



**Maria João Pereira  
Guedes**

**Pesquisa de esteróis e de ácidos gordos em solos  
de uma mina de urânio**



**Maria João Pereira  
Guedes**

**Pesquisa de esteróis e ácidos gordos em solos de  
uma mina de urânio**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira, Investigadora Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Universidade de Aveiro, e co-orientação científica da Doutora Ana Cristina Freitas, Professora Auxiliar do Instituto de Estudos Interculturais e Transdisciplinares do Instituto Piaget de Viseu.

Trabalho realizado no âmbito dos  
projectos POCI e  
PPCDT/AMB/60899/2004,  
financiados pela FCT e pelo Programa  
Operacional Ciência e Inovação 2010  
(POCI 2010) participado pelo fundo  
comunitário Europeu FEDER

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira**

professora associada com agregação, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Fernando José Mendes Gonçalves**

professor associado com agregação, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Teresa Alexandra Peixoto da Rocha Santos**

professora associada do Instituto de Estudos Interculturais e Transdisciplinares do Instituto Piaget de Viseu

**Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira (Orientadora)**

investigadora auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro

**Doutora Ana Cristina Freitas Lopes de Freitas (Co-orientadora)**

professora auxiliar do Instituto de Estudos Interculturais e Transdisciplinares do Instituto Piaget de Viseu

## **Agradecimentos**

Ao Instituto Jean-Piaget de Viseu, pelo acolhimento e disponibilidade de meios e das condições necessárias ao desenvolvimento deste trabalho.

À Doutora Ruth Pereira pela orientação, ajuda, disponibilidade e dedicação incansável para a elaboração deste trabalho.

À Doutora Ana Cristina Freitas por todo o acompanhamento, apoio, incentivo e ânimo que me transmitiu no longo caminho para a elaboração deste trabalho.

A todas as pessoas que conheci no Instituto Jean-Piaget de Viseu, sem elas a elaboração deste trabalho não teria sido possível, realço a Doutora Teresa Santos, Kátia Duarte e Filipe Ferreira por todo o acompanhamento laboratorial e ajuda na realização das várias etapas deste trabalho.

Aos meus amigos em particular à Josiana Vaz e ao Nelson Silva por todos os momentos em que me encorajaram e pela ajuda prestada em algumas etapas de elaboração deste trabalho.

À Amélia Gonçalves pelo carinho e companhia durante a minha estadia em Viseu.

Aos meus pais, ao meu irmão e a minha avó pela disponibilidade, apoio e preocupação.

Um muito obrigado a todos.

## palavras-chave

avaliação de risco para o local; mina de urânio; ácidos gordos; esteróis; comunidade microbiana; estrutura da comunidade

## resumo

É facto conhecido que os microrganismos são sensíveis ao stress e à degradação ambiental. Impactos significativos, nas comunidades microbianas, podem ocorrer após uma perturbação reflectindo-se tanto na biomassa total, como na diversidade das espécies presentes. Assim, incluída na fase 3 da avaliação de risco, que está a ser efectuada numa mina de urânio abandonada (Cunha Baixa, Mangualde, Centro de Portugal), procedeu-se à análise de ácidos gordos e de esteróis que foram usados como biomarcadores para avaliar o impacto da contaminação dos solos com metais e radionuclídeos na estrutura da comunidade microbiana, em sete locais de amostragem situados a diferentes distâncias (A-D-E-F-G-H-I) da mina. Amostras de solo superficial foram recolhidas, em diferentes estações do ano (Novembro, Fevereiro, Maio e Agosto). Após extracção e metilação, os ácidos gordos foram quantificados por cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massa (GC-MS); Esteróis foram também quantificados por GC-MS, após extracção e derivatização. A análise de componentes principais (PCA) foi efectuada a ambos biomarcadores. De seguida, os resultados da PCA obtidos para ambas componentes, foram usados para testar o efeito dos locais e das estações do ano, via ANOVA bi-factorial, na variabilidade das amostras de solo recolhidas na mina de urânio. Através da análise de PCA, dois grupos foram separados segundo as duas principais componentes (PC1 e PC2). Um grupo incluiu os locais situados a uma maior distância da mina (E, H e I) correlacionando-se com maiores percentagens de iC15:0 e iC17:0, ambos indicadores de bactérias Gram-positivas, bem como dos três esteróis detectados. O segundo grupo, por sua vez, constituiu-se pelos locais de amostragem que estiveram mais sujeitos à exploração do minério nomeadamente à lixiviação *in situ* do minério pobre e à dispersão de lamas da lagoa de tratamento dos efluentes (A, D, F e G). Estes locais correlacionaram-se com maiores níveis de iC16:0 (indicador de bactérias Gram-positivas), cyC17:0 (comum nas bactérias Gram-negativas) e iC18:0 e iC17:0, biomarcadores de bactérias não específicas. O perfil dos ácidos gordos obtidos nos locais de amostragem revelou uma predominância variável nos grupo de bactérias, indicando uma diferença clara nas comunidades bacterianas do solo, que por sua vez estão directamente relacionadas com as condições ambientais que prevalecem na área da mina de urânio.

**keywords**

site-specific risk assessment; uranium mine; fatty acids; sterols; microbial community; microbial community structure

**abstract**

It is well known that soil microorganisms are sensitive to environmental stresses and degradation and severe impacts on microbial community can occur following disturbance, both in terms of total biomass and species composition. Thus, included in the tier 3 of a site specific risk assessment that is being carried out in an abandoned uranium mine (Cunha Baixa, Mangualde, Central Portugal), fatty acids biomarkers and sterols were analyzed to assess the impact of soil contamination with metals and radionuclides in the structure of the microbial community of seven sampling sites at different distances (A-D-E-F-G-H-I) from the mine. Surface soil samples were collected in those sampling sites in the four different seasons of the year (November, February, May and August). After extraction and methylation, fatty acids were quantified by gas-chromatography coupled to a mass spectrometry (GC-MS); sterols were also quantified by GC-MS after extraction and derivatization procedures. Principal component analysis (PCA) was performed on fatty acid biomarkers and sterol data. Subsequently PCA scores obtained for both components were used to test the effect of sites and seasons, on soil samples collected in Cunha Baixa uranium mine, through bi-factorial ANOVAS. Through PCA analysis, two distinct groups were set apart along the first two components. One group included sites at a great distance from the mine (E, H, and I) which were correlated with higher contents of iC15:0 and iC17:0, both indicators of Gram-positive bacteria, as well as with the three sterols detected. The second group, in turn, was composed of the sampling sites most impacted by ore exploration, *in situ* leaching of poor ore, and spread of sludge from the effluent treatment pond (A, D, F and G). These sites were correlated with higher levels of iC16:0 (Gram-positive bacteria indicator), cyC17:0 (generally common in gram negative bacteria) and C18:0 and C17:0 biomarkers of non-specific bacteria. The profile of fatty acids obtained in the sampling sites revealed variable predominance of groups of bacteria which are a clear indication of differences in the soil microbial communities that are directly related to the environmental conditions prevailing in the uranium mine area.

# Índice Geral

	<b>Pág.</b>
<b>1. Introdução Geral</b>	1
1.1. <b>Enquadramento geral</b>	3
1.2. <b>Metodologia para Análise das Comunidades Microbianas</b>	4
1.2.1. Métodos de avaliação da biomassa microbiana do solo	5
1.2.2. Métodos de avaliação da funcionalidade da comunidade microbiana do solo	8
1.2.3. Métodos de avaliação da diversidade estrutural das comunidades microbianas do solo	10
1.3. <b>Caracterização do Local de Estudo</b>	14
1.4. <b>Objectivos e Estrutura da Dissertação</b>	15
<b>Referências</b>	17
<b>Capítulo 1 - Sterols and fatty acid biomarkers as indicators of changes in soil microbial communities in a uranium mine area</b>	25
<b>Abstract</b>	27
<b>1. Introduction</b>	27
<b>2. Materials and Methods</b>	29
2.1. <i>General Characterization of the Study area</i>	29
2.2. <i>Soil sampling and pré-treatment procedures</i>	31
2.3. <i>Analytical procedures</i>	32
2.4. <i>Statistical Analysis</i>	34
<b>3. Results and Discussion</b>	34
<b>References</b>	42
<b>Conclusão</b>	47





## Índice de Tabelas

<b>Tabelas</b>	<b>Pág.</b>
<b>Tabela 1</b> - Biomarcadores lipídicos dos diferentes grupos de procariontes.	12
<b>Table 2</b> - Heavy metal concentrations extracted with artificial rain water and with aqua regia from soils collected in Cunha Baixa uranium mine area (Pereira et al., 2008).	30
<b>Table 3</b> - Total FAME's (mg/Kgsoil), percentage of Gram-positive, Gram-negative bacteria and of non-specific bacteria and ratio of cholestanol/cholesterol in the different soil samples around Mine through the four seasons.	39
<b>Table 4</b> Coefficients of the two principal components explaining 97.0% of total variation.	40
<b>Table 5</b> - F statistics for bi-factorial ANOVA, testing the effects of site and seasons on PCA scores for both components ( $p < 0.001$ for all the tests).	41



## Índice de Figuras

<b>Figuras</b>	<b>Pág.</b>
<b>Figure 1.</b> Schematic representation of study area showing sampling sites (A, D, E, F, G, H, and I). Black and grey lines represent main and secondary roads, respectively, while black circles represent houses. Grey areas represent the abandoned mining areas.	29
<b>Figure 2.</b> Mean values of three replicas for iC15:0, iC16:0, iC17:0, cycloC17:0, C17:0 e C18:0 present in the soil of the different sampling sites (A, D, E, F, G, H, and I) around the mine around Mine through the four seasons.	37
<b>Figure 3.</b> Mean values of three replicas for ergosterol, cholesterol and cholestanol present in the soil of the different sampling sites (A, D, E, F, G, H, and I) around the mine around Mine through the four seasons.	38
<b>Figure 4.</b> PCA biplot of soil samples (sites A, D, E, F, G, H, and I) from the Cunha Baixa area based on determined fatty acid biomarkers and sterols evaluated in the four seasons (Aut:Autumn, Win:Winter, Spr:Spring, Sum_Summer).	40



## **Introdução Geral**



## 1.1. Enquadramento Geral

A legislação Europeia, publicada recentemente, e em avaliação, traduz a crescente preocupação com a protecção do solo, em virtude do aumento das pressões e da perda de qualidade que estes recursos têm vindo a sofrer, e como resposta à necessidade de manter os níveis de fertilidade e produtividade dos ecossistemas terrestres (Filzek et al., 2004; Beck et al., 2005; Römbke e Breure, 2005; Römbke et al., 2005; Winding et al., 2005; CEC, 2006).

O solo é composto fundamentalmente por uma fracção mineral, constituída por partículas de diferentes dimensões, rodeadas por água e gases, cuja proporção e composição varia temporal e espacialmente (Nielsen e Winding, 2003). A actividade biológica deste compartimento está confinada sobretudo aos primeiros 30 cm da superfície. Nesta camada superficial os componentes biológicos correspondem a uma ínfima fracção do volume total do solo (0,5%) e a menos de 10% da biomassa do solo (Nielsen e Winding, 2003). Estes componentes biológicos são fundamentalmente microrganismos que habitam o filme aquoso ou os poros, deslocando-se passivamente por acção do fluxo de água no solo. Os microrganismos do solo (bactérias e fungos) servem de alimento a outros seres vivos e têm um papel fulcral na mineralização de compostos orgânicos complexos, contribuindo para a libertação de elementos minerais essenciais ao desenvolvimento de outros seres vivos (Winding et al., 2005). Assim quer por acção dos microrganismos, quer pelas suas propriedades físicas e químicas, o solo desempenha funções vitais como sejam: i) a degradação de matéria orgânica; ii) a reciclagem de nutrientes (e.g. carbono, azoto, enxofre etc.); iii) a protecção dos recursos de água subterrâneos, quer por degradação (e.g. de pesticidas e herbicidas) quer por filtração de contaminantes; iv) a regulação do ciclo hidrológico; v) a oferta de substrato para agricultura e de suporte para edifícios e infra-estruturas, assim como para as mais diversas actividades antropogénicas e, por último, vi) a oferta de *habitat* de uma grande diversidade de espécies sendo que alberga uma elevada proporção da biodiversidade do planeta (Beck et al., 2005, Barrios, 2007).

Não obstante ter sido já reconhecido que os organismos do solo desempenham um papel fundamental na determinação das suas propriedades físicas e químicas e das suas funções, a biodiversidade existente neste compartimento continua a ser largamente desconhecida, persistindo ainda a questão de quantas espécies serão necessárias para a manutenção de tais funções (Barrios, 2007) ou seja qual a verdadeira relação entre a biodiversidade do solo e as suas funções ecológicas (Ekschmitt e Griffiths, 1998). Uma

vez que a maior parte desta biodiversidade reside no mundo microbiológico, na última década desenvolveram-se novas técnicas de biologia molecular com vista a uma análise mais profunda das comunidades microbianas do solo. Estas técnicas têm vindo também a permitir a integração de parâmetros microbiológicos nos esquemas de avaliação da qualidade de solos e na avaliação de riscos de solos contaminados (e.g. Rutgers e Breure, 1999; Winding et al., 2005; Mesman et al., 2006).

Na avaliação de risco de locais contaminados, além da importância dos microrganismos na manutenção das funções e serviços dos ecossistemas, existem outras razões de peso que justificam a introdução de parâmetros microbiológicos neste processo, nomeadamente: o facto de os microrganismos viverem em contacto íntimo com o solo, serem sensíveis aos contaminantes e responderem a estes de forma rápida (Rutgers e Breure, 1999).

