo muito estudados nas últimas décadas quanto à sua utilização como indicadores, especialmente em solos contaminados por derivados de petróleo (RAYMOND *et al.*, 1976; MOLINA-BARAHONA *et al.*, 2005).

## 2.2 | Plantas

Ensaio com vegetais também têm merecido grande atenção nos dias atuais para avaliação da contaminação de solos por hidrocarbonetos. Os ensaios mais comumente aplicados neste caso avaliam a emergência e o crescimento de vegetais superiores com as espécies *Brassica rapa* e *Avena sativa* (DAWSON *et al.*, 2007).

Dentre os parâmetros comumente avaliados, incluem-se os índices de germinação das sementes, alongamento da raiz e altura de crescimento das plantas. Concentrações de



hidrocarbonetos de petróleo (HPs) no solo maiores que 0,1 % inibiram a germinação de sementes de trigo e milho, além de afetarem negativamente o tamanho da raiz e o desenvolvimento destas espécies (TANG *et al.*, 2011). Em outro estudo, no entanto, foi verificado que a preseça de óleo diesel em concentrações maiores que 7,5 % causaram inibição da germinação de sementes de milho e maxoeira (LUHACH e CHAUDHRY, 2012).

### 2.3 | Ensaios Ecotoxicológicos Normalizados

Com a crescente importância que está sendo dispensada a esse tema internacionalmente e com o desenvolvimento de metodologias nacionais complementares pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2010 e 2011), estima-se que a aplicação dos ensaios ecotoxicológicos seja mais abrangente para a caracterização do solo em relação a suas funções de retenção e de *habitat*, indicando sua viabilidade de uso.

Os ensaios para avaliação das funções de retenção ou de *habitat* podem ser aplicados nas seguintes ocasiões:

- i) monitoramento e controle da eficiência do tratamento do solo;
- ii) avaliação do potencial ecotoxicológico do solo e materiais de solo (por exemplo, solos escavados e remediados, de aterro e material de contenção) com relação ao seu uso pretendido e aos possíveis efeitos adversos sobre organismos aquáticos e do solo;

- iii) avaliação de substâncias nocivas potencialmente móveis e biodisponíveis, nos casos em que o solo/material de solo pode afetar as águas subterrâneas e superficiais e nos casos em que poluentes são adicionados aos solos e podem entrar na cadeia alimentar, por exemplo, quando há utilização agrícola de resíduos (lodo de esgoto, compostos etc.) (ABNT, 2010).

As algas (*Pseudokirchneriella subcapitata*), bactérias luminescentes (*Vibrio fischeri*) e microcrustáceos (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*) são recomendados como organismos-teste usados em extratos aquosos para avaliação da função de retenção do solo.

A função de *habitat* pode ser avaliada por meio de ensaios agudos – incluindo organismos-teste representantes de produtores primários (ex.: vegetais), consumidores primários (ex.: minhocas) e decompositores (ex.: micro-organismos) – e crônicos, com representantes de produtores primários (ex.: vegetais) e consumidores primários (ex.: minhocas, colêmbolos e enquitreídeos). As espécies de colêmbolos e enquitreídeos mais utilizadas são, respectivamente, *Folsomia candida*, *Enchytraeus albidus* e *E. crypticus* (ABNT, 2010).

### 3 | ENSAIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Em função do grande avanço tecnológico, foi possível verificar que o conhecimento a cerca de biodiversidade existente no planeta é praticamente insignificante. O estudo de caracterização e o conhecimento da dinâmica de determinados ecossistemas ainda são pequenos apesar de todo o esforço que vem sendo realizado. Esta falta de conhecimento se deve, em grande parte, ao fato de que os micro-organismos precisam ser cultivados para serem caracterizados. Sabe-se, hoje em dia, que apenas uma pequena fração dos micro-organismos presente no meio ambiente (0,1 a 10%) podem ser cultivados por técnicas-padrão devido à grande seletividade dos meios de cultura comumente utilizados. Essas técnicas clássicas, baseadas no cultivo destes micro-organismos, demandam um tempo relativamente grande para análise, havendo a possibilidade também de após várias gerações, os micro-organismos apresentarem alterações fisiológicas e até genéticas significativas, como também a de só crescerem em meios específicos (ROSADO e DUARTE, 2002; THERON e CLOETE, 2000).

Desde o início da década de 1990, os estudos em microbiologia ambiental começaram a aplicar metodologias capazes de detectar e caracterizar (parcialmente) os micro-organismos encontrados no ambiente usando partes destes organismos (*i.e.*, DNA, RNA, proteínas e lipídeos) ao invés dos organismos inteiros, vivos e crescendo em um ambiente artificial. Embora existam técnicas que utilizem como alvos lipídeos e proteínas, nesse texto iremos focar em técnicas baseadas em ácidos nucleicos por serem as mais utilizadas e apresentarem maior amplitude de uso.

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, associadas ao conhecimento em bioinformática, tornou possível a caracterização de comunidades microbianas mistas em determinados ecossistemas, revelando os grupos atuantes, muitos destes até então desconhecidos. Elas apresentam uma importância fundamental para desenvolver o conhecimento à nível de microambiente, que até então tem sido pouco explorado e pouco utilizado (ROSADO e DUARTE, 2002).

Apesar da utilização dessas novas técnicas para o estudo da diversidade microbiana, as tradicionais, que envolvem enriquecimento e cultivo, também são fundamentais para obter um conhecimento mais detalhado a respeito de capacidades metabólicas e caracterização fenotípica, podendo, desta forma, chegar ao mais próximo possível da caracterização do ambiente real.

A utilização de técnicas moleculares permite, portanto, um conhecimento mais aprofundado dos grupos microbianos presentes, após a seleção natural imposta por condições extremas, como a presença de substâncias poluentes e de suas formas distintas de tratamento. Do ponto de vista técnico, esses métodos são viáveis porque são rápidos e sensíveis para identificar e monitorar a população microbiana presente e atuante no processo de Biorremediação (CUNHA, 2004; WILKSTRÖM *et al.*, 1996).

Os resultados obtidos com essas técnicas possibilitam definir com maior precisão o melhor processo de Biorremediação a ser implementado, desenvolvendo mecanismos que promovam a utilização máxima de um determinado grupo presente na comunidade microbiana. A presença de uma grande quantidade de cópias de um gene catabólico em uma área

contaminada pode ser um indicativo de que esteja ocorrendo um processo de biodegradação natural ou que a estratégia de tratamento empregada seja eficiente (CUNHA, 2004).

Essas técnicas podem ser usadas para complementar o monitoramento nos estudos de impactos ambientais. Além de avaliar a diversidade de amostras ambientais, estudando o efeito da presença de um determinado poluente na estrutura da comunidade microbiana, é possível verificar aqueles que se adaptam e atuam no processo de Biorremediação. Pode também ser aplicada no monitoramento de micro-organismos inoculados *in situ*, avaliando sua permanência ou eliminação nos processos de Bioaumento (IWAMOTO e NASU, 2001; JANSSON *et al.*, 2000).

