

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E
AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL**

Lorena Bittencourt Guimarães

**IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE COMBUSTÍVEIS EM
SUBSUPERFÍCIE ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA
MOLECULAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Ambiental.
Orientador: Prof. Dr. Henry Xavier Corseuil
Co-orientadora: Dr^a. Melissa Paola Mezzari

Florianópolis SC
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

G693i Guimarães, Lorena Bittencourt

Identificação da presença de combustíveis em subsuperfície através de técnicas de biologia molecular [dissertação] / Lorena Bittencourt Guimarães ; orientador, Henry Xavier Corseuil. - Florianópolis, SC, 2011.

120 p.: il., grafs., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia ambiental. 2. Águas subterrâneas. 3. Combustíveis. 4. Energia da biomassa. 5. Reação de oxidação-redução. 6. Reação em cadeia de polimerase. I. Corseuil, Henry Xavier. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. III. Título.

CDU 628.4

**“IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE COMBUSTÍVEIS EM SUBSUPERFÍCIE
ATRAVÉS DE TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR”**

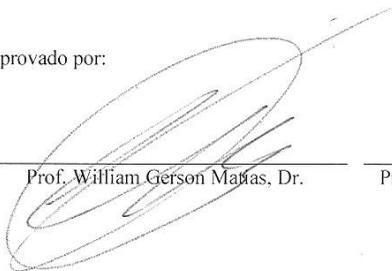
LORENA GUIMARÃES BITTENCOURT

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós - Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL

na Área de Engenharia Ambiental.

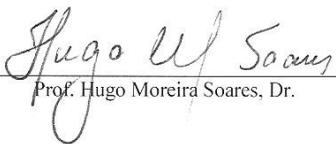
Aprovado por:



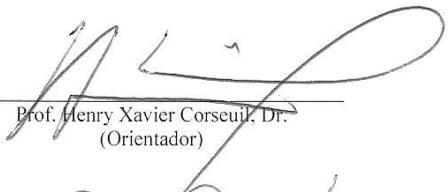
Prof. William Gerson Mañas, Dr.



Prof. Rejane Helena Ribeiro da Costa, Dr^a.



Prof. Hugo Moreira Soares, Dr.



Prof. Henry Xavier Corseuil, Dr.
(Orientador)



Prof. Flávio Rubens Lapolli
(coordenador)

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL
MAIO/2011

*Dedico esta dissertação aos
meus amores.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA), pela infraestrutura e equipe disponibilizada.

Ao CENPES/PETROBRAS pelo financiamento do projeto.

Ao professor Dr. Alexandre Verzani Nogueira por disponibilizar o Laboratório do MIP, essencial para o desenvolvimento das análises deste trabalho.

Aos membros da banca: Dr^a. Rejane Helena Ribeiro da Costa, Dr. William Gerson Matias, Dr. Hugo Moreira Soares pela disponibilidade e pelas contribuições na melhoria deste trabalho.

Ao meu orientador e professor Dr. Henry Xavier Corseuil, pela confiança, pela disponibilidade em todos os momentos que precisei, pelas críticas, pela paciência e principalmente persistência nos seus ensinamentos que muitas vezes demorei a compreender.

À minha co-orientadora Dr^a. Melissa Paola Mezzari pelo incentivo à pesquisa, pelo apoio nas atividades práticas e teóricas, pela exigência e por conversas que me acrescentou muito conhecimento como pesquisadora e como pessoa.

Ao Dr. Márcio L. B. da Silva por todos os ensinamentos, desde bancada de laboratório, passando por respostas virtuais rápidas e diretas, até horas de discussão pessoalmente sobre a biologia molecular.

À Dra. Cristina Cardoso Nunes por sua perspicácia e entusiasmo que me ajudaram na organização das idéias para o fechamento da dissertação.

Aos colegas e amigos do laboratório REMAS pelos ensinamentos e valiosas contribuições neste trabalho: Mário do Rosário, Marilda Fernandes, Carlos Amorim Jr., Helen Chiaranda, Jean Junkes, Ana Schneider, Alexandre Scheidt, Cássio Schambeck, Camila Müller, José Neto, Daniele Pezzini, Pieter van der Zon, Renata Pacheco, Djema Cristiano e a todos os bolsistas do laboratório.

Aos amigos Débora Toledo Ramos, Suhita Ramos, Márcia Farias, Juliana Müller, Karina Joussef, Franciele Fedrizzi, Pilar Serbent, Jamile Wagner, Wanderli Rogério, Thiago Belli, Jorge Tavares, Kalil Salin pelo

companheirismo e carinho que me proporcionaram momentos de muita alegria durante a jornada do mestrado.

Ao amigo Rogério Melo de Sena por aparecer na minha vida em um momento delicado e ter me proporcionado um aconchegante lar para a realização deste trabalho.

Ao meu namorado Guilherme Augusto De Domenico Araujo pelo carinho, amor, parceria e paciência nos momentos mais angustiantes e intermináveis desta dissertação.

Aos meus pais e irmão, pelo apoio em todas as minhas decisões, pela credibilidade no meu potencial, pela segurança que me transmitem e por serem presente no meu cotidiano mesmo estando fisicamente muito distantes de mim.

*“Eu tô te explicando prá te confundir
Eu tô te confundindo prá te esclarecer
Tô iluminado prá poder cegar
Tô ficando cego prá poder guiar”*

Tom Zé (1976)

RESUMO

A contaminação de águas subterrâneas por combustíveis/biocombustíveis tem sido uma grande preocupação em países industrializados, principalmente no que diz respeito à sua utilização para o abastecimento público. Com isso, a identificação das áreas contaminadas se faz necessária para minimizar os riscos a que estão sujeitos a população e o meio ambiente. Neste estudo foram investigadas oito áreas experimentais, onde houveram liberações controladas de combustíveis/biocombustíveis, com o objetivo de identificar estes focos de contaminação com o uso de técnicas de biologia molecular. Foi utilizada a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para quantificação de bactérias totais e comunidades específicas de microrganismos (nitrito redutase (*nirS*), *Geobacter*, δ -*Proteobacteria* e *Arqueas*) associados aos processos de oxidação-redução da degradação dos contaminantes. Análises físico-químicas (BTEX, etanol, acetato, nitrato, ferro²⁺, sulfato, sulfeto, metano e potencial redox) foram comparadas às microbiológicas. As bactérias totais tiveram uma correlação positiva com as concentrações dos substratos etanol e acetato, mas não mostrou correlação com os hidrocarbonetos aromáticos (BTEX). Desta forma, o método de qPCR, especificamente com a análise de bactérias totais, é adequado para a detecção da presença de contaminação recente de biocombustíveis em águas subterrâneas. As arqueas foram detectadas em locais altamente redutores, mas não mostrou relação com as análises de metano. As comunidades microbianas específicas, *nirS* e sulfato-redutoras, foram encontradas em maiores quantidades em áreas onde houve o decaimento dos respectivos receptores de elétrons nitrato e sulfato. Assim como também foi observada a relação das comunidades microbianas específicas (*Geobacter* e sulfato-redutoras) com altas concentrações do seu subproduto metabólico (ferro²⁺ e sulfeto). Sendo assim, com a análise dos quatro genes filogenéticos específicos avaliados neste trabalho, é possível identificar o processo de biodegradação que está ocorrendo em uma área potencialmente contaminada. Portanto, o método molecular (PCR) não se mostrou suficiente para traçar um diagnóstico de áreas contaminadas por combustíveis, mas sim como uma técnica complementar às físico-químicas proporcionando respostas mais

refinadas na definição do processo de oxirredução prevalecente, sendo relevante na diminuição de incertezas no momento de tomada de decisão.

Palavras-Chave: Águas Subterrâneas, BTEX, Combustíveis, Biocombustíveis, Processos de Oxidação-Redução, PCR quantitativo.

ABSTRACT

Contamination of groundwater by fuels and biofuels has been subject of great concern. One of the main issues related to groundwater contamination is its use for public supply. Therefore, water contamination identification is needed for minimizing risks to which the population and environment are exposed. The current work evaluated eight experimental areas, where controlled release of fuels and biofuels occurred, with the purpose of identifying contamination sources through the use of molecular biology. Real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed using for quantification of total bacteria and specific microorganisms communities (nitrite reductase (*nirS*), *Geobacter*, δ -*Proteobacteria* and *Archaeas*) which are associated with redox degradation processes of contaminants. Chemical analysis (BTEX, ethanol, acetate, nitrate, iron²⁺, sulfate, sulfide, methane and redox potential) were compared with microbiological analysis. A positive correlation was noticed between total bacteria and substrates (ethanol and acetate) concentrations, but the correlation was not noticed with aromatics hydrocarbons (BTEX). Therefore, the qPCR method, specifically with total bacteria analysis, is suitable for detecting the presence of biofuels in groundwater in fresh spills. Archaeas were detected in highly reducing sites, but not related with methane analysis. Specific microbial communities, *nirS* and sulfate-reducing bacteria, were detected in high numbers in areas where the decrease of electrons acceptor (nitrate and sulfate, respectively) concentrations was observed over time. As well as was observed a relation between specific microbial communities (*Geobacter* and sulfate-reducing bacteria) with high concentrations of its metabolic byproducts (iron²⁺ and sulfide). Thus, with the phylogenetic analysis of four specific genes studied in this work, we can identify the biodegradation process that is occurring in a potentially contaminated area. Therefore, only the molecular method (PCR) was not enough to draw diagnostic contaminated areas by fuel, but rather a tool to complement physical-chemical analysis, which provides answers more refined to define the predominant redox process, being relevant in reduction of uncertainties at the moment of decision.

Key-words: Groundwater, BTEX, Fuels, Biofuels, Oxidation-Reduction Processes, quantitative PCR.

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1: Ordem de utilização de receptores de elétrons em uma aquífero contaminado por hidrocarbonetos de petróleo.....</u>	<u>36</u>
<u>Figura 2: Correlação entre os potenciais de oxidação-redução e a quantidade da energia livre de Gibbs; e caracterização das faixas de ORP correspondentes aos processos de oxi-redução.....</u>	<u>37</u>
<u>Figura 3: Primeira etapa de degradação anaeróbica do tolueno.....</u>	<u>41</u>
<u>Figura 4: Árvore filogenética representando as subdivisões do filo <i>Proteobacterias</i> em bactérias gram-positivas, α-<i>Proteobactérias</i>, γ-<i>Proteobacterias</i> e δ-<i>Proteobacterias</i></u>	<u>42</u>
<u>Figura 5: Localização da área de estudo dos experimentos</u>	<u>46</u>
<u>Figura 6: Direção do fluxo da água subterrânea na área experimental da Ressacada indicada pela seta e fontes de liberação de combustíveis controlada representadas pelos marcadores em cada área.....</u>	<u>49</u>
<u>Figura 7: Representação de uma área experimental com os poços de monitoramento multiníveis. Indicado pela seta vermelha a simulação do poço onde foi liberado o combustível/bicombustível e a formação da pluma de contaminação.....</u>	<u>51</u>
<u>Figura 8: Diferenciação dos níveis de profundidade através de fitas coloridas.....</u>	<u>52</u>
<u>Figura 9: Sistema montado para a filtração à vácuo das amostras de água subterrânea</u>	<u>55</u>
<u>Figura 10: Gráfico comparativo do log de cópias de gene <i>Bacteria 16S</i> . g⁻¹ de sólidos suspensos totais de água subterrânea nas áreas onde ainda é presente o biocombustível (etanol e biodiesel) ou seu produto metabólico (acetato).</u>	<u>69</u>

<u>Figura 11: Gráfico comparativo do log de cópias de gene <i>Bacteria 16S</i>. g⁻¹ de sólidos suspensos totais de água subterrânea com as concentrações de BTEX (ug.L⁻¹) de 5 áreas experimentais</u>	<u>71</u>
<u>Figura 12: Correlação positiva entre a concentração de etanol e acetato (mg.L⁻¹) com a quantidade de bactérias totais</u>	<u>72</u>
<u>Figura 13: Gráfico comparativo da relação (<i>nirS/16S</i>) nas 8 áreas experimentais avaliadas. Linha preta sólida indica a relação <i>nirS/16S</i> de uma área sem contaminação</u>	<u>75</u>
<u>Figura 14: Concentração de nitrato (mg.L⁻¹) das áreas contendo os combustíveis diesel B20 (A4) e gasolina E25 (A5) ao longo do tempo de monitoramento.....</u>	<u>77</u>
<u>Figura 15: Gráfico comparativo do log de cópias de gene para <i>Geobacter</i>. g⁻¹ de sólidos suspensos totais de água subterrânea de 8 áreas experimentais juntamente com a concentração de ferro (II).</u>	<u>79</u>
<u>Figura 16: Gráfico comparativo das bactérias sulfato-redutoras de 8 áreas experimentais</u>	<u>80</u>
<u>Figura 17: Gráfico comparativo das bactérias sulfato-redutoras nos experimentos onde elas foram detectadas juntamente com as concentrações de sulfato e sulfeto</u>	<u>82</u>
<u>Figura 18: Concentração de sulfato e sulfeto (mg.L⁻¹) da área contendo o combustível gasolina E10 (A2) ao longo do tempo de monitoramento</u>	<u>83</u>
<u>Figura 19: Gráfico comparativo do log de cópias de gene para Arqueas. g⁻¹ de sólidos suspensos totais de água subterrânea de 8 experimentos juntamente com os potenciais de oxirredução.....</u>	<u>85</u>

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1: Descrição das áreas experimentais da Ressacada contendo o contaminante liberado em cada área, com sua data de liberação, quantidade liberada e a técnica de remediação utilizada.....</u>	<u>47</u>
<u>Tabela 2: Valores máximos e mínimos das variáveis analisadas na água subterrânea de um local sem contaminação (área controle).....</u>	<u>50</u>
<u>Tabela 3: Seqüência de iniciadores e sondas usados para PCR em tempo real.....</u>	<u>58</u>
<u>Tabela 4: Diferenças das características (Concentração de DNA, tamanho da cepa e cópias por genoma) entre as bactérias utilizadas para a curva de calibração.</u>	<u>63</u>
<u>Tabela 5: Presença das comunidades microbianas mais relevantes em cada área experimental representada pelo símbolo +.</u>	<u>88</u>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANM	Atenuação Natural Monitorada
ANP	Agência Nacional de Petróleo
bp	Base pair (par de bases)
BSS	Benzilsuccinato sintase
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos
B20	Mistura com 20% de biodiesel
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
DGGE	Denaturing or temperature gradient gel electrophoresis
Eh ⁰	Potencial de Oxidação-Redução Padrão
ENS	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
EUA	Estados Unidos de América
E10	Mistura com 10% de etanol
E24	Mistura com 24% de etanol
E25	Mistura com 25% de etanol
E50	Mistura com 50% de etanol
E85	Mistura com 85% de etanol
FISH	Hibridação <i>in situ</i> com fluorescência
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
Kow	Coefficiente de partição octanol-água
Mbp	Um milhão de pares de bases
ORP	Potencial de oxidação-Redução
PM	Poços de monitoramento
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
REMAS	Laboratório de Remediação de Águas Subterrâneas
SC	Santa Catarina
SIP	Stable Isotopic Probing
SST	Sólidos suspensos totais
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNESP	Universidade Estadual Paulista
US EPA	United States Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 OBJETIVOS	26
1.2.1 Objetivo Geral	26
1.2.2 Objetivos Específicos	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 TÉCNICAS DE INVESTIGAÇÃO DE CONTAMINAÇÕES EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS	27
2.1.1 Técnicas moleculares: Biomarcadores	28
2.1.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	30
2.2 DEGRADAÇÃO MICROBIANA ANAERÓBIA DOS HIDROCARBONETOS	34
2.2.1 Nitrato-redução	39
2.2.2 Ferro(III)-redução	40
2.2.3 Sulfato-redução	41
2.2.4 Metanogênese	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 ÁREA DE ESTUDO	45
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	48
3.3 CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL	50
3.3.1 Poços de monitoramento	50
3.3.2 Amostragem	52
3.4 PROCEDIMENTOS QUÍMICOS	53
3.4.1 BTEX, etanol e metano	53
3.4.2 Ânions – cloreto, nitrato, nitrito, fosfato, sulfato e acetato	54
3.4.3 Ferro (II) e sulfeto	54
3.5 PROCEDIMENTOS MICROBIOLÓGICOS	55
3.5.1 Filtração	55
3.5.2 Extração do DNA	56
3.5.3 PCR quantitativo em tempo real	56
3.6 AVALIAÇÕES DAS COMUNIDADES MICROBIANAS	61

3.7 AVALIAÇÕES DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	66
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA SUBTERRÂNEA NAS REGIÕES DAS FONTES DE CONTAMINAÇÃO POR COMBUSTÍVEIS	67
4.1.1. Comunidade de bactérias totais associada à concentração de substratos orgânicos em águas subterrâneas	68
4.1.1.1. Etanol e acetato	68
4.1.1.2. Hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX)	70
4.1.2. Comunidades microbianas específicas associadas aos processos de oxi-redução atuantes na degradação dos combustíveis em águas subterrâneas.....	72
4.1.2.1. Nitrito-redutoras (nirS) e indicadores físico-químicos da nitrato-redução	73
4.1.2.2. Ferro-redutoras (Geobacter) e indicadores físico- químicos da ferro(III)-redução	77
4.1.2.3. Sulfato-redutoras (δ -Proteobacterias) e indicadores físico-químicos da sulfato-redução.....	79
4.1.2.4. Metanogênicas (arqueas) e indicadores físico- químicos da metanogênese	84
4.2. DETERMINAÇÃO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS MAIS RELEVANTES (BIOMARCADORES) NA IDENTIFICAÇÃO DE UMA ÁREA CONTAMINADA POR COMBUSTÍVEIS	85
5 CONCLUSÕES.....	93
6 RECOMENDAÇÕES	95
REFERÊNCIAS	96
APÊNDICES	107

1 INTRODUÇÃO

Os problemas ambientais tem se tornado uma questão cada vez mais importante para a sociedade, visto que há uma maior percepção da escassez dos recursos naturais e da poluição gerada pelo desenvolvimento acelerado que sempre foi negligenciada. Os compostos derivados de petróleo representam grande influência na economia mundial devido à sua abundância natural, importância industrial e à sua intensa utilização como fonte de energia. Como consequência desta demanda enérgica pelo petróleo e seus derivados, os efeitos causados por eles são de grande preocupação ambiental e social. Um dos mais graves impactos ambientais provocados por derivados de petróleo está relacionado à contaminação de recursos hídricos, a qual prejudica a qualidade do corpo receptor levando à grande preocupação social já que boa parte da população se abastece destes recursos comprometidos. A contaminação de águas subterrâneas é um problema ainda mais agravante, pois se trata de uma contaminação silenciosa e invisível proveniente, na maior parte dos casos, de derramamentos de combustíveis armazenados em tanques subterrâneos de postos automotivos. Além disso, muitas vezes os poços perfurados para captação da água subterrânea não são cadastrados, o que dificulta a fiscalização e o controle em casos de poluição desses mananciais.

Os hidrocarbonetos aromáticos constituintes dos combustíveis, dentre eles os hidrocarbonetos monoromáticos - benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), são mais preocupantes porque são de três a cinco vezes mais solúveis que os hidrocarbonetos de cadeia aberta e por isso possuem maior mobilidade em água. Outro fator que colabora para maior parcela dos aromáticos estarem no meio aquoso é por possuírem um menor coeficiente de partição octanol/água (K_{ow}), o qual descreve a tendência de partição de um composto entre uma fase orgânica e uma fase aquosa (SCHWARZENBACH et al., 2003). Deste modo, em caso de derramamentos, grande parte dos constituintes aromáticos dos combustíveis derivados de petróleo está presente nas águas

subterrâneas e são transportados, facilmente, para uma possível fonte de água potável. Com isso, a identificação (localização) das áreas contaminadas se faz necessário para minimizar os riscos a que estão sujeitos a população e o meio ambiente. Dois processos constituem a base do gerenciamento de áreas contaminadas, são eles: processo de identificação de áreas contaminadas e processo de recuperação de áreas contaminadas. O processo de identificação de áreas contaminadas tem como objetivo a localização das áreas contaminadas, e com a confirmação da contaminação, inicia-se o processo de recuperação, que tem como meta a adoção de medidas corretivas nessas áreas (CETESB, 2001).

A escolha das técnicas de investigação de uma área contaminada é realizada em função das características específicas de cada área a ser estudada. Para o diagnóstico das contaminações, as investigações podem ser conduzidas por métodos diretos e indiretos, mas em ambos os resultados são sempre comparativos com marcos que caracterizam uma normalidade ambiental (área controle), uma anomalia aceitável ou um estado crítico. Os métodos diretos normalmente utilizados são as análises físico-químicas da água subterrânea e os indiretos são os geofísicos, os quais são realizados com o intuito de identificar áreas contaminadas por compostos orgânicos provenientes de indústrias petroquímicas. Estas técnicas são geralmente dispendiosas e demoradas, as quais exigem grandes quantidades de sondagens o que demanda a construção de muitos poços de coleta de amostras no caso das análises físico-químicas.

Em solos e águas subterrâneas os decréscimos das concentrações dos hidrocarbonetos são resultantes da ação microbiológica sobre estes compostos. Portanto, outra abordagem utilizada para detectar a contaminação de uma área é avaliar a dinâmica microbiana do local de interesse (YAGE, et al., 2010). A técnica de isolamento e cultivo de bactérias em laboratório não é indicada para a identificação de áreas contaminadas com combustíveis, pois pode ser extremamente demorada e muitas vezes insatisfatória por não incluir a maioria das espécies de bactérias de amostras de ambientes naturais. As técnicas de Biologia Molecular, associadas ao avanço no conhecimento da Bioinformática, tornaram possível uma avaliação e caracterização mais detalhada do ambiente. Essas ferramentas permitem avaliar a dinâmica populacional de um

determinado ecossistema frente ao impacto causado pela presença do poluente e frente às diversas formas de tratamento utilizadas. Elas apresentam uma importância fundamental para desenvolver o conhecimento, em nível de microambiente, que até então tem sido pouco explorada e pouco utilizada. Nos últimos anos, os pesquisadores têm apostado nas técnicas moleculares para o monitoramento, já que incidem diretamente sobre genes catabólicos que codificam enzimas específicas de degradação de poluentes (DA SILVA E ALVAREZ, 2004; BALDWIN et al., 2003). Até o momento, a técnica de biologia molecular tem focado na filogenia e confiado na seqüência 16S rDNA para identificar espécies bacterianas em amostras de ambientes naturais.

Das técnicas moleculares, a análise da Reação em cadeia da Polimerase em Tempo-Real (qPCR) oferece muitas vantagens sobre os métodos tradicionais usados para detectar populações específicas de bactérias em amostras de ambientes naturais. Este método se sobressai, pois possui alta sensibilidade e tem sido utilizado para aumentar a quantidade de genes para detecção. Em métodos quantitativos, isso acontece quando ocorre a amplificação do DNA alvo a uma concentração suficiente para permitir a detecção. Outras características favoráveis da PCR em Tempo-Real incluem a alta especificidade, uma análise relativamente rápida e precisão no complexo de DNA a ser amplificado. Contudo, a PCR também tem limitações, como a necessidade de conhecer a seqüência de DNA a amplificar para que possam ser sintetizados os iniciadores¹ específicos. Outra desvantagem é a possibilidade de ocorrer a contaminação da amostra por um DNA estranho (uma vez que se trata de uma técnica muito sensível).