Nos esquemas Europeus de análise de risco em etapas (Weeks e Comber, 2005; Mesman et al., 2006), de locais contaminados seguem o esquema de TRIAD proposto por Chapman (1990) o qual prevê que se integre informação de três linhas de evidência ecológica: química, ecotoxicológica e ecológica. A nível da linha de evidência ecológica, os estudos levados a cabo na etapa mais elevada da análise de risco (etapa 3) têm como objectivo fazer uma avaliação mais aprofundada, do impacto da contaminação nas populações e comunidades locais (Jensen e Mesman, 2006). A nível da comunidade microbiana esta avaliação pode incidir sobre alterações na diversidade estrutural e/ou funcional e no desenvolvimento de tolerância induzida pelos poluentes em causa (Rutgers e Breure, 1999; Jensen e Mesman, 2006). Para esta avaliação foram desenvolvidos recentemente novos métodos que permitem obter um *fingerprint* da comunidade microbiana, através por exemplo da extracção e caracterização dos ácidos gordos dos fosfolípidos (*do inglês*: PLFA) ou de outros lípidos das membranas celulares, do ADN ou ARN, da obtenção do perfil fisiológico da comunidade utilizando o sistema de placas BIOLOG<sup>®</sup> ou ainda pelo método de indução da tolerância da comunidade ao contaminante (Jensen et al., 2006).

### **1.1 Metodologias para Análise das Comunidades Microbianas**

Os métodos tradicionais utilizados no estudo das comunidades microbianas do solo, designados por métodos dependentes de cultura, envolviam a cultura dos microrganismos, utilizando meios diversos, de forma a maximizar o número de espécies



recuperadas (Hill et al, 2000; Leckie, 2005). Contudo, apenas uma fracção muito reduzida dos microrganismos (fungos e bactérias) presentes em amostras de solo são cultiváveis, o que reduzia a representatividade dos microrganismos presentes nas amostras e comprometia largamente os estudos sobre as comunidades microbianas terrestres (Ekschmitt e Griffiths, 1998; Malik et al., 2008). Neste contexto, a evolução das técnicas moleculares modernas puseram ao alcance dos ecologistas e dos ecotoxicologistas a possibilidade de compreenderem a diversidade e funcionalidade das comunidades microbianas em condições ambientais, assim como a possibilidade de perceberem o impacto que agentes de stress podem ter no comprometimento destas propriedades. As vantagens dos métodos não dependentes de cultura residem ainda na possibilidade de se extraírem directamente do solo, moléculas passíveis de serem utilizadas como biomarcadores de diferentes grupos ou espécies (e.g. PLFAs, ADN, ARN) ou de preservar a actividade funcional da comunidade, no seu ambiente natural, através da preservação imediata das amostras (Malik et al., 2008).

### *1.1.1 Métodos de avaliação da biomassa microbiana do solo*

A biomassa microbiana é um parâmetro chave na avaliação da comunidade microbiana do solo, quer em processos de avaliação da qualidade do solo, quer de análise de risco (Winding et al., 2005), dado que representa toda a componente metabolicamente activa da matéria orgânica do solo. Contudo, alguns autores têm verificado a insensibilidade deste parâmetro ao impacto de determinados contaminantes como metais (e.g. Bååth et al., 1998; Kelly et al., 1999; Zhang et al., 2008), o que poderá resultar da substituição das espécies mais sensíveis por outras menos sensíveis. Em oposição outros autores demonstraram a sensibilidade deste parâmetro a processos de gestão/manuseamento do solo, como a lavoura (Mikanová et al., 2009), sobretudo nas camadas superficiais do solo.

A biomassa microbiana pode ser determinada por métodos directos como a microscopia e a contagem de unidades formadoras de colónias (do inglês: *colony forming units* - CFUs) ou por métodos bioquímicos e fisiológicos indirectos (Ananyeva et al., 2008). O método de microscopia de fluorescência permite determinar o comprimento do micélio dos fungos e actinomicetes e a análise de esporos fúngicos (Ananyeva et al., 2008). Estes autores compararam ainda a estimativa da biomassa microbiana efectuada em diferentes tipos de solos quer pelo método de microscopia de fluorescência quer pela avaliação da respiração induzida pelo substrato (do inglês: *substrate induced respiration* -

SIR), tendo verificado que os valores de biomassa microbiana medidos por ambos os métodos apresentavam mais semelhanças nas camadas superficiais do solo (0-5 cm), com propriedades físico-químicas contrastantes, do que nas camadas mais inferiores.

Os principais métodos indirectos de avaliação da biomassa microbiana incluem: a respiração basal e a respiração induzida pelo substrato (SIR) (Anderson e Domsch, 1978), o método fumigação com clorofórmio e incubação (do inglês: *chloroform fumigation incubation method* – CFI) (Jenkinson et al., 1976) ou ainda o método de fumigação com clorofórmio e extracção (do inglês: *chloroform fumigation extraction method* – CFE) (Vance et al., 1987).

A respiração induzida por substrato (SIR) (Anderson e Domsch, 1978) avalia a taxa de produção de CO<sub>2</sub> por uma amostra de solo, após a adição de um substrato (geralmente D-glucose), cuja quantidade se assume ser proporcional à biomassa microbiana nessa amostra. Com base neste método é possível calcular o C<sub>mic</sub>, do solo, a partir da taxa respiratória máxima atingida após a adição de glucose:

$$C_{mic} \text{ (mg de } C_{mic} \text{ g}^{-1} \text{ solo)} = 40,04y+0,37$$

$$y = \text{taxa de máxima de respiração inicial (ml CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ de solo h}^{-1}\text{)}$$

A taxa máxima de respiração inicial refere-se exactamente ao valor mais elevado registado imediatamente após a adição de glucose, na medida em que em alguns casos, após um período de algumas horas, a taxa respiratória volta a aumentar como resultado do crescimento (multiplicação celular) promovido pela fonte de carbono adicional que foi proporcionada (Demetz e Insam, 1999). Estes autores reforçam ainda que este método pode também não ser eficaz em solos com limitação de nutrientes, na medida em que a falta destes pode limitar a actividade microbiana do solo acima de um valor basal, apesar da fonte adicional de carbono (Demetz e Insam, 1999). Para solos ricos carbonatados, a libertação de CO<sub>2</sub> abiótico pode também conduzir a resultados erróneos (Stenberg, 1999)

A respiração induzida por substrato é geralmente medida em paralelo com a taxa de respiração basal avaliada antes da adição de substrato (Stenberg et al., 1999).

No método de fumigação-incubação (CFI) (Jenkinson et al., 1976) são obtidas duas porções iguais de uma mesma amostra de solo (sub-amostras), sendo que uma porção é fumigada com CHCl<sub>3</sub> e a outra não. Após o tratamento, o conteúdo em água das duas sub-amostras é ajustado e cada uma é incubada durante dez dias, a 25°C, num recipiente fechado contendo 1ml de NaOH 1N. Após o período de incubação, o NaOH é

titulado com HCl 0,1N. Este processo permite determinar o CO<sub>2</sub> libertado durante o período de incubação pela amostra fumigada, ao qual se deve subtrair o CO<sub>2</sub> libertado pelo controlo (sem amostra de solo). Esta determinação é feita com base no volume de ácido necessário para diminuir o pH da solução de 8,7 para 3,7. Em suma este método mede o CO<sub>2</sub> resultante da decomposição das células microbianas mortas, que é libertado durante o período de incubação. De acordo com Jordan e Beare (1991) que compararam este método com o método CFE, o primeiro apresenta maior variabilidade na medida em que apresenta duas potenciais fontes de erro, nomeadamente: a fixação do CO<sub>2</sub> pela base e o processo de titulação, mais precisamente, a determinação, com precisão, da quantidade de ácido necessária. No método de fumigação extracção (CFE) (Vance et al., 1987), actualmente padronizado (ISO, 1997), as duas porções (sub-amostras) de uma mesma amostra sofrem tratamento diferenciado, sendo uma fumigada, geralmente durante 1 a 5 dias, enquanto que a outra não o é. Após este processo, o carbono é extraído das amostras com uma solução K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5M, e os extractos são analisados por um analisador de carbono orgânico total.

A biomassa microbiana C total é calculada a partir do CO<sub>2</sub> libertado ou extraído das sub-amostras fumigadas e não fumigadas, utilizando a seguinte fórmula:

$$C = F - NF/K_c \text{ ou } K_{ec}$$

F = CO<sub>2</sub> C libertado (CFI) ou C extraído (CFE) das amostras fumigadas.

NF = CO<sub>2</sub> C libertado (CFI) ou C extraído (CFE) das amostras não fumigadas.

K<sub>c</sub> ou K<sub>ec</sub> = 0,45 ou 0,33 para a fracção de biomassa C mineralizada em CO<sub>2</sub> (CFI) ou para a fracção de biomassa C extraída com K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (CFE).

O quociente metabólico qCO<sub>2</sub>, também designado por taxa de respiração específica, é a taxa de respiração microbiana (medida pela libertação de CO<sub>2</sub>, pelo método SIR) por unidade de biomassa microbiana, igualmente determinada pelo método SIR, e por unidade de tempo (Anderson e Domsch, 1990; Insam et al., 1996; Winding et al., 2005). De acordo com Stenberg (1999) situações de stress impostas pela deficiência de nutrientes ou pelo pH conduzem a elevados quocientes metabólicos, em resultado da diminuição da biomassa microbiana. Enquanto, que perturbações causadas pelo tratamento do solo (lavoura ou adição de estrume), irão originar um aumento do quociente, mas em associação com aumentos da biomassa microbiana. Insam et al. (1996) demonstraram a aparente insensibilidade deste parâmetro à contaminação com metais, apresentando duas explicações possíveis para o facto, em situações de stress

diferentes. Assim, de acordo com estes autores em cenários de baixos níveis de contaminação e de exposições curtas a comunidade microbiana pode compensar aumentando a taxa de renovação (aumento da respiração), enquanto, em cenários de elevados níveis de contaminação, ou de exposições prolongadas podem ocorrer mudanças na estrutura da comunidade microbiana, com o estabelecimento e crescimento das estirpes resistentes, sem alterações na biomassa microbiana. Nestas situações o quociente metabólico poderá não ser um bom indicador do impacto de contaminantes.

### *1.1.2 Métodos de avaliação da funcionalidade da comunidade microbiana do solo*

Aquando da ocorrência de perturbações na comunidade microbiana, a manutenção de funções cruciais da comunidade pode ser mais importante do que a manutenção da sua diversidade (Caldwell et al., 2005). Neste contexto as enzimas do solo, predominantemente de origem microbiana, são responsáveis pela transformação de diferentes compostos orgânicos, como a celulose, lignina, açúcares, aminoácidos, entre outros, tendo um papel fundamental na manutenção dos principais ciclos de nutrientes (C, N, P e S) e sendo por isso consideradas como bons indicadores de stress ou de alterações na actividade funcional da comunidade microbiana do solo (Rossel et al., 1997; Dick e Wang, 2000; Sowerby et al., 2005). As enzimas do solo podem ter diferentes localizações, podendo estar no interior de células vivas ou permanecerem activas em células mortas ou ainda serem activas no exterior das células onde permanecem livres em solução ou adsorvidas e estabilizadas pelos diferentes componentes celulares (Nannipieri et al., 2002). As enzimas extra-celulares são fundamentalmente de origem microbiana, sendo produzidas pelos microrganismos para iniciarem a degradação de compostos orgânicos em nutrientes que podem absorver posteriormente.

De forma a avaliar a actividade de diferentes enzimas do solo, foram desenvolvidos diversos ensaios enzimáticos que se caracterizam pela sua simplicidade, sensibilidade, especificidade e baixo custo, o que permite que possam ser aplicados a um número elevado de amostras de solo, permitindo desta forma reduzir a heterogeneidade dos resultados obtidos (Sinsabaugh, 1994; Rossel et al., 1997; Nannipieri et al., 2002). Na medida em que os processos metabólicos do solo são diversos e incluem um grande número de enzimas que catalisam reacções específicas, a avaliação da actividade de uma única enzima, não permite inferir sobre a actividade microbiológica do solo de uma forma global (Nannipieri et al., 2002). Assim, deve-se proceder à avaliação de um conjunto de

enzimas, envolvidas nos diferentes ciclos biogeoquímicos, como por exemplo:  $\beta$ -glucosidade e celulase (ciclo do C), urease (ciclo do N), fosfatases (ciclo do P) arissulfatase (ciclo do S) e as desidrogenases como indicadores gerais da actividade microbiana (1971). As diferentes actividades enzimáticas podem posteriormente ser integradas num índice (Bastida et al., 2008) ou analisadas de forma integrada através de métodos de análise multivariada (Nannipieri et al., 2002). Esta metodologia tem ainda a vantagem de permitir a determinação dos parâmetros com maior contributo para a variação entre solos.

A produção de enzimas extra-celulares não é apenas induzida pelo substrato. Outros factores podem regular a produção e a actividade enzimática, nomeadamente: a presença no solo de elevados níveis do produto final da actividade dessas enzimas ou do nutriente alvo (e.g. N), temperatura, pH e a qualidade e quantidade de detritos vegetais produzidos, a seca entre outros (Acosta-Martínez e Tabatabai, 2000; Dick et al., 2000; Pereira et al., 2006; Sardans e Peñuelas, 2005; Sowerby et al., 2005; Geisseler e Horwath, 2009; Kang et al., 2009). Contudo, entre estes factores o pH é um dos mais importantes na modulação da actividade enzimática, não só pela sensibilidade dos grupos funcionais dos aminoácidos a variações no pH, os quais podem sofrer alterações químicas e funcionais, comprometendo a ligação do substrato e a subsequente acção catalítica (Dick et al., 2000) Esta variabilidade faz com que seja difícil relacionar alterações na actividade de enzimas do solo, com um factor específico, ou seja dificulta o estabelecimento de relações causa-efeito com determinadas perturbações em particular.