As metodologias independentes de cultivo aplicadas em estudos de microbiologia ambiental têm como alvo as características que diferenciem os micro-organismos presentes nas amostras que podemos chamar de marcadores moleculares (do inglês *molecular markers*). Os marcadores moleculares se dividem em dois tipos principais: os universais (presentes em todos os organismos) e os específicos (presentes em um grupo apenas). Todos os marcadores moleculares precisam ter duas características principais, possuir regiões constantes e conservadas que permitam a sua detecção e regiões variáveis que permitam a diferenciação dos organismos que os possuem. Dentre todos os marcadores, o mais utilizado é o RNA ribossomal 16S (e 18S no caso de eucariotos) e o gene que o codifica (*rrs*). Sua importância se deve a sua presença em todas as espécies de micro-organismos e ao extenso conhecimento acerca de sua estrutura e variação entre os diferentes organismos (HUGENHOLTZ e PACE 1996). O rRNA 16S é amplamente

utilizado como marcador universal e também como específico, desenhados para detectar apenas um determinado ramo da árvore filogenética.

Dentre os marcadores específicos, em anos mais recentes, vêm ganhando espaço os chamados marcadores funcionais (ANDREOTE *et al.*, 2009). Marcadores funcionais têm como alvo genes que codificam proteínas específicas relacionadas com funções metabólicas. Esses marcadores são normalmente selecionados por se relacionarem com alguma atividade diretamente ligada ao processo que está sendo monitorado ou avaliado. Alguns estudos, por exemplo, visaram avaliar a diversidade de genes como os *ndo* e *alk* que codificam para naftaleno dioxigenase e alcano monoxigenase, respectivamente, em ambientes contaminados com hidrocarbonetos (GOMES *et al.*, 2007; KUHN *et al.*, (2009). Esses genes estão diretamente relacionados com a degradação dos contaminantes presentes nos ambientes estudados. No entanto, um grande número de estudos avaliou o efeito da poluição em grupos microbianos responsáveis por importantes funções ecológicas (TAKETANI *et al.*, 2009).

De modo geral, os estudos sobre as comunidades microbianas têm como foco a avaliação das alterações na comunidade ao longo do tempo ou do espaço. Essas mudanças podem ser naturais ou ocasionadas por intervenções humanas (propositais ou acidentais). A dinâmica das comunidades microbianas devido a essas variações podem ser de dois tipos:

- i) qualitativa, quando a composição da comunidade (que espécies estão presentes) varia entre as amostras;
- ii) quantitativa, quando o número de indivíduos é alterado nas amostras.

A comparação qualitativa das amostras é realizada pela análise comparativa das regiões variáveis dos marcadores utilizados. Para isso, a grande maioria dos estudos utiliza técnicas de tipagem (do inglês *fingerprinting*) para comparar amostras. As técnicas mais utilizadas são a DGGE (*denaturing gradient gel eletrophoresis*) e o T-RFLP (*terminal restriction fragment lenght polymorphism*), embora se encontre um grande número de trabalhos empregando outras técnicas como o TGGE (*temperature gradient gel eletrophoresis*), SSCP (*single strand conformation polymorphism*) e ARISA (*automated ribosomal intergenic spacer analysis*). Todas essas técnicas apresentam a grande vantagem de poder analisar um grande número de amostras de uma só vez, apresentando uma boa sensibilidade a pequenas variações na comunidade e grande reprodutibilidade.

Em conjunto com as técnicas de *fingerprinting*, outra técnica de biologia molecular que tem tido espaço nos estudos de ecologia microbiana é a PCR em Tempo-Real. Essa é uma ferramenta altamente sensível capaz de detectar e quantificar os produtos de amplificação de uma reação de PCR. Esta detecção é realizada por meio de marcadores fluorescentes presentes na reação de amplificação. O sinal emitido é então detectado e utilizado para determinar a quantidade de amplificação presente neste momento na reação. Com o decorrer da amplificação, quando um valor arbitrário de amplificação é atingido, é alcançado o valor chamado de Ct (limiar do ciclo de detecção - *cycle threshold*). Este valor de Ct é o utilizado na estimativa de quantidade de DNA presente inicialmente na reação de PCR (ANDREOTE *et al.*, 2009).

Utilizando a técnica de PCR em tempo real, vários grupos e espécies de bactérias têm sido alvos de quantificação (ZHANG e FANG 2006). Sistemas de detecção e quantificação de diversos grupos de micro-organismos, funções ecológicas e metabolismos específicos estão publicados na literatura (TAKETANI e TSAI, 2010; TAKETANI *et al.*, 2009; POWELL *et al.*, 2006; FURUKAWA *et al.*, 2006; AN *et al.*, 2006).

A técnica de construção e sequenciamento de bibliotecas de clones de genes é uma ferramenta de alta sensibilidade no estudo de comunidades microbianas (SCHLOSS e HANDELSMAN 2006). Comparado a outras metodologias de análise de comunidades (ex., PFLA, T-RFLP, DGGE), o sequenciamento de clones ambientais se destaca por permitir uma análise mais profunda das comunidades, indo além da comparação da comunidade presente nas amostras e permitindo que se tenha uma caracterização dos constituintes majoritários das comunidades. Pode-se notar que a maioria dos trabalhos na literatura utiliza como alvo os genes ribossomais, com posterior comparação entre genótipos de micro-organismos presentes em diferentes amostras (BORNEMAN e TRIPLETT 1997; TAKETANI *et al.*, 2010; TAKETANI e TSAI, 2010; TAKETANI *et al.*, 2010; ROESCH *et al.*, 2007). De maneira similar, porém utilizando a técnica de pirosequenciamento, a comunidade bacteriana presente no perfil de profundidade do oceano foi descrita (ANDERSSON *et al.*, 2010; ROESCH *et al.*, 2007; MANTER *et al.*, 2010; HUSE *et al.*, 2008), e os autores também descreveram uma rara e inexplorada diversidade de espécies compondo estas comunidades.



Com a expansão da utilização desta técnica, diversas metodologias foram desenvolvidas com o objetivo de se expandir a exploração destes dados. Com isso foi lançado em 2009 o software Mothur (SCHLOSS *et al.*, 2009). Baseando-se em uma matriz de similaridade, este software separa os clones de uma biblioteca baseando-se na similaridade entre eles, permitindo-se, assim, a separação das sequências em unidades taxonômicas operacionais (UTOs). Baseando-se nessas UTOs, esse software, então, calcula índices de diversidade (Simpson – D- e Shannon – H'), estimativas de riqueza (CHAO1 e ACE), além de curvas de rarefação/abundância de ranks. Já o DOTUR é uma ferramenta de análise de  $\alpha$ -diversidade (diversidade local), permitindo apenas comparação desses dados obtidos, o que pode levar à interpretação errônea dos dados analisados. Para análise de  $\beta$ -diversidade (diversidade partilhada entre ambientes), os softwares mais empregados são o Libshuff e o J-Libshuff (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2008), que permitem avaliar o quanto uma biblioteca cobre a outra e com isso avaliam o quanto elas são similares. Esses, no entanto, não são os únicos testes empregados, sendo que recentemente um maior número de programas voltados à comparação de bibliotecas têm surgido (HAMADY *et al.*, 2009; LOZUPONE *et al.*, 2006).

## 4 | ENSAIOS COM BIOSENSORES

Embora bioensaios sejam utilizados para a avaliação dos efeitos de compostos químicos nos organismos há muito tempo, o desenvolvimento específico da tecnologia dos biossensores é relativamente novo. Isto pode ser constatado pelo aumento exponencial no número de publicações que tratam desta abordagem nos últimos anos.