Neste contexto, este trabalho propõe o biomonitoramento molecular como alternativa aos métodos químicos convencionais para identificar a presença de combustíveis em subsuperfície. Em virtude da sua morosidade e, evidentemente, do custo das análises físico-químicas, a biologia molecular foi usada para avaliar se esta técnica pode ser utilizada na identificação de fontes de contaminação durante a investigação de áreas impactadas por petróleo e seus

¹ Iniciadores ou *primers* são pequenas seqüências de nucleotídeos que hibridiza no início da seqüência do DNA alvo que se deseja amplificar e da qual ele é complementar.

derivados e também na elucidação dos principais processos de oxidação-redução responsáveis pela biodegradação próxima às fontes de contaminação. Além disso, ela será usada para investigar a influência dos combustíveis nas comunidades microbianas nativas de um local, em função das modificações de quantidade e diversidade dos microrganismos. Portanto, foi utilizado o método de PCR em Tempo-Real para identificar e quantificar as comunidades microbiológicas existentes em águas subterrâneas contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo.

1.1 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Identificar contaminações por combustíveis e biocombustíveis em águas subterrâneas através de técnicas da biologia molecular.

1.2.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a influência da presença dos poluentes BTEX e dos biocombustíveis na produção de biomassa microbiana próximo a fontes de contaminação;
- 2) Identificar os grupos de bactérias mais relevantes presentes em locais contaminados por combustíveis/biocombustíveis;
- 3) Identificar o processo de oxidação-redução predominante em águas subterrâneas contaminadas por combustíveis/biocombustíveis;
- 4) Comparar a identificação de águas subterrâneas contaminadas por combustíveis/biocombustíveis através das análises físico-químicas e através das análises de biologia molecular.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TÉCNICAS DE INVESTIGAÇÃO DE CONTAMINAÇÕES EM ÁGUAS SUBTERRÂNEAS

Os compostos derivados de petróleo têm sido misturados com biocombustíveis como o etanol e o biodiesel, para atingir os requerimentos exigidos pela legislação e diminuir as emissões de CO₂. O uso de biocombustíveis, como etanol e biodiesel, como aditivo nos combustíveis fósseis é uma das políticas mundiais que tem sido adotada para atender às exigências ambientais. Apesar do avanço ambiental do uso destes biocombustíveis no que diz respeito à diminuição da emissão de gases que contribuem para o efeito estufa melhorando assim a qualidade atmosférica, a sua adição na gasolina ou diesel torna a questão bem mais complexa em ambientes subterrâneos. Os hidrocarbonetos aromáticos, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, (BTEX) constituintes dos combustíveis são uma preocupação particular quando contaminam águas subterrâneas devido a alta solubilidade e mobilidade destes compostos. Outra característica preocupante é a estabilidade destes contaminantes provocada por seus anéis benzênicos, o que dificulta seus processos de degradação, além de serem altamente tóxicos e com propriedades carcinogênicas (MEHLMAN, 1992). Com isso, o gerenciamento das áreas contaminadas se faz necessário para minimizar os riscos a que estão sujeitos a população e o meio ambiente. Dois processos constituem a base do gerenciamento de áreas contaminadas, são eles: processo de identificação de áreas contaminadas e processo de recuperação de áreas contaminadas. O processo de identificação de áreas contaminadas tem como objetivo a localização das áreas contaminadas, e com a confirmação da contaminação, inicia-se o processo de recuperação, que tem como meta a adoção de medidas corretivas nessas áreas (CETESB, 2001).

Um dos desafios nas atividades voltadas para a proteção ambiental consiste na avaliação da extensão, dinâmica e concentração das contaminações provocadas por esses vazamentos

de tanques de combustíveis derivados do petróleo. A forma como os poluentes interagem com o fluxo freático, com os argilo-minerais e com a matéria orgânica presente no solo é complexa do ponto de vista físico e químico. Além disso, sendo contaminantes orgânicos, estes são modificados em função de ações microbiológicas que alteram o comportamento e a estrutura dos contaminantes ao longo do tempo. Desta forma, o profissional que investiga uma área potencialmente contaminada por hidrocarbonetos com essas características se depara com um problema multidisciplinar que exige o domínio dos processos físicos, químicos e biológicos que estão associados.

Para o diagnóstico das contaminações, as investigações podem ser conduzidas por métodos diretos e indiretos, mas em ambos os resultados são sempre comparativos com marcos que caracterizam uma normalidade ambiental, uma anomalia aceitável ou um estado crítico. Há várias abordagens propostas de monitoramento e investigação de águas subterrâneas contaminadas com derivados de petróleo. Entre elas inclui a medição físico-química de diferentes metabólitos no aquífero, modelagem numérica, ou fracionamento de isótopos de carbono estável de carbono orgânico dissolvido ou hidrocarbonetos residuais. Outra abordagem é mostrar que uma comunidade microbiana nativa inclui bactérias capazes de degradar os contaminantes, e que estas são enriquecidas em zonas contaminadas (BELLER et al., 2002). Neste caso, técnicas baseadas em ácidos nucléicos são preferidas para este acompanhamento quando comparadas com o isolamento e o cultivo de bactérias.

2.1.1 Técnicas moleculares: Biomarcadores

Investigações de populações microbianas e suas atividades têm cada vez mais necessitado do desenvolvimento e utilização de métodos de culturas independentes. Com rápidos procedimentos moleculares como, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Desnaturação ou Gradiente de Temperatura em Eletroferese de gel (*denaturing or temperature gradient gel electrophoresis*, DGGE ou TGGE), *Microarrays*, Hibridação *in situ* com fluorescência (FISH),

Stable Isotopic Probing (SIP) e outros, pode ser possível obter uma avaliação abrangente da composição e estrutura das comunidades microbianas.

A detecção e hibridização de seqüências de ácidos nucléicos específicos usando sondas (*probes*) específicas é uma abordagem considerável para a identificação de microrganismos em amostras ambientais. A detecção de genes filogenéticos e catabólicos em amostras ambientais é baseada em um conjunto de diferentes abordagens genômicas. As sondas podem ser empregadas para determinar a diversidade genética global, a associação de gene dominante e ativo, e a densidade e freqüência de linhas de genes específicos necessários para degradar um composto alvo em um local (MANEFIELD et al., 2004). Por causa da posição chave das oxigenases durante a degradação aeróbia dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e dos BTEX, assim como da benzilsuccinato sintase (BSS) para a degradação anaeróbia do tolueno e xileno, os genes que codificam essas enzimas tem sido usado como foco para detectar a presença de degradadores de hidrocarbonetos e para construir sondas de genes específicos. Uma vez que uma sonda foi desenvolvida ela pode se expandir para muitos usos.

O método conhecido como SIP (*Stable Isotopic Probing*) pode ser utilizado no monitoramento da biodegradação *in situ* de um composto. O SIP envolve o monitoramento de átomos isótopos estáveis de substratos particulares dentro de componentes de células microbianas. Os componentes de célula informativos usados na microbiologia ambiental são DNA, RNA e fosfolipídeos de ácidos graxos (PFLAs) (MANEFIELD et al., 2002). Jeon et al. 2003 realizou a marcação do ^{13}C do naftaleno de um local contaminado para traçar o fluxo do carbono poluente na comunidade microbiana natural. Eles conseguiram documentar a evolução do $^{13}\text{CO}_2$, identificar o grupo taxonômico envolvido no metabolismo do naftaleno acrescentado e isolar uma bactéria ainda não descrita, cepa CJ2, intimamente relacionada à *Polaromonas vacuolata*. Esta cepa propiciou a descoberta da seqüência do gene dioxigenase (*nahAc*) responsável pela biodegradação do naftaleno *in situ*. Radajewski et al. (2000) demonstraram que o DNA marcado com o isótopo estável

pode ser isolado de comunidades microbianas mistas, com base no aumento da densidade associado com o enriquecimento isotópico.

Uma técnica molecular alternativa é o uso de biomarcadores específicos para identificação de bactérias ou atividade de genes específicos. Um biomarcador é definido como uma sequência de DNA, introduzida em um organismo, o qual confere um genótipo ou fenótipo distinto para permitir o acompanhamento em um determinado ambiente. Genes marcadores bioluminescentes, fluorescentes e cromogênicos, como os genes *luxAB* (luciferase bacteriana), *gfp* (Green fluorescent protein, GFP), e *xylE* (catecol 2,3 oxigenase) são exemplos de biomarcadores promissores (JANSSON, 2003). O GFP foi usado para identificar diferentes isolados ambientais de *Mycobacterium* capazes de degradar HPAs. Microscopia a laser foi usada para analisar GFP e sinais fluorescentes derivados do HPA e permitiu que a bactéria fosse visualizada em associação com os substratos (WATTIAU et al., 2002).

2.1.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação em cadeia da Polimerase tem a habilidade de produzir milhões de cópias de uma porção de um gene ou de um gene inteiro desejado dentro de 3 a 4 horas. Este é o método mais utilizado para o gene 16S rRNA, o qual identifica e quantifica “sequências-alvo” das células microbianas de amostras de solo e de água (WILSON et al., 1999). O processo de multiplicação da região cromossômica de interesse, chamado de amplificação, é dependente da extração e purificação dos ácidos nucleicos das amostras de ambientes naturais. Na extração, pode acontecer um tratamento severo danificando o DNA; e uma ineficiente purificação compromete a amplificação devido à presença de ácidos húmicos, material orgânico ou pequenas partículas que contaminam o DNA (MALIK et al., 2008).

Para a detecção de organismos ou genes de ambientes contaminados, duas variantes da técnica de PCR são usadas, PCR simples e PCR múltiplo. O simples usa um par de iniciadores em uma única reação de amplificação, enquanto a técnica de PCR

múltipla utiliza numerosos pares de iniciadores simultaneamente para amplificar vários genes em uma única reação (MARKOULATOS et al., 2002). Embora a PCR múltipla possa economizar tempo e recursos na detecção de microrganismos ou de genes envolvidos em biodegradação, a sua aplicação bem-sucedida depende da combinação de vários pares de iniciadores serem capazes de executar em uma única reação. Baldwin et al. (2003) conduziram um estudo para desenvolver procedimentos para a PCR múltipla para quantificar os genes catabólicos aromáticos de amostras ambientais. Testaram combinações de conjuntos de iniciadores utilizando a técnica de PCR múltiplo para detecção dos genes naftaleno dioxigenase, bifenil dioxigenase, tolueno dioxigenase, xileno dioxigenase, fenol dioxigenase e anel-hidroxilado tolueno monooxigenase. A combinação dos iniciadores PHE/NAH, TOL/TOD, e BPH2/BPH4, correspondentes aos genes já citados, permitiram uma confiável detecção nos experimentos com PCR múltipla.

Outra variante desta técnica molecular é a PCR em Tempo-Real, a qual pode simultaneamente detectar e quantificar o produto amplificado enquanto a reação ainda acontece. A PCR em Tempo-Real envolve o uso de marcadores fluorescentes para quantificar o produto no fim da cada ciclo de amplificação (SALEH-LAKHA et al., 2005). Várias etapas subseqüentes são efetuadas pelo detector térmico e um resultado quantitativo é processado pelo computador (BUSTIN, 2000). Beller et al. (2002) utilizaram o método de PCR em tempo real para monitorar a degradação anaeróbia do tolueno através da quantificação do gene *bssA*. O estudo foi realizado em microcosmos inoculado com sedimentos de aquíferos e incubado anaerobicamente com BTEX e nitrato na presença e na ausência de etanol. No microcosmo que houve a mais rápida degradação do tolueno foi encontrado o maior número de cópias *bssA*. Portanto, o maior número de cópias de um gene catabólico dentro de uma área contaminada, em comparação com aqueles em locais não contaminados, pode ser usado como evidência da atenuação natural ou da eficácia de uma biorremediação.

O desenvolvimento de iniciadores tem permitido detectar e quantificar em amostras ambientais a presença de genótipos específicos, assim como o *bssA*, que codificam etapas chaves da

biodegradação dos HPAs e BTEX (BALDWIN et al., 2003). Por exemplo, seqüências do gene *nid* que codificam grandes (*nidA*) e pequenas subunidades (*nidB*) do sistema das oxigenases foram usadas para criar uma sonda para detecção de micobactérias degradadoras de HPA em solos submetidos a biorremediação (HALL et al., 2005). No estudo de mesocosmos *in situ* de Hendrickx et al. (2006) foi examinado o efeito da pluma de contaminantes BTEX na dinâmica da comunidade bacteriana do próprio aquífero e na dinâmica de genótipos catabólicos específicos. Houve uma rápida colonização pelas *Pseudomonas spp.* no material aquífero a jusante da área contaminada, e esta nova comunidade permaneceu estável durante um período de tempo prolongado. A comunidade na área contaminada foi especialmente caracterizada pelo aparecimento de *xylM/xylE1*-(C23O), enquanto que uma área não contaminada, apenas *tmoA* foram detectadas. Em 2006, Hendricks et al. testou novos conjuntos de iniciadores e observou que enquanto *xylM* e *xylE1* foram apenas encontrados em amostras contaminadas, *tmoA* foi detectado em amostras contaminadas e não contaminadas. Técnicas de PCR competitivo quantitativo foram usadas em regiões conservativas do gene Catechol 2,3-Dioxygenase (C23O) e permitiram enumerar seus números de cópias de gene e correlacionar suas relativas abundancias com o nível de poluente. Os genes C23O foram enumerados por esta técnica com o competidor 163-bp em um solo alterado com petróleo usando o mesmo iniciador. A seqüência alvo e o concorrente tiveram amplificação cinética idêntica (MESARCH et al., 2000).

Quando se faz este tipo de análise, de DNA, a informação obtida se restringe à presença ou ausência do gene no local desejado. Para saber se este determinado gene está sendo expresso necessita-se de uma análise do RNA_{mensageiro} da amostra desejada através da sua transcrição. Apesar das dificuldades de extrair um RNA purificado em suficiente rendimento de amostras ambientais para subseqüentes manipulações e análises, uma variedade de métodos desenvolvidos para extração de RNAm já estão disponíveis para detectar a expressão do gene. Muitos fatores ambientais podem ativar ou reprimir a expressão de um gene e conseqüentemente modular a atividade microbiana. A influência de agentes que aumentam a biodisponibilidade dos HPAs na expressão do gene catabólico *nahAC*

foi estudado pela ensaio RT-PCR para avaliar a regulação do gene *nahAC* durante a degradação do fenantreno. A expressão do gene foi determinada com sucesso pela extração do RNAm bacteriano seguido da amplificação do gene *nahAC* (RT-PCR). O gene *rpoD*, o qual codifica o fator sigma “housekeeping” para a iniciação da transcrição, serviu como controle para avaliação/interpretação da expressão do gene catabólico *nahAC*. Com a expressão do gene controle, mudanças temporais na expressão do gene *nahAC* foram mostradas quando o fenantreno foi degradado (MARLOWE et al., 2002). Assim, a expressão do gene controle pode permitir a detecção de mudanças sutis na expressão de genes de degradação, por causa das mudanças temporais na fisiologia celular ou mudanças na toxicidade associada com a acumulação de metabólitos intermediários.

Dentro deste contexto as vantagens para o uso da técnica de PCR quantitativo em tempo real para biomonitoramento molecular na investigação e caracterização de áreas impactadas por derivados de petróleo são: praticidade da análise, estabilidade da molécula de DNA (ao contrário do RNA), alta resolução de detecção, alta especificidade, além de ser uma análise que fornece uma resposta rápida. Porém, é necessário o conhecimento da sequencia-alvo do DNA dos microrganismos que se deseja detectar. As técnicas moleculares devem focar em genes catabólicos que codificam enzimas específicas degradadoras de poluentes e/ou em genes filogenéticos associados á biodegradação. Portanto, durante a investigação de subsuperfícies contaminadas por combustíveis é de fundamental importância a compreensão em nível de microambiente, que envolve os processos de degradação destes poluentes.

2.2 DEGRADAÇÃO MICROBIANA ANAERÓBIA DOS HIDROCARBONETOS

Contaminações por BTEX são preocupantes pela alta toxicidade e solubilidade destes compostos que causam a rápida introdução destes no aquífero. Pesquisas anteriores confirmam que os BTEX podem ser degradados por microrganismos aerobicamente. Até hoje, microrganismos aeróbicos degradadores de benzeno, por exemplo, e suas rotas da biodegradação já foram bem documentadas por SMITH (1990). Porém, devido a baixa quantidade de oxigênio dissolvido e a baixa difusão do oxigênio na subsuperfície, estes organismos rapidamente esgotam o oxigênio. Este fenômeno sugere que a biodegradação anaeróbia seja mais atrativa em ambientes subterrâneos. Técnicas de monitoramento molecular baseadas na sequência 16S rDNA tem sido amplamente empregada para identificar membros de comunidades microbianas sem o isolamento de espécies individuais em culturas puras.

No mecanismo de ação dos microrganismos sob os contaminantes BTEX ocorrem reações de oxidação-redução. Através destas reações ocorre a transferência de elétrons, envolvendo a perda de elétrons de um grupo de compostos, denominado de doador de elétrons, para outro, receptor de elétrons. Estas reações ocorrem concomitantemente e a troca de elétrons resulta em uma quantidade de energia liberada (energia livre de Gibbs, ΔG). Esta energia liberada é utilizada pelos microrganismos como fonte de energia para seu crescimento, mas dependendo das reações (dos compostos envolvidos) esta quantidade de energia varia, sendo mais ou menos favorável à célula microbiana. Os hidrocarbonetos de petróleo presentes no solo e águas subterrâneas se encontram em um estado reduzido, com isso eles atuam como a fonte de elétrons e se tornam um composto oxidado. Enquanto isso, compostos como oxigênio, nitrato, ferro férrico (ferro³⁺), sulfato e o dióxido de carbono se encontram na natureza na forma oxidada e por isso recebem os elétrons transformando-se em compostos reduzidos. Portanto, os microrganismos utilizam os compostos na forma oxidada como receptores de elétrons na sua cadeia respiratória (energia), os

compostos reduzidos como fonte de carbono e o resultado é a oxidação do composto de interesse, poluentes orgânicos, e subprodutos metabólicos (CHAPELLE, 2001).

As reações de oxirredução e a ação dos microrganismos são regidas pelas leis da termodinâmica. Desta forma, os microrganismos utilizam preferencialmente os receptores de elétrons que fornecem mais energia ao seu metabolismo respiratório, o que influencia diretamente a taxa de degradação dos compostos orgânicos. A energia livre de Gibbs determina a ordem de utilização dos receptores de elétrons, sendo aqueles que as reações resultam em um ΔG mais negativo, os mais favoráveis. Na oxidação da matéria orgânica em ambientes subterrâneos a sequência de utilização dos receptores de elétrons, seguindo os valores da energia livre de Gibbs é: $O_2 > NO_3^- > Fe^{3+} > SO_4^{2-} > CO_2$, mostrado na Figura 1 (CHRISTENSEN et al., 2000). Portanto, na degradação de hidrocarbonetos de petróleo encontrados em águas subterrâneas as reações de oxirredução apresentam uma ordem de ocorrência e de eficiência, em função de sua energia liberada à célula microbiana, sendo ela: respiração aeróbia, desnitrificação, redução do manganês, ferro-redução, sulfato-redução e metanogênese (Figura 1). Porém, apesar da taxa de degradação utilizando o oxigênio ser mais alta do que as demais, a biodegradação anaeróbia é o mecanismo determinante na eliminação de hidrocarbonetos de petróleo em aquíferos, pois condições anaeróbias se formam rapidamente sob a pluma de contaminantes. Quando ocorre a contaminação, primeiramente há uma alta demanda de oxigênio dissolvido que leva à rápida depleção do oxigênio no ambiente e então os processos de biodegradação anaeróbios são prevaletentes. Contudo, em casos reais, a ordem das reações não acontece de modo consecutivo, elas dependem das condições do meio como pH, temperatura, potencial de oxidação-redução (ORP) e principalmente a disponibilidade dos receptores de elétrons no ambiente. Há que se considerar também a simbiose dos organismos e a concomitância das reações já relatada por vários autores (CHAPELLE et al., 2002; BORCH 2010).

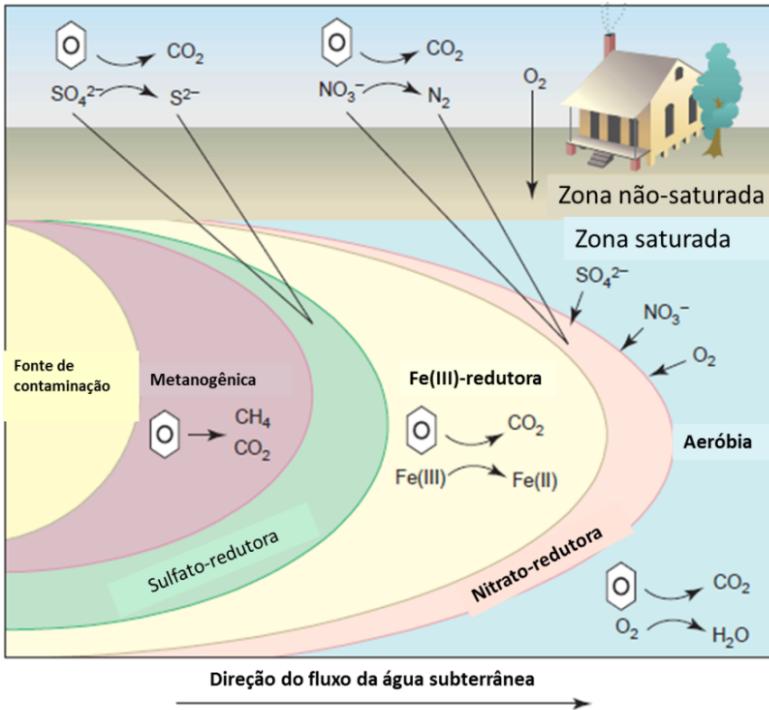


Figura 1 - Ordem de utilização de receptores de elétrons em uma aquífera contaminada por hidrocarbonetos de petróleo

Fonte: Lovley (2001) - Adaptado.

O potencial de oxidação-redução (ORP) é um parâmetro importante e também definitivo na realização dos processos de biodegradação (E_h^0). Este parâmetro representa a medida de afinidade por elétrons, ou seja, a tendência de uma solução em aceitar ou transferir elétrons (NELSON e COX, 2000). Quanto mais positivo é o ORP, significa a presença de maiores quantidades de agentes oxidantes (receptores de elétrons), o que mostra alta capacidade de receber elétrons (afinidade por elétrons), definindo o meio como um ambiente oxidante. Na medida em que os hidrocarbonetos são liberados na água subterrânea a carga orgânica no local aumenta gerando um acelerado metabolismo microbiano, o qual utiliza os receptores de elétrons e nutrientes, tornando o meio mais redutor,

com valores de ORP mais negativos. Estas condições do meio se tornam desfavoráveis para alguns grupos de microrganismos, por exemplo, os estritamente aeróbios, selecionando apenas aqueles que resistem à este estado de oxidação. É importante ressaltar a relação do ORP com a energia livre de Gibbs liberada, visto que valores positivos de potencial redox correspondem a um valor negativo de Gibbs (processos termodinamicamente mais favoráveis), enquanto que em ambientes altamente redutores (ORP negativo) corresponde às reações desfavoráveis, ou seja, com energia de Gibbs positiva (Figura 2).

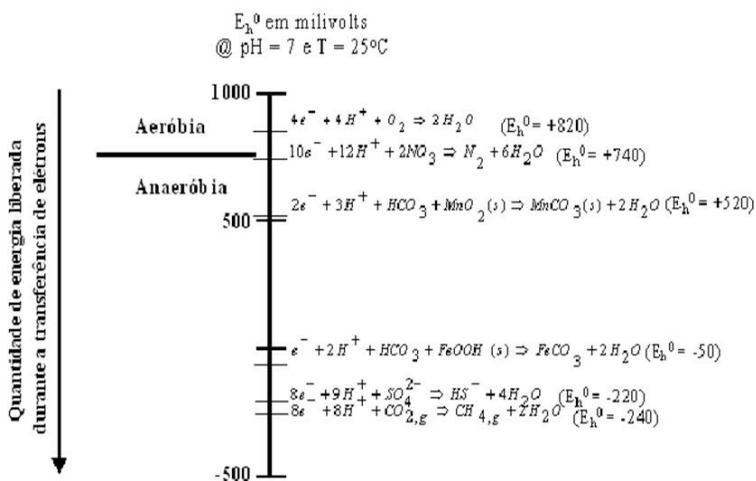


Figura 2 - Correlação entre os potenciais de oxidação-redução e a quantidade da energia livre de Gibbs; e caracterização das faixas de ORP correspondentes aos processos de oxi-redução
Fonte: Stumm e Morgan (1981).