No que refere à avaliação da funcionalidade da comunidade microbiana como um todo, é possível obter um perfil fisiológico das comunidades (do inglês: *community level physiological profile* - CLPP), com base na análise efectuada pelo sistema BIOLOG<sup>®</sup> disponível comercialmente (Garland e Mills, 1991; Garland 1997). A análise efectuada por este sistema é baseada na utilização diferenciada de um conjunto de 95 substratos de carbono diferentes, em que a utilização de cada substrato é detectada pela redução e subsequente mudança de cor do pigmento tetrazólio-violeta avaliada espectrofotometricamente. O padrão de substratos utilizados permite estabelecer o perfil funcional das comunidades microbianas (CLPPs) ao fornecer informação sobre: a taxa global de desenvolvimento de cor; a diversidade e a equitabilidade das respostas entre os poços e o padrão, ou a taxa de utilização relativa dos substratos. Esta informação pode ser comparada entre amostras de diferentes tipos de solo, de locais diferentes, de tratamentos diferentes ou recolhidas em períodos diferentes, com recursos a metodologias de análise estatística multivariada. Apesar de alguns constrangimentos

apresentados por esta metodologia, nomeadamente a influência que a densidade do inoculo tem na taxa de desenvolvimento da cor (Garland, 1997; Hofman et al., 2004; Leckie et al., 2004) e a falta de relevância ecológica dos substratos (Nannipieri et al., 2002), o BIOLOG é considerado uma ferramenta rápida de avaliação da estrutura funcional das comunidades microbianas (Machulla, 2003). Para eliminar os factores de confusão associados à interpretação do perfil fisiológico das comunidades, pode proceder-se à padronização da densidade do inoculo e do tempo de incubação, contudo os procedimentos requeridos vão reduzir a qualidade deste ensaio, como uma ferramenta de rastreio rápida (Garland, 1997). Em alternativa este autor propõe a monitorização contínua do desenvolvimento de cor nas placas, e subsequente utilização de amostras com uma taxa média de desenvolvimento de cor nos poços (do inglês: *average well colour development - AWCD*) equivalente, ainda que o tempo de incubação não seja o mesmo. No sentido de eliminar o enviesamento produzido pelos substratos foram produzidas as Ecoplates<sup>®</sup> especificamente desenhadas para aplicações ecológicas, e que compreendem três réplicas de 31 substratos com relevância ambiental, e dos quais pelo menos 9, são componentes dos exsudados das raízes das plantas. Em alternativa, as MT Microplates<sup>®</sup> contêm os químicos necessários para as reacções redox, mas sem substratos, permitindo, deste modo, aos utilizadores produzirem placas com substratos específicos (Preston-Mafham et al., 2002). Contudo, e não obstante todos os esforços desenvolvidos no sentido de mitigar os constrangimentos da técnica, o BIOLOG será sempre mais útil para comparar comunidades do que para as caracterizar (Preston-Mafham et al., 2002).

### *1.1.3 Métodos de avaliação da diversidade estrutural das comunidades microbianas do solo*

Pela sua diversidade química a abundância celular os lípidos, particularmente os fosfolípidos e os ácidos nucleicos têm sido considerados como moléculas particularmente interessantes para avaliar a diversidade da comunidade microbiana (Drenovsky et al., 2004). Assim, baseados na extracção destas moléculas do solo, existem diversos métodos de avaliação da estrutura e da diversidade das comunidades microbianas, nomeadamente: a análise dos ácidos gordos dos fosfolípidos (do inglês: *phospholipid fatty acid analysis – PLFAs*), e métodos baseados em PCR (do inglês: *polymerase chain reaction*) – como a electroforese em gel de gradiente desnaturante (do inglês: *denaturing gradient gel electrophoresis – DGGE*).

Os ácidos gordos dos fosfolípidos são um dos principais constituintes das membranas celulares. As suas cabeças polares e as cadeias de ácidos gordos a ela ligadas por ligações éster variam entre eucariontes e procariontes, assim como entre os diferentes grupos de procariontes (Drenovsky e tal., 2004) como bactérias gram-positivas, bactérias gram-negativas, actinomicetes, fungos, etc. Deste modo, diferenças no padrão de PLFAs, presentes em diferentes amostras de solo, são indicadoras de diferenças na estrutura da comunidade microbiana das amostras (Sverdrup et al., 2006). Após a morte celular, as membranas são degradadas e os PLFAs são metabolizados de imediato em diglicerídeos (White et al., 1979), pelo que são indicadores apenas da biomassa viva e metabolicamente activa (Hill et al., 2000).

Os PLFAs são extraídos directamente das amostras de solo, por acção de solventes orgânicos, posteriormente convertidos em ésteres metilados de ácidos gordos (do inglês: Fatty acid methyl esters – FAMES) e analisados por cromatografia gasosa (Leckie et al., 2004). Wu et al. (2009) verificaram que a razão entre a massa de solo: volume de solvente é pouco determinante da quantidade e diversidade de PLFAs extraídos das amostras. Contudo, as condições de armazenamento da amostra podem provocar alterações significativas nos perfis de PLFAs extraídos, pelo que sempre que possível a extracção deve ser feita de imediato após a colheita das amostras.

A designação dos diferentes ácidos gordos segue uma nomenclatura própria, descrita por Frostegård et al. (1993). De acordo com exemplo em baixo esta indica o número total de carbonos; o número de ligações duplas ( $\omega$ ) e a sua posição relativamente ao grupo metil do final da molécula.

### **18:2 $\omega$ 6,9**

18 átomos de carbono

2 ligações duplas ( $\omega$ ) nos carbonos 6 e 9 a contar a partir do terminal metil

Os prefixos “t” e “cis” indicam se as ligações duplas têm uma configuração “trans” ou “cis”, respectivamente, enquanto os prefixos “i” e “a” nos ácidos gordos ramificados, indicam se a ramificação é “isso” ou “anteiso”. O prefixo “cy” refere-se a ácidos gordos com anéis ciclopropanóicos (Leckie et al., 2004). A tabela 1 relaciona os diferentes PLFAs usados como biomarcadores e os respectivos grupos de procariontes onde estão presentes.

**Tabela 1-** Biomarcadores lipídicos dos diferentes grupos de procariontes.

Género, Espécies, grupo microbiano	Biomarcador lipídico	Autores
<b>Fungos</b>	18:2 $\omega$ 6, 18:3 $\omega$ 3, 18:3 $\omega$ 6 24:0, 26:0 16:1 $\omega$ 5c	Frostegard et al., 1993a e 1996 Zeles et al., 1999a Olsson et al., 1999a
<b>Bactérias Sulfato-redutoras</b> <i>Desulfobacter</i> <i>Desulfovibrio</i> <i>Desulfomine tiedjei</i>	<i>i</i> 17:1 $\omega$ 7c; <i>i</i> 15:1 $\omega$ 7c; <i>i</i> 19:1 $\omega$ 7c 16:1 $\omega$ 8c; 16:1 $\omega$ 5c LPS-OHFA	Edlung et al., 1985 Nichols et al., 1987 Ringelberg et al., 1993
<b>Bactérias gram-positivas</b>	Ácido gordos isso e anteiso ( <i>i</i> 15:0, <i>a</i> 15:0, <i>i</i> 17:0, <i>a</i> 17:0)	Pennanen et al., 1998 Zeles et al., 1999a Zeles et al., 1999b
<b>Bactérias gram-negativas e algumas gram-positivas anaeróbias</b>	Ácidos gordos OH (3OH 16:1, 3OH18:1) Ácidos gordos monoinsaturados (16:1 $\omega$ 7c, 18:1 $\omega$ 7 <i>t</i> ) Ácidos gordos ciclopranoícos (ex: <i>cy</i> 17:0, <i>cy</i> 19:0)	Cavigelli et al., 1995 Zeles et al., 1999a Zeles et al., 1999b
<i>Arthrobacter</i>	<i>a</i> 15:0 e 17:0 em grandes quantidades	Haack et al., 1994
<i>Pseudomonas</i>	16:0 e 16:1 em proporções equivalentes 18:1 $\omega$ 7 <i>c</i> / 18: $\omega$ 9 <i>t</i> / 18: $\omega$ 12 <i>t</i>	Haack et al., 1994
<i>Vibrio cholerae</i>	11Me19:1, 18:2 $\omega$ 6,9	Guckert et al., 1986
<i>Actinomycetales</i>	Ácidos gordos 10Me (10Me 16:0; 10Me17:0)	Frostegård et al., 1993a
Metanotróficas	10Me16:0; <i>cy</i> 18.0 ( $\omega$ 7,8)	Nichols et al., 1987
<i>Thiobacillus</i>	<i>i</i> 17:1 $\omega$ 5; 10Me18:1 $\omega$ 6; 11Me18:1 $\omega$ 6	Kerger et al., 1986

A análise de PFLAs tem demonstrado ser sensível a alterações na estrutura das comunidades microbianas induzidas por contaminação com metais (Frostegård et al., 1996; Sverdrup et al., 2006), medidas de remediação de solo (Mummey et al., 2002), alterações sazonais na disponibilidade e qualidade dos resíduos orgânicos disponíveis para a comunidade microbiana (Habekost et al., 2008) e ainda a processos de preparação/gestão do uso do solo (Drijber et al., 2000). Contudo, a análise de PLFAs não permite tirar conclusões mais aprofundadas sobre alterações em populações específicas de microrganismos, devido ao facto de os PLFAs serem comuns a mais do que um grupo de microrganismos. Deste modo, os PLFAs podem ser usados para determinar diferenças entre tratamentos e se, as mesmas ocorrerem, os métodos baseados em



PCRs poderão ser úteis para identificar as populações envolvidas na resposta em causa (Ramsey et al., 2006).

A análise de PLFAs pode igualmente ser usada como um índice da biomassa microbiana do solo ou ainda para estimar a razão entre a biomassa de fungos: bactérias nas amostras analisadas, isto porque compõem uma proporção relativamente constante da biomassa das membranas celulares (Zelles et al., 1999). Balley et al. (2002) encontrou uma boa relação linear entre a biomassa microbiana determinada por CFE e o conteúdo total de PLFAs enquanto que a correlação deste último parâmetro com o SIR foi fraca. Em oposição, Drijber et al. (2000), verificou que a biomassa microbiana determinada por CFE em solos sujeitos a diferentes tipos de preparação (lavrados, não lavrados, cultivados ou em pousio) era três vezes superior à determinada com base na extracção do fósforo dos lípidos. De acordo com estes autores tal facto resulta sobretudo de diferenças fundamentais entre os métodos, pois enquanto o método CFE depende de uma resposta fisiológica, a medição do fósforo lipídico depende de um processo de extracção, cuja eficiência pode ser limitada.

De acordo com Hinojosa et al. (2005), os métodos para analisar PLFAs são demorados não sendo os mais adequados para práticas de monitorização ambiental. Deste modo, métodos mais simples e de extracção directa de ácidos gordos a partir de amostras de solo revestem-se de interesse para identificar comunidades microbianas (Schutter e Dick, 2000) em que os ácidos gordos de células microbianas são saponificados através do contacto com solução alcalina quente. De seguida os ácidos gordos livres são metilados (*do inglês*: fatty acid methyl esters - FAMES) e extraídos num solvente orgânico. Uma vez que a origem do PLFAs provem unicamente de membranas de células viáveis enquanto que os FAMES podem provir de células viáveis ou mortas assim como de células de animais ou plantas, a análise de FAMES exige cuidado na interpretação dos resultados especialmente se estes forem extraídos em grandes quantidades uma vez que neste caso se torna mais difícil tirar conclusões sobre alterações na extensão da comunidade microbiana (Hinojosa et al., 2005)

No que concerne aos métodos de avaliação da diversidade estrutural da comunidade microbiana, baseados em PCR, destaca-se o PCR-DGGE, por ser esta a metodologia destacada pela OCDE (2004) para avaliação da comunidade microbiana de solos agrícolas (Winding et al., 2005). Neste método o ADN é extraído directamente de amostras de solos, seguindo-se a amplificação de genes específicos de determinados grupos de microrganismos por PCR, utilizando *primers* específicos. Esta fase de amplificação permite aumentar as cópias dos genes em análise, facilitando a sua

detecção (Nakatsu, 2007). Geralmente utiliza-se os genes 16S rRNA para Eubacteria e Archae, e os genes 18S rRNA para fungos. Posteriormente, os diferentes fragmentos resultantes da amplificação são separados num gradiente desnaturante. A análise das comunidades microbianas pode assim ser efectuada por PCR-DGGE, quer através da comparação do perfil de bandas, quer através da sequenciação das bandas. Adicionalmente a riqueza, diversidade, equitabilidade e estabilidade das comunidades bacterianas de habitats específicos pode ser determinada com base na análise das bandas (Asakawa e Kimura, 2008). Este método apresenta contudo algumas desvantagens na medida em que pode subestimar a diversidade das comunidades dada a baixa resolução das bandas para revelar todas as sequências existentes (Asakawa e Kimura, 2008; Nakatsu, 2007). Por outro lado, Kozdroj e van Elsas (2000) evidenciaram que diferentes métodos de extração de ADN das amostras de solo, resulta em diferentes perfis, gerados por PCR-DGGE.

Não obstante estes inconvenientes, esta metodologia foi capaz de identificar diferentes perfis associados à salinização do solo (Crecchio et al., 2004), a diferentes tipos de gestão do solo (Asakawa e Kimura, 2008), ao tratamento do solo com fungicidas (Wang et al., 2009), herbicidas (Hua et al., 2009) ou ainda com metais (Zhang et al., 2009). Apresenta ainda como vantagens adicionais o facto de ser um método fidedigno, reprodutível, rápido e relativamente económico, o que permite a avaliação de um número elevado de amostras (Nakatsu et al., 2000; Nakatsu, 2007). Comparativamente a outras técnicas de análise do perfil de comunidades, o PCR-DGGE apresenta ainda a grande vantagem de poder ser acoplado a outras metodologias que permitem identificar as bandas, por excisão das bandas, re-amplificação do DNA, clonagem e sequenciação (Smalla et al., 2007).