As primeiras referências com o termo biossensor, na concepção atual surgem na literatura em meados da década de 1980, com cerca de 19 artigos por ano. Na década seguinte, observa-se um aumento de mais de 20 vezes, chegando a mais de 500 artigos por ano. Já na primeira década dos anos 2000, este valor mais que triplicou atingindo 1.819 artigos por ano. Nos últimos anos (2011 e 2012) este valor quase dobrou, observando-se mais de 3.000 artigos por ano sobre este tema e tudo indica que esta tendência continuará no futuro. O crescente interesse da comunidade científica sobre o assunto também pode ser evidenciado pela realização de eventos científicos e a criação de periódicos específicos sobre biossensores (BARROCAS *et al.*, 2008).

Os bioensaios tradicionais possuem uma série de inconvenientes, tais como: longo tempo de análise, altos custos para manutenção dos organismos, pouca reprodutibilidade e dificuldade de extrapolação dos resultados de uma espécie para outra (URE e DAVIDSON, 1995; CAROLI, 1996).

Estimulada pelas dificuldades das abordagens tradicionais em resolver adequadamente questões como a biodisponibilidade, pesquisadores buscaram alternativas chegando ao desenvolvimento da tecnologia dos biossensores. Um biossensor é um dispositivo analítico que combina a

sensibilidade do elemento biológico com um transdutor para produzir um sinal elétrico ou ótico, proporcional à concentração do analito (CHARRIER *et al.*, 2011; TURNER *et al.*, 1992).

O funcionamento dos biossensores, de forma geral, se baseia inicialmente no reconhecimento de um dado substrato pelo componente biológico, desta forma a alta especificidade e a alta sensibilidade do componente biológico com o substrato de interesse são de grande importância para o bom funcionamento do biossensor. Em seguida, como produto da interação entre a molécula biológica e o substrato, variações de um ou mais parâmetros físico-químicos são gerados e estes produzem íons, elétrons, calor, luz, massa, fluorescência ou gases, que são convertidos em um sinal elétrico quantificável e processável pelo uso de um transdutor adequado (SHARMAT & ROGERS, 1994).

A reação biológica detectada pode ser a atividade enzimática, a indução da expressão de um gene ou mesmo a morte celular. Os sistemas de detecção destes efeitos biológicos, geralmente se baseiam em princípios eletroquímicos ou óticos que são eletronicamente amplificados. Os biossensores podem ser diferenciados dos bioensaios tradicionais, nos quais o conversor ou detector não é parte integral do sistema analítico. Nestes bioensaios, os resultados são obtidos somente após o uso de equipamentos ou “conversores” externos, o que pode causar maiores custos e tempos de resposta devido à necessidade de etapas de processamento das amostras (SELIFONOVA *et al.*, 1993; RAMANATHAN *et al.*, 1997; ALFAYA e KUBOTA, 2002; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2005; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2006; BATZIAS e SIONTOROU, 2007).

Alguns biocompostos são adequados para o uso como biosensores, entre eles: enzimas, cofatores, receptores, anticorpos, células de micro-organismos, tecidos de plantas e animais e organelas. Micro-organismos têm sido integrados com uma variedade de transdutores, tais como amperométricos, potenciométricos, calorimétricos, condutimétricos, colorimétricos, luminescentes e fluorescentes para construir dispositivos biosensores (D'SOUZA, 2001).

Os biosensores têm sido classificados de diversas maneiras. Duas formas amplamente descritas na literatura são baseadas nos métodos de conversão do sinal ou nos elementos receptores biológicos utilizados. Assim, em relação ao primeiro tipo de classificação, temos: Elétricos, Eletroquímicos, Ópticos, Acústicos, Piezoelétricos e Termométricos. Já em relação ao elemento biológico, podemos dividi-los em: Imunológicos (naturais ou manipulados geneticamente), Ácidos Nucleicos (ADN ou ARN), Enzimáticos, Receptores não enzimáticos e Células Microbianas Íntegras. Neste último grupo tivemos inicialmente células bacterianas, mas isto tem sido expandido para incluir fungos e algas (ALFAYA e KUBOTA, 2002; BELIN, 2003; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2004, BARROCAS *et al.*, 2008; ELTZOV e MARKS, 2011).

Os micro-organismos são uma alternativa conveniente para compor estes instrumentos, pois a maioria das enzimas e co-fatores que coe-xistem nas células fornecem a estas habilidade para consumir e, portanto, detectar uma grande quantidade de elementos químicos, embora não apresente tanta seletividade. Estes podem ser facilmente manipulados e adaptados ao consumo à degradação de um novo substrato sob certas condições. São mais baratos de se produzir porque podem ser cultivados em grandes quantidades sem

necessidade do isolamento de componentes específicos. Entretanto, as condições de cultivo devem ser cuidadosamente controladas para assegurar a reprodutibilidade. (SELIFONOVA *et al.*, 1993; RAMANATHAN *et al.*, 1997). De forma análoga, embora tenha-se avançado bastante nas técnicas de imobilização de células que permitem, por exemplo, a construção de microarranjos de células sensoras em diferentes plataformas (ex.: biochips e fibra óticas), ainda é necessário o desenvolvimento de técnicas confiáveis para preservação dos biosensores microbianos de forma a garantir sua viabilidade e atividade (DOU *et al.*, 2012; DEPAGNE *et al.*, 2011; HERAS e LORENZO, 2011; BJERKETORP *et al.*, 2006).

Além disso, o progresso na tecnologia do DNA recombinante tem fornecido possibilidades de aumentar a atividade de uma enzima existente ou expressar certa proteína/enzima na célula. Esta tecnologia tem sido amplamente empregada na construção dos biosensores que utilizam células microbianas íntegras (biosensores microbianos). Embora exista uma grande variedade de arranjos, eles geralmente apresentam um gene sinalizador sob o controle de um promotor, muitas vezes proveniente de um gene de resistência à substância que se deseja estudar, o qual é induzido apenas pela presença intracelular desta substância. Este material é organizado em elementos genéticos móveis (ex.: plasmídios ou transposons) que são introduzidos em organismos hospedeiros, que por sua vez podem ser imobilizados em substratos, utilizando diferentes técnicas (BARROCAS *et al.*, 2008; BELKIN, 2003; RENSING e MAIER, 2003).

Os biosensores complementam as análises químicas, fornecendo informações que, de outra maneira, não estariam disponíveis, como por exemplo, avaliando os efeitos biológicos

(tóxicos ou não) de compostos químicos a nível celular ou intracelular ou determinando a fração biodisponível da concentração total do poluente presente em uma amostra ambiental. Devido a sua grande seletividade e sensibilidade para detecção e quantificação de compostos relevantes para diferentes áreas, como a clínica, industrial e ambiental (SELIFONOVA *et al.*, 1993; RAMANATHAN *et al.*, 1997). A aplicação de biosensores se encontra em plena expansão. Na área clínica, por exemplo, existem biosensores microbianos bioluminescentes capazes de avaliar a eficácia de drogas contra leucemia (ALLOUSH *et al.*, 2010).