As reações de oxi-redução com os diferentes receptores de elétrons ocorrem em uma determinada faixa de potencial redox, que varia de -400 a 800 mV em águas subterrâneas (WIEDEMEIER et al., 1999). Stumm e Morgan (1981) consideraram reações em pH 7 e temperatura a 25°C, na caracterização sequencial de potenciais de oxidação-redução (Figura 2), o qual auxilia na delimitação de zonas

oxidantes e redutoras nas águas subterrâneas. Edmund et al. (1984) propuseram uma sequência destes processos com os seguintes intervalos: oxigênio-nitrogênio, ferro, sulfato e metanogênese. Os potenciais correspondentes a esses intervalos eram respectivamente: (+) 250 mV a (+) 100 mV, (+) 100 mV a zero mV, zero a (-) 200 mV e abaixo de (-) 200 mV. Portanto, a avaliação do ORP em águas subterrâneas pode indicar uma contaminação e dependendo do valor encontrado, supor o processo de biodegradação predominante.

Os processos de biodegradação, além de serem indicados pela medição do decaimento na concentração de receptores de elétrons ou por valores de ORP, eles também podem ser investigados pelo acúmulo dos subprodutos gerados a partir do metabolismo microbiano. Estes compostos são os chamados indicadores geoquímicos da biodegradação. Os indicadores podem ser compostos orgânicos mais simples (intermediários) resultante da oxidação dos hidrocarbonetos, ou compostos inorgânicos reduzidos a partir da redução dos receptores de elétrons. Os compostos orgânicos intermediários da biorremediação dos hidrocarbonetos são muito utilizados como indicadores da biodegradação. O benzilsuccinato, por exemplo, pode ser usado como indicador da atividade microbiana utilizando BTEX como substrato. No estudo de campo de um aquífero em Seal Beach, CA, Beller et al. (1995) observaram o comportamento de um grupo de compostos incluindo ácido benzilsuccínico, ácido benzilfumárico (ou seus isômeros relacionados), e os homólogos *o*-, *m*-, e *p*-metil destes compostos. Uma forte correspondência foi observada entre o desaparecimento dos alquilbenzenos da água subterrânea e o aparecimento dos subprodutos metabólicos correspondentes. Estes metabólitos foram propostos como indicadores do metabolismo anaeróbico dos alquilbenzenos de aquíferos contaminados com gasolina. Os processos de oxidação anaeróbia de compostos orgânicos podem ocorrer através de processos metabólicos de fermentação, com ausência de receptores de elétrons externos. Na presença deles (oxigênio, nitrato, ferro (III), manganês, sulfato) ocorre o processo de respiração através da cadeia transportadora de elétrons (CHERNICHARO, 1997). O subproduto metabólico é diferente para cada via respiratória, de acordo com o receptor de elétrons utilizado, assim como para a via fermentativa.

2.2.1 Nitrato-redução

Sob condições anaeróbias, a nitrato-redução é favorecida em relação à ferro redução, sulfato-redução e metanogênese, visto que o nitrato é o receptor de elétrons mais energeticamente favorável depois do oxigênio. A desnitrificação ocorre em duas etapas: na primeira o nitrato (NO_3^-) é reduzido a nitrito através da enzima especializada, nitrato redutase; na segunda, o nitrito é reduzido em nitrogênio gasoso (N_2), envolvendo compostos intermediários contendo nitrogênio (CHAPELLE, 2001). A redução do nitrito a NO é realizada pela enzima nitrito redutase (*Nir*), a qual é uma das enzimas chave no processo de desnitrificação. Nos sistemas anaeróbios, onde o nitrato é o principal receptor de elétrons, o NO_3^- é reduzido para N_2 , e a concentração de NO_3^- decresce. Desta forma, a detecção de baixas concentrações de nitrato em uma área contaminada na qual este receptor já esteve presente pode indicar processos de biodegradação dos poluentes através da nitrato-redução. No entanto, é necessário muito critério e rigor no momento de assumir a nitrato-redução como um processo de biodegradação dos contaminantes, pois algumas das mais importantes reações mediadas por bactérias em solos são as que envolvem os compostos do nitrogênio (N). O nitrato pode ser usado apenas como fonte de nutriente e, na verdade, estar ocorrendo outro processo de oxirredução, utilizando outro receptor de elétron como fonte de energia na degradação de poluentes. O subproduto metabólico nitrito é difícil de ser detectado, devido à sua instabilidade no meio, pois logo após sua produção a partir do nitrato, ele é metabolizado pela nitrito redutase.

As bactérias desnitrificantes são filogeneticamente diversas, e pertencem aos principais grupos fisiológicos com exceção dos *Enterobacteriaceae*, anaeróbios estritos, e as bactérias gram-positivas que não *Bacillus spp.* As bactérias desnitrificantes são anaeróbias facultativas e podem trocar do oxigênio para óxidos de nitrogênio como receptores de elétrons quando se encontram em condições anóxicas. Os microrganismos desnitrificantes manifestam a enzima nitrito redutase (*Nir*), a qual é codificada por dois diferentes genes, *nirS* e *nirK*. O primeiro é mais amplamente distribuído, enquanto

nirK é encontrado em apenas 30% dos organismos estudados até o momento (COYNE et al., 1989). O gene *nirS* já foi identificado em algumas cepas de bactérias, tais como: *Alcaligenes eutropus*, *Alcaligenes faecalis*, *Azospirillum brasilense*, *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Roseobacter denitrificans*, *Alcaligenes eutrophus* (BRAKER et al., 1998).

2.2.2 Ferro(III)-redução

A redução do ferro (III) a ferro (II) é uma das mais significativas mudanças químicas que ocorre em ambientes subsuperficiais. Este processo é mediado por microrganismos conhecidos como bactérias ferro-redutoras (BRF) e pertencem à família *Geobacteraceae*, a qual é um grupo abundante na subsuperfície e são filogeneticamente e metabolicamente diversos, unificados pela habilidade de oxidar matéria orgânica pela redução de metais oxidados (LOVLEY, 1995; LOVLEY, 2002). O estudo de Kane et al. (2002), por exemplo, demonstrou que cepas de *Geobacter metallireducens* possui o gene *bssa*, o qual codifica a enzima benzilsucinato sintase responsável pela primeira etapa de degradação anaeróbia do tolueno (Figura 3). Este foi o primeiro organismo estudado que apresenta a completa oxidação de compostos orgânicos utilizando óxidos de ferro (III) como receptor de elétrons (LOVLEY et al., 1989). Além disso, estes microrganismos são gram-negativos, estritamente anaeróbios e também possuem a habilidade de utilizar nitrato e outros metais, como Mn (IV) e U (VI), como receptor de elétrons (LOVLEY, 1993). Esta característica fornece ao gênero *Geobacter* maiores possibilidades de utilização dos compostos biodisponíveis no meio e por isso maior competitividade frente às outras comunidades microbianas, que muitas vezes são capazes de utilizar somente um determinado receptor de elétrons. Por causa de suas capacidades diversas, as bactérias ferro-redutoras têm sido propostas como agentes biorremediadores para locais anóxicos contaminados (LOVLEY, 2002).

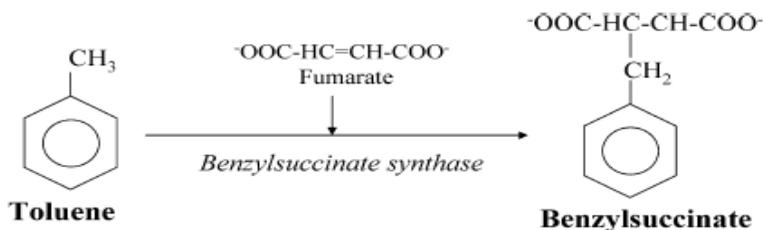


Figura 3 - Primeira etapa de degradação anaeróbica do tolueno
 Fonte: Heider et al. (1998).

O principal subproduto metabólico mensurável que apresenta aumento em sua concentração dissolvida em áreas com derramamento de combustíveis em que ocorre a ferro-redução é o ferro ferroso. O ferro na forma reduzida (ferro II) é mais solúvel e móvel do que na forma oxidada (ferro III), por isso este é normalmente o composto utilizado como indicador de uma biorremediação. O acúmulo de ferro $^{2+}$ é também diretamente influenciado pela presença de sulfato, visto que quanto mais se tem sulfato que se reduz a sulfeto, mais se tem sulfeto livre disponível para reagir com Fe^{2+} dissolvido para a precipitação do FeS (ROYCHOUDHURY e MERRETT, 2006). Por isso, para a determinação do processo de oxi-redução atuante na biodegradação dos hidrocarbonetos é importante verificar a disponibilidade dos receptores disponíveis juntamente com os subprodutos metabólicos formados.

2.2.3 Sulfato-redução

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) compreendem em vários grupos de bactérias, estritamente anaeróbios, que utilizam o sulfato como receptor de elétrons, reduzindo-o a sulfeto. A maioria das BRS também podem utilizar compostos de enxofre oxidados tais como o sulfito e o tiosulfato ou enxofre elementar. Estes microrganismos encontram-se em várias linhas filogenéticas, três ordens das quais se incluem na subunidade delta das *Proteobacterias*,

como *Desulfobacterales*, *Desulfovibrionales* e *Syntrophobacterales*. A subunidade δ é uma classe do filo *Proteobacterias* composto por bactérias gram-negativas e um grupo de gêneros estritamente anaeróbios que contém a maior parte das redutoras de sulfato (*Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfonema*, etc.) e das bactérias redutoras de enxofre (por exemplo, *Desulfuromonas*) juntamente com outras bactérias anaeróbias com diferente fisiologia (por exemplo, redutoras de ferro férrico como o gênero *Geobacter* e os gêneros sintróficos *Pelobacter* e *Syntrophus*) (MADIGAN e MARTINKO, 2005). A proximidade filogenética destes grupos de microrganismos pode ser melhor observada na Figura 4, a qual representa as subdivisões do filo *Proteobacterias*, e a distância evolucionária entre algumas espécies da subunidade delta.

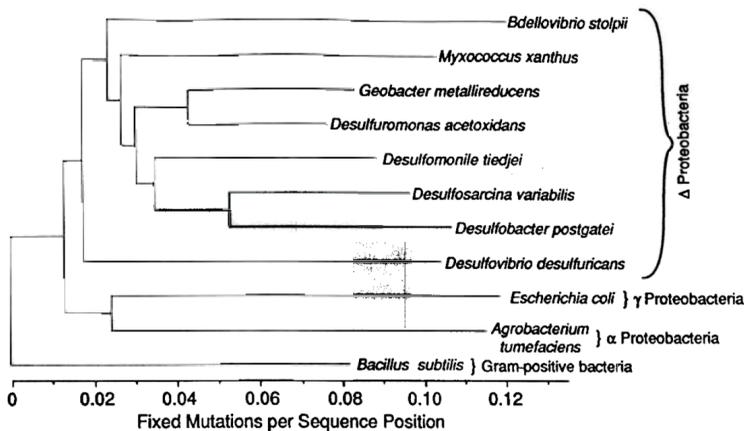


Figura 4 - Árvore filogenética representando as subdivisões do filo *Proteobacterias* em bactérias gram-positivas, α -*Proteobactérias*, γ -*Proteobacterias* e δ -*Proteobacterias*
 Fonte: Lovley et al. (1993).

Pelo fato das bactérias sulfato-redutoras serem organismos filogeneticamente próximos das redutoras de ferro, estas possuem características taxonômicas e metabólicas parecidas, assim como rotas de biodegradação semelhantes. Isto já foi reportado que a espécie *Geobacter metallireducens* e seu “parente” mais próximo, *Desulfuromonas acetoxidans*, que oxida o acetato a dióxido de

carbono pelo ciclo do ácido cítrico, enquanto a maioria dos microrganismos estritamente anaeróbios que oxidam o acetato não utiliza esta rota (THAUER, et. al., 1989). No entanto, um importante contraste entre o gênero *Geobacter* e as sulfato-redutoras é a que bactérias *Geobacter* não conseguem utilizar o sulfato ou enxofre como receptor de elétrons.

Em ambientes subterrâneos, o sulfato só será o receptor de elétrons termodinamicamente mais favorável após a utilização do nitrato e do ferro (III) durante a biodegradação anaeróbia da matéria orgânica (ATLAS e BARTHA 1987; WEIDEMEIER et al., 1999). Além disso, o sulfato é um receptor de elétrons menos competitivo que os demais por seu baixo rendimento energético e a ocorrência da sulfato-redução exigir baixíssimos valores de potencial de oxirredução. Diversas fontes de carbono podem cumprir o papel de doadores de elétrons na sulfato-redução. Em estudos de laboratório no qual foi feita a comparação entre diferentes fontes de carbono para a sulfato-redução, Bryant et al. (1977) observaram que o etanol (comparado ao acetato e ao lactato) foi o que se mostrou mais eficaz como fonte de carbono, já que incentivou a sulfato-redução e o crescimento bacteriano. Mackay et al. (2007), em experimento de campo utilizando o éter metilterc-butílico (MTBE em inglês), no qual foram injetadas soluções contendo benzeno, tolueno e o-xileno e etanol, observaram que a sulfato-redução foi responsável pela biodegradação do etanol.

2.2.4 Metanogênese

A degradação metanogênica de materiais orgânicos é um processo que ocorre em ambientes anaeróbios, onde receptores de elétrons inorgânicos, como oxigênio, nitrato, ferro, manganês e sulfato, são ausentes. O acetato é um dos mais importantes intermediários da biodegradação anaeróbia e é utilizado na metanogênese para mineralização de materiais orgânicos (HATTORI, 2008). A metanogênese é um processo de respiração onde o carbono presente tanto na forma de acetato (CH_3COO^-) quanto dióxido de carbono (CO_2) é utilizado como receptor final de elétrons, obtendo-se como produto final o gás metano (CH_4) (CHAPELLE, 1993). Desta

forma, um indicativo da biodegradação de compostos orgânicos em condições anaeróbias é o acúmulo de acetato no meio. Além disso, em ambientes subterrâneos contaminados com hidrocarbonetos a possibilidade da ocorrência da metanogênese é suportada pelas medidas do potencial de oxirredução e pelo aumento da concentração de metano.

Para a completa mineralização da matéria orgânica para metano são necessários quatro diferentes grupos microbianos filogenéticos, bactérias fermentativas primárias, secundárias e dois tipos de arqueas metanogênica. As bactérias fermentativas primárias realizam a hidrólise de polímeros (proteínas, lipídeos, polissacarídeos) em monômeros e depois em compostos reduzidos (álcoois, ácidos orgânicos). Os produtos reduzidos são oxidados a acetato, hidrogênio e dióxido de carbono pelas bactérias fermentativas secundárias. H_2 e CO_2 são convertidos em CH_4 pela ação das metanogênica hidrogenotróficas (*Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanobrevibacter*, *Methanoculleus* e *Methanocorpusculum*), enquanto a degradação metanogênica do acetato é realizada pelas metanogênicas acetoclásticas (*Methanosaetaceae* e *Methanosarcinaceae*). Porém, a oxidação dos compostos reduzidos a acetato realizado pelas bactérias secundárias é um processo termodinamicamente desfavorável ($\Delta G > 0$) e para que este ocorra é necessária a ação das metanogênicas hidrogenotróficas, as quais reduzem o H_2 do meio, deslocando a reação a favor da formação de acetato (HATTORI, 2008).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Na metodologia é detalhada a caracterização da área de estudo, as análises químicas e moleculares dos experimentos analisados neste trabalho. A área de estudo é composta por oito experimentos que envolvem liberações controladas de diferentes contaminantes. Somente as análises moleculares foram realizadas pela autora deste trabalho. As análises físico-químicas foram realizadas pela equipe técnica do Laboratório de Remediação de águas subterrâneas (REMAS).

3.1 ÁREA DE ESTUDO

Os experimentos avaliados neste trabalho se situam na Área Experimental da Fazenda Ressacada onde são realizados os experimentos de campo do Laboratório de Remediação de Águas subterrâneas (REMAS). Esta área é propriedade da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e está localizada em Florianópolis/SC (UFSC), bairro Tapera, próximo ao aeroporto Hercílio Luz. Desde 1998, o Laboratório REMAS realiza estudos com derramamentos controlados de combustíveis, tais como misturas de gasolina com etanol em diferentes proporções, diesel puro e sua mistura com biodiesel ou etanol e biodiesel puro. Desde então, as diversas áreas vêm sendo monitoradas com análises de campo e laboratoriais. Neste trabalho de dissertação, são avaliadas oito áreas experimentais, cada qual com a liberação de um poluente recebendo diferentes tipos de tratamentos de biorremediação. Os contaminantes liberados de maneira controlada foram: Gasolina comercial com 24% de etanol (E24), Misturas de Gasolina 90% com Etanol 10% (E10), Gasolina 75% – Etanol 25% (E25), Gasolina 15% - Etanol 85% (E85), Biodiesel puro (B100), Diesel puro (D100), Diesel 80% - Biodiesel 20% (B20), Diesel 50% - Etanol 50% (DE50). Em todas as áreas é feito o monitoramento da pluma dos poluentes pelo REMAS. Em algumas áreas são realizadas técnicas de bioestimulação com

injeção de receptores de elétrons como o sulfato, nitrato e acetato em outras é somente monitorado os processos de atenuação natural da pluma de contaminação.

Neste trabalho, as coletas e análises sempre foram realizadas na região da fonte de contaminação de cada área experimental, portanto, para facilitar a compreensão do leitor sobre as áreas, elas foram nomeadas em ordem crescente de tempo após a liberação do contaminante da seguinte maneira: A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 e A8 (Figura 5). A Tabela 1 apresenta cada área com seu respectivo contaminante, quantidade liberada, data de liberação do poluente e do receptor de elétron e o tipo de remediação testada e estudada.

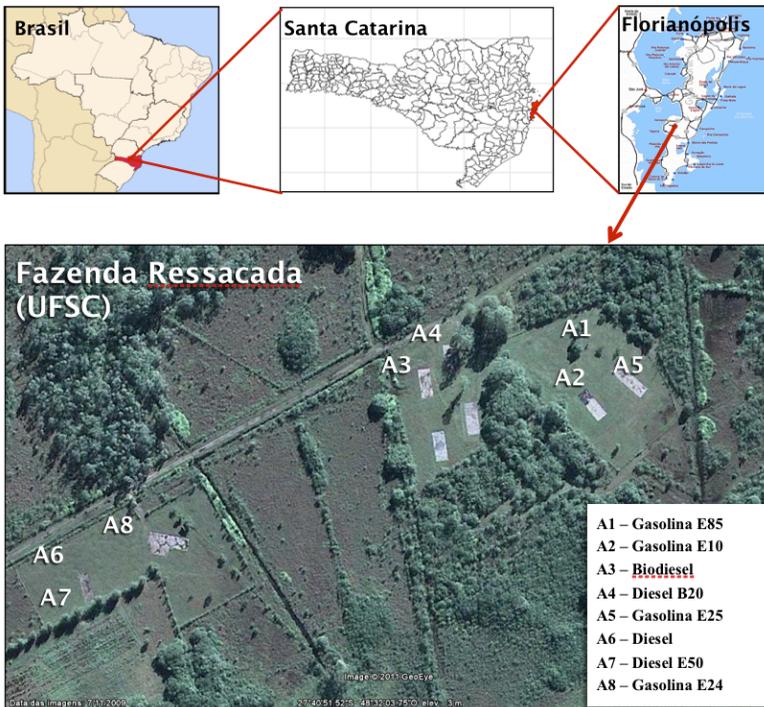


Figura 5 - Localização da área de estudo dos experimentos

Tabela 1: Descrição das áreas experimentais da Ressacada contendo o contaminante liberado em cada área, com sua data de liberação, quantidade liberada e a técnica de remediação utilizada.

Área	Combustíveis	Data da liberação controlada	Tipo de Remediação	Quantidade e liberada
A1	Gasolina com 85% de etanol	08/09/2010	Atenuação Natural	100L
A2	Gasolina com 10% de etanol	26/05/2009	Bioestimulação com Sulfato	100L
A3	Biodiesel	12/06/2008	Atenuação Natural	100L
A4	Diesel com 20% de biodiesel	12/06/2008	Atenuação Natural	100L
A5	Gasolina com 25% de etanol	22/12/2004	Bioestimulação com Nitrato	100L
A6	Diesel	17/12/2000	Atenuação Natural	20L
A7	Diesel com 50% de etanol	17/12/2000	Atenuação Natural	20L
A8	Gasolina com 24% de etanol	01/12/1998	Atenuação Natural	100L

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

A hidrogeologia do local de estudo é um fator importante na caracterização da área, pois indica a velocidade, a direção do fluxo de águas subterrâneas e conseqüentemente o percurso da pluma de contaminação. A Fazenda Experimental da Ressacada apresenta em sua região um aquífero livre cujo limite superior é a superfície freática na qual todos os pontos se encontram à pressão atmosférica (FEITOSA, 2008). Neste aquífero o escoamento da água subterrânea ocorre em várias direções, mas o sentido do fluxo da água subterrânea é bastante influenciado pela existência de águas superficiais e pelo relevo da região estudada. Nas diversas áreas experimentais da Ressacada ocorre pequenas variações quanto à porosidade efetiva, condutividade hidráulica, direção do fluxo, gradiente hidráulico e velocidade intersticial. A determinação da condutividade hidráulica foi realizada, pelo Laboratório de Estudo de Bacias (LEBAC), da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) através de testes de *slug* o que indicou um valor médio de $4,25 \times 10^{-4}$ cm/s. A porosidade total média é de 40% e a porosidade efetiva média é de 20%; o gradiente hidráulico da área é de 0,6% e a velocidade da água subterrânea varia de 5,2 a 6,2 m/ano (COSTA, 2008). Para a compreensão da direção do fluxo da água subterrânea, são monitoradas as flutuações do nível freático através de piezômetros situados ao redor da área pelo laboratório REMAS. Na região dos experimentos, a variação das flutuações apresentou-se ser de 0,7 a 2,0 m em relação à cota do terreno (COSTA, 2008). Com a compreensão destes parâmetros, e com experimentos realizados há mais de 10 anos, a direção do fluxo da água subterrânea confiada pelo Laboratório REMAS está indicada pela seta na Figura 6.

A geologia da fazenda experimental da Ressacada pode ser caracterizada como uma areia fina de coloração, variando do cinza ao cinza marrom, pouco argiloso, apresentando baixo teor de matéria orgânica. De acordo com Lage (2005), a geologia da região das áreas experimentais (Figura 6) é representada por sedimentos essencialmente arenosos, com predominância de areia fina em sua granulometria. Os perfis indicam a presença de lentes e camadas

intercaladas com comportamento argiloso, o que atribui heterogeneidade ao material.



Figura 6 - Direção do fluxo da água subterrânea na área experimental da Ressacada indicada pela seta e fontes de liberação de combustíveis controlada representadas pelos marcadores em cada área.