## **1.2 Caracterização do Local de Estudo**

A região centro de Portugal caracteriza-se por uma composição geológica rica em substâncias minerais como o volfrâmio, o urânio, o feldspato, o sal-gema, o pegmatito com lítio, o caulino e o quartzo (Cardoso, 2008). Tal facto levou a que se tivessem concentrado nesta região um elevado número de minas de urânio e volfrâmio, sobretudo na região da Beira Alta, que tiveram os seus momentos áureos de exploração no período das Grandes Guerras Mundiais e durante o período da Guerra Fria. Assim e neste contexto, a exploração de minério radioactivo nesta região, começou em 1913 e terminou

em 2000, em 62 locais diferentes. Entre as minas de urânio exploradas nesta região destacam-se a mina da Cunha Baixa e da Quinta do Bispo, sendo que na primeira a exploração começou por ser efectuada através de lavra subterrânea, tendo evoluído mais tarde, entre 1970 e 1991, para exploração subterrânea (Pereira et al., 2004). Entre 1983 e 1993 procedeu-se, em ambas as áreas mineiras, à lixiviação ácida *in situ*, do minério pobre, para extracção de licores de urânio. (Pereira et al., 2004). Actualmente, a exploração cessou em ambas as áreas mineiras, as quais foram legalmente consideradas como áreas prioritárias para remediação, com intuito de mitigar os riscos que representam para a saúde humana (Dec. Lei nº 198-A/2001, de 6 de Julho e Despacho conjunto nº 242/2002, de 5 de Abril). Tais riscos derivam da deposição na zona de resíduos ricos em elevadas concentrações de metais e radionuclídeos que contribuíram para a contaminação dos recursos de água circundantes, assim como dos sedimentos e solos (Carvalho et al., 2007; Pereira et al., 2008), bem como da contínua produção de um efluente ácido, igualmente rico nestes contaminantes, que se caracteriza por ter uma elevada toxicidade para organismos aquáticos (Antunes et al. 2007a-b).

Na mina de urânio da Cunha Baixa, foi iniciado um processo de análise de risco para o compartimento terrestre, com o intuito de identificar as áreas que exigem uma intervenção prioritária, dentro da zona de exploração. Este processo de análise de risco, baseado em esquemas europeus de avaliação de riscos de locais contaminados (Weeks e Comber, 2005; Mesman et al., 2006), segue um esquema de TRIAD proposto por Chapman (1990) e integra informação correspondente a 3 linhas de evidência: química, toxicológica e ecológica. Assim, numa fase inicial de rastreio foi feita uma caracterização físico-química dos solos recolhidos em pontos localizados a distâncias crescentes da zona de exploração subterrânea (Pereira et al., 2008). Esta caracterização química permitiu identificar os locais com riscos mais elevados em virtude dos teores em metais do solo, sobretudo com base nas concentrações biodisponíveis. Esta caracterização química foi complementada com uma avaliação ecotoxicológica dos solos através da realização de ensaios de evitamento com *Eisenia fetida* (Antunes et al., 2008). Numa fase mais avançada do processo foram realizados ensaios de reprodução com oligoquetas e colêmbolos (dados não publicados), assim como ensaios de emergência e crescimento com plantas superiores (Pereira et al., 2009). Mais recentemente, a etapa 3 da análise de risco ecológico centrou-se na avaliação da comunidade microbiana do solo, através da análise da actividade de enzimas do solo (dados não publicados) e da análise de lípidos e esteróis do solo (Guedes et al., submetido). A avaliação da actividade da fauna edáfica

foi igualmente efectuada *in situ*, através de um ensaio de *Bait Lamina* (André et al., 2009).

### **1.3 Objectivos e Estrutura da Dissertação**

A presente dissertação teve assim como objectivo, contribuir para a análise de risco, em curso na mina de urânio da Cunha Baixa (Mangualde, Distrito de Viseu), nomeadamente para a linha de evidência ecológica, com informação sobre o impacto da contaminação dos solos na diversidade estrutural da comunidade microbiana. Para o efeito procedeu-se à extracção e à avaliação de ácidos gordos e de esteróis, de amostras de solo recolhidos em locais de amostragem previamente definidos na área mineira. Estas moléculas foram utilizadas como biomarcadores da comunidade microbiana e a informação obtida permitiu comparar os diferentes locais com recurso a análise multivariada.

A estrutura da dissertação engloba assim uma Introdução Geral, onde é feito um enquadramento geral da problemática, seguida de uma revisão das diferentes metodologias existentes para avaliação da comunidade microbiana do solo, quer em esquemas de avaliação da qualidade do solo, quer de avaliação de riscos. Após a descrição do objectivo do trabalho, surge o corpo da tese, em formato de artigo científico, o qual foi já submetido a publicação à revista *Applied Soil Ecology*. Este engloba a metodologia utilizada para alcançar o objectivo definido, os resultados obtidos e respectiva discussão dos mesmos à luz da informação já existente para a zona. No final apresenta-se uma pequena conclusão do trabalho efectuado.

## Referências

- Acosta-Martínez, V., Tabatabai, M.A., 2000. Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biology and Fertility of Soil* 31: 85-91.
- Ananyeva, N.D., Polyanskaya, L.M., Susyan, E.A., Vasenkina, I.V., Wirth, S., Zvyasgintsev, D.G., 2008. Comparative assessment of soil microbial biomass determined by the methods of direct microscopy and substrate induced respiration. *Microbiology* 77 (3): 356-364.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 10: 215-221.
- André, A., S.C. Antunes, F. Gonçalves, Pereira, R. Bait-lamina assay as a tool to assess the effects of metal contamination in the feeding activity of soil invertebrates within a uranium mine area. *Environmental Pollution* 157: 2368-2377.
- Antunes, S.C., de Figueiredo, D.R., Marques, S.M., Castro, B.B., Pereira, R., Gonçalves, F., 2007a. Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of Total Environment* 374: 252-259.
- Antunes, S.C., Pereira, R., Gonçalves, F., 2007a. Evaluation of the potential toxicity (acute and chronic) of sediments from abandoned uranium mine ponds. *Journal of Soils and Sediments* 7(6): 368-376.
- Antunes, S.C., Castro, B.B., Pereira, R., Gonçalves, F., 2008. Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): II. Soil ecotoxicological screening. *Science of the Total Environment* 370: 387-395.
- Asakawa, S., Kimura, M., 2008. Comparison of bacterial community structures at main habitats in paddy field ecosystem based on DGGE analysis. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 1322-1329.
- Bååth, E., Diaz-Ravina, M., Frostegard, A., Campbell, C.D., 1998. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. *Applied and Environmental* 64(1): 238-245.
- Bailey, V.L., Peacock, A.D., Smith, J.L., Holton Jr., H., 2002. Relationship between soil microbial biomass determined by chloroform fumigation-extraction, substrate induced respiration, and phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 1385-1389.
- Barrios, E., 2007. Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological Economics* 64:269-285.
- Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, T. García, C., 2008. Past, present and future of soil quality indices: a biological perspective. *Geoderma* 147: 159-171.
- Beck, L., Römbke, J., Breure, A.M., Mulder, C., 2005. Considerations for the use of soil ecological classification and assessment concepts in soil protection. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 189-200.
- Caldwell, B.A., 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. *Pedobiologia* 49:637-644.

- Cardoso, A.C.M.S.T., 2008. Explorações de Recursos Geológicos na Região Centro. Divisão de Licenciamento e Promoção Ambiental da DSA. Disponível em [www.ccdr.pt/ambiente/](http://www.ccdr.pt/ambiente/), disponível em Novembro de 2009.
- Carvalho, F.P., Madruga, M.J., Reis, M.C., Alves, J.G., Oliveira, J.M., Gouveia, J., Silva, L., 2007. Radioactivity in the environment around past radium and uranium mining sites of Portugal. *Journal of Environmental Radioactivity* 96: 39-46.
- Cavigelli M.A., Robertson G.P., Klug M.J. Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure. *Plant Soil* 170, 99, 1995.
- CEC-Commission of the European Communities, 2006. Communication from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. Thematic Strategy for Soil Protection. COM(2006)231 final, Brussels.
- Chapman, P.M., 1990. The sediment quality TRIAD approach for determining pollution-induced degradation. *The Science of the Total Environment* 97/98: 815-825.
- Crecchio, C., Gelsomino, A., Ambrosoli, R., Minati, J.L., Ruggiero, P., 2004. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 1873-1883.
- Decreto Lei nº198-A/2001, de 6 de Julho. Diário da República I Série 155 Suplemento: 4084(2)-4084(7).
- Demetz, M., Insam, H., 1999. Phosphorus availability in a forest soil determined with a respiratory assay compared to chemical methods. *Geoderma* 89: 259-271.
- Despacho conjunto nº242/2002, de 5 de Abril. Diário da República II Série, nº80: 6270-6271
- Dick, W.A., Cheng, L., Wang, P., 2000. Soil acid and alkaline phosphatase activity as pH adjustment indicators. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1915-1919.
- Drenovsky, R.E., Elliott, G.N., Graham, K.J., Scow, K.M., 2004. Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities *Soil Biology and Biochemistry* 36:1793-1800.
- Drijber, R.A., Doran, J.W., Parkhurst, A.M., Lyon, D.J., 2000. Changes in soil microbial community structure with tillage under long-term wheat-fallow management. *Soil Biology and Biochemistry* 32: 1419-1430.
- Edlund A., Nichols P.D., Roffey R., White D.C. Extractable and lipopolysaccharide fatty acid and hydroxyl acid profiles from *Desulfovibrio* species. *Journal of Lipid Research* 26,1982, 1985.
- Ekschmitt, K., Griffiths, B.S., 1998. Soil biodiversity and its implications for ecosystem functioning in a heterogeneous and variable environment. *Applied Soil Ecology* 10: 201-215.
- Filzek, P.D.B., Spurgeon, D.J., Broll, G., Svendsen, C., Hankard P.K., Kammenga, J.E. and Week, J.M. (2004). Pedological characterisation of sites along a transect from a primary cadmium/lead/zinc smelting works. *Ecotoxicology* 13, 725–737.

- Frostegård, Å., Bååth, E., Tunlid, A., 1993. Shifts in the structure of soil microbial communities in limed forests as revealed by phospholipid fatty acid analysis. *Soil Biology and Biochemistry* 25(6): 723-730.
- Frostegard A., Tunlid A., Baath E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 3605,1993a.
- Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E., 1996. Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soils experimentally contaminated with metals. *Soil Biology and Biochemistry* 28 (1): 55-63.
- Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon source utilization. *Applied and Environmental Microbiology* 57(8): 2351-2359.
- Garland, J.L., 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology, *FEMS Microbiology Ecology* 24: 289-300.
- Geisseler, D., Horwath, W.R., 2009. Relationship between carbon and nitrogen availability and extracellular enzyme activities in soil. *Pedobiologia* 53: 87-98.
- Guckert B., Hood M.A., White D.C. Phospholipid, ester-linked fatty acid profile changes in nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*. Increase in the *trans/cis* ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 794, 1986.
- Habekost, M., Eisenhauer, N., Scheu, S., Steinbeiss, S., Weigelt, A., Gleixner, G., 2008. Seasonal changes in the soil microbial community in a grassland plant diversity gradient four years after establishment. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 2588-2595.
- Hill, G.T., Mitkowski, N.A., Aldrich-Wolfe, L., Emele, L.R., Jurkonie, D.D., Ficke, A., Maldonado-Ramirez, S., Lynch, S.T., Nelson, E.B., 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology* 15:25-36.
- Hinojosa, M.B., Carreira, J.A., García-Ruíz, R., Dick, R.P. 2005. Microbial response to heavy metal-polluted soils: Community analysis from phospholipid-linked fatty acids and ester-linked fatty acids extracts. *Journal Environment Quality* 34:1789-1800.
- Hofman, J., Švihálek, J., Holoubek, I., 2004. Evaluation of functional diversity of soil microbial communities – a case study. *Plant and Soil Environment* 50(4): 141-148.
- Hua, G., Guofeng, C., Zhaoping, L.V., Hua, Z., Hong, Y., 2009. Alteration of microbial properties and community structure in soils exposed to napropamide. *Journal of Environmental Sciences* 21:494-502.
- ISO - International Organization for standardization, 1997. Soil quality: Determination of Soil Microbial Biomass, Part 2: Fumigation-Extraction Method ISSO 14240-2.
- Insam, H., Hutchinson, T.C., Reber, H.H., 1996. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. *Soil Biology and Biochemistry* 28 (4/5): 691-694.
- Jenkinson, D.S., Powlson, D.S., 1976. The effects of biocidal treatments on meyhabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 8: 209-213.

- Jensen, J., Mesman, M., 2006. Decision Charts in Ecological Risk Assessment of Contaminated Sites. In Ecological Risk Assessment of Contaminated Land. Decision support for site specific investigations. Chapter 5. Ed. por John Jensen and Miranda Mesman. RIVM report number 711701047. Liberation Project Pp 55-64.
- Jensen, J., Sorokin, N., Dirven-van Breeman, E.M., Bogolte, T., Erlacher, E., Ehlers, C., Ter Laak, T., Hartnik, T., Bierkens, J., Rutgers, M., and Mesman, M., 2006. A triad-based selection of tools for site-specific assessment of ecological risk, In Ecological Risk Assessment of Contaminated Land. Decision support for site specific investigations. Chapter 6. Ed. por John Jensen and Miranda Mesman. RIVM report number 711701047. Liberation Project Pp 65-116.
- Jordan D., Beare, M.H., 1991. A comparison of methods for estimating soil microbial biomass carbon. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 34: 35-41.
- Kang, H., Kang, S., Lee, D., 2009. Variations in soil enzyme activities in a temperate forest soil. *Ecology Research* 24:1137-1143.
- Kelly, J.J., Häggblom, M., Tate III, R.L., 1999. Changes in soil microbial communities over time resulting from one application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 1455-1465.
- Kerger B., Nichols P.D., Antworth C.P, Sand W., Bock E., Coks J.C., Langworthy T.A., White D.C. Signature fatty acids in the polar lipids of acid-producing *Thiobacilli*: methoxy, cyclopropyl, alpha-hydroxy-cyclopropyl and branched and normal monoenoic fatty acids. *FEMS Microbiology Ecology* 38, 67, 1986.
- Kozdroj, J., van Elsas, J.-D., 2000. Application of polymerase chain reaction-denaturing gel electrophoresis for comparison of direct and indirect extraction methods of soil DNA used for microbial community fingerprinting. *Biology and Fertility of Soil* 31: 372-378.
- Leckie, S.E., Prescott, C.E., Grayston, S.J., Neufeld, J.D., Mohn, W.W., 2004. Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipid fatty-acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 529-532.
- Machulla, G., Soil Microbial Indicators and their Environmental Significance. *Journal of Soils and Sediments* 3(4): 229.
- Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R., 2008. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. *Environment International* 34: 265-276.
- Mesman, M., Rutgers, M., Jensen, J., 2006. Using the TRIAD in site specific assessment of contaminated soil. In Ecological Risk Assessment of Contaminated Land. Decision support for site specific investigations. Chapter 4. Ed. por John Jensen and Miranda Mesman. RIVM report number 711701047. Liberation Project Pp 41-54.
- Mikanová, O., Javůrek, M., Šimon, T., Friedlová, M., Vach, M., 2009. The effect of tillage systems on some microbial characteristics. *Soil and Tillage Research* 105:72-76.