Na área ambiental, estes novos sistemas de detecção baseados em sensores microbianos estão em amplo desenvolvimento e na grande maioria usam a resposta luminescente a um composto tóxico presente no meio poluído. Em geral, a intensidade da luminescência é uma medida mais sensível à atividade metabólica do que à atividade respiratória ou à geração de calor (KARUBE e NAKANISHI, 1994; LIGLER, 2009). Vários trabalhos ilustram o potencial da biologia molecular no projeto de biosensores para a detecção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e de metais pesados (MULCHANDANI *et al.*, 2005; KEANE *et al.*, 2002; TIBAZARWA *et al.*, 2001; RODA *et al.*, 2001; REID *et al.*, 1998; STICHER *et al.*, 1997).

A elevada especificidade dos biosensores é decorrente de mecanismos bioquímicos, geneticamente codificados, os quais são responsáveis em muitos casos por mecanismos de resistência a poluentes. A expressão destes genes é fortemente regulada e induzida apenas pela presença das respectivas substâncias indutoras no ambiente celular, em concentrações fisiologicamente significativas (SU *et al.*, 2011).

Outras vantagens da abordagem com biosensores, em relação às técnicas tradicionais são a economia, a portabilidade, a rapidez da resposta e a possibilidade de analisar compostos diretamente em amostras complexas, como amostras ambientais ou biológicas, sem a necessidade de pré-tratamentos. Vislumbra-se, em um futuro não muito distante, o desenvolvimento de sistemas autônomos de monitoramento em tempo real, de diversos poluentes ambientais, simultaneamente. Estes sistemas devem ter robustez, que permitam sua utilização diretamente no campo e possibilidade de conexão sem fio *on line* para o seu acompanhamento remoto a partir de centrais de controle. Os recentes desenvolvimentos nas áreas de nanotecnologia, incluindo o desenvolvimento de novos materiais e da nanoeletrônica, deverão auxiliar na miniaturização dos equipamentos, reduzindo a necessidade de energia para sua operação, assim como, do volume de amostra necessário à análise e da geração de resíduos. Os primeiros protótipos comerciais destes sistemas já estão disponíveis no mercado, embora ainda para um grupo restrito de poluentes e com preços elevados. O recente desenvolvimento da abordagem do microarranjo (ex.: biochips) de biosensores (ex.: proteínas, DNA, anticorpos) tem gerado um grande desenvolvimento neste campo. Por fim, tem sido proposta por alguns autores a futura criação de redes *on line* de monitoramento ambiental, baseadas em plataformas de biosensores que possam gerar alertas precoces em casos de emergência (ELTZOV & MARKS, 2011; FARRÉ *et al.*, 2009; BLASCO e PICO, 2009; LIGLER, 2009; LUONG *et al.*, 2008; BARROCAS *et al.*, 2008; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2005, BELKIN, 2003; STEINBERG *et al.*, 1995; RAMANATHAN *et al.*, 1997).

## 5 | ENSAIOS MICROBIOLÓGICOS

Os micro-organismos do solo também constituem uma forma de biomonitoramento (medida da resposta de organismos vivos a mudanças de seu ambiente) e são ainda utilizados para avaliação do ambiente impactado porque eles são capazes de responder à fração biodisponível dos contaminantes (DAWSON *et al.*, 2007).

A atividade microbiológica é altamente concentrada nas primeiras camadas do solo (até 30 cm), sendo essencial para a decomposição da matéria orgânica, biodisponibilizando nutrientes e degradando substâncias tóxicas (KENNEDY e DORAN, 2002).

Em muitos ecossistemas existe uma comunidade autóctone de micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos (hidrocarbonoclasticos) (KATAOKA, 2001). Como a presença de atividade microbiana no solo é abundante e suas características de atividade bioquímica e metabólica proporcionam respostas às mudanças no ambiente, estes se apresentam como bioindicadores na avaliação da qualidade do solo.

Os métodos microbiológicos podem ser divididos em tradicionais e alternativos. Os tradicionais que envolvem cultivo de micro-organismos apresentam limitações relacionadas à baixa seletividade dos meios de cultura e conseqüentemente diferentes respostas biológicas aos mesmos. Já os métodos alternativos figuram entre os mais eficazes, pois proporcionam respostas mais rápidas, seletivas e de melhor qualidade.

A escolha do método deve considerar sua aplicabilidade e a compatibilidade com a matriz a ser analisada.



A seguir, são apresentados alguns dos métodos microbiológicos comumente empregados no biomonitoramento de amostras de solos contaminados.

## 5.1 | Contagem da População Microbiana

Os parâmetros tipicamente medidos em testes laboratoriais visando avaliar a eficiência do processo de biodegradação incluem a contagem de micro-organismos heterotróficos totais e a contagem de micro-organismos degradadores de um ou de vários substratos específicos (SONG *et al.*, 1990; BALBA *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2000; KATAOKA, 2001; FOGHT e AISLABIE, 2005; GUO *et al.*, 2012).

A presença de uma população elevada de micro-organismos heterotróficos totais não indica, necessariamente, correlação direta com a eficiência de biodegradação; porém, a quantificação da fração da comunidade que degrada o contaminante de interesse tem sido utilizada como um dos métodos mais comuns para o monitoramento da evolução do processo (GUO *et al.*, 2012; KATAOKA, 2001).

A técnica do Número Mais Provável (NMP) vem sendo usada para estimar a densidade de uma enorme gama de micro-organismos provenientes das mais diversas origens e em diferentes sistemas (bactérias, fungos e actinomicetos). A referida técnica permite estimar a densidade de um grupo microbiano, sem necessidade de contagem direta (ALEXANDER, 1982).

O uso deste método permitiu que BENTO *et al.* (2005) observassem que, em geral, a população microbiana responsável pela degradação de diesel em solos contaminados

não fosse afetada pelas diferentes técnicas de biorremediação empregadas (bioaugmentação, bioestimulação e atenuação natural).

A mesma metodologia foi aplicada por WRENN e VENOSA, (1996) para enumerar, de forma seletiva, as bactérias degradadoras de hidrocarbonetos alifáticos ou aromáticos em solos contaminados. Neste ensaio, o NMP para as degradadoras de alcanos foi baseado no uso de hexadecano como substrato no meio seletivo, enquanto as degradadoras de compostos aromáticos foram selecionadas pela técnica de NMP na presença de fenantreno e antraceno como fontes seletivas de carbono. Já RIZZO *et al.* (2010) utilizaram a técnica do NMP para acompanhamento do processo de biorremediação, em um biorreator piloto de fase sólida não convencional, de um solo tropical contaminado com cerca de 5% de óleo cru. Os autores observaram uma adaptação lenta e gradual da população degradadora de óleo cru ao longo do processo de tratamento proposto.

Recentemente, o NMP foi utilizado para detectar a presença de micro-organismos redutores de nitrato e ferro em sedimentos contendo óleo cru (RIJAL *et al.*, 2012).

## 5.2 | Respirometria

O ensaio de respiração basal (ensaio de respirometria), quantificação do CO<sub>2</sub> liberado pela respiração dos micro-organismos, fornece uma medida da decomposição de carbono orgânico em solos pelos micro-organismos ativos e vem sendo muito utilizado para quantificar a atividade microbiana. Por outro lado, a respiração induzida por substrato determina a

utilização de substratos específicos com carbono, por certas comunidades, dentro da população microbiana geral.