A caracterização geoquímica e hidroquímica foram realizadas no dia 30 de março de 2010 a partir de análises das amostras da água subterrânea de um poço sem contaminação. Foram coletadas 5 amostras, sendo uma amostra por nível de profundidade do poço em estudo. Essas amostras foram analisadas para as variáveis cujas mudanças são importantes para avaliar processos de biorremediação dos contaminantes. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, potencial de oxidação-redução (ORP), nitrito, ferro (II), sulfeto, acetato, nitrato e sulfato, mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Valores máximos e mínimos das variáveis analisadas na água subterrânea de um local sem contaminação (área controle)

Parâmetros	Valores (mín.-máx.)
Temperatura (°C)	24 – 25
pH	3,76 – 3,83
Oxigênio dissolvido (mg/L)	2 - 5
Potencial de oxidação-redução (mV)	126 - 172
Nitrito (mg/L)	N.D.
Fe (II) (mg/L)	0,0 - 0,4
Sulfeto (µg/L)	2,0 - 25,0
Acetato (mg/L)	N.D.
Nitrato (mg/L)	0,3- 2,4
Sulfato (mg/L)	0,7- 2,8

3.3 CONFIGURAÇÃO EXPERIMENTAL

3.3.1 Poços de monitoramento

As oito áreas experimentais avaliadas neste trabalho apresentaram plumas de contaminação de tamanhos variados, visto que seus tempos de monitoramento e mistura de combustível liberado são diferentes e por isso apresentam quantidades variadas de poços de monitoramento (Figura 7). Contudo, todas elas são constituídas por um poço, chamado de fonte, onde foram liberadas as porções conhecidas dos contaminantes, os quais podem ter uma solubilização contínua de compostos orgânicos nas águas subterrâneas, ou ser apenas uma contaminação onde a liberação de

poluentes já cessou, ou não ser mais um local contaminado e sim remediado (Figura 7).

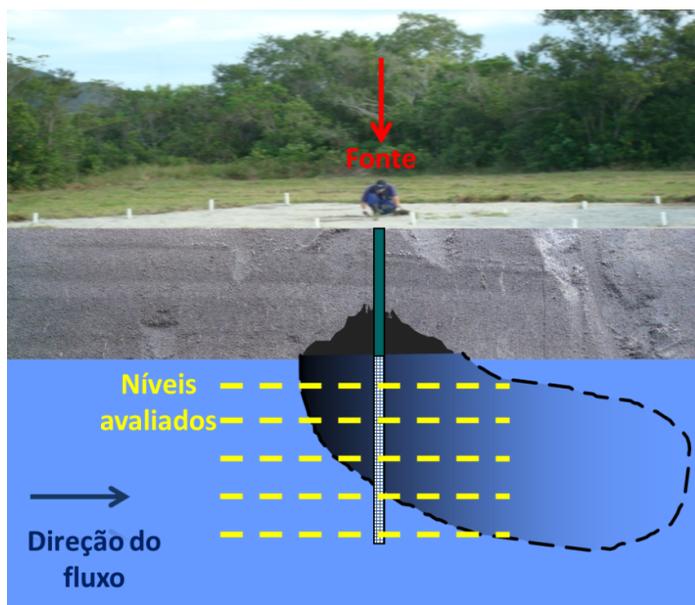


Figura 7 - Representação de uma área experimental com os poços de monitoramento multiníveis. Indicado pela seta vermelha a simulação do poço onde foi liberado o combustível/biocombustível e a formação da pluma de contaminação.

Os poços de monitoramento utilizados neste trabalho foram exatamente estes poços onde foram liberados os combustíveis (fonte) em cada área experimental. A fonte de cada área varia em relação aos níveis de profundidade, os quais são diferenciados através de mangueiras com fitas coloridas, como mostradas na Figura 8. Portanto, com o auxílio de uma bomba peristáltica foram coletadas amostras de água subterrânea da fonte em todos os níveis de profundidade de todas as oito áreas experimentais. Os níveis monitorados em cada área tem profundidade variável sendo que nas áreas contendo os combustíveis gasolina E85 (A1), gasolina E10 (A2), biodiesel (A3), diesel B20 (A4) os níveis são 2, 3, 4, 5 e 6m abaixo da cota do terreno; para a área que foi liberado gasolina E25

(A5) os níveis são 2,3, 2,8, 3,8, 4,8 e 5,8m abaixo da cota do terreno; nas áreas com diesel (A6) e diesel E50 (A7) foram coletadas água a 1, 2, 3 e 4m de profundidade e na área contendo gasolina E24 (A8) os níveis foram 1, 2, 2,5, 3,5 e 4,5m.



Figura 8 - Diferenciação dos níveis de profundidade através de fitas coloridas.

3.3.2 Amostragem

Para as análises microbiológicas foi amostrado em cada nível 1 litro (L) de água subterrânea em frascos âmbar, previamente esterilizados com álcool 70% e secados. Visto que grande parte da comunidade microbiana se encontra aderida ao solo, há a necessidade de se ter grande volume de água subterrânea coletada para que seja uma amostra representativa, ou seja, com uma quantidade de microrganismos detectável que caracterize a área de estudo. As amostras foram transportadas em uma caixa de isopor com gelo e logo foram filtradas para prevenir a decomposição dos DNAs.

Para a determinação dos compostos BTEX, etanol e metano foram utilizados frascos âmbar de 40 mL, nos quais as amostras foram conservadas em um pH inferior a 2; e para as demais análises

físico-químicas (acidez, alcalinidade, ferro e sulfeto) foram utilizados frascos âmbar de 200 mL. As amostras foram analisadas logo após a coleta, pois o nitrato possui um período de conservação inferior a 48 horas (COSTA, 2008).

Para o bombeamento da água foi utilizado uma bomba peristáltica *Millipore*, modelo XX80EL000 – tipo *easy load*, e mangueiras *Masterflex® Tygon* para cada poço de monitoramento. No momento da coleta foram realizadas medições de temperatura (°C), oxigênio dissolvido (%), Oxigênio Dissolvido (mg/L), pH, SpC (mS/cm)², PR – Orp (mV) e Salinidade (‰) utilizando o analisador de água *Micropurge® Flow Cell*, modelo MP20–1380.

3.4 PROCEDIMENTOS QUÍMICOS

3.4.1 BTEX, etanol e metano

As soluções-padrão para o BTEX e o etanol foram preparadas segundo normas da *Environmental Protection Agency (USA) EPA/8015^A – Aromatic Volatile Organics by Gas Chromatography* (EPA, 1996), como descrito por FERNANDES, 2002. Os padrões utilizados foram: *UST Modified Gasoline Range Organics* da SUPELCO para os BTEX e o etanol da indústria *J.T. Baker*, com 99,9% de pureza. Para o metano, a solução-padrão foi preparada a partir do gás metano com 99,5% da empresa *White Martins*. O gás metano é borbulhado dentro de um recipiente contendo água ultra-pura, até a obtenção do equilíbrio entre as duas fases: gasosa e aquosa. Conhecendo a pressão parcial e a constante de Henry, para o metano, foi possível calcular a concentração do metano na fase aquosa, e representada em miligramas por litro de água (STUMM e MORGAN, 1981).

As amostras dos compostos voláteis (BTEX, etanol e metano) foram analisadas em um cromatógrafo a gás da HP (modelo 6890 – série II) com *HeadSpace Autosampler HP* – estático (modelo 7694) equipado com detector por ionização em chama (FID), conectado a

um computador Pentium II com o *Software ChemStation*, versão A. 10.02.

O gás de arraste empregado foi o hélio, com velocidade de 7,0 mL min⁻¹ em todas as análises. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida: HP 1 (metil siloxano) nº 19095z-123 (HP, USA) com 0,53mm de diâmetro interno, com 30m de comprimento e espessura do filme de 2,65µm. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas, respectivamente, a 260°C e 280°C, para o BTEX e o etanol, e a 190°C e 280°C, para o metano. Para os BTEX e etanol foi usada temperatura programada de 70°C por 2 min com taxa de aquecimento 5°C/ min até 120°C e 30°C/min até 210°C e para o metano as análises foram feitas em isoterma, à temperatura de 40°C, respectivamente. O método empregado para os compostos voláteis são EPA 5021A combinado com o método EPA/8015D (EPA, 1996).

3.4.2 Ânions – cloreto, nitrato, nitrito, fosfato, sulfato e acetato

Os ânions cloreto (Cl⁻), nitrato (NO₃⁻), nitrito (NO₂⁻), fosfato (PO₄⁻³) sulfato (SO₄⁻²) e acetato (CH₃COO⁻) foram analisados por cromatografia iônica, em cromatógrafo DIONEX (modelo ICS -1000), equipado com detector de condutividade iônica, e coluna utilizada AS4A-SC. Os padrões utilizados foram todos da marca J. T. Baker e o método empregado é Chromatography with chemical suppression of eluent conductivity – do Standard Methods (APHA, 1992).

3.4.3 Ferro (II) e sulfeto

As análises de ferro (II) e sulfeto foram conduzidas em espectrofotômetro HACH – DR/2500; seguindo método 3500-Fe D – método 1,10 fenantrolina para o ferro (II) e o 4500-S²-D – método colorimétrico azul de metileno para o sulfeto do Standard Method (APHA, 1992). Os reagentes da HACH utilizados foram: para o ferro (II) (1,10-fenantrolina e bicarbonato de sódio, na proporção para analisar 25 mL de amostra) e para o sulfeto (reagente 1, que contém ácido sulfúrico, oxalato de N,N-dimetil-p-fenilenodiamina e o reagente 2, uma solução de azul de metileno, todos na proporção correta para analisar 25 mL da amostra).

3.5 PROCEDIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

3.5.1 Filtração

Para a caracterização da população microbiana, aproximadamente, 1 L de água subterrânea foi coletado em todos os níveis de profundidade do poço localizado nas regiões das fontes de contaminação das áreas em estudo. Visto que foram avaliadas oito áreas experimentais e em cada uma foram amostradas cinco profundidades de um poço na região da fonte e uma profundidade controle em um local sem contaminação, totalizam aproximadamente 48 amostragens. Todas as amostras foram submetidas a uma filtração à vácuo utilizando *Kitasato*, bomba à vácuo, filtro *Millipore* de 0,22 μm (Figura 9).



Figura 9 - Sistema montado para a filtração à vácuo das amostras de água subterrânea

Os filtros contendo o material microbiológico de interesse foram transferidos para a solução do *Power Bead Tube* do kit de

extração de DNA MoBio Power Soil™ kit (Carlsbad, CA) para então ser extraído o DNA (DA SILVA e CORSEUIL, 2008).

3.5.2 Extração do DNA

De cada amostra de água subterrânea, os filtros contendo o material retido foram utilizados para a extração de DNA. Nesta etapa foi utilizado o kit *DNA MoBio Power Soil™* (Carlsbad, CA) e o DNA foi extraído de acordo com as recomendações do kit. Após o processo de extração, 100 µL de solução com DNA foi obtido e armazenado em frascos de 2 mL (*Eppendorf*), livres de DNA e RNA, e estocados em freezer (-30°C, *MidSci*) para análises em PCR quantitativo (qPCR).

3.5.3 PCR quantitativo em tempo real

As análises de biologia molecular foram realizadas utilizando os métodos de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real-time quantitative polymerase chain reaction - qPCR*). qPCR foi utilizado para quantificar fragmentos de DNA específicos que carregam informações responsáveis por manifestar características ligadas à biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo. As comunidades microbianas avaliadas neste trabalho foram bactérias totais (quantificadas pelo gene 16S rDNA), bactérias redutoras de nitrito (associadas ao processo de nitrato-redução), bactérias pertencentes ao gênero *Geobacter* (associadas ao processo de ferro-redução), bactérias pertencentes à subunidade delta (δ) das *Proteobacterias* (associadas ao processo de ferro- e sulfato-redução) e arqueas (associadas ao processo metanogênico).

A quantificação das bactérias totais, redutoras de nitrito, redutoras de ferro (III), redutoras de sulfato e metanogênicas foram determinadas utilizando os iniciadores BACT1369F e PROK1492R e a sonda TM1389F; os iniciadores nirS1F/ nirS6R; 561F e 825R; 361F e 685R; ARCH1-1369F e PROK1541R e sonda TM1389F, respectivamente. As análises foram realizadas no equipamento *Mastercycler ep realplex* (*Eppendorf*). Os kits para reação de PCR

foram o *Taqman* e *Sybr-Green* (*Applied Biosystems*, EUA). Todos os iniciadores e sondas foram obtidos da empresa *Integrated DNA Technologies* (*Coralville, IA, EUA*) e suas seqüências com os respectivos trabalhos (referências) que os desenvolveram estão mostradas na Tabela 3.

Tabela 3: Sequência de iniciadores e

Comunidade microbina	Iniciadores (Primers)	Sequência
<i>Bacteria 16S rDNA</i> (bactérias totais)	PROK1492-R	5'- GGATTACCTTGTTACGACTT -3'
	BACT1369-F	5'- CGGTGAATACGTTCCCTCGG -3'
Bactérias nitrito-redutoras (<i>nirS</i>)	NIRS6-R	5'- CGT TGA ACT TAGC CGG T -3'
	NIRS1-F	5'- CCT ACTT GGC CGC CAGC AAGT -3'
<i>Geobacter</i>	561-F	5'- GCG TGT AGG CGG TTT CTT AA -3'
	825-R	5'- TAC CCG CAGA CAC CTA GTT CT -3'
δ - <i>Proteobacterias</i>	685-R	5'- ATC TAC GGA TTT CAC TCC TAC A -3'
	361-F	5'- AAG CCT GAC GCA GCCA A -3'
Arqueas	ARCH1-1369F	5'- CGGTGAATACGTTCCCTGC -3'
	PROK1541R	5'- AAGGAGGTGATCCTGCCGCA -3'

sondas usados para PCR em tempo real.

Sonda (<i>probe</i>)	Referência
TM1389F 5'- /56-FAM/CTT GTA CAC ACC GCC CGT C/3BHQ_1/ -3'	Da Silva e Alvarez, 2004
	Braker et al., 1998
	Sults et al., 2001
	Sults et al., 2001
TM1389F 5'- /56-FAM/CTT GTA CAC ACC GCC CGT C/3BHQ_1/ -3'	Da Silva e Alvarez, 2004

Na preparação das amostras de DNA para a análise de PCR em Tempo Real foi feito o Master Mix, uma mistura de reagentes, que varia a quantidade de cada substância adicionada dependendo dos iniciadores utilizados, ou seja, da análise que se deseja realizar. Primeiramente os iniciadores e as sondas foram diluídos para uma concentração de $50\mu\text{M}$. O Master Mix teve uma concentração de $0,5\mu\text{M}$ de cada iniciador ($0,5\mu\text{M}$ do *forward* e do *reverse*), concentração de $0,25\mu\text{M}$ da sonda (TM1389F), $1\times$ TaqMan Universal PCR Master mix (Applied Biosystems)², $2\mu\text{L}$ de solução de DNA não diluído e água estéril livre de nucleases (AMRESO-E476) para um volume final de $25\mu\text{L}$.

A técnica de RTQ-PCR foi conduzida com seqüência ABI PRISM 7000 como sistema de detecção (Applied Biosystems) com as seguintes condições de temperatura: 50°C por 2 min para ocorrer a fusão das amostras (etapa de desnaturação do DNA), seguidos de 95°C por 10 min (etapa de anelamento dos iniciadores na fita simples de DNA) e para a amplificação dos DNAs foi programado 40 ciclos a 95°C por 15 s, e 60°C por 1 min. Para as análises de PCR que não utilizaram a sonda TM1389F foi necessário usar o corante Syber Green e com isso a programação de temperatura no equipamento foi a seguinte: 50°C por 2 min, seguidos de 95°C por 10 min e 55 ciclos a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min e por fim acrescenta-se a curva de fusão (Melting curve), que é 95°C por 15 s, seguidos de 60°C por 15 s, 20 min de aquecimento e finaliza com 95°C por 15 s (BELLER et al., 2002). Durante os ciclos de PCR, a quantidade de fita dupla de DNA se eleva de maneira exponencial, aumentando assim a quantidade de Syber Green ligado e sua fluorescência. Entretanto, quando ocorre amplificação inespecífica ou amplificação de dímeros de iniciadores estes também são detectados, interferindo com a quantificação final dos produtos específicos da reação. Para avaliar se produtos de PCR inespecíficos foram formados na reação, uma curva de fusão é construída. Se apenas os produtos específicos de PCR foram amplificados, um único pico será visualizado no gráfico de fusão. Portanto, a curva de fusão é uma avaliação das características de dissociação da fita dupla de DNA durante o aquecimento, realizada para a confirmação da amplificação específica.

² $1\times$ TaqMan Universal PCR Master mix equivale a $12,5\mu\text{L}$

3.6 AVALIAÇÕES DAS COMUNIDADES MICROBIANAS

O estudo em escala real e a interpretação de análises em nível de microambiente exigem o conhecimento de metabolismos microbiológicos e possíveis correlações entre as variáveis, assim como um rigor no momento de assumir os valores referenciais. Por isso, para cada comunidade microbiana investigada neste trabalho, há determinados critérios para serem avaliados que se diferenciam entre si. Estes critérios são em relação à curva de calibração, ao limite de detecção, ao controle negativo (branco) e à ordem de grandeza que é considerada como detecção da presença da comunidade no meio analisado.

As comunidades microbianas avaliadas neste trabalho foram bactérias totais (quantificadas pelo gene *16S rDNA*), bactérias redutoras de nitrito (associadas ao processo de nitrato-redução), bactérias pertencentes ao gênero *Geobacter* (associadas ao processo de ferro-redução), bactérias pertencentes à subunidade delta (δ) das *Proteobacterias* (associadas ao processo de ferro- e sulfato-redução) e arqueas (associadas ao processo metanogênico). Cada um destes grupos é identificado em uma amostra por diferentes iniciadores descritos na Tabela 3. Estes, por sua vez, reagem de maneira diferente com o DNA da amostra e por isso apresentam diferentes curvas de calibração e conseqüentemente limites detecção (LD) distintos.

A concentração de microrganismo de cada amostra será baseada nos valores de CT gerados pela qPCR. O valor de CT é o número de ciclos realizados pela PCR necessários para o início da amplificação da seqüência alvo, ou seja, seqüência que se deseja quantificar (Figura C 1 no apêndice C). Portanto, quanto maior o número de ciclos, menor é o número de seqüências alvo que se tem em determinada amostra. Estes valores de CT foram substituídos nas equações obtidas através das curvas de calibração. Os valores de CT das amostras que foram maiores que o controle negativo, que consiste na reação dos *primers* com água ultra pura autoclavada, foram desconsiderados. As curvas foram realizadas com o DNA, de concentrações conhecidas, (obtido pela *MoBio*) das bactérias, *Pseudomonas aeruginosa* DSM 50071 para as comunidades de

bactérias totais e nitrito-redutoras; *Geobacter metallireducens* DSM 7210 para as comunidades ferro- e sulfato-redutoras (gênero *Geobacter* e δ *Proteobacterias*); e *Methanococcus maripaludes* DSM 2067 para a comunidade de arqueas. Estas curvas foram plotadas (Figura C 2 e Figura C 3 no apêndice C), utilizando o software Microsoft Excel®, de maneira que no eixo y tem-se log de cópias de gene μL^{-1} em função do eixo x, onde entram os valores de CT. A equação da reta dada a partir desta distribuição foi utilizada para substituir os valores de CT gerados pela PCR em log de cópias de gene μL^{-1} . Na construção da curva de calibração, o número de cópias de gene por μL é calculado pela equação 3.1, a qual foi baseada nas seguintes hipóteses segundo Da Silva e Alvarez (2004): (i) que o conjunto de iniciadores e sondas utilizados seja representativo para todas as bactérias que contém a sequência de gene que se deseja detectar; (ii) o tamanho aproximado, em Mbp, da cepa padrão a ser utilizada, deve ser consultado no genoma, e existe aproximadamente 9.12576×10^{14} bp μg of DNA⁻¹, o qual é equivalente ao tamanho do genoma da *Escherichia coli* (BLATTNER et al, 1997); e (iii) que existe um certo número de cópias do gene a ser analisado por genoma. Desta forma, para cada reação de iniciadores das diferentes comunidades microbianas, os valores da concentração do DNA padrão, o tamanho da cepa e o número de cópias de gene se diferenciaram, de acordo com a equação 3.1 e Tabela 4.

Eq. 3.1

$$\frac{\text{Cópias de genes}}{\mu\text{L}} = \left(\frac{\text{Concentração de DNA padrão} \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right)}{\text{Tamanho da cepa} \left(\frac{\text{Mpb}}{\text{Genoma}} \right)} \right) \left(\frac{9,1257 \times 10^{14} \text{ bp}}{\mu\text{g de DNA}} \right) \left(\frac{\text{Cópias de gene}}{\text{Genoma}} \right)$$

Tabela 4: Diferenças das características (Concentração de DNA, tamanho da cepa e cópias por genoma) entre as bactérias utilizadas para a curva de calibração.

Microrganismo	Concentração de DNA	Tamanho da cepa (Mbp)	Cópias de gene por genoma
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,1095	6,6	4
<i>Geobacter metallireducens</i>	0,1095	4,01	2
<i>Methanococcus maripaludes</i>	0,1095	1,8	3

Para se ter uma quantificação das bactérias ou arqueas em cópias de gene por grama de sólidos suspensos totais (SST) de água subterrânea (cópias de gene.g⁻¹ – equação 3.2), a partir do DNA extraído do sólido filtrado de amostras de água subterrânea, assumiu-se que para as amostras que saturaram o filtro havia 0,026g de SST, e para as amostras que não colmataram havia 0,015g de SST. Estes valores foram assumidos devido a um teste realizado no princípio desta pesquisa, o qual demonstrou que independente da quantidade do volume de água subterrânea que colmata o filtro, a massa de SST retida não é variável (0,026g). Da mesma forma acontece para as amostras que não saturaram o filtro, as quais mostraram valores sempre próximos de 0,015g (dados não mostrados). Já o número de cópias de gene foi dividido por dois μL de DNA, o qual é o volume de DNA utilizado para realizar cada reação da PCR e multiplicado por 100, considerando que para cada filtro saturado com SST de amostras de água subterrânea foi extraído 100 μL de DNA, como mostrado na equação 3.2.

Eq. 3.2

$$\frac{\text{Cópias de gene}}{\text{g de SS}} = \left(\frac{\text{Cópias de gene}}{\text{Reação}} \right) \left(\frac{\text{Reação}}{2\mu\text{L de DNA}} \right) \left(\frac{100\mu\text{L de DNA por filtro}}{\text{g DNA por filtro}} \right)$$

O LD representa a menor concentração de DNA que pode ser detectada, e pode ser calculado por um método baseado nos parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004; ARAGÃO et al., 2009). Portanto, para a definição do LD das distintas comunidades microbianas foi realizada para cada reação de PCR uma curva de calibração utilizando a matriz contendo o DNA de interesse na faixa de concentração próxima ao LD. Os limites de detecção foram calculados a partir da equação 3.3 para cada uma das comunidades - bactérias totais, bactérias redutoras de nitrito, bactérias pertencentes ao gênero *Geobacter*, bactérias pertencentes à subunidade delta (δ) das *Proteobacterias* e as arqueas – sendo os valores encontrados de $2,21 \times 10^3$, $1,1 \times 10^3$, $2,53 \times 10^3$, $1,95 \times 10^3$, $1,81 \times 10^3$ cópias de gene . g de SS⁻¹, respectivamente.

Eq. 3.3

$$\text{LD} = 3,3 \times \frac{S}{S}$$

Onde:

s é a estimativa do desvio padrão da resposta

S é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica

Além dos controles negativos da PCR, para efeito comparativo foi feito o branco dos experimentos em uma área não contaminada, supondo que os valores detectados nesta são semelhantes aos que existiram nas áreas contaminadas antes da liberação do combustível. As médias dos valores encontrados para esta área não contaminada estão representadas nos gráficos pela linha contínua preta, como um valor de referência para comparação com as áreas contaminadas. Para algumas análises os valores do branco foram abaixo do limite de detecção (*Geobacter*, δ -*Proteobacterias* e Arqueas). Nestes casos, a linha preta contínua nos gráficos corresponde ao próprio limite de detecção, servindo como referência.