- Mummey, D.L.; Stahl, P.D.; Buyer, J.S.; Soil Microbiological properties 20 years after surface mine reclamation: spatial analysis of reclaimed and undisturbed sites. *Soil Biology & Biochemistry*, 2002, 34, p.1717-1725.
- Nakatsu, C.H., Torsvik, V., Øvreås, L., 2000. Soil Community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. *Soil Science Society of American Journal* 64: 1382-1388.
- Nakatsu, C.H., 2007. Soil Microbial Community Analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science Society of American Journal* 71: 562-571.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soil. In *Enzymes in the Environment. Activity, Ecology and Applications*. Ed by Burns, R.G. e Dick, R.P. Marcel and Dekker Inc., New York. Pp.1-33.
- Nichols P.D., Mancuso C.A., White D.C. Measurement of methanotroph and methanogen signature phospholipids for use in assessment of biomass and community structure in model system. *Organization Geochemistry* 11, 451, 1987.
- Nielsen, N.M.; Winding, A., 2002. Microorganisms as indicators of soil health. NERI Technical Report nº388. National Environment Research Institute, Ministry of Environment, Denmark.
- OECD – Organization for Economic Development and Cooperation, 2004. Agricultural impacts on soil erosion and soil biodiversity. Developing indicators for policy analysis. In *Proceedings of an OECD Expert Meeting, 25-28 March 2003, Rome, Italy, OECD, Paris*.
- Olsson, S & Persson, P (1999). The composition of bacterial populations in soil fractions differing in their degree of adherence to barley roots. *Applied Soil Ecology* 12: 205-215.
- Olsson P.A. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. *FEMS Microbiology Ecology*. 29, 303, 1999a.
- Pennanen T., Perkiomaki J., Kiikkila O., Vanhala P., Neuvonen S., Fritze H. Prolonged, simulated acid rain and heavy metal deposition: separated and combined effects on forest soil microbial community structure. *FEMS Microbiology Ecology* 27, 291, 1998.
- Pereira, A.J.S.C., Neves, L.J.P.F., Dias, J.M.M., Barbosa, S.V.T., 2004a. Evaluation of radionuclide contamination in the vicinity of the Cunha Baixa and Quinta do Bispo old uranium mines (Central Portugal). *Radioprotecção* 2(4/5): 103-117.
- Pereira, R., Sousa, J.P., Ribeiro, R., Gonçalves, F., 2006. Microbial indicators in mine soils (S. Domingos Mine, Portugal). *Soil and Seiment Contamination* 15(2): 147-167.
- Pereira, R., Antunes, S.C., Marques, S.M., Gonçalves, F., 2008. Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): I Soil chemical characterization. *Science of the Total Environment* 390: 377- 386.
- Pereira, R., Marques, C.R., Silva Ferreira, M.J., Neves, M.F.J.V., Caetano, A.L., Antunes, S.C., Mendo, S., Gonçalves, F., 2009. Phytotoxicity and genotoxicity of soils from an abandoned uranium mine area *Applied Soil Ecology* 42: 209-220.
- Preston-Mafham, J., Boddy, L., Randerson, P.F., 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles. *FEMS Microbiology Ecology* 42:1-14.

- Ramsey, P.W., Rilling, M.C., Feris, K.P., Holben, W.E., Gannon, J.E., 2006. Choice of methods for microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. *Pedobiologia* 50: 275-280.
- Ringelberg D.B., Townsend T., Dewaard K.A., Suflita J.M., White D.C. Detection of the anaerobic dechlorinator *Desulfomonile tiedjei* in soil by its signature lipopolysaccharide branched-long-chain hydroxy fatty acids. *FEMS Microbiology Ecology* 14, 9, 1993.
- Römbke, J., Breure, A.M., 2005. Status and outlook of ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62(2): 300-308.
- Römbke, J., Breure, A.M., Mulder, C., Rutgers, M., 2005. Legislation and ecological quality assessment of soil: implementation of ecological indication systems in Europe. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 201-210.
- Ross, D.J., 1971. Some factors influencing the estimation of dehydrogenase activities of some soils under pasture. *Soil Biology and Biochemistry* 3: 97-110.
- Rossel, D., Tarradellas, J., Bitton, G., Morel, J.-L., 1997. Use of enzymes in soil Ecotoxicology: a case for dehydrogenase and hydrolytic enzymes. In *Soil Ecotoxicology*. Ed. by Tarradellas, J., Bitton, G. E Rossel, D. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. Pp.179-205.
- Rutgers, M., Breure, A.M., 1999. Risk Assessment, Microbial Communities, and Pollution-Induced Community Tolerance. *Human and Ecological Risk Assessment* 5 (4): 661-670.
- Sardans, J., Peñuelas, J., 2005. Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean *Quercus ilex* L. forest. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 455-461.
- Schutter, M.E., Dick, R.P. 2000. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. *Soil Science Society of American Journal* 64, 1659-1668.
- Smalla, K., Oros-Sichler, M., Milling, A., Heuer, H., Baugmgarte, S., Becker, R., Neuber, G., Kropf, S., Ulrich, A., Tebbe, C.C., 2007. Bacterial diversity of soils assessed by DGGE, T-RFLP and SSCP fingerprints of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments: Do the different methods provide similar results? *Journal of Microbiological Methods* 69: 470-479.
- Sinsabaugh, R.L., 1994. Enzymic analysis of microbial pattern and process. *Biology and Fertility of Soils* 17: 69-74.
- Sowerby, A., Emmett, B., Beier, C., Tietema, A., Peñuelas, J., Estiarte, M., Van Meeteren, J.M., Hughes, S., Freeman, C., 2005. Microbial community changes in heathland soil communities along a geographical gradient: interaction with climate change manipulations. *Soil Biology & Biochemistry* 37: 1805-1813.
- Stenberg, B., 1999. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science* 49: 1-24.
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring microbial biomass carbon. *Soil Biology and Biochemistry* 19: 253-258.

- Sverdrup, L.E., Linjordet, R., Stromman, G., Hagen, S.B., van Gestel, C.A.M., Frostegard, A., Sorheim, R., 2006. Functional and community-level soil microbial responses to zinc addition may depend on test system biocomplexity. *Chemosphere* 65(10): 1747-1754.
- Wang, Y.-S-, Huang, Y.-J., Chen, W.-C., Yen, J.-H., 2009. Effect of carbendazim and pencycuron on soil bacterial community. *Journal of Hazardous Materials* 172: 84-91.
- Weeks, J.M., Comber, D.W., 2005. Ecological risk assessment of contaminated soil. *Mineralogical Magazine* 69 (5): 601-613.
- White, D., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, J.D., Bobbie, R.J., 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* 40: 51–62.
- Winding, A., Hund-Rinke, K., Rutgers, M., 2005. The use of microorganisms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62: 230-248.
- Wu, Y., Ding, Na, Wang, G., Xu, J., Wu, J., Brookes, P.C., 2009. Effects of different soil weights, storage times and extraction methods on soil phospholipid fatty acid analyses. *Geoderma* 150: 171-178.
- Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* 29, 111, 1999a.
- Zelles L. Identification of single cultured micro-organisms based on their whole-community fatty acid profiles, using an extended extraction procedure. *Chemosphere* 39, 665, 1999b.
- Zhang, Y., Zhang, H.-W., Su, Z.-C., Zhang, C.-G-, 2008. Soil microbial characteristics under long-term heavy metal stress: a case study in Zhangshi wastewater irrigation area, Shenyang, *Pedosphere* 18 (1):1-10.
- Zhang, Y., Zhang, X., Zhang, H., He, Q., Zhou, Q., Su, Z., Zhang, C., 2009. Responses of soil bacteria to long –term and short-term cadmium stress as revealed by microbial community analysis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 82: 367-372.



**Capítulo 1**  
**Sterols and fatty acid biomarkers as indicators of changes in soil  
microbial communities in a uranium mine area**

Artigo submetido à revista *Applied Soil Ecology* em 12 de Novembro de 2009



## **Abstract**

Included in the tier 3 of a site specific risk assessment that is being carried out in an abandoned uranium mine (Cunha Baixa uranium mine, Central Portugal), fatty acids biomarkers and sterols were analyzed to assess the impact of soil contamination with metals and radionuclides in the structure of the microbial community in seven sampling sites at different distances (A-D-E-F-G-H-I) from the mine. Surface soil samples were collected in those sampling sites in the four different seasons of the year (November, February, May and August). After extraction and methylation, fatty acids were quantified by gas-chromatography coupled to a mass spectrometry (GC-MS); sterols were also quantified by GC-MS after extraction and derivatization procedures. Principal component analysis (PCA) was performed on fatty acid biomarkers and sterol data. Subsequently PCA scores obtained for both components were used to test the effect of sites and seasons, on soil samples collected in Cunha Baixa uranium mine, through bi-factorial ANOVAS. Through PCA analysis, two distinct groups were set apart along the first two components. One group included sites at a great distance from the mine (E, H, and I) which were correlated with higher contents of iC15:0 and iC17:0, both indicators of Gram-positive bacteria, as well as with the three sterols detected. The second group, in turn, was composed of the sampling sites most impacted by ore exploration, *in situ* leaching of poor ore, and spread of sludge from the effluent treatment pond (A, D, F and G). These sites were correlated with higher levels of iC16:0 (Gram-positive bacteria indicator), cyC17:0 (generally common in gram negative bacteria) and C18:0 and C17:0 biomarkers of non-specific bacteria. The profile of fatty acids obtained in the sampling sites revealed variable predominance of groups of bacteria which are a clear indication of differences in the soil microbial communities that are directly related to the environmental conditions prevailing in the uranium mine area.

## **1. Introduction**

Significant changes in the microbial community can occur following drastic disturbances (e.g. mining activity), both in terms of total microbial biomass and microbial species composition (Mummey et al., 2002a,b). Soil microbial communities are of critical importance for the ecological functioning of a terrestrial ecosystem; disturbance of soil

ecosystems that impacts normal functioning of microbial community structure is potentially detrimental to soil formation, energy transfers, nutrient cycling, plant reestablishment and long-term stability (Mummey et al., 2002a).

Classical culture-dependent microbial methods have limited an in-depth evaluation of environmental samples (Piotrowska-Seget and Mroziak, 2003) and, subsequently, of the impact of contaminants on soil microbial communities. More recently methods which permit the examination of microbial communities through the analysis of biomarkers such as methyl ester fatty acids (FAME) and phospholipid fatty acids (PLFA) directly extracted from soil have been extensively used as sensitive and reproducible measurements for characterizing the numerically dominant portion of soil communities and to detect responses to various environmental stresses in different ecosystems (Schutter and Dick, 2000; Kaur, 2005, Joergensen & Emmerling 2006, Dong 2008, Liang 2008, Kindler 2009). According to Drenosvsky et al. (2004), among different possible biomarkers, lipids are relevant for investigating and characterizing microbial communities due to their chemical diversity and cellular abundance. Furthermore, using multivariate statistical analyses, the variation in fatty acid composition extracted from environmental samples can reveal differences between microbial communities (Macalady et al., 2000).

Sterols have also been used as biomarkers (Shah et al., 2007; Nash et al., 2005). Ergosterol, in particular, which is found almost exclusively in fungi, is frequently used as an indicator of fungal biomass (Mille-Lindbom et al. 2004). Cholesterol, a sterol present in the membrane of animal cells, may either be reduced to coprostanol by intestinal bacteria or transformed into cholestanol by microbial reduction in an environment matrix such as soil (Bull et al., 2002), becoming indicators of microbial activity of different origin in the environmental samples.

Abandoned contaminated sites, such as mines or industrial facilities, are fairly common and usually exhibit high levels of environmental contamination. This work aimed to assess the impact of soil contamination with metals and radionuclides on the structural diversity of the microbial community by determining fatty acid biomarkers and sterols in soils collected in seven sampling sites at different distances from the mine pit. This study was carried out in the Cunha Baixa uranium mine (Mangualde - Central Portugal), as a part of the tier 3 of an ongoing site-specific risk assessment for the terrestrial compartment (Antunes et al., 2008; Pereira et al., 2008; André et al., 2009; Pereira et al., 2009), following European risk assessment frameworks (Weeks and Comber, 2005; Mesman et al., 2006) which foresee the integration of information from three lines of evidence (LoE): chemical, ecotoxicological and ecological. We have hypothesized that soils most impacted by metal

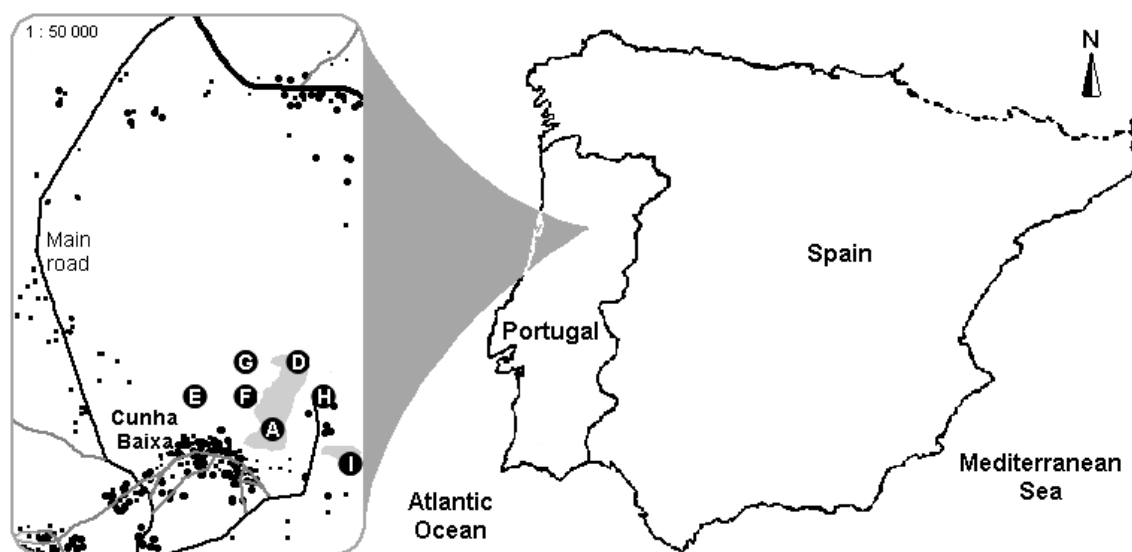


contamination, with their habitat function for plants and invertebrates compromised, have a different soil microbial community composition than the reference soil.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. General characterization of the study area*

Field work was conducted in the vicinity of an inactive uranium mine located in Cunha Baixa (Mangualde, Central Portugal) (Figure 1). The site specific risk assessment of the terrestrial compartment in this area started with an extensive physical and chemical characterization of soils (Pereira et al., 2008) collected at 10 sampling sites (named by the letters A-J) located in an increasing distance from the mine pit (Figure 1).