Através da medida das duas taxas de respiração é possível avaliar o potencial da população microbiana em degradar determinados compostos e esta vem sendo aplicada como parâmetro de medida do grau de biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos (MARGESIN *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2005). Quando a taxa de respiração induzida é maior em uma amostra, pode-se concluir que a biomassa microbiana degradadora presente também encontra-se em maior quantidade (BROHON *et al.*, 2001; RIZZO *et al.*, 2008).

### 5.3 | Atividades Enzimáticas

As atividades enzimáticas são comumente utilizadas como indicadores da qualidade do solo porque elas representam um importante papel na ciclagem de nutrientes e podem ser indicadores sensíveis na remediação de solos contaminados com hidrocarbonetos.

De maneira geral, as enzimas são mediadoras do catabolismo dos componentes orgânicos e inorgânicos do solo e encontram-se relacionadas com a atividade e a biomassa microbiana, além de estarem diretamente envolvidas nos processos de degradação de compostos recalcitrantes (BARBOSA *et al.*, 2008).

Dentre as enzimas indicadoras da qualidade de solo, destacam-se: desidrogenase, enzima do sistema de transporte de elétrons (atividade microbiana); beta-glucosidase e celulase, responsáveis pela hidrólise de materiais celulolíticos (ciclagem

do carbono); urease e amilase (ciclagem do nitrogênio); fosfatase (liberação de  $\text{PO}_4^{3-}$ , ciclagem do P) e arilsulfatase (liberação de  $\text{SO}_4^{2-}$ , ciclagem do S).

O uso da enzima desidrogenase como indicador de atividade microbiana e indicadora de atividade oxidante total em solos vem sendo avaliada extensivamente. BENTO *et al.* (2005) observaram mudanças significativas nas taxas de atividade microbiana e biorremediação de solos contaminados com diesel através de testes de atividade de desidrogenase nos experimentos comparando bioaumento, bioestimulação e atenuação natural dos solos nos ensaios.

LI *et al.* (2007), em um experimento laboratorial de 110 dias, visando relacionar a atividade enzimática no solo com o teor de contaminante orgânico, observaram que o aumento da concentração do contaminante (diesel) estimulou o crescimento da população bacteriana heterotrófica e também o aumento da atividade das enzimas desidrogenase, hidrogenioperoxidase e polifenol oxidase no solo.

GUO *et al.* (2012) investigaram a influência da contaminação de petróleo sobre a atividade microbiana em 13 amostras de solo (teores de TPH variando de 7,5 a 34.600,00  $\text{mg kg}^{-1}$ ). Os autores observaram uma queda da atividade da enzima urease com o aumento da concentração de óleo. O mesmo aconteceu com a concentração de bactérias e fungos cultiváveis. Foi verificada a correlação positiva entre a concentração do contaminante e a matéria orgânica do solo com o estímulo da atividade fungos-bactérias- urease em baixas concentrações de TPH, sugerindo que o TPH se liga à matéria orgânica do solo, sendo lentamente metabolizado durante o consumo desta. Os resultados obtidos indicaram que

estes métodos podem ser utilizados a fim de avaliar o potencial dos solos poluídos para realizar um processo natural de biorremediação.

Em outro experimento, WANG *et al.* (2010) observaram que as atividades de desidrogenase, invertase e urease em solo contaminado foram inibidas quando a concentração de hidrocarbonetos foi aumentada de 0 para 1000 mg/kg de solo (0,1% m/m). Em contrapartida, as atividades de fosfatase e catalase (peroxidase envolvida na degradação de compostos aromáticos) aumentaram significativamente.

O método da hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) também tem sido avaliado como indicador de atividade microbiana em solos contaminados de sistema de "landfarming" de resíduos petroquímicos (NAKATANI *et al.*, 2008), diesel (VAN GESTEL *et al.*, 2003) e combustíveis (SONG & BARTHA, 1990).

## 6 | CONCLUSÕES

A biorremediação configura-se como uma das técnicas menos impactantes de remediação do solo contaminado por hidrocarbonetos, uma vez que o solo não é destruído e pode retornar novamente ao ambiente. Entretanto, esta técnica requer o acompanhamento de uma série de fatores capazes de influenciar na atividade microbiológica responsável pela degradação dos compostos no solo.

Um dos fatores que merece destaque nesse monitoramento é a biodisponibilidade dos contaminantes, visto que sua redução é talvez o objetivo mais apropriado a ser atingido no final de um processo de tratamento. Essa redução na biodisponibilidade é bem demonstrada por meio de vários ensaios com indicadores biológicos, atualmente usados ainda de forma pouca rotineira.

Espera-se que, além do incremento da biorremediação como técnica de tratamento de solos contaminados com hidrocarbonetos, a aplicação de ensaios com indicadores biológicos passe a ser mais utilizada como uma das ferramentas mais adequadas para avaliar a biodisponibilidade dos contaminantes e seus riscos associados.

## **7 | AGRADECIMENTOS**

À Dra. Adriana Soriano, do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Petrobras (CENPES).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. John Wiley. New York, 1967.
- ALEXANDER, M. Most propable number method for microbial population. In: PAGE, A.L; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Org.). Methods of soil analysis. 2.ed. Madison: ASA/SSSA, 1982. Part.2, p.815-820. (Agronomy, 2).
- ALLOUSH, H. M., ANDERSON, E., MARTIN, A. D., RUDDOCK, M. W., ANGELL, J. E., HILL, P. J., MEHTA, P. M., SMITH, M. A., SMITH, J. G., SALISBURY, V. C. A bioluminescent microbial biosensor for in vitro pretreatment assessment of cytarabine efficacy in leukemia. *Clinical Chemistry*, vol. 56, p.1862-1870, 2010.
- AL-MUTAIRI, N.; BUFARSAN, A. & AL-RUKAIBI, F. Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. *Chemosphere*, vol. 74, p.142-148, 2008.
- AN, HR, MAINELIS, G, & WHITE, L . Development and calibration of real-time PCR for quantification of airborne microorganisms in air samples. 40: 7924-7939. 2006.
- ANDERSSON, AF, RIEMANN, L, & BERTILSSON, S. Pyrosequencing reveals contrasting seasonal dynamics of taxa within Baltic Sea bacterioplankton communities. *The ISME journal* 4: 171-81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19829318>. 2010.
- ANDREOTE, FD, AZEVEDO, JL, & ARAUJO, WL . Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 417-432: //WOS:000269120400001. 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO 15799/2013: Qualidade do solo — Guia para caracterização ecotoxicológica de solos e materiais de solo. Rio de Janeiro: ABNT, 2011.



- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO 17616/2010: Qualidade do Solo – Guia para a Seleção e a Avaliação de Bioensaios para Caracterização Ecotoxicológica de Solos e Materiais de Solo. Rio de Janeiro: ABNT, 2010.
- BALBA, M. T., AL-AWADHI, N. & AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 32, p.155-164, 1998.
- BELKIN, S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 6, p. 206-212, 2003.
- BENTO, F. M., CAMARGO, F. A. O., OKEKE, B. C. & FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, vol. 96, p.1049-1055, 2005.
- BJERKETORP, J., HAKANSSON, S., BELKIN, S., JANSSON, J. K. Advances in preservation methods: keeping biosensor microorganisms alive and active. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 17, p. 43-49, 2006.
- BORNEMAN, J, & TRIPLETT, EW . Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2647-2653. :/WOS:A1997XJ18200025. 1997.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução N<sup>o</sup> 420 de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Disponível em:<<http://www.mma.gov.br>>. Acesso em: 10 out. 2010.