Para a análise das comunidades de microrganismos, considerou-se presença relevante destas quando o valor da média do log de cópias de gene das amostras da área contaminada foi aproximadamente duas ordens de grandeza maiores que a área sem contaminação, marcada nos gráficos pela linha tracejada vermelha. Este referencial foi adotado considerando a possível detecção de DNAs sem atividade, ou seja, DNAs que não expressam mais as enzimas que eles codificam. Porém, quando se trata de um estudo em escala real e ainda de microambiente subterrâneo, deve ser considerado que a água subterrânea está sempre em movimento de acordo com a recarga e fluxo do lençol freático, além do próprio solo ser um ambiente de muito atrito e com isso não preservar a estabilidade do DNA inativo. Desta forma, por mais que seja possível a presença de DNAs inativos nos locais avaliados neste estudo, além de se ter o background para comparação, as duas ordens de grandeza é para garantir a real presença ativa dos organismos avaliados, visto que o desvio padrão varia dentro de uma ordem de grandeza. Esta análise de duas ordens de grandeza só não pôde ser realizada para a comunidade específica redutoras de nitrito e redutoras de sulfato. Para as redutoras de nitrito (*nirS*) os maiores valores encontrados nas áreas avaliadas foi de uma ordem de grandeza acima do resultado obtido na área sem contaminação. Além disso, foi a comunidade microbiana específica que mostrou as maiores quantidades de organismos presente, por isso, a comparação foi realizada com as bactérias totais através da relação (*nirS/16S*) a partir da unidade, log de cópias de gene .g⁻¹ de SS. Para análise das redutoras de sulfato foi considerado a diferença entre as *δ-Proteobacterias* e as *Geobacter*, visto que esta também faz parte desta subunidade (como explicado no item 2.2.3). Portanto, foi realizado o cálculo dos organismos redutores de sulfato através da seguinte equação:

Eq. 3.4

$$\log \text{ de cópias(sulfato-redutoras)} \times g^{-1} =$$

$$\log \text{ de cópias(Proteobacterias)} \times g^{-1} - \log \text{ de cópias(Geobacter)} \times g^{-1}$$

3.7 AVALIAÇÕES DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

A compreensão da distribuição de dados de uma variável permite a escolha de medidas descritivas (média, mediana) adequadas para a sua análise. Neste estudo, os valores de alguns parâmetros físico-químicos analisados obtidos no campo apresentaram grandes variações, não se constituindo funções gaussianas, com distribuição normal. Nestes casos a média aritmética não seria adequada para avaliar a tendência de variação dessas variáveis analisadas. Assim, dependendo da variável e da sua distribuição de dados buscou-se por meio do diagrama em caixas (diagrama de caixas) perceber o comportamento dos parâmetros de cada área experimental (Figura A 1, no Apêndice A). Percebe-se que, para algumas variáveis os valores de desvio padrão são muitas vezes próximos ou até maiores que os valores de média. Isso ocorre porque estes cálculos dos parâmetros físico-químicos foram realizados de amostras coletadas de poços de monitoramento multiníveis. Os resultados encontrados em cada nível amostrado estão detalhados nos apêndices. Portanto, para a discussão dos indicadores físico-químicos de biodegradação foi considerado a maior concentração detectada dentro dos níveis amostrados de cada área experimental analisada, exceto para o potencial de oxidação-redução, o qual foi considerado os valores mínimos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FÍSICO-QUÍMICA DA ÁGUA SUBTERRÂNEA NAS REGIÕES DAS FONTES DE CONTAMINAÇÃO POR COMBUSTÍVEIS

Para avaliar os processos microbiológicos atuantes em ambientes subsuperficiais e identificar a presença de combustíveis e biocombustíveis, a técnica de PCR em tempo real foi utilizada para investigar determinados grupos de microrganismos, em oito áreas experimentais (Figura 5 e Tabela 1). As comunidades microbianas anaeróbias foram priorizadas, porque em contaminação de subsuperfícies, primeiramente há uma alta demanda de oxigênio dissolvido que leva à rápida depleção deste receptor de elétrons no ambiente, e então os processos de biodegradação anaeróbios são prevalentes.

Para efeito comparativo, foi feita a análise de uma área não contaminada, supondo que os valores detectados nesta são semelhantes aos que existiram nas áreas contaminadas antes da liberação do combustível. As médias dos valores encontrados para esta área não contaminada estão representadas em alguns gráficos pela linha contínua preta, como um valor de referência para comparação com as áreas contaminadas. Na quantificação de algumas comunidades microbianas, os valores encontrados para a área sem contaminação ficaram abaixo do limite de detecção. Nestes casos, a linha preta contínua nos gráficos corresponde ao próprio limite de detecção, servindo como referência.

4.1.1. Comunidade de bactérias totais associada à concentração de substratos orgânicos em águas subterrâneas

4.1.1.1. Etanol e acetato

Estudos de contaminação de águas subterrâneas com o etanol mostraram que inicialmente este composto provoca um efeito negativo, pois estes são substratos preferenciais e a biodegradação dos compostos BTEX é relegada a um segundo plano até o seu esgotamento (CORSEUIL et al, 1998). No entanto, estudos recentes afirmam que este efeito do etanol ocorre durante um curto tempo devido ao acúmulo de acetato (CORSEUIL et al., 2011), e que após este período a degradação dos contaminantes BTEX dissolvidos procede em uma taxa mais acelerada do que em casos de atenuação natural de gasolina pura (LU et al., 1999). Com o biodiesel espera-se o mesmo comportamento, pois este também é um substrato de fácil biodegradação e já vem sendo utilizado na recuperação de locais impactados com combustíveis fósseis (PEREIRA & MUDGE, 2004; MUDGE & PEREIRA, 1999). Gomes (2008) avaliou a influência do biodiesel de soja na biodegradação anaeróbia dos compostos BTEX e observou que os hidrocarbonetos monoaromáticos foram mais lentamente removidos na presença de biodiesel que em sua ausência. Mas em escala real, espera-se que após sua degradação uma maior biomassa estará disponível para a biodegradação dos compostos aromáticos do diesel (PASQUALINO et al., 2006).

Em condições anaeróbias e na ausência de receptores de elétrons, o etanol e o biodiesel são degradados através do processo fermentativo, produzindo moléculas orgânicas mais simples, como o acetato (HATTORI, 2008). Neste estudo comparou-se a concentração de acetato e etanol com concentração de bactérias totais presente em cada local. O objetivo foi de avaliar a influência da carga orgânica dissolvida proveniente dos biocombustíveis ou de sua degradação na produção de biomassa em águas subterrâneas. As áreas que apresentaram presença do biocombustível etanol e de acetato foram as quatro mais recentes com menos de 2 anos de liberação do

contaminante (A1 – A4). Nestas áreas nota-se um aumento da quantidade de bactérias totais com o aumento da concentração de etanol e acetato (Figura 10). Estudos em colunas apresentaram uma relação positiva em que o número de bactérias totais, quantificado pelo gene *16S*, foi maior na presença de maiores concentrações destes substratos (DA SILVA E ALVAREZ, 2004).

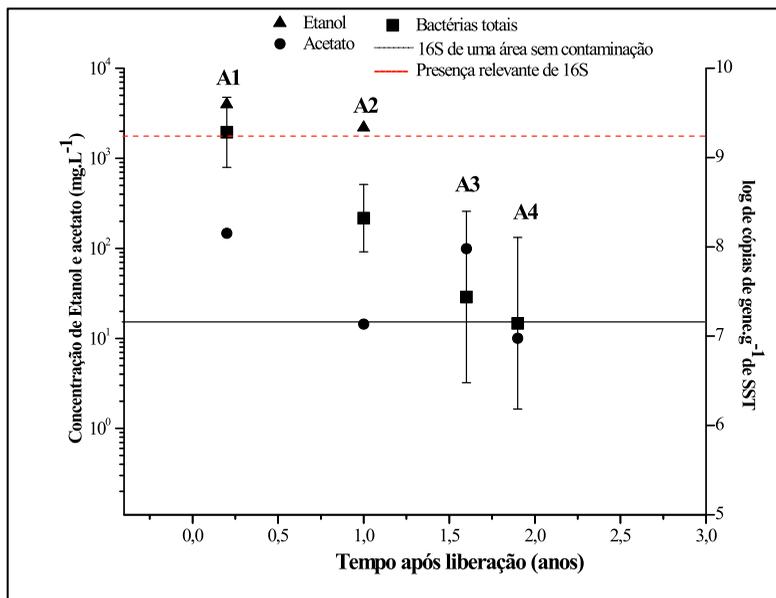


Figura 10 - Gráfico comparativo do log de cópias de gene *Bacteria 16S* . g⁻¹ de sólidos suspensos totais de água subterrânea nas áreas onde ainda é presente o biocombustível (etanol e biodiesel) ou seu produto metabólico (acetato).

4.1.1.2. Hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX)

Em águas subterrâneas contaminadas, o número total de bactérias pode estar relacionado com a concentração de poluentes proveniente de combustíveis, como os compostos BTEX. Neste estudo foi avaliada a influência dos hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX) dissolvidos na quantidade de bactérias totais presentes em locais contaminados por derivados de petróleo em escala real. Desta forma, comparou-se o número de bactérias totais com a concentração total dos compostos BTEX das áreas experimentais onde os hidrocarbonetos são o substrato principal e as concentrações de etanol e acetato são insignificantes (abaixo de 10 mg.L⁻¹). As cinco áreas (A4 - A8) que apresentaram presença do biocombustível etanol e de acetato abaixo desse valor, possuem um tempo de contaminação superior a 2 anos. Nestas áreas não foi observada uma relação entre a quantidade de bactérias totais e a concentração dos BTEXs (Figura 11). Nota-se que não houve diferenças relevantes nos valores de cópias de gene 16S entre áreas que possuem concentrações de BTEX total que variam de 0,0 µg.L⁻¹ (diesel A6 e diesel E50 A7) a 1813,3 µg.L⁻¹ (diesel B20) (Figura 11). Em estudos de microcosmos também não foi observada correlação significativa do gene *Bacteria 16S* com a degradação do tolueno (KAZY et al., 2010).

A liberação dos biocombustíveis juntamente com hidrocarbonetos na água subterrânea, aumenta a carga orgânica no local gerando um acelerado metabolismo microbiano. Os compostos de fácil biodegradação (etanol, biodiesel, acetato) são primeiramente utilizados como substrato e mostraram uma correlação positiva ($r^2 = 0,98$ e $p < 0,05$) com a proliferação das bactérias totais (Figura 12). Outros estudos também mostraram que o etanol estimulou o crescimento da biomassa, incluindo bactérias redutoras de sulfato associadas à biodegradação anaeróbia dos BTEX (DA SILVA e ALVAREZ, 2002) e de microrganismos metanogênicos (FERIS et al., 2008). Porém, ao cessar estes substratos, os hidrocarbonetos se tornam a principal fonte de carbono, os quais não mostraram correlação ($p > 0,05$) com a quantidade de bactérias totais. Estes resultados sugerem que altas quantidades de bactérias totais (acima

de duas ordens de grandeza do valor de uma área sem contaminação) indicam presença de altas concentrações de substrato (etanol e acetato). A partir de dois anos de contaminação, onde a concentração dos substratos provenientes dos biocombustíveis é insignificante (abaixo de 10 mg.L^{-1}), a quantificação deste gene 16S não fornece informações indicativas de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. Em estudos de campo também não se observou o aumento da abundância do gene *16S* ao longo da pluma de hidrocarbonetos de petróleo (STAPLETON et al., 2000). Portanto, a análise de *Bacteria 16S rDNA* é uma ferramenta útil apenas para derramamentos recentes, com menos de dois anos, de misturas de combustíveis com biocombustíveis.

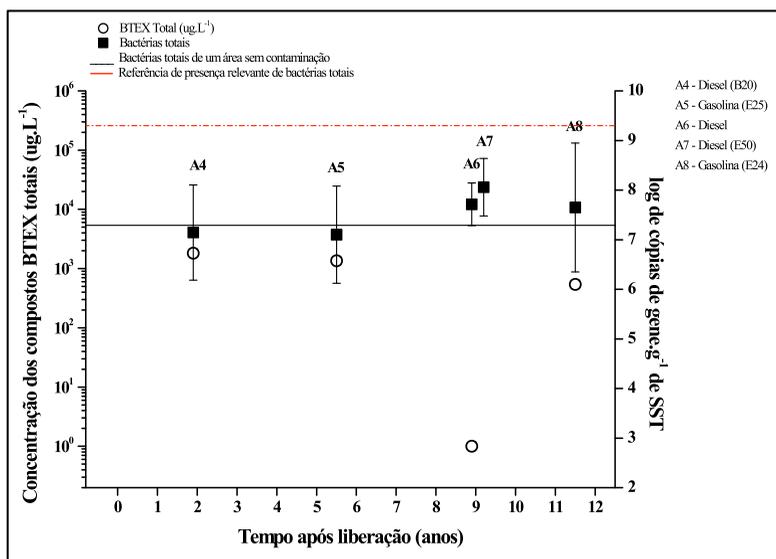


Figura 11 - Gráfico comparativo do log de cópias de gene *Bacteria 16S* . g^{-1} de sólidos suspensos totais de água subterrânea com as concentrações de BTEX ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de 5 áreas experimentais

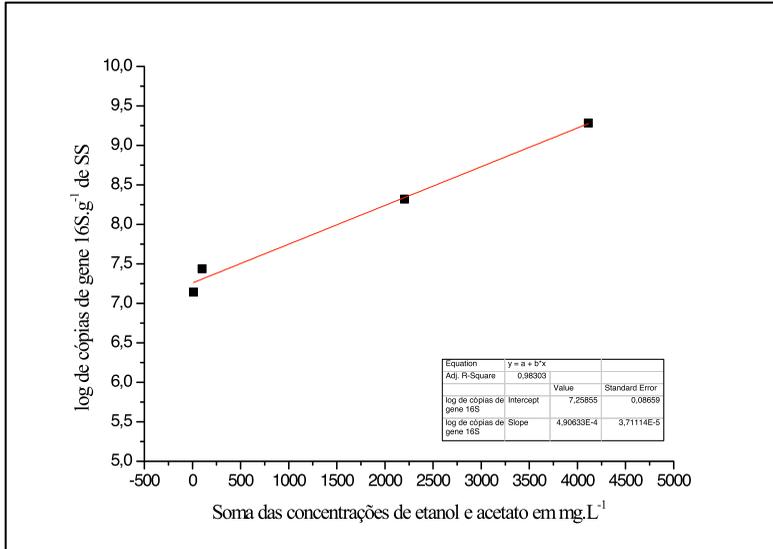


Figura 12 - Correlação positiva entre a concentração de etanol e acetato (mg.L^{-1}) com a quantidade de bactérias totais.

4.1.2. Comunidades microbianas específicas associadas aos processos de oxi-redução atuantes na degradação dos combustíveis em águas subterrâneas

Os BTEX podem ser degradados por microrganismos aeróbicos e anaeróbicos. Até hoje, microrganismos aeróbicos degradadores dos compostos BTEX, por exemplo, e suas rotas da biodegradação já foram bem documentadas (SMITH, 1990). Além disso, genes catabólicos de rotas aeróbicas de degradação dos BTEX demonstraram uma correlação positiva com as concentrações de BTEX (BALDWIN et al. 2008). Porém, devido à baixa quantidade de oxigênio dissolvido e a baixa difusão do oxigênio na subsuperfície, a biodegradação anaeróbia é predominante em ambientes subterrâneos. Neste estudo as comunidades anaeróbicas associadas à biodegradação dos hidrocarbonetos aromáticos foram quantificadas com o objetivo de estabelecer a presença relevante

destes microrganismos e definir o processo de oxi-redução predominante em cada área experimental.

4.1.2.1. Nitrito-redutoras (*nirS*) e indicadores físico-químicos da nitrato-redução

O processo de desnitrificação consiste na oxidação de compostos nitrogenados utilizados como receptores de elétrons na produção de energia em organismos procarióticos. A primeira etapa da desnitrificação é a redução do nitrato a nitrito através da enzima nitrato redutase e o nitrito é reduzido a NO em uma segunda etapa pela nitrito redutase (*Nir*), a qual é a enzima chave no processo de desnitrificação. Esta enzima é codificada pelo gene *nirS*, o qual foi identificado e quantificado em amostras de águas subterrâneas deste trabalho. A média dos resultados obtidos do número de cópias de *nirS* para cada área experimental está representada na Tabela B 1. Percebe-se que para todas as áreas, inclusive para aquela sem contaminação, a média do log de cópias do gene *nirS* foi alta, entre 6 e 8, quando comparados com os valores encontrados para a análise dos grupos de ferro- e sulfato-redutoras mostrados também na Tabela B 1, com valores que chegaram no máximo 6,5. Por isso, foi necessário muito critério e rigor no momento de assumir a nitrato-redução como um processo de biodegradação dos contaminantes, visto que algumas das mais importantes reações mediadas por bactérias em solos são as que envolvem os compostos do nitrogênio (N). Devido a estas altas quantidades de *nirS* detectadas, especialmente para a área sem contaminação, os valores de log de cópias para as áreas experimentais não chegaram a duas ordens de grandeza maiores que o branco (referência adotada para as outras análises moleculares). Portanto, foi necessário comparar estas altas quantidades de *nirS* com o número de bactérias totais identificadas para cada área. Por isso, estes resultados estão apresentados como a fração dos valores da média do log de cópias (*nirS*/16S *rDNA*) de áreas experimentais contaminadas com combustíveis, juntamente com os valores de uma área sem contaminação.

Quando a carga orgânica em ambientes subsuperficiais é alta, a atividade microbiana é acelerada e ocorre uma alta demanda de oxigênio dissolvido. Estas condições do meio se tornam desfavoráveis para alguns grupos de microrganismos selecionando apenas os anaeróbios facultativos e/ou estritos, os quais possuem a habilidade de utilizar outras fontes de energia. Desta forma, em locais contaminados há mais de dois anos, onde se observou o decaimento na quantidade de bactérias totais, espera-se um aumento na quantidade das comunidades específicas associadas à biodegradação dos hidrocarbonetos. Neste estudo, notou-se que em áreas (A4 e A5) onde se detectou as menores quantidades de bactérias totais, foram encontrados os maiores valores para o gene *nirS*. A concentração de cópias do gene *nirS* nas áreas A4 e A5 foi muito próxima ou um pouco maior que das bactérias totais (99,2% e 107,4%, respectivamente) resultando em valores da relação *nirS/16S rDNA* próximos de 1 (Figura 13). Este resultado indica que grande parte da população bacteriana presentes nestas áreas é redutora de nitrito, sugerindo a presença do processo de nitrato-redução atuante na degradação de contaminantes nestas áreas experimentais. Bactérias que possuem o gene *nirS* (BRAKER et al., 1998), também demonstraram possuir gene catabólicos da degradação de hidrocarbonetos (KIM et al., 2008).

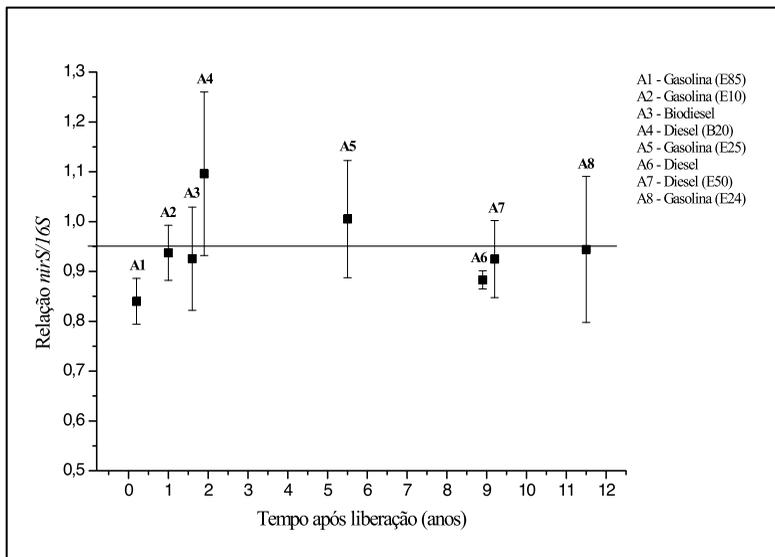


Figura 13 - Gráfico comparativo da relação ($nirS/16S$) nas 8 áreas experimentais avaliadas. Linha preta sólida indica a relação $nirS/16S$ de uma área sem contaminação

Sob condições anaeróbias, a desnitrificação é favorecida em relação à ferro redução, sulfato-redução e metanogênese, e pode ser verificada pelo decaimento na concentração de NO_3^- em uma pluma de contaminação. O nitrato pode ser usado apenas como fonte de nutriente e, na verdade, estar ocorrendo outro processo de oxirredução, utilizando outro receptor de elétron como fonte de energia na degradação de poluentes. Para confirmar a nitrato-redução nas áreas dos combustíveis diesel B20 (A4) e gasolina E25 (A5) foi necessário consultar o banco de dados de monitoramento dessas áreas fornecido pelo laboratório REMAS, a fim de confirmar uma diminuição na concentração de nitrato ao longo do tempo. Os dados mostraram inicialmente a presença do nitrato e a sua depleção com o tempo nas duas áreas experimentais (Figura 14) confirmando a presença das bactérias redutoras de nitrato como um indicativo da degradação dos hidrocarbonetos. Assim como já foi relatada a degradação anaeróbia dos BTEXs com a redução do nitrato (BURLAND e EDWARDS, 1999). Na área contendo diesel B20 a

concentração de nitrato atualmente é abaixo de 1 mg.L^{-1} o que indica a nitrato-redução em fase final, enquanto que na área da gasolina E25 notou entre os dois primeiros anos altíssimas concentrações de nitrato devido a injeção deste receptor de elétrons até uma concentração próxima de 8 mg.L^{-1} , nos dias atuais, sugerindo ainda a disponibilidade do nitrato nesta área para o processo de nitrato-redução. O processo de desnitrificação já havia sido considerado por Costa (2008), que avaliou a bioestimulação com o nitrato e observou o aumento da taxa de degradação dos compostos BTEX quando comparada com a atenuação natural na área da gasolina comercial E24 (A8) estudada por Fernandes (2002) e Nunes (2006).

Nas demais áreas contendo os combustíveis gasolina E85, gasolina E10, biodiesel, diesel, diesel E50 e gasolina E24, os resultados mostraram a presença das bactérias desnitrificantes, porém com valores das frações *nirS/16S rDNA* menores que da área sem contaminação, o que indica que a desnitrificação não é um processo de biodegradação nessas áreas. Portanto, a quantificação do gene *nirS* quando comparado com as bactérias totais de um local, se mostrou uma ferramenta indicativa do processo de biodegradação atuante em uma área potencialmente contaminada. Este resultado também sugere a importância desta ferramenta no auxílio de uma identificação de águas subterrâneas potencialmente contaminadas com combustíveis.