**Figure 1.** Schematic representation of study area showing sampling sites (A, D, E, F, G, H, and I). Black and grey lines represent main and secondary roads, respectively, while black circles represent houses. Grey areas represent the abandoned mining areas.

This work describes geographical coordinates of each site as well as a general physical and chemical characterization of soils including pH, organic matter content, moisture content, conductivity, water holding capacity, particle size distribution, and pseudo-total and available metal concentrations evaluated through the analysis of soil extracts from the different sites obtained both with aqua regia and artificial rain water (for more details please see Table 2).

**Table 2** - Heavy metal concentrations extracted with artificial rain water and with aqua regia from soils collected in Cunha Baixa uranium mine area (Pereira et al., 2008).

	A	D	E	F	G	H	I
<i>Heavy metal concentrations extracted with artificial rain water – 1 Week (mg/kg dry soil)</i>							
Al	205.3±3.2	0.76±0.0	1.54±0.0	64.9±0.4	7.17±0.8	4.21±0.2	74.2±0.6
Be	0.33±0.0	0.00±0.0	0.03±0.0	0.26±0.0	0.00±0.0	0.03±0.0	0.00±0.0
Cd	0.02±0.0	0.00±0.0	0.11±0.0	0.01±0.0	0.05±0.0	0.17±0.0	0.00±0.0
Co	0.34±0.0	0.04±0.0	0.04±0.0	0.08±0.0	0.05±0.0	0.21±0.0	0.01±0.0
Cu	1.88±0.1	0.00±0.0	0.00±0.0	0.14±0.0	0.67±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0
Fe	0.95±0.1	0.00±0.0	0.00±0.0	1.01±0.1	8.88±0.0	0.94±0.2	0.00±0.0
Mn	15.5±0.2	6.07±0.3	31.0±1.3	21.9±0.5	25.0±0.9	39.8±0.2	12.0±0.4
Ni	0.60±0.0	0.11±0.0	0.15±0.0	0.53±0.0	1.24±0.0	0.45±0.0	0.08±0.0
Pb	0.81±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.00±0.0	0.27±0.0	0.00±0.0
Sr	2.59±0.0	11.7±0.0	8.33±0.0	2.17±0.0	3.21±0.0	7.00±0.0	3.15±0.0
U	41.3±0.0	1.09±0.0	0.43±0.0	2.09±0.0	0.45±0.0	0.62±0.0	0.18±0.0
Zn	0.00±0.0	0.00±0.0	6.55±0.0	3.06±0.0	7.39±0.0	20.0±0.0	0.00±0.0
<i>Heavy metal pseudo-total concentrations – extraction with Aqua Regia (mg/kg dry soil)</i>							
Al	544.7 ±7.6	43478 ±1681	9007.0 ±4184	13404 ±512	16642 ±1731	15974 ±811	3963.3 ±150
Be	0.12±0.0	103.87±3.2	2.34±1.1	2.70±0.2	6.45±1.1	1.20±0.0	1.29±0.1
Cd	0.01±0.0	4.43±0.2	0.02±0.0	0.04±0.0	0.28±0.0	0.06±0.0	0.03±0.0
Co	0.23±0.1	136.98±3.8	1.18±0.5	2.73±0.3	6.80±0.8	2.02±0.1	1.75±0.1
Cu	0.53±0.0	79.74±2.6	9.62±4.2	3.76±0.2	13.92±2.1	31.33±1.1	9.23±1.1
Fe	617.4 ±7.4	22315 ±846	4747.0 ±2142	9984.5 ±264	10282 ±610	9200.2 ±310	2650.0 ±99.7
Mn	8.41 ±1.4	7721.3 ±190	93.86 ±43.6	295.32 ±22.2	582.16 ±38.8	197.48 ±14.7	287.83 ±9.7
Ni	0.29±0.0	147.58±3.0	0.70±0.3	3.26±0.3	9.92±1.5	1.55±0.1	2.08±0.2
Pb	0.99±0.0	4.50±0.0	5.40±0.2	6.74±0.4	9.97±1.2	26.07±1.1	9.22±0.6
Sr	0.15±0.0	3.87±0.1	0.37±0.2	2.50±0.1	2.48±0.1	2.48±0.2	7.51±0.2
U	13.34 ±0.2	1245.1 ±17.4	524.14 ±249	122.00 ±8.3	239.45 ±14.6	225.84 ±17.9	16.36 ±0.5
Zn	2.78 ±0.1	826.99 ±23.5	14.60 ±6.5	43.05 ±0.4	54.34 ±6.0	47.41 ±2.7	27.59 ±1.1

Results gathered by Pereira et al. (2008) showed that all the soils have concentrations of Al and U above soil quality guideline values (SQGVs), while only some soils showed concentrations of Be, Mn, Cu, Cd, Co, Ni and Zn surpassing such values when aqua regia extracts, were analyzed. In opposition, and based on artificial rain water extracts only soils located near the exploration area (A, C and D) and the site at the greatest distance from the mine (J) showed available concentrations of U and Al above

SQGVs (Pereira et al., 2008). Thus, based on the chemical line of evidence (LoE), these sites were those presenting higher risks. However, screening ecotoxicological data provided by avoidance assays with earthworms showed that soil habitat function was not only compromised at sites A, C, and D, but also on other sampling sites (B, F and G) (Antunes et al., 2008). Additionally, most soils from the mining area have significantly compromised the growth of lettuce plants, both when evaluation was performed based on wet biomass (A, C, D, G, H and J) and on dry biomass (for all the soil) of plants and compared with plants grown at the site I, the reference site (Pereira et al., 2009). Such observations have been justified to follow up with risk assessment, collecting data for the ecological LoE.

## *2.2. Soil sampling and pre-treatment procedures*

Sample collection was conducted four times over one year (in February, May, August, and November) to account for seasonal variation in soil communities. Sites A, D, E, F, G, H and I of those previously defined by Pereira et al. (2008), were selected for analysis. Sites B and C were not considered, as the impact on these soils, due to deposits of sludge from the effluent treatment pond, rich in metals and radionuclides, led the author made us to expect similar effects as those registered for site D.

In each site, ten soil samples (up to 10 cm depth, excluding leaf litter) were randomly collected for the determination of sterols and fatty acids, in a total of 280 soil samples collected (4 sampling times x 7 sites x 10 replicate samples). Each soil sample was hand mixed on site and coarse materials, such as plant roots and stones, were removed. In the laboratory, air dried samples were sieved (2 mm) and stored in polyethylene bags at -20 °C until further analysis. From the ten soil samples collected at each sampling point, a composite sample was made, from which three replicates were withdrawn for analysis of fatty acids and sterols. To obtain a composite soil sample, the soil from the ten samples was mixed, homogenized and spread in a square which was divided in four equal parts and the soil present in two of these portions was rejected. This procedure was repeated twice and the remaining soil was divided in three portions consisting of three replicas of each composed soil sample. This procedure reduced the number of soil samples from 280 to 84, were submitted to extraction procedures.

### *2.3. Analytical procedures*

The first steps for extracting fatty acids from soil replicates consisted in weighing 1.0 g of soil to a round-bottomed flask of 100 mL and adding 10.0 mL of potassium hydroxide (KOH, 0.2 M, Eka Chemicals AB) in methanol (Riedel- de Haën). The samples were placed in an oven (Binder), at 37 °C, for 1 hour, with manual agitation every 15 minutes. Afterwards, 1.0 mL of acetic acid 1N (Ridel de Haën) and 5.0 mL of hexane (99%, Fluka) were added to each soil sample, which was homogenized for 1 minute, followed by 30 minutes ultrasonic bath (57 Hiney Ultra sonic). The hexane layer formed on the top during the ultrasonic sample treatment was collected by aspiration. The organic phase was filtered with anhydrous sodium sulfate (Sigma) and brought to dryness with a rotary evaporator (Laborato 4000, Heidolph). The residue was re-dissolved in 1.0 mL of dichloromethane/hexane (1:1) and then filtered in a silica gel column (Macherey-Nagel) pre-conditioned with 1.0 mL of dichloromethane/hexane (1:1) (Lab-scan) and 1.0 mL of diethyl ether (Panreac, Spain), in order to eliminate any interferences. The fatty acids of interest were eluted from the column by adding 1.0 mL of diethyl ether twice. Each sample eluate was transferred to microreaction vessels. After solvent evaporation, 500 µL of hexane were added to the dry extract. Then 100 µL of sodium hydroxide (1N) were added and the extract was stirred vigorously with a vortex for 1 minute. The extract was placed at 70 °C for 15 minutes and left to cool at room temperature for a few minutes. 200 µL of boron trifluoride (14%, Sigma) were added and stirred vigorously. Then was left to stand for 30 minutes at room temperature. Finally, 200 µL of hexane were added to the sample extract followed by stirring. The analysis of the fatty acids methyl ester (FAME) present in the extracts was carried out by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS, QP-5000, SHIMAZDU), operated in SIM mode. The temperature program started at 80 °C (maintained for 1 minute), rising up to 220 °C with a program rate of 3 °C min<sup>-1</sup>, and to 290 °C with a program rate of 6 °C min<sup>-1</sup>. The initial pressure was maintained at 50 kPa for 1 minute, rising up to 90 kPa at 1.5 kPa/min and at 0.7 kPa/min to 110 kPa, remaining at this value until the end of the program (3.09 min). Calibration models were built by injection of 1 µL of different concentrations of standard solutions (FAME and BAME standard, Supelco 47885-U and 47080-U, respectively). 10Me16:0, 10Me17:0 and 10Me18:0 in turn were identified using the GC-MS SCAN method and quantified using GC-MS SIM method by internal standard with C19:0. The concentration of each compound was determined by direct interpolation in the standard curve within its linear dynamic range and the detection limits were calculated using  $y=y_B+3S_B$ , where  $S_B$  is the

SD of the blank signal estimated as  $s_{y/x}$ , the residual SD taken from the calibration line, and  $y_B$  is the blank signal estimated from the intercept also taken from the calibration line (Miller and Miller, 2005). Recovery tests were carried out to ensure effectiveness of the extraction procedure of FAME from the complex matrix of soil. Matrix spikes were prepared by adding each FAME in a known concentration.

The first step for extraction of sterols from the soil replicates consisted in weighing 0.3 g of soil to a 50 mL glass, adding 3 mL of KOH 10% in methanol and heating at 70 °C for 45 minutes. After cooling, 1 mL of water was added and the samples were extracted three times with 2 mL of hexane. After solvent evaporation, the samples were dissolved in 1 mL of dicloromethane-hexane (1:1, v/v) and applied to a disposable silica gel column (preconditioned with 1 mL of ether and 1 mL of dichloromethane-hexane). The elution of sterols was performed with two portions of 1 mL of diethyl ether each. After evaporation of the solvent, trimethylsilyl derivatives were formed using 250  $\mu$ L of pyridine (Fluka), 250  $\mu$ L of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA, Fluka) and 50  $\mu$ L of trimethylsilyl chloride (TMSCL, Sigma-Aldrich) after 30 minutes at 70 °C. Following the derivatization, the sterols were measured for M/Z 396.66 using GC-MS operating in SIM mode. The temperature program started at 80 °C (maintained for 1 minute), rising up to 300 °C with a program rate of 8 °C/min. The initial pressure was maintained at 50 kPa for 1 minute, rising up to 90 kPa at 1.5 kPa/min and at 0.7 kPa/min to 110 kPa, remaining at this value until the end of the program (3,09 min). Calibration models were built by injection of 1  $\mu$ L of different concentrations of standard solutions (ergosterol, Supelco 47130-U; cholesterol Supelco 47127-U; cholestanol 47129-U, coprostan-3-ol, Aldrich C7578). The concentration of each compound and recovery was determined according to the same method performed for FAME's. Fatty acids are designated by the total number of carbons atoms followed by the total of double bonds beginning with the position of the double bond closest to the methyl end (n or  $\omega$ ) of the molecule. The configuration of the double bond is designated by "c" for cis or "t" for trans. The prefixes a, i and cy refer to anteiso, iso and cyclopropyl branching fatty acids. The number followed by ME indicates the position of a methyl group (i.e. 10Me16:0) whereas the number preceded by OH indicates the position of this group from the carboxylic end of fatty acid (i.e., 2-OHC14:0).

## **2.4 .Statistical analysis**

Data are presented as the mean plus the standard deviation of three pseudo-replicates (obtained from composite samples) analyzed for each biomarker.

A principal component analysis (PCA) was performed with statistical software package SPSS 17.0 for Windows to integrate and reduce information related with all the fatty acid biomarkers and sterols analyzed in a small number of components, without losing information, and to analyze relationships between sites with different levels of contamination. To meet this final purpose PCA scores for the first two components were used as dependent variables in bi-factorial ANOVAS (General Linear Model) to test the effect of season and site factors in their variability. The significance of the interaction between both factors was also analyzed.