- BROHON, B., DELOLME, C. & GOURDON, R. Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 33, p.883-891, 2001.
- CACHADA, A.; PEREIRA, R.;SILVA, E. F. & DUARTE, A. C. The prediction of PAHs bioavailability in soils using chemical methods: State of the art and future challenges. *Science of the Total Environment*. vol. 472, p. 463–480, 2014.
- CAROLI, S. Element speciation in bioinorganic chemistry. *Chemical Analysis series*. John Willey & Sons. New York, 1996.
- CARTER, M. R. & GREGORICH, E. G. *Soil Sampling and Methods of Analysis*. 2 ed. Canadian of Society of Soil Science. CRC Press, Taylor & Francis Group. 2008
- CHOJNACKA, K., CHOJNACKI, A., GÓRECKA, H. & GÓRECKI, H. Bioavailability of heavy metals polluted soils to plants. *Science of the Total Environment*, vol. 337, p.175-182, 2005.
- CUI, X., MAYER, P.& GAN, J. Methods to assess bioavailability of hydrophobic organic contaminants: Principles, operations, and limitations. *Environmental Pollution*, vol. 172, p. 223–234, 2013.
- CUNHA, C. D.; ROSÁRIO, M. ;ROSADO, A. S.; LEITE, S. G. F. *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. *Process Biochemistry*, vol. 39, p. 2277-2282, 2004.
- D'ANDRÉA, A. F., SILVA, M. L. N. , CURI, N., SIQUEIRA, J. O. & CARNE, M. A. C. Atributos biológicos indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na região do cerrado no sul do estado de Goiás. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, vol. 26, p.913-923, 2002.
- D'SOUZA, S.F. Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, vol.16, p. 337-353, 2001.

- DAWSON, J.J.C., GODSIFFE, E.J., THOMPSON, I.P., RALEBITSO-SENIOR, T.K., KILLHAM, K.S. & PATON, G.I. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 39, p.164-177, 2007.
- DENI, J. & PENNINGCKX, M. J. Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon-polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, p. 4008–4013, 1999.
- EHLERS, L. J. & LUTHY, R. G. Contaminant Bioavailability in Soil and Sediment. *Environ. Sci. Technol.*, vol.37, nº 15, p.295A – 302A, 2003.
- EOM, I.C., RAST, C., VEBER, A.M. & VASSEUR, P.. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 67, p.190-205, 2007.
- EVANS, F. F., SELDIN, L., SEBASTIAN, G. V., KJELLEBERG, S., HOLMSTRÖM, C. & ROSADO, A. S. Influence of petroleum contamination and biostimulation treatment on the diversity of *Pseudomonas* spp. in soil microcosms as evaluated by 16S rRNA based-PCR and DGGE. *Letters and Applied Microbiology*, vol. 38, p.93-98, 2004.
- FOGHT, J., AISLABIE, J., Enumeration of soil microorganisms. In: MARGESIN, R.,SCHINNER, F. (Eds.), *Manual for Soil Analysis – Monitoring and Assessing Soil Bioremediation*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany, pp. 261–280, 2005.
- FÖRSTNER, U. & WITTMANN, G.T. *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer-Verlag. Heidelberg, 1981.
- FRANCO, I., CONTINA, M., BRAGATO, G. & DE NOBILIA, M. Microbiological resilience of soils contaminated with crude oil. *Geoderma*, vol.121, p.17–30, 2004.

- FURUKAWA, K, NODA, N, TSUNEDA, S, SAITO, T, ITAYAMA, T, & INAMORI, Y .Highly sensitive real-time PCR assay for quantification of toxic cyanobacteria based on microcystin synthetase a gene. 102: 90-96. 2006.
- GEISSEN, V.; GOMEZ-RIVERA, P.; LWANGA, E.H.; MENDOZA, R.B.; NARCÍAS, A.T. 7 MARCÍAS, E.B. Using earthworms to test the efficiency of remediation of oil-polluted soil in tropical Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 71, p.638-642, 2008.
- GOMES, N. C. M., BORGES, L. R., PARANHOS, R., PINTO, F. N., KRÖGERRECKLENFORT, E., MENDONÇA-HAGLER, L. C. S. & SMALLA, K. Diversity of *ndo* genes in mangrove sediments exposed to different sources of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Applied and environmental microbiology*, 73(22), 7392-9. doi:10.1128/AEM.01099-07. 2007.
- GUO H. , YAO J., CAI M., QIAN Y., GUO Y., RICHNOW H. H., BLAKE R. E., DONI S. & CECCANTI B. Effects of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity. *Chemosphere*, vol. 87, p. 1273–1280, 2012.
- HAMADY, M, LOZUPONE, C, & KNIGHT, R . Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. *The ISME Journal* 4: 17-27. 2009.
- HAWS, N. W., BALL, W. P. & BOUWER, E. J. Modeling and interpreting bioavailability of organic contaminant mixtures in subsurface environments. *Journal of Contaminant Hydrology*, vol. 82, p.255-292, 2006.
- HUBÁLEK, T.; VOSÁHLOVÁ, S.; MATEJU, V.; KOVÁCOVÁ, N. & NOVOTNY, C. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: a case study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 52, p.1-7, 2007.
- HUGENHOLTZ, P, & PACE, NR . Identifying microbial diversity in the natural environment: A molecular phylogenetic approach. 14: 190-197. 1996.

- HUND, K. & TRAUNSPURGER, W. Ecotox Evaluation Strategy for Soil Bioremediation Exemplified for a PAH Contaminated Site. *Chemosphere*, vol. 29, p. 371-390, 1994.
- HUSE, SM, DETHLEFSEN, L, HUBER, JA, MARK WELCH, D, WELCH, DM, RELMAN, DA, & SOGIN, ML . Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. *PLoS genetics* 4: e1000255. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19023400>. 2008.
- IWAMOTO, T. & NASU, M. Current bioremediation practice and perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.92, nº 1, p.1-8, 2001.
- JANSSON, J. K., BJÖRKLÖF, K., ELVANG, A. M. & JORGENSEN, K. S. Biomarkers for monitoring efficacy of bioremediation by microbial inoculants. *Environmental Pollution*, vol. 107, p.217-223, 2000.
- KARUBE, I. & NAKANISHI, K. Immobilized cell used for detection and analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 5, p.54-59, 1994.
- KATAOKA, A. P. A. G. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de "landfarming". Rio Claro: Instituto de Biociências, Unesp, (Tese de doutorado), 2001.
- KUHN, E., BELLICANTA, G. S., & PELLIZARI, V. H. New alk genes detected in Antarctic marine sediments. *Environmental microbiology*, 11(3), 669-73. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01843.x. 2009.
- LEI, L., KHODADOUST, A. P., SUIDAN, M.T. & TABAK, H.H. Biodegradation of sediment-bound PAHs in field contaminated sediment. *Water Research*, vol. 39, p.349-361, 2005.