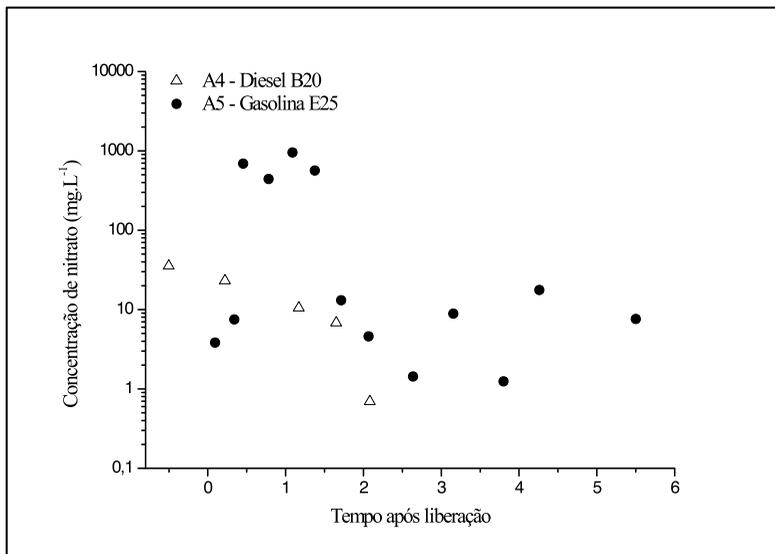


Figura 14 - Concentração de nitrato (mg.L^{-1}) das áreas contendo os combustíveis diesel B20 (A4) e gasolina E25 (A5) ao longo do tempo de monitoramento

4.1.2.2. Ferro-redutoras (*Geobacter*) e indicadores físico-químicos da ferro(III)-redução

A redução do ferro (III) a ferro (II) é um processo mediado por microrganismos conhecidos como bactérias ferro-redutoras (BRF) e pertencem à família *Geobacteraceae*. O principal subproduto metabólico mensurável em áreas com derramamento de combustíveis em que ocorre a ferro-redução é o ferro ferroso. Por causa de sua conservação filogenética e ubiquidade em ambientes anóxicos, este estudo focou no grupo das BFR da subdivisão delta das *Proteobacteria*, e utilizou iniciadores específicos para detectar o gênero *Geobacter*. Devido à abundância da família *Geobacteraceae* na subsuperfície sob condições anaeróbias e capacidade de utilização de vários receptores de elétrons, foram encontrados valores mais altos deste gene em todas as áreas experimentais do que na área sem contaminação (abaixo do limite de detecção) (Figura 15). Contudo, o gênero *Geobacter* só foi encontrado em uma concentração relevante

(linha vermelha tracejada é a referência de duas ordens de grandeza) nas áreas que foram contaminadas com gasolina E85 (A1), biodiesel (A3) e gasolina E25 (A5) (Figura 15), áreas que ainda apresentam altas concentrações de poluentes. Nesta última área (A5), foi discutido anteriormente que 100% das bactérias totais possuem o gene *nirS*, e ainda ocorre a presença do receptor de elétrons, nitrato, nesta área experimental. Sabendo da disponibilidade do nitrato, um receptor de elétrons que fornece mais energia a uma célula microbiana do que o ferro (III), além da dificuldade de utilização de óxidos de ferro (III) por sua estrutura sólida e de difícil permeabilidade na célula, é possível que a concentração de *Geobacter* detectada nesta área não esteja realizando ferro-redução. Além disso, não foi detectado ferro (II) (Figura 15), o subproduto metabólico da ferro-redução nesta área, corroborando com a hipótese da utilização do nitrato pelas *Geobacter* detectadas, como já relatado em estudos anteriores a capacidade de algumas espécies deste gênero de utilizar o nitrato como receptor de elétrons reduzindo-o em amônia (LOVLEY et al.; 1993).

Nas outras áreas (A1 e A3), onde foram observadas quantidades relevantes deste gênero e o gene *nirS* não foi significativo (Figura 13), é possível que o processo de ferro-redução, seja predominante na biodegradação dos BTEXs. O estudo de Kane et al. (2002) demonstrou que cepas de *Geobacter metallireducens* possui o gene *bssa*, o qual codifica a enzima benzilsucinato sintase responsável pela primeira etapa de degradação anaeróbia do tolueno. Além disso, a concentração de nitrato nas áreas da gasolina E85 (A1) e biodiesel (A3) foram baixas (3,52 mg.L⁻¹ e 0,23 mg.L⁻¹, respectivamente) e foram as áreas com as maiores concentrações de ferro ferroso (25,60 e 99,50 mg.L⁻¹, respectivamente, Figura 15) corroborando com a ferro-redução nestas áreas experimentais. Nas demais áreas contaminadas com gasolina E10 (A2), diesel B20 (A4), diesel E50 (A7) e gasolina E24 (A8) o gênero *Geobacter* se mostrou presente, mas em menor quantidade, com o número de cópias entre 10⁴ a 10⁵, indicando uma atividade inferior destas bactérias nestes locais. Portanto, a quantificação do gene que identifica bactérias do gênero *Geobacter* demonstrou ser uma análise confiável para definir o processo de ferro-redução associado à biodegradação em uma área potencialmente contaminada. Este

resultado também sugere a importância desta ferramenta no auxílio da identificação de águas subterrâneas potencialmente contaminadas com combustíveis.

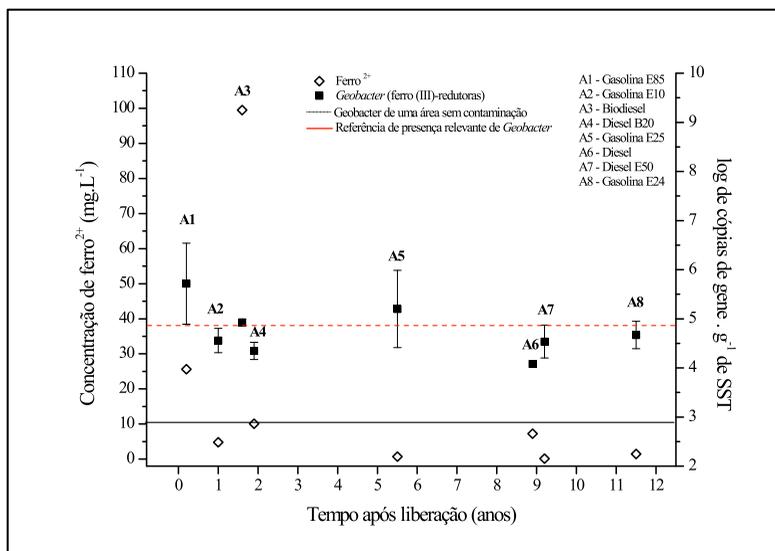


Figura 15 - Gráfico comparativo do log de cópias de gene para *Geobacter*. g⁻¹ de sólidos suspensos totais de água subterrânea de 8 áreas experimentais juntamente com a concentração de ferro (II).

4.1.2.3. Sulfato-redutoras (δ -Proteobacterias) e indicadores físico-químicos da sulfato-redução

Em ambientes subterrâneos, o sulfato será o receptor de elétrons termodinamicamente mais favorável após a utilização do nitrato e do ferro (III) durante a biodegradação anaeróbia da matéria orgânica (ATLAS e BARTHA 1987; WEIDEMEIER et al., 1999). Os microrganismos que realizam a sulfato-redução se encontram em várias linhas filogenéticas dentro da subunidade delta das *Proteobacterias*. Portanto, neste trabalho utilizaram-se os iniciadores adequados (Tabela 3) com o intuito de detectar organismos

pertencentes a esta subunidade das *Proteobacterias*. No entanto, o gênero *Geobacter* também pertence à este grupo. Desta forma, a diferença entre a concentração das δ -*Proteobacteria* encontradas neste estudo com as *Geobacter* discutidas no item anterior indica com melhor precisão a quantidade das bactérias sulfato-redutoras. Os microrganismos redutores de sulfato foram detectados apenas nas áreas contaminadas com gasolina E85 (A1), gasolina E24 (A8) e gasolina E10 (A2), representando 3,15, 8,17 e 21,54% das δ -*Proteobacterias*, respectivamente, apresentadas na Figura 16.

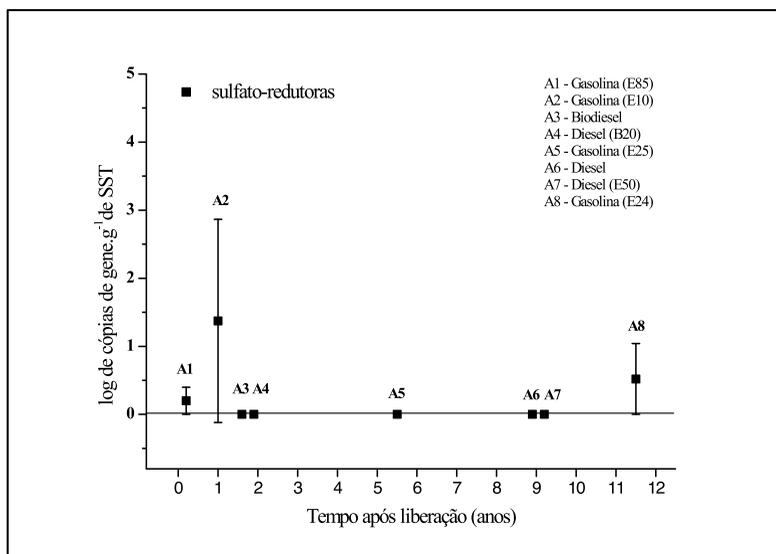


Figura 16 - Gráfico comparativo das bactérias sulfato-redutoras de 8 áreas experimentais

As bactérias redutoras de sulfato (BRS) compreendem em vários grupos de bactérias, estritamente anaeróbios, que utilizam o sulfato como receptor de elétrons, reduzindo-o a sulfeto. Neste estudo comparou-se a concentração de sulfato e sulfeto com concentração de bactérias sulfato-redutoras presente em cada local. O objetivo foi de avaliar a relação entre a comunidade de sulfato-redutoras e a utilização do receptor de elétrons sulfato e, concomitantemente, à produção do subproduto metabólico sulfeto

em águas subterrâneas. Nas áreas onde as sulfato-redutoras foram detectadas nota-se um aumento da quantidade destas bactérias com o aumento da concentração de sulfato e sulfeto (Figura 17). Estudos em campo já relataram a mesma relação, em que nos poços onde foram detectadas concentrações de sulfato e sulfeto houve a presença dos microrganismos redutores de sulfato (TIAN et al., 2005). Nas demais áreas contaminadas com biodiesel (A3), diesel B20 (A4), gasolina E25 (A5), diesel (A6) e diesel E50 (A7) as bactérias sulfato-redutoras não foram detectadas, pois há outros receptores de elétrons mais energeticamente favoráveis disponíveis (discutidos nos itens 4.1.2.1 e 4.1.2.2). Desta forma, apesar de ser difícil a predominância das bactérias sulfato-redutoras, é possível encontrá-las onde o receptor de elétrons sulfato é presente em altas concentrações e os outros receptores tenham esgotado.

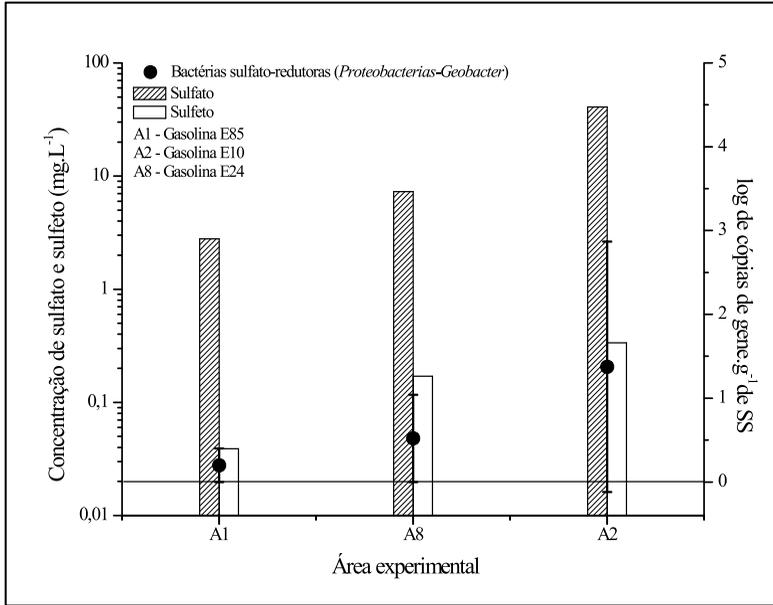


Figura 17 - Gráfico comparativo das bactérias sulfato-redutoras nos experimentos onde elas foram detectadas juntamente com as concentrações de sulfato e sulfeto

Sob condições anaeróbias, a sulfato-redução é desfavorecida em relação à respiração aeróbia, nitrato-redução e ferro redução, e pode ser verificada pelo decaimento na concentração de SO_4^{2-} em uma pluma de contaminação. Para confirmar a sulfato-redução nas áreas (A1, A2 e A8) onde as bactérias sulfato-redutoras foram detectadas neste trabalho foi necessário consultar os dados de monitoramento dessas áreas fornecido pelo laboratório REMAS, a fim de confirmar uma diminuição na concentração de sulfato ao longo do tempo. Assim como foi observado inicialmente a presença do nitrato e a sua depleção ao longo do tempo nas áreas dos combustíveis B20 (A4) e E25 (A5) sugerindo a nitrato-redução, também houve o mesmo comportamento com o receptor de elétrons, sulfato, na área do combustível E10 (A2), confirmando o processo de sulfato-redução nesta área (Figura 18). Nas outras duas áreas (A1 e A8) onde a quantidade de bactérias sulfato-redutoras foram menores que 10 cópias de gene.g⁻¹ de SST, além de não se observar a depleção

do sulfato ao longo do tempo, as concentrações deste receptor de elétrons não passaram de 9 mg.L^{-1} . Desta forma, estes resultados demonstram o processo de sulfato-redução na degradação dos contaminantes somente na área A2, contaminada com o combustível E10. Nesta área o substrato (contaminante) principal é o etanol, sugerindo a degradação deste biocombustível auxiliada pelas bactérias sulfato-redutoras. Mackay et al. (2007), em experimento de campo utilizando o éter metilerc-butílico (MTBE), no qual foram injetadas soluções contendo benzeno, tolueno e o-xileno e etanol, observaram que a sulfato-redução foi responsável pela biodegradação do etanol. Portanto, a análise da comunidade microbiana redutora de sulfato mostrou ser uma ferramenta confiável na indicação da sulfato-redução em águas subterrâneas potencialmente contaminadas.

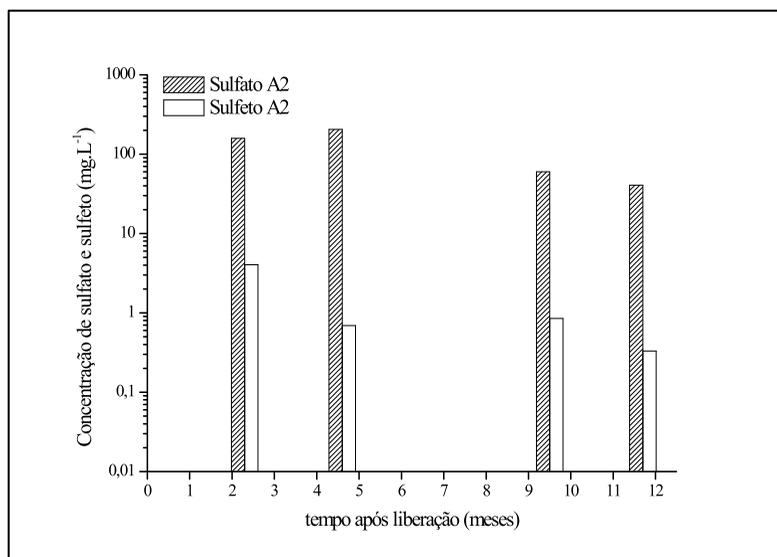


Figura 18 - Concentração de sulfato e sulfeto (mg.L^{-1}) da área contendo o combustível gasolina E10 (A2) ao longo do tempo de monitoramento

4.1.2.4. Metanogênicas (arqueas) e indicadores físico-químicos da metanogênese

A degradação metanogênica de materiais orgânicos é um processo que ocorre em ambientes anaeróbios, onde receptores de elétrons inorgânicos, como oxigênio, nitrato, ferro, manganês e sulfato, são ausentes. Em ambientes subterrâneos contaminados com hidrocarbonetos a possibilidade da ocorrência da metanogênese é avaliada pelas medidas do potencial de oxirredução e da concentração de metano. Neste estudo foi avaliado o número total de organismos constituintes do domínio das arqueas, incluindo as metanogênicas, com o objetivo de indicar em quais áreas experimentais está ocorrendo processos de biodegradação metanogênica. Além disso, estes microrganismos foram comparados com o potencial redox e com a detecção de metano nos locais onde as arqueas foram encontradas em quantidades relevantes. Os resultados revelaram a detecção de arqueas em áreas que apresentaram potenciais de oxirredução negativos, porém nem todas as áreas que apresentaram potencial redox negativos demonstraram presença de arqueas (Figura 19). Portanto, este resultado confirma que o potencial de redução negativo é uma condição para a ocorrência da ação das metanogênicas e não uma consequência do processo metanogênico.

Em águas subterrâneas contaminadas a ocorrência da metanogênese é afirmada pelo aumento da concentração de metano. Porém, neste estudo não foi observada uma relação com o metano detectado no mesmo ponto de coleta da quantificação das arqueas nas áreas A1 e A8, somente na área A3 que foi quantificado uma concentração de $10,57 \text{ mg.L}^{-1}$ de metano. Desta forma, os indicadores físico-químicos não indicaram com precisão o processo de biorremediação ocorrente nas áreas experimentais. Já a análise das arqueas justificaram as análises físico-químicas e mostraram, com a presença dos organismos remediadores, os processos de oxirredução atuantes na degradação dos contaminantes. Portanto, o monitoramento de processos de biodegradação metanogênica pode

ser melhor acompanhado e interpretado com análises moleculares dos próprios agentes biorremediadores, as arqueas metanogênicas.

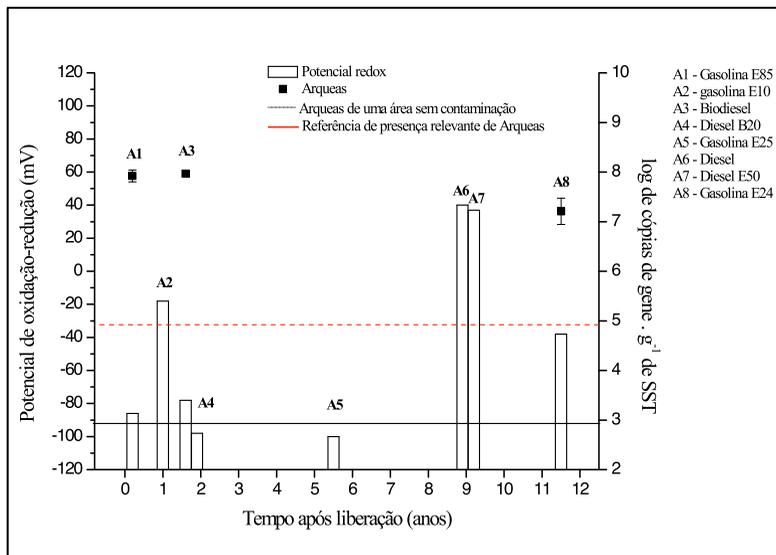


Figura 19 - Gráfico comparativo do log de cópias de gene para Arqueas. g^{-1} de sólidos suspensos totais de água subterrânea de 8 experimentos juntamente com os potenciais de oxirredução

4.2. DETERMINAÇÃO DAS COMUNIDADES MICROBIANAS MAIS RELEVANTES (BIOMARCADORES) NA IDENTIFICAÇÃO DE UMA ÁREA CONTAMINADA POR COMBUSTÍVEIS

A avaliação das condições de oxi-redução é muitas vezes um pré-requisito para compreensão do comportamento dos poluentes na pluma e para a seleção de abordagens de remediação. Desta forma, este estudo teve como objetivo identificar o processo de oxi-redução predominante em fontes de contaminação intemperizadas através da biologia molecular. Os resultados discutidos no item 4.1 revelaram a relação entre as comunidades microbianas específicas, associadas aos

processos redox, com seus respectivos receptores de elétrons e subprodutos metabólicos. A partir destes resultados foi montada a Tabela 5, a qual indica o processo de oxi-redução predominante em cada área experimental. O processo de nitrato-redução foi predominante nas áreas do diesel B20 (A4) e gasolina E25 (A5), enquanto a sulfato-redução somente foi observada na área onde foi liberada a gasolina E10 (A2). As ocorrências destes processos corroboram com as técnicas de remediação aplicadas nas áreas A5 e A2, as quais foram bioestimuladas com os receptores de elétrons nitrato e sulfato, respectivamente. O processo metanogênico foi observado na área mais antiga (A8), demonstrando o esgotamento dos outros receptores de elétrons nesta área. Foi observada a concomitância dos processos de ferro-redução e metanogênese nas áreas da gasolina E85 (A1) e do biodiesel (A3), sugerindo a simbiose destes microrganismos na degradação dos contaminantes presentes nestas áreas. Embora a ordem de utilização dos receptores de elétrons siga os princípios termodinâmicos, em ambientes naturais, a interação micróbios-água-sedimento pode ser bem mais complexa e com isso mais de uma rota metabólica pode ocorrer simultaneamente (ROYCHOUDHURY e MERRET, 2006; HATTORI, 2008).

Um desafio para maior aceitação da técnica de biorremediação *in situ* de derivados de petróleo em ambientes subsuperficiais é demonstrar que os decréscimos das concentrações dos contaminantes são resultantes da ação microbiológica sobre estes compostos ao invés de ocorrer exclusivamente por processos abióticos. Desta forma, uma abordagem a ser utilizada é mostrar que comunidades microbianas nativas de um local associadas aos processos de degradação de poluentes são enriquecidas quando se encontram em zonas contaminadas (BELLER et al., 2002). Neste estudo avaliaram-se as comunidades microbianas associadas aos processos de degradação de hidrocarbonetos em áreas (A2 e A5) onde são aplicadas técnicas de Bioestimulação. Na área onde foi liberado o combustível E10 (A2) verificou-se a presença de bactérias sulfato-redutoras (Figura 16) (maior concentração do que nas demais áreas) e a predominância do processo de sulfato-redução (Tabela 5) demonstrando a eficiência da técnica de Bioestimulação com sulfato aplicada nesta área. Na área contendo o combustível gasolina E25

(A5), onde foi empregada a Bioestimulação com o nitrato, também constatou-se o enriquecimento das comunidades específicas (*nirS*) bioestimuladas (Figura 13), corroborando com a eficiência destas técnicas de remediação. Estudos com a detecção de genes catabólicos da biodegradação aeróbica dos BTEXs indicaram o potencial de biodegradação desses contaminantes durante a técnica de extração multifásica empregada em locais contaminados com derivados de petróleo (BALDWIN et al., 2009).

Neste estudo também buscou-se por um biomarcador de águas subterrâneas contaminadas com combustíveis. Desta forma, avaliou-se a presença de um grupo microbiano anaeróbio em comum em todas as áreas contaminadas. Não foi possível identificar o mesmo grupo de bactérias ou arqueas (biomarcador) em todas as áreas contaminadas avaliadas deste trabalho, como pode ser observado na Tabela 5. Porém, nos locais contaminados (A1, A2, A3, A4, A5 e A8) houve a presença de pelo menos uma comunidade específica revelando o processo de oxirredução atuante na biodegradação dos contaminantes, o que indica, conseqüentemente, um local potencialmente contaminado (Tabela 5). Além disso, foi observado que em áreas onde já não possui mais concentração de poluentes (que foi liberado 20L de diesel e 20L de diesel E50, áreas A6 e A7 respectivamente) ou em área que nunca houve uma contaminação (área controle), nenhuma comunidade anaeróbia específica foi detectada, indicando áreas que não há processos de degradação e desta forma, áreas não contaminadas. Outros estudos corroboram com esta ideia, como os degradadores de solventes clorados *Dehalococcoides* spp., os quais são tipicamente presentes em locais onde ocorre a atenuação natural destes solventes (HE, et al., 2003 e HENDRICKSON, et al., 2002). Estes resultados sugerem que o tempo de uma contaminação, a composição do contaminante e as características geoquímicas do local são fatores determinantes e/ou limitantes no processo de biorremediação. Portanto, somente com a análise de todas estas comunidades microbianas anaeróbias, seria possível identificar os distintos grupos microbianos indicando os possíveis locais potencialmente contaminados.