## **3. Results and Discussion**

Six different methylated fatty acids were above the detection limit in soils of the different sampling sites around the mine in the four seasons of the year. According to the fatty acids extraction and analysis procedures, 40 different FAMES were analyzed (C4:0; C6:0; C8:0; C10:0; C11:0; C12:0; C13:0; C14:1n5c; C14:0; C15:1; C15:0; C16:0; C16:1n7c; C17:0; C17:1; C18:1n9c; C18:1n9t; C18:0; C18:2n6c; C18:2n6t; C18:3n6; C18:3n3; C20:1n9; C20:0; C21:0; C20:3n6; C20:3n3; C20:2; C23:0; C24:1n9; C24:0; iC15:0; aC15:0; 2-OHC14:0; 3-OHC14:0; iC16:0; iC17:0; cyC17:0; 2-OHC16:0 and cyC19:0) based on FAME and BAME standards used in this study as well as 10Me16:0, 10Me17:0 and 10Me18:0 through the internal standard method. The recovery values for three replicate samples (randomly selected) of soil varied between 99.2 and 99.9%, suggesting a high level of efficiency in the extraction of all the FAMES studied in these soil samples.

Different assignments are attributed to different fatty acid biomarkers by a number of authors for making inferences about the microbial community (bacteria and fungi) profiles of natural soil samples. Thus, according to Kaur et al. (2005), Piotrowska-Seget et al. (2003) and Myers et al. (2001), a dominance of microbial groups in the soil samples analyzed can be inferred from the abundance of the bacterial biomarker fatty acids such, as iC15:0, iC16:0, iC17:0, which are indicators of Gram-positive bacteria; cyC17:0 indicator of Gram-negative bacteria and C17:0 and C18:0 as nonspecific bacterial

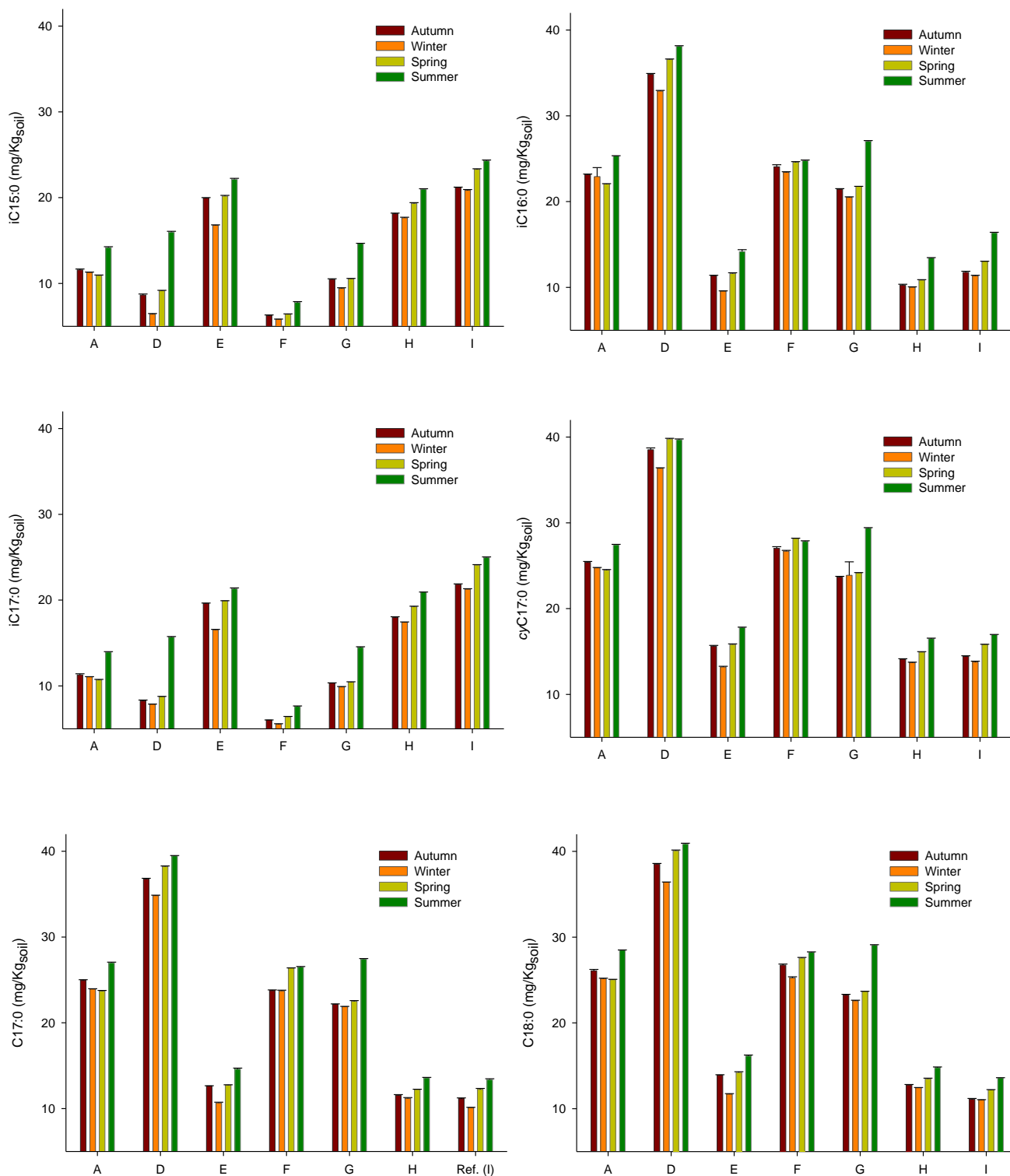
biomarkers. FAME biomarkers for Gram-positive actinomycetes such as 10Me16:0, 10Me17:0 and 10Me18:0 were detected at concentrations below the detection limit (<68.2, <72.1 and <70.4 ng Kg<sup>-1</sup>, respectively).

The highest values (> 20 mg kg<sup>-1</sup> soil) were observed for iC16:0, cyC17:0 as well for C17:0 and C18:0 fatty acid biomarkers in sites A, D, F, and G, which, in turn, were characterized by the lowest values of iC15:0 and iC17:0, respectively (Figure 2). According to the ecotoxicological screening evaluation published by Antunes et al. (2008), soil F was classified as highly toxic whereas soils A, D, and G were classified as toxic and moderately toxic, respectively. The opposite, i.e. higher values of iC15:0 and iC17:0 and lower values for other detected FAMES, were observed for sites E, H, and I which were classified as non-toxic soil (Antunes et al., 2008). In fact, Mummey et al. (2002a) indicated that all fatty acid biomarkers analyzed were significantly lower in mining soil than in undisturbed soil even after surface reclamation has been carried out. These authors also indicated that despite the total recovery of vegetation cover to a pre-disturbance condition, the total microbial biomass remained greatly reduced in comparison with the undisturbed soil. Consistent with other studies (Frostegård et al., 1993) the Gram-negative bacteria have dominated in the most contaminated Cunha Baixa uranium mine soils. The greater survival of Gram-negative bacteria under stress conditions could be attributed to the presence of the cyclo fatty acids in their membrane (Guckert et al., 1986) and the outer lipopolysacchride layer which can counteract the stress. It is usually thought that Gram-negative bacteria dominate in metal contaminated soils compared to Gram-positive bacteria. However, contradictory evidence is also reported (Pennanen et al., 1996), resulting in variable response of bacterial community to heavy metal stress. The highest level of cyC17:0 was also recorded in the most toxic soils (A, D, F, and G) reinforcing the use of this biomarker as an indicator of environmental stress. Cyclopropyl fatty acids (cyC17:0, cy19:0) are formed by transmethylation of cis monounsaturated fatty acids (16:1n7c, 18:1n7c) as the cell enters the stationary phase, a phenomena that helps the maintenance of functional living membranes, minimizing losses of membrane lipids or changes in membrane fluidity owing to cellular degradation during stress conditions (Guckert et al., 1986). The transformation of cis double bonds to cyclopropane ring restricts the overall mobility, which helps in reducing the impact of environmental stress on membrane fluidity (Kaur et al., 2005).

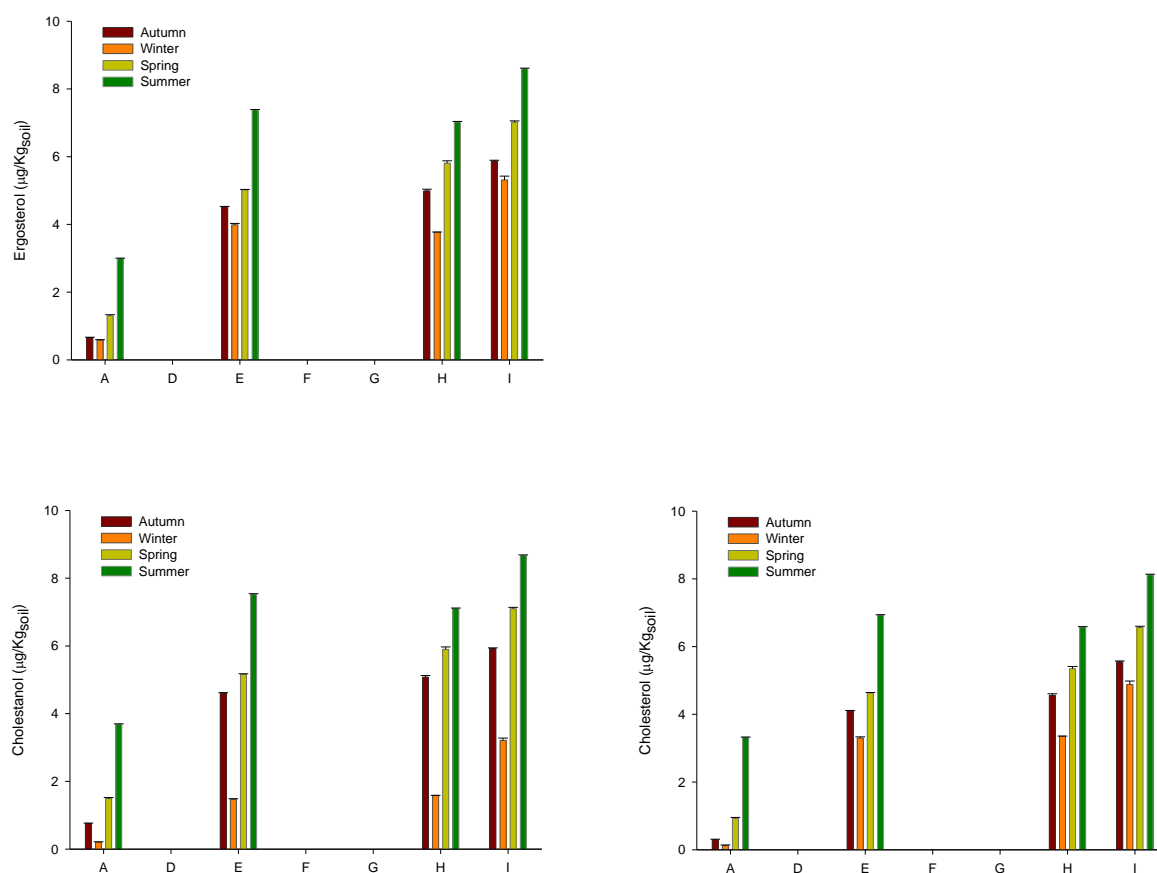
No fatty acids biomarkers for fungi have been identified since, C18:2n6c, C18:2n6t, C18:3n6 and C18:3n3 fatty acids were all detected at concentrations below the detection limit (<45.7, <45.8, <50.3 and <50.5 ng Kg<sup>-1</sup>, respectively). The absence, or at least the

residual presence of fungi in the most impacted soils was reinforced by the low level (site A) or even by levels below the detection limit of ergosterol (sites D, F and G) (Figure 3). Ergosterol content can be a useful indicator of living fungal biomass in polluted soils (Barajas-Aceves et al., 2002; Mille-Lindblom et al., 2004). However, despite the surprising absence of fatty acid biomarkers for fungi, ergosterol was recorded in the lowest toxic sites (E, H and I). Kaur et al. (2005) also found a negative correlation between fungal biomarker and the intensity of physical disturbance (Bååth et al., 1995; Bardgett et al., 2001; Calderson et al., 2000-2001, Gattinger et al., 2002). Other authors have demonstrated the impact of chemical disturbances like heavy metal addition and pesticide application on fungi biomarkers (Frostegård et al., 1993; Pennanen et al., 1996; Schimdt et al., 2000). The reduced levels of 18:2n6 in soil contaminated with heavy metal could be related to decline in ectomycorrhizal fungi because of damage to the fine roots of trees with subsequent loss of rhizosphere habitats for mycorrhizal fungi (Pennan et al., 1996). This could be a possible explanation for the apparent absence of fungi from sites D and G, correlated with a near absence of vegetation especially at site D. Site F is covered by a pine tree forest, with serious symptoms of sickness; these trees are growing on pore ore and are under the influence of runoffs from the effluent treatment pond. Kelly et al. (1999) further observed the same decline in 18:2n6c biomarker in field studies, contrary to laboratorial microcosm studies aimed at evaluating changes in microbial communities resulting from zinc applications to soils. Contrastingly our results were not coincident with other studies which report a lower sensitivity of fungi to metal contaminated soils (e.g. Frostegård et al., 1996; Khan and Scullion, 2000). Thus, factors other than contamination may contribute to the apparent absence of fungi, or of ergosterol, in at least the most toxic soils (e.g. continuous exposure to solar radiation in site D) (Mille-Lindblom et al., 2004). Further, the use of ergosterol as a biomarker for the fungi community may underestimate the presence of Oomycetes, which do not produce ergosterol. The high bioabsorption capacity of the cell wall of this group (Souza et al., 2008) may increase their resistance to metal contaminated soils. However, additional studies are required to confirm the presence of fungi in uranium mine soils.





**Figure 2.** Mean values of three replicates for iC15:0, iC16:0, iC17:0, cycloC17:0, C17:0 e C18:0 present in the soil of the different sampling sites (A, D, E, F, G, H, and I) around the mine around Mine through the four seasons.