- LI, H. ; ZHANG, Y.; KRAVCHENKO, I.; XU H.& ZHANG C. Dynamic changes in microbial activity and community structure during biodegradation of petroleum compounds: A laboratory experiment. *Journal of Environmental Sciences*, vol. 19, p. 1003–1013, 2007.
- LORS, C., ALDAYA, M. M.; SLAMON, S. & PONGE, J.-F. Use of an avoidance test for the assessment of microbial degradation of PAHs. *Soil Biology & Biochemistry*, vol. 38, p.2199-2204, 2006.
- LOZUPONE, C, HAMADY, M, & KNIGHT, R. UniFrac - An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. 7. 2006.
- LUHACH, J. & CHAUDHRY, S. Effect of diesel fuel contamination on seed germination and growth of four agricultural crops. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, vol. 2, p.311-317, 2012.
- MACNAUGHTON, S. J., STEPHEN, J. R., VENOSA, A. D., DAVIS, G. A., CHANG, Y.-J. & WHITE, D. C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, n<sup>o</sup> 8, p.3566-3574, 1999.
- MANTER, D, DELGADO, J, HOLM, D, & STONG, R . Pyrosequencing Reveals a Highly Diverse and Cultivar-Specific Bacterial Endophyte Community in Potato Roots. *Microbial Ecology*. 2010. <http://www.springerlink.com/index/NN8W74W270327343.pdf>.
- MANZO, S.; NICOLA, F.D.; PICIONE, F.D.L.; MAISTO, G. & ALFANI, A. Assessment of the effects of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests. *Chemosphere*, vol. 71, p.1937-1944, 2008.
- MARGESIN, R., ZIMMERBAUER, A. & SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, vol. 40, p.339-346, 2000.

- MESEARCH, M. B., NAKATSU, C. H. & NIES, L. Development of catechol 2,3-dioxygenase – specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. Applied and Environmental Microbiology, vol. 66, nº 2, p.678-683, 2000.
- MOLINA-BARAHONA, L., VEGA-LOYO, L., GUERRERO, M., RAMÍREZ, S., ROMERO, I., VEGA-JARQUÍN, C. & ALBORES, A. Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after a bioremediation process. Environmental Toxicology .vol. 20(1), p. 100-9, 2005.
- MULCHANDANI, P., HANGARTER, C. M., LEI, Y., CHEN, W. & MULCHANDANI, A. Amperometric microbial biosensor for *p*-nitrophenol using *Moraxella* sp.-modified carbon paste electrode. Biosens. Bioelectron., vol. 21, p. 523-527, 2005.
- MUYZER, G., DE WAAL, E. C. & UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, vol. 59, nº 3, p.695-700, 1993.
- NAKATANI, A. S., SIQUEIRA, J. O., SOARES, C. R. F. S. & LAMBAIS, M. R. Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de "landfarming" de resíduos petroquímicos. Revista Brasileira de Ciência do Solo, vol. 32, p.1501-1512, 2008.
- NAKATSU, C. H., TORSVIK, V. & OVREAS, L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. Soil Science Society of America Journal, vol. 64, p.1382-1388, 2000.
- NAMAZI, S. V., RAIESI, F. & GHORBANI, S. H. The interactive effects of crude oil and N forms on C mineralization and microbial biomass of a clay soil. Journal of Environmental Studies, vol. 38, p.1-3, 2012.

- NUNES-HALLDORSON, V. S., STEINER, R. L. & SMITH, G. B. Residual toxicity after biodegradation: Interaction among benzene, toluene and chloroform. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 57, p.162-167, 2004.
- OH, Y. S., CHOI, W. Y., LEE, Y. H., CHOI, S. C. & KIM, S. J. Biological treatment of oilcontaminated sand: comparison of oil degradation based on thin-layer chromatography/flame ionization detector and respirometric analysis. *Biotechnology Letter*, vol. 22, p.595-598, 2000.
- OLSEN, G. J., WOESE, C. R. & OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *Journal of Bacteriology*, vol. 176, n<sup>o</sup> 1, p.1-6, 1994.
- PLAZA, G., NALECZ-JAWECKI, G., ULFIG, K. & BRIGMON, R.L. The application of bioassays as indicator of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere*, vol. 59, p.289-296, 2005.
- POWELL, SM, FERGUSON, SH, BOWMAN, JP, & SNAPE, I. Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. *Microbial Ecology* 52: 523-532. 2006.
- RAMANATHAN, S., ENSOR, M. & DAUNERT, S. Bacterial biosensor for monitoring toxic metals. *Trends in Biotechnol.*, vol.15, p.500-506, 1997.
- RAYMOND, R. L., HUDSON, J. O. & JAMISON V. W. Oil degradation in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, vol.31, p.522-535, 1976.
- REID, B.J., SEMPLE, K.T., MACLEOD, C.J., WEITZ, H.J. & PATON, G.I. Feasibility of using prokaryote biosensors to assess acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 169, p. 227-233, 1998.
- RENSING, C. & MAIER, R.M. Issues underlying use of biosensors to measure metal bioavailability. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, vol. 56, p. 140-147, 2003.



- RIFFALDI, R., LEVI-MINZI, R., CARDELLI, R., PALUMBO, S. & SAVIOZZI, A. Soil Biological Activities in Monitoring the Bioremediation of Diesel Oil-Contaminated Soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 170, p.3-15, 2006.
- RIJAL, M. L., PORSCH, K., APPEL, E. & KAPPLER, A. Magnetic signature of hydrocarbon-contaminated soils and sediments at the former oil field Hänigsen, Germany. *Studia Geophysica Et Geodaetica*, vol. 56, 889-908, 2012.
- RIZZO, A. C. L.; CUNHA, C. D.; SANTOS, R. L. C.; SANTOS, R. M.; MAGALHÃES, H. M.; LEITE, S. G. F. & SORIANO, A. U.. Preliminary Identification of the Bioremediation Limiting Factors of a Clay Bearing Soil Contaminated with Crude Oil. *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 19, n<sup>o</sup>. 1, p. 169-174, 2008.
- RIZZO, A. C. L, SANTOS, R. M.; SORIANO, A. U.; ROSADO, A.; CUNHA, C. D.; SOBRAL, SOBRAL, L. G. S.; SANTOS, R.; LEITE, S. G. F. Petroleum-contaminated soil remediation in a new solid phase bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 85, p. 1260-1267, 2010.
- RODRIGUEZ-MOZAZ, S., ALDA, M. J. L., MARCO, M. P. & BARCELO, D. Biosensors for environmental monitoring: a global perspective. *Talanta*, vol. 65, p.291-297, 2005.
- ROESCH, L, FULTHORPE, R, RIVA, A, & CASELLA, G. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME* 000: 283-290. <http://www.nature.com/ismej/journal/v1/n4/abs/ismej200753a.html>. 2007.
- ROSADO, A. S. & DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: MELLO, I.S. (Ed.). *Genética e Melhoramento de Microorganismos*. São Paulo: EdUSP, 2002.
- ROSADO, A. S., DUARTE, G. F., SELDIN, L. & VAN ELSAS, J. D. Molecular microbial ecology: a minireview. *Revista de Microbiologia*, vol. 28, p.135-147, 1997.