Tabela 5: Presença das comunidades microbianas mais relevantes

Tempo de contaminação (anos)	Área experimental	Comunidades microbianas relevantes				
		<i>Bactérias Totais</i>	<i>mirS</i>	<i>Geobacter</i>	<i>δ-Proteo-bacterias</i>	Arqueas
0,2	A1 – gasolina E85	+		+		+
1	A2 – gasolina E10				+	
1,6	A3 - biodiesel			+		+
1,9	A4 – diesel B20		+			
5,5	A5 – gasolina E25		+			
8,9	A6 - diesel					
9,2	A7 – diesel E50					
11,5	A8 – gasolina E24					+

em cada área experimental representada pelo símbolo +.

Processo de oxidação-redução ocorrente	Resultado Final/contaminações
	Indica uma área potencialmente contaminada?
Ferro-redução e metanogênese	SIM
Sulfato-redução	SIM
Ferro-redução e metanogênese	SIM
Nitrato-redução	SIM
Nitrato-redução	SIM
-	NÃO
-	NÃO
Metanogênese	SIM

4.3. DISCUSSÃO DAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO FÍSICO-QUÍMICAS E MOLECULARES DE ÁGUAS SUBTERRÂNEAS POTENCIALMENTE CONTAMINADAS POR COMBUSTÍVEIS

Para o diagnóstico das contaminações, as investigações podem ser conduzidas por métodos diretos e indiretos. Neste estudo os métodos diretos utilizados foram as análises físico-químicas da água subterrânea e os indiretos foram as análises moleculares, os quais foram comparados com o intuito de avaliar a eficiência dessas ferramentas no momento de tomada de decisão. Através da interpretação dos resultados das técnicas diretas físico-químicas e das técnicas indiretas moleculares o objetivo foi identificar concentrações altas de contaminantes (substratos) orgânicos e o processo de biodegradação. Neste trabalho, foram realizadas análises de dez diferentes parâmetros físico-químicos e cinco diferentes parâmetros biológicos para o diagnóstico das áreas experimentais. As respostas destes parâmetros em cada área experimental já foram discutidas nos itens anteriores (4.1.1. e 4.1.2.) e estas técnicas mostraram ser complementares a partir das seguintes avaliações:

- No processo de investigação de uma área, a identificação da contaminação é concebida através das análises físico-químicas (BTEX, etanol e acetato), as quais fornecem uma resposta direta e precisa da concentração dos compostos investigados (Figura 11, Tabela A 1 e Tabela A 2). Porém, as análises físico-químicas precisam ser racionalizadas em virtude da sua morosidade e custo. É neste ponto que se inserem as técnicas de biomonitoramento (bactérias totais 16S), que mesmo não quantificando os teores de contaminantes presentes no sistema, fornecem uma avaliação sistêmica e qualitativa. A amostragem de solo no nível do lençol freático, através de um trado, para a análise de bactérias totais é muito mais simples do que a construção de poços de monitoramento para análises físico-químicas em instrumentação analítica. Desta forma, em alguns casos é interessante a informação da quantidade de biomassa do local investigado, visto que se esta for alta em relação a um ambiente controle, há fortes indicativos de uma contaminação recente por substratos de fácil degradação (biocombustíveis) (item

4.1.1). No monitoramento deste local contaminado também é relevante utilizar as bactérias totais, que se permanecem altas provavelmente há uma fonte contínua de biocombustíveis ou seus subprodutos metabólicos na água subterrânea (vazamento de biocombustível, por exemplo, nas áreas experimentais A1, A2 e A3 deste estudo), porém, se elas diminuem pode ter esgotado os substratos orgânicos de fácil degradação (como nas áreas A4, A5, A6, A7 e A8) ou os contaminantes chegaram a concentrações altíssimas, sendo tóxicos e selecionando a população microbiana local. Portanto, a utilização preliminar da técnica molecular (com o gene 16S) no processo de investigação fornecerá informações da quantidade de biomassa, a qual direciona o investigador nas sondagens diretas das concentrações.

- O processo de identificação de áreas contaminadas tem como objetivo a localização das áreas contaminadas, e com a confirmação da contaminação, inicia-se o processo de monitoramento e recuperação. Para aplicar tecnologias de remediação de águas subterrâneas é preciso critério em relação às condições físico-químicas do local. No entanto, é com urgência que estas técnicas são estabelecidas. Desta forma, é fundamental amostragens e análises rápidas, como a biologia molecular, que forneçam informações do potencial de biodegradação do local de interesse, para a adequada implantação de remediação. As análises dos genes filogenéticos indicam comunidades microbianas associadas aos processos de oxirredução (Tabela 5) que atuam na degradação dos contaminantes. Com isso, altas quantidades de uma dessas comunidades em uma área contaminada, por exemplo as que possuem o gene *nirS* na área A4 contaminada com o combustível diesel B20, sugere o potencial da nitrato-redução na degradação dos contaminantes e propõe a implantação da técnica de bioestimulação com o nitrato. No monitoramento da técnica empregada são necessárias as análises físico-químicas com o controle direto das concentrações para avaliar a utilização do receptor de elétrons injetado (Figura 14 e Figura 18), a produção de subproduto metabólico (Figura 15) e a diminuição dos contaminantes. Contudo, é essencial a análise dos microrganismos que estão sendo estimulados para confirmar a eficiência e desempenho da técnica de remediação implantada, como foi

observado nas áreas A2 e A5 bioestimuladas com nitrato e sulfato, respectivamente. Outros estudos também já apresentaram a eficiência dos processos de bioestimulação com a biologia molecular (DOMINGUEZ et al., 2008)

5 CONCLUSÕES

- Altas quantidades de bactérias totais indicaram presença de altas concentrações de substrato (etanol e acetato). A partir de dois anos de contaminação, onde a concentração dos substratos provenientes dos biocombustíveis é insignificante (abaixo de 10 mg.L^{-1}), a quantificação deste gene *16S* não fornece informações indicativas de contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. Portanto, a análise de *Bacteria 16S rDNA* é uma ferramenta útil para derramamentos recentes, com menos de dois anos, de misturas de combustíveis com biocombustíveis.

- As comunidades microbianas específicas, *nirS* e sulfato-redutoras, foram encontradas em maiores quantidades em áreas onde houve o decaimento dos respectivos receptores de elétrons nitrato e sulfato ao longo do tempo, indicando a nitrato- e sulfato-redução respectivamente. Assim como também foi observada a relação da comunidade microbiana específica (*Geobacter* e sulfato-redutoras) com altas concentrações do seu subproduto metabólico (ferro²⁺ e sulfeto), demonstrando a Fe(III)-redução. Quanto às metanogênicas, a relação com o metano não foi observada, embora estes organismos tenham sido detectados em condições extremamente redutoras, além de terem demonstrado uma relação de simbiose com outros grupos de microrganismos como as ferro-redutoras. Além disso, nas áreas (A2 e A5), onde foram empregadas técnicas de bioestimulação com nitrato e sulfato, constatou-se o enriquecimento das comunidades específicas (*nirS* e sulfato redutoras) bioestimuladas, corroborando com a eficiência destas técnicas de remediação.

- A identificação de um mesmo grupo de bactérias ou arqueas (biomarcador) em todas as áreas contaminadas avaliadas deste trabalho não foi observada. Desta forma, a análise de apenas um dos genes filogenéticos não é suficiente para descrever o processo redox

atuante na biodegradação de contaminantes. Porém, a análise molecular dos quatro grupos microbianos avaliados neste trabalho é suficiente para indicar os processos de oxi-redução predominante e os possíveis locais contaminados.

- As técnicas de diagnóstico diretas, mesmo que executadas em menor número são de vital importância para quantificação das contaminações em subsuperfície. No entanto, o método indireto da quantificação molecular de grupos microbianos específicos apresentou-se como uma técnica complementar no diagnóstico de águas subterrâneas contaminadas por combustíveis. A qPCR proporciona respostas mais refinadas na definição do processo de oxirredução prevalecente, sendo relevante na diminuição de incertezas no momento de tomada de decisão, mas não pode ser utilizada isoladamente para identificar fontes de contaminação por combustíveis.

6 RECOMENDAÇÕES

- Avaliação de diferentes metodologias de amostragem em subsuperfície para a quantificação de microrganismos que caracterize a área de estudo. Estes estudos são necessários porque grande parte da comunidade microbiana se encontra aderida ao solo, porém, em alguns casos, o solo não pode ser removido para análise. A coleta de um grande volume de água subterrânea para que seja uma amostra representativa muitas vezes também é inviável. Portanto, há a necessidade de padronizar a amostragem para análises da qPCR.

- O sucesso da técnica de amplificação de ácidos nucleicos pela qPCR, possibilita a detecção e quantificação direta de grupos de bactérias e genótipos catabólicos específicos envolvidos na biodegradação dos contaminantes em questão. Desta forma, o continuado uso de técnicas alternativas de biologia molecular pode adicionar informações sobre a diversidade (espécies) e a ecologia microbiana associada aos processos de degradação, melhorando a qualidade das informações e diminuindo incertezas em tomadas de decisão.

REFERÊNCIAS

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (clae) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**. v. 32, n.9, p.1-6, 2009.

APHA – American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 18th edition. Washington, DC. 1992.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**. New York: Addison Wesley Publishing Company, ed.2, p. 533, 1987.

BALDWIN, B. R.; NAKATSU, C. H.; NEBE, J.; WICKHAM, G. S.; PARKS, C.; NIES, L. Enumeration of aromatic oxygenase genes to evaluate biodegradation during multi-phase extraction at a gasoline-contaminated site. **Journal of Hazardous Materials** v.163,p.524–530, 2009.

BALDWIN, B. R.; NAKATSU, C. H.; NIES, L. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p. 3350–3358, 2003.

BALDWIN, B. R.; NAKATSU, C. H.; NIES, L.; Enumeration of aromatic oxygenase genes to evaluate monitored natural attenuation at gasoline-contaminated sites. **Water Research** v. 42, n. 3, p. 723-731, Fevereiro 2008.

BELLER, H. R.; DING, W., -H.; REINHARD, M. Byproducts of Anaerobic Alquylbenzene Metabolism Useful as Indicators of In Situ Bioremediation. **Environmental Science Technology**, v. 29, n.11, p. 2864–2870, 1995.

BELLER, H. R.; KANE, S. R.; LEGLER, T. C.; ALVAREZ, P. J. J. A Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Monitoring Anaerobic, Hydrocarbon-Degrading Bacteria Based on a Catabolic Gene. **Environmental Science Technology**. v. 36, p. 3977-3984, 2002.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G.; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science** v. 277, p. 1453-1474, 1997.

BORCH, T.; KRETZSCHMAR, R.; KAPPLER, A.; VAN CAPPELEN, P. et al.,
Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 1, p. 15-23, 2010.

BRAKER, G. ; FESEFELDT, A. ; WITZEL, K-P. Development of PCR Primer Systems for Amplification of Nitrite Reductase Genes (nirK and nirS) To Detect Denitrifying Bacteria in Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, n. 10, p. 3769-3775, 1998.

BRYANT, M.P.; CAMPBELL, L.L.; REDDY, C.A. et al., Growth of desulfovibrio in lactate or ethanol media low in sulfate in association with H₂-utilizing methanogenic bacteria. **Applied Environmental Microbiology**. v.5, n.33, p.1162-1169, maio 1977.

BURLAND, S. M.; EDWARDS, E. A. Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 529-533, 1999.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**. v. 25, p. 169-193, 2000.

CETESB. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas.** Companhia Ambiental do Estado de São Paulo/ Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit. 2.ed. São Paulo, 2001.

CHAPELLE, F. H. **Ground-Water Microbiology & Geochemistry.** 1 ed. Souh Carolina: John Wiley & Sons, 424p. 1993.

CHAPELLE, F. H. **Ground-water Microbiology and geochemistry.** 2 Ed. New York: John Wiley and Sons, p.477, 2001.

CHAPELLE, F.H.; BRADLEY, P.M.; LOVLEY, D.R.; et al. Rapid Evolution of Redox Processes in a Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Aquifer. **Ground Water**, v.40, n.4, p.353-360, julho 2002.

CHERNICHARO, C.A. L. **Reatores Anaeróbios.** 2 ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, 1997. 379p. (Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias).

CHRISTENSEN, T.H.; BJERG, P.L.; BANWART, S.A.; JAKOBSEN, R.H; ALBRECHTSEN, G.H-J. Characterization of redox conditions in groundwater contaminant plumes. **Journal of Contaminant Hydrology**, v.45, n. 3-4, p.165-341, outubro 2000.

CORSEUIL, H. X.; HUNT, G. S.; SANTOS, R. C. F. DOS; ALVAREZ, P. J. J. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. **Water Research**, v. 32, n. 7, p. 2065-2072, 1998.

CORSEUIL, H. X.; MONIER, A. L.; FERNANDES, M., SCHNEIDER, M. R.; NUNES, C. C.; DO ROSARIO, M.; ALVAREZ, P. J. J. BTEX Plume Dynamics Following an Ethanol Blend Release: Geochemical Footprint and Thermodynamic Constraints on Natural Attenuation. **Environmental Science and Technology**. v.45, n. 7, p. 2519, 2011.

COSTA, A. H. R. **Bioestimulação com injeção de nitrato em águas subterrâneas** impactadas por derramamentos de gasolina com etanol. 2008. 248 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2008.

COYNE, M. S.; ARUNAKUMARI, A.; AVERILL, B. A.; TIEDJE, J. M. Immunological identification and distribution of dissimilatory heme *cd1* and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 55, p. 2924–2931, 1989.

DA SILVA, M. L. B.; ALVAREZ, P. J. J. Effects of ethanol versus MTBE on benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene natural attenuation in aquifer columns. **Journal of Environmental Engineering**. v. 128, n. 9, p. 862–867, 2002.

DA SILVA, M. L. B.; ALVAREZ, P. J. J. Enhanced Anaerobic Biodegradation of Benzene-Toluene-Ethylbenzene-Xylene-Ethanol Mixtures in Bioaugmented Aquifer Columns. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4720–4726, 2004.

DA SILVA, M. L. B.; CORSEUIL, H. X. Monitoramento de áreas impactadas por derramamento de gasolina utilizando biologia molecular. **XV Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas**, 2008.

EDMUNDS, W.M.; MILES, D.L.; COOK, J.M. A comparative study of sequential redox processes in three British Aquifers, in: Eriksson, E. (ed.). **Hydrochemical Balance of Freshwater Systems**. Washington, D.C: IAHS-AIHS International Association of Hydrogeological Sciences, Publ.150, p.55-70, 1984.

FEITOSA, F. A. C.; FILHO, J. M.; FEITOSA, E. C.; DEMETRIO, J. G. A. **Hidrogeologia: Conceitos e Aplicações**. 3. ed. rev. e ampl. - Rio de Janeiro :CPRM:LABHID, 2008.

FERNANDES, M. **Atenuação natural da contaminação de aquífero submetido a derramamento de gasolina.** Florianópolis. 2002. 233p. Tese de doutorado em Química – Universidade Federal de Santa Catarina.

FERIS, K.; MACKAY, D.; DE SIEYES, N.; CHAKRABORTY, I.; EINARSON, M.; HRISTOVA, K.; SCOW, K. Effect of ethanol on microbial community structure and function during natural attenuation of benzene, toluene, and o-xylene in a sulfate-reducing aquifer. **Environmental Science and Technology**. v.42, n.7, p.2289–2294, 2008.

GOMES, A. P. N. **Biodegradação de biodiesel de soja, mamona e hidrocarbonetos monoaromáticos em ambientes aquáticos.** Florianópolis. 102p. Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental – Universidade Federal de Santa Catarina. 2008.

HALL, K.; MILLER, C. D.; SORENSEN, D. L.; ANDERSON, A. J.; SIMS, R. C. Development of a catabolically significant genetic probe for polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading Mycobacteria in soil. **Biodegradation** v. 16, p. 475–484, 2005.

HATTORI, S. Syntrophic Acetate-Oxidizing Microbes in Methanogenic Environments, **Microbes and Environments**, v.23, n. 2, p118-127, 2008.

HE, J. Z.; RITALAHTI, K. M.; AIELLO, M. R.; LOFFLER, F. E. Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a Dehalococcoides species. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p.996-1003, 2003.

HENDRICKSON, E. R.; PAYNE, J. A.; YOUNG, R. M.; STARR, M. G.; PERRY, M. P.; FAHNESTOCK, S.; ELLIS, D. E.; EBERSOLE, R. C. Molecular analysis of Dehalococcoides 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout

north America and Europe. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 68, p.485-495, 2002.

HENDRICKX, B.; DEJONGHE, W.; FABER, F.; BOENNE, W.; BASTIAENS, L.; VERSTRAETE, W.; et al. PCR-DGGE method to assess the diversity of BTEX mono-oxygenase genes at contaminated sites. **FEMS Microbiology and Ecology**. v. 55, p. 262–73, 2006.

JANSSON, J. K. Marker and reporter genes: illuminating tools for environmental microbiologists. **Current Opinion of Microbiology**. v. 6, p. 310–316, 2003.

JEON, C. O.; PARK, W.; PADMANABHAN, P.; DERITO, C.; SNAPE, J. R.; MADSEN, E. L. Discovery of a bacterium, with distinctive dioxygenase, that is responsible for in situ biodegradation in contaminated sediment. **Proceedings National Academy of Sciences USA** v. 100, p. 13591–13596, 2003.

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

KAZY S. K.; MONIER, A. L.; ALVAREZ , P. J. J. Assessing the correlation between anaerobic toluene degradation activity and *bssA* concentrations in hydrocarbon-contaminated aquifer material. **Biodegradation**. v. 21, n. 5, p. 793-800, 2010.

KIM, J. M.; LE, N. T.; CHUNG, B. S.; PARK, J. H.; BAE, J. W.; MADSEN, E. L.; JEON, C. O. Influence of Soil Components on the Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and *o*-, *m*-, and *p*-Xylenes by the Newly Isolated Bacterium *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59. **Applied and Environmental Microbiology**. v.74, n. 23, p. 7313–7320, 2008.

LAGE, I. C. **Avaliação de metodologias para determinação da permeabilidade em meios porosos: a área experimental da Fazenda da Ressacada, SC**. Rio de Janeiro, 2005. 86 p. Dissertação

(Mestrado em Geologia) – Departamento de Geologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

LOVLEY, D. R.; BAEDECKER, M. J.; LONERGAN, D. J.; COZZARELLI, I. M.; PHILLIPS, E. J. P.; SIEGAL, D. I. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. **Nature**. v. 33, p. 297-299, 1989.

LOVLEY D. R. Bioremediation of organic and metal contaminants with dissimilatory metal reduction. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 85–93, 1995.

LOVLEY, D. R. Analysis of the Genetic Potential and Gene Expression of Microbial Communities Involved in the *In Situ* Bioremediation of Uranium and Harvesting Electrical Energy from Organic Matter. **Journal of Integrative Biology**. v. 6, n. 4, p. 331-339, 2002.

LOVLEY, D. R.; GIOVANNONI, S. J.; WHITE, D. C.; CHAMPINE, J. E.; PHILLIPS, E. J. P.; GORBY, Y. A.; GOODWIN, S. *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. **Archives of Microbiology**, v. 159, p. 336-344, 1993.

LU, G.; CLEMENT, T. P.; ZHENG, C.; WIEDEMEIER, T. H. Natural attenuation of BTEX compounds: Model development and field-scale application. **Ground Water**. v. 7, n.5, p. 707–717, 1999.

MADIGAN, M; MARTINKO, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 11th ed. ed. [S.l.]: Prentice Hall, 2005.

MACKAY, D.M; DE SIEYES R.N.; EINARSON, M.D. et al. Impact of ethanol on the natural attenuation of MTBE in a normally sulfate-reducing aquifer. **Environmental Science and Technology**, v.41, n.6, p.2015-2021, fevereiro 2007.

MALIK, S.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. **Environment International** v. 34, p. 265–276, 2008.

MANFIELD, M.; WHITELEY, A.S.; BAILEY, M.J. What can stable isotope probing do for bioremediation? **International Biodeterioration and Biodegradation** v. 54, p. 163 – 166, 2004.

MANFIELD, M.; WHITELEY, A. S.; OSTLE, N.; INESON, P.; BAILEY, M. J. Technical considerations for RNA-based stable isotope probing: an approach to associating microbial diversity with microbial community function. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 16, p. 2179–2183, 2002.

MARKOULATOS, P., SIAFAKAS, N., MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis** v. 16, p. 47–51, 2002.

MARLOWE, E. M.; WANG, J. M.; PEPPER, I. L.; MAYER, R. M. Application of a reverse transcription-PCR assay to monitor regulation of the catabolic nahAc gene during phenanthrene degradation. **Biodegradation**. v. 13, p. 251–260, 2002.

MEHLMAN, M. A.; Dangerous and cancer-causing properties of products and chemicals in the oil refining and petrochemical industry. VIII. Health effects of motor fuels: carcinogenicity of gasoline-scientific update, **Environmental Research**. v. 59 p. 238-249, 1992.

MESARCH, 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**. v. 66, p. 678–683, 2000.

MUDGE, S. M.; PEREIRA, G. M. Stimulating the Biodegradation of Crude Oil with Biodiesel Preliminary Results, **Spill Science & Technology Bulletin**, v.5, p.353-355, 1999.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Lehninger's Principles of Biochemistry**. Ed. Worth Publishers, New York, ed. 4, p. 1552, 2000.

NUNES, C.C. **Dinâmica da variação dos receptores de elétrons e subprodutos metabólicos em águas subterrâneas impactadas por derramamento de gasolina com etanol**. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - Universidade Federal de Santa Catarina. 244p. 2006.

PASQUALINO, J. C.; MONTANÉ, D.; SALVADÓ, J. Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels, **Biomass and Bioenergy**, v.30, p.874–879, 2006.

PEREIRA, G. M.; MUDGE, S. M. Cleaning oiled shores: laboratory experiments testing the potential use of vegetable oil biodiesels, **Chemosphere**, v.54, p.297-304, 2004.

RADAJEWSKI, S.; INESON, P.; PAREKH, N.R.; MURRELL, J.C. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. **Nature**. v. 403, p. 646–649, 2000.

RIBANE, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004

ROYCHOUDHURY, A. N.; MERRETT, G. L. Redox pathways in a petroleum contaminated shallow sandy aquifer: Iron and sulfate reductions. **Science of the Total Environment**. v. 366, n. 1, p. 262-274, 2006.

SALEH-LAKHA, S., MILLER, M., CAMPBELL, R. G., SCHNEIDER, K., ELAHIMANESH, P., HART, M. M., et al. Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, p. 1–19, 2005.

SCHWARZENBACH, R. P.; GSCHWEND, P. M.; IMBODEN, D. M. **Environmental Organic Chemistry**. 2 Ed, New York: John Wiley & Sons, Inc., 2003.

SMITH, M. R. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. **Biodegradation**. v. 1, n. 2-3, p. 191-206, 1990.

STAPLETON, R. D.; SAYLER, G. S.; BOGGS, J. M.; LIBELO, E. L.; STAUFFER, T.; MACINTYRE, W. G. Changes in subsurface catabolic gene frequencies during natural attenuation of petroleum hydrocarbons. **Environmental Science and Technology**. v. 34, n. 10, p. 1991-1999, 2000.

STULTS, J. R.; SNOEYENBOS-WEST, O.; METHE, B.; LOVLEY, D. R.; CHANDLER, D. P. Application of the 5' Fluorogenic Exonuclease Assay (TaqMan) for Quantitative Ribosomal DNA and rRNA Analysis in Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, n.6, p. 2781-2789, 2001.

STUMM, W.; MORGAN, J. J. **Aquatic Chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 780 p., 1981.

THAUER, R. K., MOLLER-ZINKHAN, D., SPORMANN, A. M. Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 43, p. 43-67, 1989.

TIAN, Y. J.; YANG, H.; LI, D. T.; LIN, Z. X. Evaluation of the potential for using molecular approaches to deduce redox conditions in groundwater contaminant plumes. **Annals of Microbiology**, v. 55, n.1, p. 9-16, 2005.