- SABATÉ, J., VINAS, M. & SOLANAS, A. M. Bioavailability assessment and environmental fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in biostimulated creosote-contaminated soil. *Chemosphere*, vol. 63, p.1648-1659, 2006.
- SABATÉ, J., VINAS, M. & SOLANAS, A. M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 54, p.19-25, 2004.
- SCHLOSS, P, & HANDELSMAN, J . Toward a census of bacteria in soil. *PLoS Comput Biol* 2. <http://compbiol.plosjournals.org/perlserv?request=get-document&doi=10.1371%2Fjournal.pcbi.0020092>. 2006.
- SCHLOSS, P, & HANDELSMAN, J. A statistical toolbox for metagenomics: assessing functional diversity in microbial communities. *Bmc Bioinformatics* 15: 1-15. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/9/34>. 2008.
- SCHLOSS, PD et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and environmental microbiology* 75: 7537-41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19801464>. 2009.
- SELIFONOVA, O., BURLAGE, R. & BARKAY, T. Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg (II) in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, n<sup>o</sup> 9, p.3083-3090, 1993.
- SEMPLE, K. T., DOICK, K. J., JONES, K. C., BURAUUEL, P., CRAVEN, A. & HARMS, H. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, n<sup>o</sup> 12, p. 228A – 231A, 2004.

- SISINNO, C., BULUS, M., RIZZO, A. & MOREIRA, J. Ensaios de comportamento com minhocas (*Eisenia fetida*) para Avaliação de Áreas Contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 8., 2004, Florianópolis: Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia. p.41
- SISINNO, C., BULUS, M., RIZZO, A., SÁFADI, R., FONTES, A. & MOREIRA, J. Ensaios ecotoxicológicos como um instrumento de complementação da avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares em áreas contaminadas por hidrocarbonetos. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE SAÚDE E AMBIENTE, 3., 2004, Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz. p.150-154
- SONG, H-G. & BARTHA, R. Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. Applied and Environmental Microbiology, vol. 56, p.646-651, 1990.
- STEINBERG, S.M., POZIOMEK, E.J., ENGELMANN, W.H. & ROGERS, K.R. A review of environmental applications of bioluminescence measurements. Chemosphere, vol. 30, nº 11, p. 2155-2197, 1995.
- STICHER, P., JASTPERS, M.C.M., STEMLER, K., HARMS, H., ZEHNDER, A.J.B. & VAN DER MEER, J.R. Development and characterization of a whole-cell bioluminescent sensor for bioavailable middle-chain alkanes in contaminated groundwater samples. Applied and Environmental Microbiology, vol. 63, nº 10, p.4053-4060, 1997.
- TAKETANI, RG, & TSAI, SM. The Influence of Different Land Uses on the Structure of Archaeal Communities in Amazonian Anthrosols Based on 16S rRNA and amoA Genes. Microbial ecology. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20204349>. 2010.

- TAKETANI, RG, ARAÚJO, FV, SOUZA CANNAVAN, F, TSAI, SM, & ROSADO, AS. Influence of the bacterioplankton community of a tropical eutrophic lagoon on the bacterial community of its neighbouring ocean. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010. <http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11274-010-0368-9>.
- TAKETANI, RG, DOS SANTOS, HF, VAN ELSAS, JD, & ROSADO, AS. Characterisation of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. *Antonie van Leeuwenhoek* 96: 343-54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19468855>. 2009.
- TAKETANI, RG, FRANCO, NO, ROSADO, AS, & VAN ELSAS, JD. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 48: 7-15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20221723>. 2010.
- TANG, J., WANG, M., WANG, F., SUN, Q. & ZHOU, Q. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, vol. 23, p.845-851, 2011.
- THERON, J. & CLOETE, T. E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 26, n<sup>o</sup> 1, p.37-57, 2000.
- TIBAZARWA, C., COTBISIER, P., MENCH, M., BOSSUS, A., SOLDA, P., MERGEAY, L., WYNS, D. & VAN DERLELIE, D. A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plant. *Environmental Pollution*, vol. 113, p.19-26, 2001.
- TRINDADE, P.V.O. ; SOBRAL, L.G. ; RIZZO; A.C.L.; LEITE, S.G.F. & SORIANO, A.U.. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere*, vol. 58, p. 515–522, 2005.
- TURNER, AP.F.; HEINEMAN, W.R.; KARUBE, I. & SCHIMD, R.D.; (1992), *Biosensors 92 Proceedings: The Second World Congress on Biosensors*, Elsevier Advanced Technology. Germany.

- URE, A.M. & DAVIDSON, C.M. Chemical Speciation in the Environment. 1. Ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995. 408 p.
- VAN GESTEL, K., MERGAERT, J., SWINGS, J., COOSEMANS, J. & RYCKEBOER, J. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environmental Pollution*, vol. 125, p. 361-368, 2003.
- WANG, J., ZHAN, X., ZHOU, L. & LIN, Y. Biological indicators capable of assessing thermal treatment efficiency of hydrocarbon mixture-contaminated soil. *Chemosphere*, vol. 80, p.837-844, 2010.
- WATANABE, K., KODAMA, Y. & HARAYAMA, S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 44, p. 253-262, 2001.
- WILKSTRÖM, P., WIKLUND, A., ANDERSSON, A-C. & FORSMAN, M. DNA recovery and PCR quantification of catechol 2,3-dioxygenase genes from different soil types. *Journal of Biotechnology*, vol. 52, p.107-120, 1996.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, vol. 51, p. 221-271, 1987.
- WRENN, B. A. & VENOSA, A. D. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable number procedure. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 42, p. 252-258, 1996.
- ZHANG, T, & FANG, HH. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *70*: 281-289. 2006.

## SÉRIES CETEM

As Séries Monográficas do CETEM são o principal material de divulgação da produção científica realizada no Centro. Até o final do ano de 2010, já foram publicados, eletronicamente e/ou impressos em papel, mais de 200 títulos, distribuídos entre as seis séries atualmente em circulação: Rochas e Minerais Industriais (SRMI), Tecnologia Mineral (STM), Tecnologia Ambiental (STA), Estudos e Documentos (SED), Gestão e Planejamento Ambiental (SGPA) e Inovação e Qualidade (SIQ). A Série Iniciação Científica consiste numa publicação eletrônica anual.

A lista das publicações poderá ser consultada em nossa homepage. As obras estão disponíveis em texto completo para download. Visite-nos em <http://www.cetem.gov.br/series>.

### Últimos números da Série Tecnologia Ambiental

**STA-72–Biofilmes: A interação micro-organismo/substrato mineral na biolixiviação.** Ellen Cristine Giese, 2014.

**STA-71–Avaliação de Emissões Radioativas em Rochas Ornamentais.** Yasmin Soares Gavioli, Julio Cesar Guedes Correia e Roberto Carlos da Conceição Ribeiro, 2014.

**STA-70–Utilização de Resíduos Oriundos do Corte de Mármore como Carga na Indústria de Papel.** Roberto Carlos da Conceição Ribeiro, Adriano Caranassios (*in memoriam*) e Beatriz Martins Morani, 2014.

## **INFORMAÇÕES GERAIS**

CETEM – Centro de Tecnologia Mineral  
Avenida Pedro Calmon, 900 – Cidade Universitária  
21941-908 – Rio de Janeiro – RJ

Geral: (21) 3867-7222

Biblioteca: (21) 3865-7218 ou 3865-7233

Telefax: (21) 2260-2837

E-mail: [biblioteca@cetem.gov.br](mailto:biblioteca@cetem.gov.br)

Homepage: <http://www.cetem.gov.br>

## **NOVAS PUBLICAÇÕES**

Se você se interessar por um número maior de exemplares ou outro título de uma das nossas publicações, entre em contato com a nossa biblioteca no endereço acima.

Solicita-se permuta.

We ask for interchange.