WATTIAU, P.; SPRINGAEL, D.; AGATHOS, S. N.; WUERTZ, S. Use of the pAL5000 replicon in PAH-degrading mycobacteria: application for strain labeling and promoter probing. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 59, p. 700-70, 2002.

WIEDEMEIER, T.H.; RIFAI, H.S.; NEWEL, C.J.; WILSON, J.T. **Natural attenuation of fuels and chlorinated solvents in the subsurface**. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1999. 617p.

WILSON, V. L., TATFORD, B. C., YIN, X., RAJKI, S. C., WALSH, M. M., LAROCK, P. Species-specific detection of hydrocarbon-utilizing bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. v. 39, p. 59–78, 1999.

YAGI, J. M., NEUHAUSER, E. F., RIPP, J. A., MAURO, D. M.; MADSEN, E. L. Subsurface ecosystem resilience: long-term attenuation of subsurface contaminants supports a dynamic microbial community. **The International Society for Microbial Ecology Journal**. v. 4, p. 131–143, 2010.

APÊNDICES

Apêndice A. Detalhamento das concentrações encontradas dos parâmetros físico-químicos.

Tabela A 1: Resultados das concentrações de BTEX (ug.L^{-1}), HPA (ug.L^{-1}), Etanol (mg.L^{-1}) e Ác. acético (ug.L^{-1}) nas diferentes profundidades de cada área experimental estudada.

Área da gasolina E85 (A1)

Nível de profundidade	[BTEX] em ug.L^{-1}	[Etanol] em mg.L^{-1}
6	10953,83	96,56
5	12518,99	105,71
4	14170,60	111,92
3	10431,72	97,42
2	91819,32	3965,34

Área da gasolina E10 (A2)

Nível de profundidade	[BTEX] em ug.L^{-1}	[Etanol] em mg.L^{-1}
6	17833,33	702,42
5	23108,14	904,16
4	55367,19	2188,86
3	5999,14	277,21
2	62124,83	1895,73

Área do biodiesel (A3)

Nível de profundidade	[BTEX] em ug.L ⁻¹	[Etanol] em mg.L ⁻¹
6	n.a.	n.a.
5	n.a.	n.a.
4	n.a.	n.a.
3	n.a.	n.a.
2	n.a.	n.a.

Área do diesel B20 (A4)

Nível de profundidade	[BTEX] em ug.L ⁻¹	[Etanol] em mg.L ⁻¹
6	458,50	n.a.
5	722,89	n.a.
4	573,85	n.a.
3	549,04	n.a.
2	1813,34	n.a.

Área da gasolina E25 (A5)

Nível de profundidade	[BTEX] em ug.L ⁻¹	[Etanol] em mg.L ⁻¹
5,8	372,27	0,00
4,8	429,03	0,00
3,8	715,67	0,00
2,8	1236,67	0,00
2,3	1353,78	0,00

Área do diesel (A6)

Nível de profundidade	[BTEX] em ug.L ⁻¹	[Etanol] em mg.L ⁻¹
4,0	0,00	0,00
3,0	0,00	0,00
2,0	0,00	0,00
1,0	Nível sem água	Nível sem água

Área do diesel E50 (A7)

Nível de profundidade	[BTEX] em ug.L ⁻¹	[Etanol] em mg.L ⁻¹
4,0	0,00	0,00
3,0	0,00	0,00
2,0	0,00	0,00
1,0	0,00	0,00

Área da gasolina E24 (A8)

Nível de profundidade	[BTEX] em ug.L ⁻¹	[Etanol] em mg.L ⁻¹
4,5	0,00	0,00
3,5	0,00	0,00
2,5	542,34	0,00
2,0	0,00	0,00
1,0	0,00	0,00

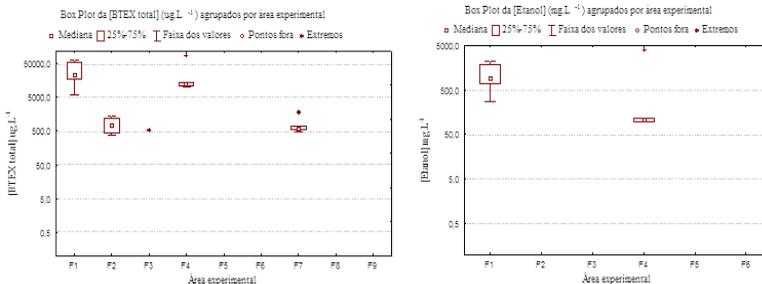


Figura A 1: Representação dos diagramas de caixa da concentração de BTEX total, HPA total e etanol, agrupados por área experimental.

Tabela A 2: Resultados individuais dos compostos BTEX ug.L⁻¹ nas diferentes profundidades de cada área experimental estudada.

Área e nível de profundidade de (m)	Benzeno (ug.L ⁻¹)	Tolueno (ug.L ⁻¹)	Etilbenzeno (ug.L ⁻¹)	Xilenos (ug.L ⁻¹)
E10; 6,0	1408,29	9060,65	1535,39	5829,00
E10; 5,0	<u>3698,80</u>	<u>11527,10</u>	1636,41	6245,83
E10; 4,0	17581,40	28177,40	1992,30	7616,09
E10; 3,0	2281,27	2773,77	<u>197,78</u>	<u>746,32</u>
E10; 2,0	26149,70	26808,10	1903,65	7263,38
Área e nível de profundidade de (m)	Benzeno (ug.L ⁻¹)	Tolueno (ug.L ⁻¹)	Etilbenzeno (ug.L ⁻¹)	Xilenos (ug.L ⁻¹)
E25; 5,8	19,96	188,90	24,81	138,60
E25; 4,8	22,01	219,54	28,82	158,66
E25; 3,8	43,33	351,15	49,85	271,34
E25; 2,8	77,77	642,46	86,43	430,01
E25; 2,3	<u>91,44</u>	<u>692,18</u>	<u>100,68</u>	<u>469,48</u>

Área e nível de profundidade (m)	Benzeno (ug.L ⁻¹)	Tolueno (ug.L ⁻¹)	Etilbenzeno (ug.L ⁻¹)	Xilenos (ug.L ⁻¹)
E85; 6,0	1941,70	5118,03	823,55	3070,55
E85; 5,0	2248,29	5801,77	945,80	3523,13
E85; 4,0	2540,78	6864,48	995,18	3770,16
E85; 3,0	1767,02	5078,18	749,49	2837,03
E85; 2,0	19211,00	42940,50	7601,68	22066,14
Área e nível de profundidade (m)	Benzeno (ug.L ⁻¹)	Tolueno (ug.L ⁻¹)	Etilbenzeno (ug.L ⁻¹)	Xilenos (ug.L ⁻¹)
B20; 6,0	79,97	117,12	44,21	217,20
B20; 5,0	199,55	106,84	58,56	357,95
B20; 4,0	51,31	137,28	60,74	324,52
B20; 3,0	41,02	128,89	85,66	293,47
B20; 2,0	227,62	505,13	241,01	839,59

Tabela A 3: Resultados individuais dos receptores de elétrons (Oxigênio dissolvido, nitrato e sulfato) nas diferentes profundidades de cada área experimental estudada.

Área e nível de profundidade (m)	Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	Nitrato (mg.L ⁻¹)	Sulfato (mg.L ⁻¹)	Potencial Redox (mV)
E10; 6,0	0,33	49,46	7,09	123,00
E10; 5,0	0,29	0,05	40,74	16,00
E10; 4,0	0,30	3,86	7,04	0,00
E10; 3,0	0,32	40,45	16,55	-18,00
E10; 2,0	0,31	0,03	37,31	103,00
E25; 5,8	2,22	0,70	5,27	111,00
E25; 4,8	0,85	7,62	2,78	101,00
E25; 3,8	0,21	3,20	0,79	-100,00

E25; 2,8	0,37	0,00	1,56	-10,00
E25; 2,3	0,71	0,20	2,32	2,70
E24; 4,5	1,28	0,00	2,06	84,00
E24; 3,5	0,51	0,11	1,99	21,00
E24; 2,5	0,22	7,89	2,85	-38,00
E24; 2,0	3,40	103,89	7,28	16,00
E24; 1,0	0,88	78,16	2,10	44,00
E85; 6,0	2,11	3,03	2,52	187,00
E85; 5,0	1,77	2,91	2,50	204,00
E85; 4,0	2,37	3,52	2,79	100,00
E85; 3,0	1,05	2,75	1,95	-38,00
E85; 2,0	0,84	2,21	1,57	-86,00
D100; 4,0	1,38	0,45	3,32	136,00
D100; 3,0	2,81	0,65	2,04	145,00
D100; 2,0	0,33	0,11	1,50	40,00
D100; 1,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
DE50; 4,0	0,78	0,08	1,52	37,00
DE50; 3,0	1,32	0,46	2,79	663,00
DE50; 2,0	2,38	3,17	2,81	82,00
DE50; 1,0	0,37	8,34	0,98	115,00
B20; 6,0	0,18	0,70	6,70	-15,00
B20; 5,0	0,22	0,00	6,53	15,00
B20; 4,0	0,37	0,00	7,68	75,00
B20; 3,0	0,46	0,00	6,27	-13,00
B20; 2,0	0,31	0,00	5,18	-98,00
B100; 6,0	0,69	0,00	21,51	27,00
B100; 5,0	0,12	0,23	16,31	17,00
B100; 4,0	0,08	0,00	9,94	-54,00
B100; 3,0	0,10	0,00	0,85	-78,00
B100; 2,0	0,13	0,00	0,85	-69,00
Área controle; 6,0	2,54	1,26	3,59	126,00

Área controle; 5,0	2,29	1,37	3,44	143,00
Área controle; 4,0	3,89	2,40	2,83	152,00
Área controle; 3,0	4,48	0,34	1,37	163,00
Área controle; 2,0	4,56	0,45	0,69	172,00

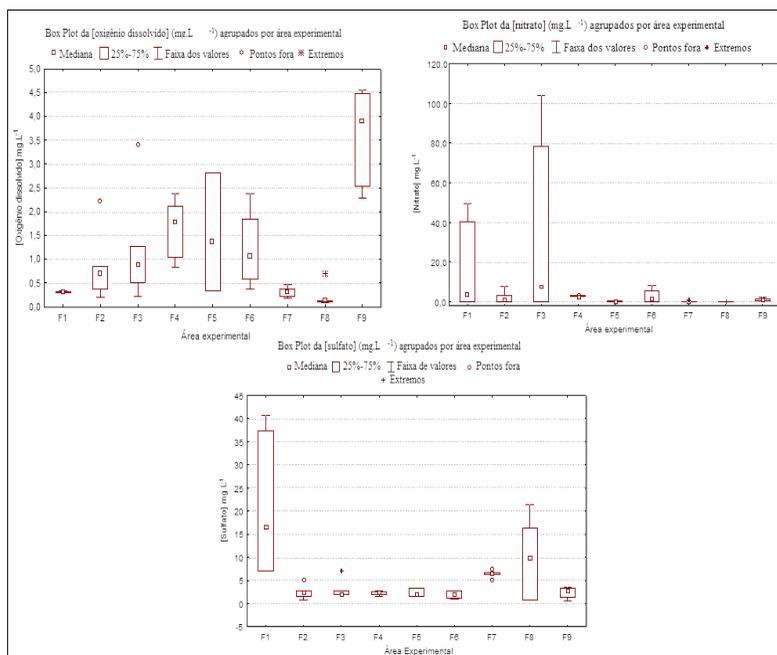


Figura A 2: Representação dos diagramas de caixa da concentração dos receptores de elétrons, oxigênio dissolvido, nitrate e sulfato, agrupados por área experimental.

Tabela A 4: Resultados individuais dos subprodutos metabólicos (nitrito, ferro (II), acetato e metano) nas diferentes profundidades de cada área experimental estudada.

Área e nível de profundidade (m)	Nitrito (mg.L⁻¹)	Ferro (II) (mg.L⁻¹)	Acetato (mg.L⁻¹)	Metano (mg.L⁻¹)
E10; 6,0	1,01	0,00	0,00	0,00
E10; 5,0	0,00	0,09	14,39	0,00
E10; 4,0	0,11	2,35	3,12	0,00
E10; 3,0	0,87	3,61	0,44	0,00
E10; 2,0	0,00	4,82	3,31	0,00
E25; 5,8	0,00	0,00	0,30	0,00
E25; 4,8	0,00	0,00	0,00	0,00
E25; 3,8	0,00	0,29	0,00	0,00
E25; 2,8	0,00	0,39	0,00	0,00
E25; 2,3	0,00	0,73	0,00	0,00
E24; 4,5	0,00	1,49	0,00	n.a.
E24; 3,5	0,00	0,08	0,00	0,04
E24; 2,5	0,03	0,00	0,00	0,00
E24; 2,0	0,07	0,00	0,00	0,00
E24; 1,0	0,00	0,00	0,00	0,00
E85; 6,0	ALD	0,00	ALD	0,04
E85; 5,0	ALD	0,00	ALD	0,04
E85; 4,0	ALD	0,00	0,67	0,04
E85; 3,0	ALD	4,19	0,72	0,52
E85; 2,0	ALD	25,60	147,00	0,12
D100; 4,0	0,00	0,00	0,23	0,00
D100; 3,0	0,00	0,63	0,00	0,04
D100; 2,0	0,00	7,27	0,00	0,00
D100; 1,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
DE50; 4,0	0,00	0,15	0,40	0,00
DE50; 3,0	0,00	0,00	0,49	0,00

DE50; 2,0	0,00	0,00	0,34	0,00
DE50; 1,0	0,03	0,00	0,19	0,00
B20; 6,0	0,00	0,00	0,87	4,22
B20; 5,0	0,00	1,36	0,87	7,79
B20; 4,0	0,00	1,77	0,35	8,23
B20; 3,0	0,00	6,73	0,00	30,03
B20; 2,0	0,00	10,06	5,92	7,88
B100; 6,0	0,00	1,23	0,25	0,08
B100; 5,0	0,00	4,17	2,85	0,18
B100; 4,0	0,00	6,02	2,29	3,69
B100; 3,0	0,00	41,00	75,38	10,57
B100; 2,0	0,00	99,50	120,64	2,90
Área controle; 6,0	ALD	0,00	ALD	ALD
Área controle; 5,0	ALD	0,22	ALD	ALD
Área controle; 4,0	ALD	0,35	ALD	ALD
Área controle; 3,0	ALD	0,25	ALD	ALD
Área controle; 2,0	ALD	0,00	ALD	ALD

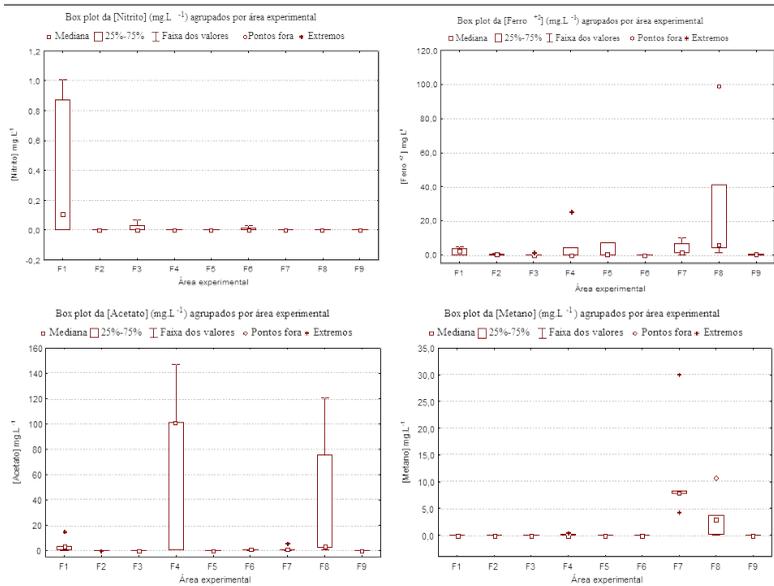


Figura A 3: Representação dos diagramas de caixa da concentração dos subprodutos metabólicos, nitrito, acetato, ferro (II) e metano agrupados por área experimental.

Apêndice B. Detalhamento das concentrações encontradas dos parâmetros moleculares.

Tabela B 1: Resultados individuais das análises de biologia molecular (16S, nitrato-, ferro- e sulfato-redutoras e arqueas) nas diferentes profundidades de cada área experimental estudada.

Área e profundidade de	16S rDNA	nirS	<i>Geobacter</i>	δ <i>Proteobacterias</i>	Arqueas
(metros)	(log cópias de gene . g ⁻¹)				
E10; 6,0	8,07	7,05	4,83	5,16	ALD
E10; 5,0	7,83	7,67	ALD	4,20	ALD
E10; 4,0	8,88	7,92	4,68	4,51	ALD
E10; 3,0	8,61	7,92	4,56	5,51	ALD
E10; 2,0	8,23	8,41	4,16	5,55	ALD
E25; 5,8	6,78	7,71	ALD	ALD	ALD
E25; 4,8	7,49	7,33	5,13	ALD	ALD
E25; 3,8	5,42	6,20	4,41	ALD	ALD
E25; 2,8	8,38	7,64	6,49	6,16	ALD
E25; 2,3	7,45	6,36	4,78	4,32	ALD
E24; 4,5	6,73	6,60	ALD	ALD	ALD
E24; 3,5	5,54	6,69	4,53	ALD	ALD
E24; 2,5	8,77	7,24	4,42	5,46	6,87
E24; 2,0	8,64	6,89	ALD	4,24	7,51
E24; 1,0	8,57	7,79	5,06	4,65	7,25
E85; 6,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
E85; 5,0	8,60	7,87	5,03	ALD	7,90
E85; 4,0	9,49	7,98	4,82	ALD	8,07
E85; 3,0	9,53	7,64	6,22	6,62	7,97
E85; 2,0	9,50	7,62	6,80	6,09	7,75
D100; 4,0	7,10	7,46	ALD	ALD	ALD
D100; 3,0	8,14	6,97	4,13	ALD	ALD
D100; 2,0	8,39	7,27	4,53	4,33	ALD

D100; 1,0	8,60	7,96	4,95	4,70	ALD
DE50; 4,0	7,25	6,52	ALD	ALD	ALD
DE50; 3,0	7,61	6,79	ALD	ALD	ALD
DE50; 2,0	8,28	7,10	4,08	ALD	ALD
DE50; 1,0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
B20; 6,0	7,18	7,59	ALD	ALD	ALD
B20; 5,0	8,14	8,07	4,58	ALD	ALD
B20; 4,0	6,89	7,56	4,17	ALD	ALD
B20; 3,0	8,03	7,47	4,29	4,24	ALD
B20; 2,0	5,48	7,69	ALD	ALD	ALD
B100; 6,0	7,24	6,50	4,83	ALD	ALD
B100; 5,0	7,04	7,71	ALD	ALD	ALD
B100; 4,0	7,69	7,38	4,99	4,11	ALD
B100; 3,0	6,85	6,15	ALD	ALD	8,28
B100; 2,0	8,37	6,50	4,95	4,54	7,97
Área controle; 6,0	7,26	7,22	ALD	ALD	ALD
Área controle; 5,0	7,02	7,15	ALD	ALD	ALD
Área controle; 4,0	7,22	6,83	ALD	ALD	ALD
Área controle; 3,0	7,68	7,07	ALD	ALD	ALD
Área controle; 2,0	8,01	6,81	ALD	ALD	ALD

Apêndice C: Detalhamento das análises moleculares a partir do equipamento de qPCR

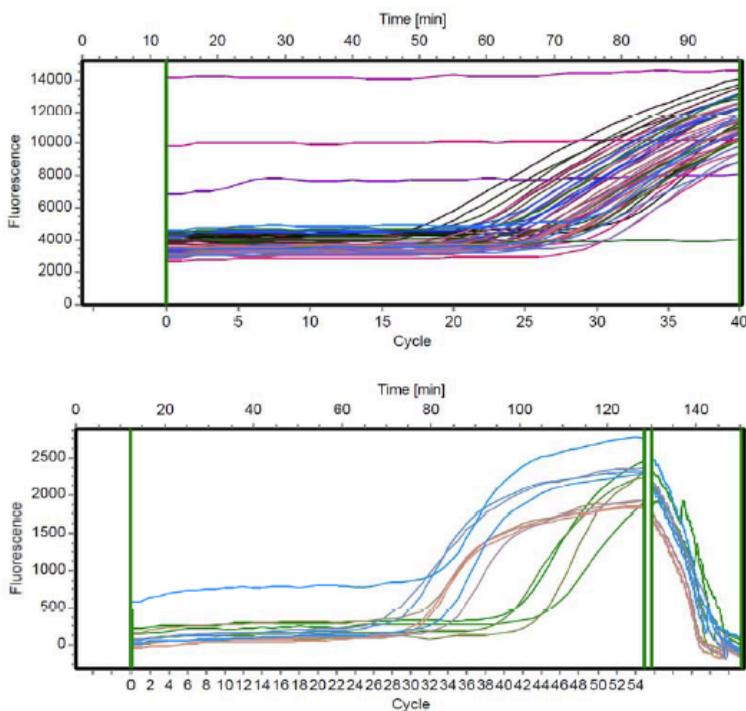


Figura C 1: Número de ciclos (CT) realizados pela PCR necessários para o início da amplificação da seqüência alvo, ou seja, seqüência que se deseja quantificar. Amostras não amplificadas também são mostradas como as linhas que não tiveram um aumento exponencial.

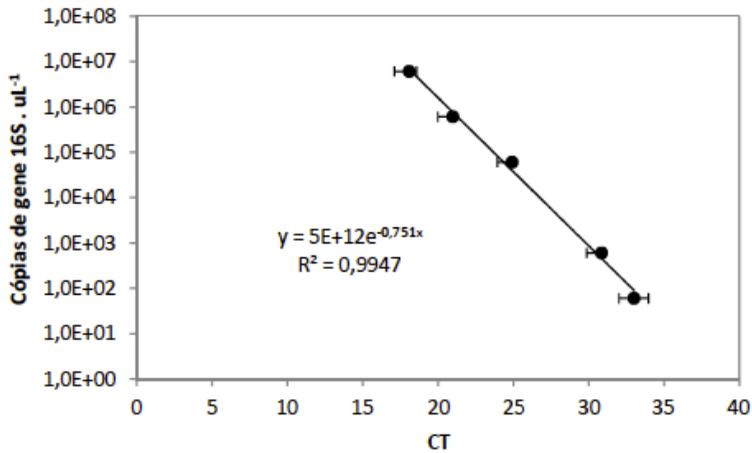


Figura C 2: Curva de calibração do número de cópias de gene 16S em função de CT

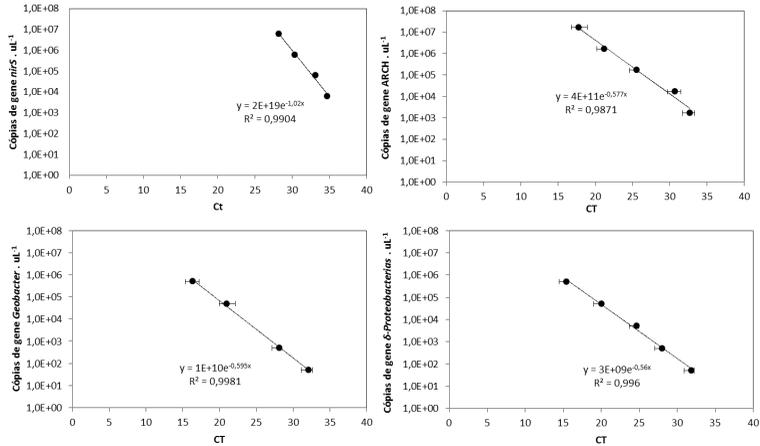


Figura C 3: Curvas de calibração para as comunidades microbianas específicas - *nirS*, *Geobacter*, *Proteobacterias* e arquea