**Figure 3.** Mean values of three replicas for ergosterol, cholestanol and cholesterol present in the soil of the different sampling sites (A, D, E, F, G, H, and I) around the mine around Mine through the four seasons.

According to data represented in figure 3 for sterols analyzed other than cholesterol, the pattern was the same since each was recorded above detection limit on the high toxic sites, i.e. D, F, and G. In soils with lower toxicity, such as E, H and I as well as in soil A, cholestanol and cholesterol were identified. Both of these sterols were detected in higher quantities in the soils of sites E, H, and I. Cholesterol is an important membrane component of animal cells but exists in vestigial traces in plant tissues (Christie, 1989). In soil, it is mainly transformed into cholestanol through microbial processes (Bull et al. 2002). This reaction occurs mainly in anaerobic reducing environments and the cholestanol/cholesterol ratio may be used as a secondary biomarker for such conditions. The presence of cholesterol and cholestanol in the soils of sites E, H and I correlates with the higher amount of iso fatty acids detected, which is a clear indication of high bacterial activity in these soils, especially in samples collected in spring and summer. The ratio cholestanol/cholesterol was similar in sites E, H, and I (Table 3) in soil samples collected

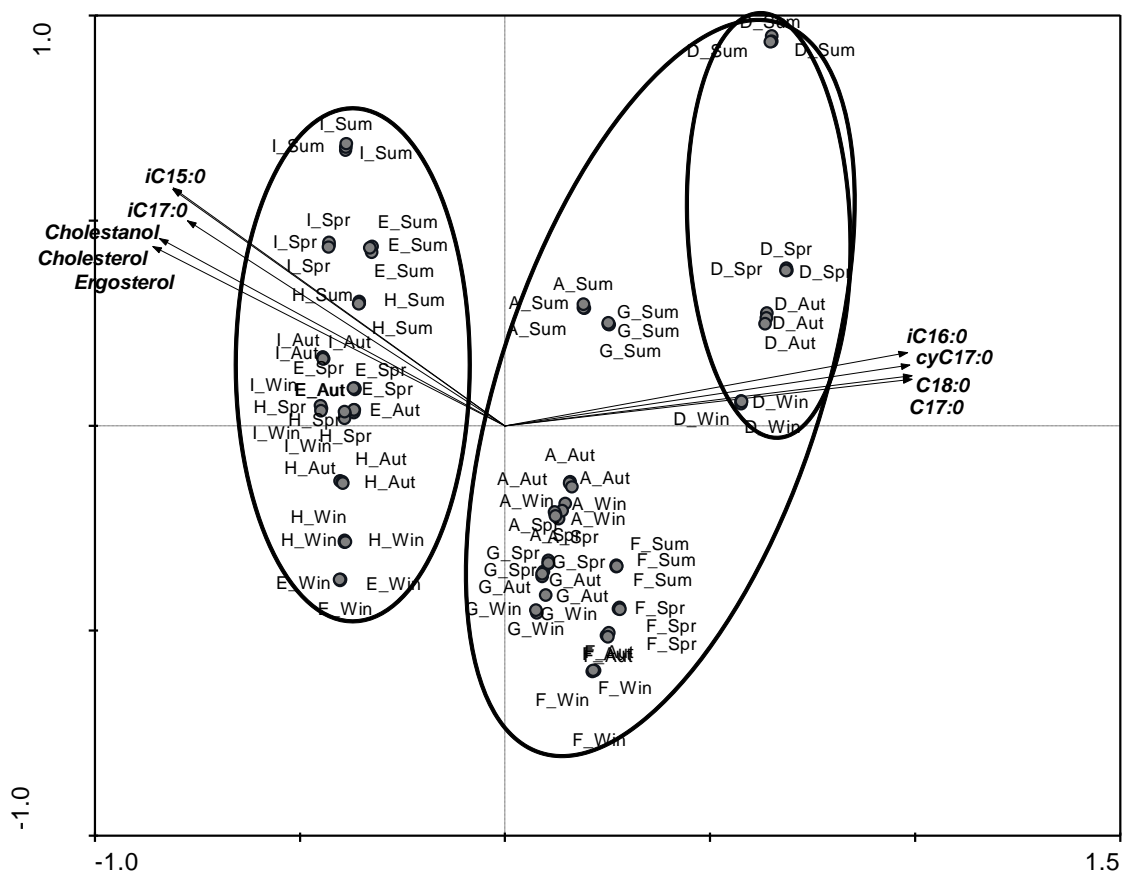
in autumn, winter and spring but lower in the samples collected in summer. This fact could be related to the water content of the soil, which was extremely lower in summer, when compared with other seasons affecting the microbial activity in the soil (Antunes et al., unpublished data). Higher levels for this ratio were achieved at site A, especially in the samples collected in the spring, probably due to a more reducing environment in the soil, resulting from higher physical disturbances which can promote soil compaction.

**Table 3** - Total FAME's (mg/Kgsoil), percentage of Gram-positive, Gram-negative bacteria and of non-specific bacteria and ratio of cholestanol/cholesterol in the different soil samples around Mine through the four seasons.

Sampling Sites - Mine	Season	Total Fatty acids (mg/Kg <sub>soil</sub> )	Gram Pos. Bacteria (%)	Gram Neg. Bacteria (%)	Non-specific bacteria (%)	Cholestanol/Cholesterol ratio
A	Autumn	122.4	37.6	20.7	41.7	1,60
	Winter	119.1	38.0	20.8	41.2	1,11
	Spring	116.9	37.4	21.0	41.7	2,54
	Summer	136.4	39.2	20.1	40.7	1,65
D	Autumn	165.5	31.2	23.3	45.4	-
	Winter	154.8	30.5	23.5	46.0	-
	Spring	172.6	31.6	23.0	45.4	-
	Summer	189.8	36.8	20.9	42.3	-
E	Autumn	93.1	54.7	16.8	28.5	1,11
	Winter	78.4	54.7	16.8	28.5	1,09
	Spring	94.5	54.7	16.7	28.5	1,12
	Summer	106.2	54.3	16.8	29.0	0,45
F	Autumn	115.6	31.4	23.4	45.2	-
	Winter	110.4	31.5	24.2	44.3	-
	Spring	119.5	31.3	23.6	45.2	-
	Summer	122.7	32.7	22.7	44.6	-
G	Autumn	111.3	37.9	21.3	40.8	-
	Winter	108.1	36.8	22.1	41.1	-
	Spring	113.1	37.8	21.4	40.8	-
	Summer	142.1	39.5	20.7	39.8	-
H	Autumn	84.8	54.7	16.6	28.7	1,10
	Winter	82.4	54.7	16.6	28.7	1,08
	Spring	90.0	54.9	16.6	28.5	1,11
	Summer	100.2	55.2	16.5	28.3	0,47
I	Autumn	91.4	59.9	15.8	24.3	1,08
	Winter	88.4	60.5	15.6	23.9	1,07
	Spring	100.6	60.0	15.7	24.3	1,07
	Summer	109.6	59.9	15.5	24.6	0,66

The principal component analyses showed that all the fatty acid and sterol biomarkers could be reduced to two components which explain 97.27% of the total variation among soil samples collected in the Cunha Baixa uranium mine area. According to data shown in Figure 4 and table 4, all variables contributed positively and with similar weight to

component 2 (y axis). For component 1, only iC16:0, C17:0, C18:0, and cyC17:0 contributed positively but, again, all variables presented similar weight on this component.



**Figure 4.** PCA biplot of soil samples (sites A, D, E, F, G, H, and I) from the Cunha Baixa area based on determined fatty acid biomarkers and sterols evaluated in the four seasons (Aut:Autumn, Win:Winter, Spr:Spring, Sum\_Summer).

**Table 4** Coefficients of the two principal components explaining 97.0% of total variation.

Variable	Component 1	Component 2
C17:0	0.930	0.365
C18:0	0.932	0.357
iC15:0	-0.914	0.322
iC16:0	0.906	0.416
iC17:0	-0.914	0.326
cyC17:0	0.918	0.392
Ergosterol	-0.958	0.248
Cholesterol	-0.899	0.353
Cholestanol	-0.948	0.275

A significant effect of sites and seasons was recorded for PCA scores obtained for components 1 and 2 (Table 5). A significant interaction among sites and seasons were recorded as well, for both components (Table 5).

**Table 5** - F statistics for bi-factorial ANOVA, testing the effects of site and seasons on PCA scores for both components ( $p < 0.001$  for all the tests).

Component 1	F
Site	276366.9
Season	4761.1
Site X Season	924.4
Component 2	
Site	25222.4
Season	16710.0
Site X Season	708.1

Considering component 1 (x axis), and based on F values, the contribution of sites was two orders of magnitude greater than that of seasons for the variability among scores given to soil samples analyzed. This explains the segregation of two distinct groups of soil samples which were set apart along component 1 (Figure 4). One group included sites at a great distance from the mine (E, H, and I), which were correlated with higher contents of iC15:0 and iC17:0, both fatty acid biomarkers of Gram-positive bacteria, as well as with the three sterols (ergosterol, cholesterol and cholestanol). The second group, in turn, was composed of soil samples from sites A, D, F, and G, most impacted by ore exploration, *in situ* leaching of poor ore, performed in the past, and actual spread of sludge from the effluent treatment pond. These sites were correlated with higher contents of iC16:0 (Gram-positive bacteria biomarker), cyC17:0 (Gram-negative bacteria biomarker), C18:0 and C17:0 (biomarkers of non-specific bacteria). These biomarkers were particularly correlated with site D (summer, autumn and winter). With respect to component 2 (y axis), both sites and seasons have a similar influence on the distribution of PCA scores. In other words, the influence of seasons did not allow a great discrimination between sites, previously included on groups described above. Only soil samples from site D seemed to be less influenced by season, and were all separated into another subgroup of samples. Biotic and abiotic factors other than metal contamination and seasonal variation, may contribute for the separation of this site from the other, namely total absence of vegetation, high levels of radioactivity (Pereira et al., 2008) etc.

For total content of fatty acid biomarkers (Table 2) which may give an idea of microbial community biomass, higher levels were detected in the soils with higher toxicity namely, in site D followed by sites A, F, and G. In opposition, lower amounts of total fatty acid biomarkers were found in the less toxic sites (E, H, and I). This variation – which contrasts with those published by Hinojosa et al., (2005) where lower total fatty acid content was found in reclaimed and polluted soils, with respect to nonpolluted soils – could be related with the microbial community (diversity vs population) present in different sampling sites, namely the development of mechanisms of tolerance or with the successful establishment of more tolerant species after soil disturbance, as suggested by other authors (Frostegård et al., 1996; Kelly et al., 1999). In general, high levels of fatty acid biomarkers were found in soils collected in spring and summer. However, some fatty acid biomarkers were detected in higher levels in winter samples (e.g. iC15:0, iC16:0 and cyC17:0 in site E). In part this was expected, since abiotic factors other than contamination influence soil microbial communities under environmental conditions (Rutgers and Breure, 1996). However, this seasonal variability (all the seasons were significant different between each other, based on two-ways ANOVAS of PCA scores for both components) what gives rise to serious concerns when this kind of evaluation is performed as part of a site specific risk assessment; this was not the case in our study. Depending on the time of the year, discrimination between sites (based on PCA scores analysis) with different levels of contamination may be masked by seasonal variability of the microbial community.

## **References**

- Antunes, S.C., Castro, B.B., Pereira, R., Gonçalves, F., 2008a. Contribution for Tier 1 of the Ecological Risk Assessment of Cunha Baixa Uranium Mine (Central Portugal): II. Soil ecotoxicological screening. *Science of the Total Environment* 390: 387-395.
- André, A., S.C. Antunes, F. Gonçalves, Pereira, R., 2009. Bait-lamina assay as a tool to assess the effects of metal contamination in the feeding activity of soil invertebrates within a uranium mine area. *Environmental Pollution* 157: 2368-2377.
- Bååth, E., Frostegård, Å., Pennanen, T., Fritze, H., 1995. Microbial community structure and pH response in relation to soil organic matter quality in wood ash fertilizer, clear-cut or burned coniferous forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 27: 229-240.

- Barajas-Aceves, M., Hassan, M., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R. 2002. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. *Journal of Microbiological Methods* 50: 227-236.
- Bardgett, R. D., Jones, A.C., Jones, D.L., Kemmit, S.J., Cook, R., Hobbs, P.J., 2001. Soil microbial biomass community patterns related to the history and intensity of grazing in sub-montane ecosystems. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 1653-1664.
- Bull. I. A., Mathew, J.L., Mohamed, M.E., David, J.R., Richard, P.E., 2002. The origin of faeces by means of biomarker detection. *Environment International* 27: 647-564.
- Calderson, F., Jackson, L.E., Scow, K.M., Rolston, D.E., 2000. Microbial responses to simulated tillage in cultivated and uncultivated soils. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 1547-1559.
- Calderson, F., Jackson, L.E., Scow, K.M., Rolston, D.E., 2001. Shortterm dynamics of nitrogen, microbial activity and phospholipid fatty acids after tillage. *Soil Science Society of American Journal* 65: 118-126.
- Christie, W.W., 1989. Gas chromatography and lipids – A practical guide. 2<sup>nd</sup> Edition, The Oily Press, Scotland.
- Dong X., Huai-Ying Y., De-Yong G.E., Huang C.-Y., 2008. Soil Microbial Community Structure in Diverse Land use systems: A comparative study using Biolog, DGGE and PLFA analysis. *Pedosphere* 18: 653-663.
- Drenosvsky, R.E., Elliot, G.N., Graham, K.J., Scow, K.M., 2004. Comparison of phospholipid fatty acid (PLFA) and total soil fatty acid methyl esters (TSFAME) for characterizing soil microbial communities. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1793-1800.
- Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E., 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. *Applied Environmental Microbiology* 59: 3605-3617.
- Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E., 1996. Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soils experimentally contaminated with metals. *Soil Biology & Biochemistry* 28: 55-63.
- Gattinger, A., Ruser, R., Schloter, M., Munch, J., 2002. Microbial community structure varies in different soil zones in a potato field. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165: 421-428.
- Guckert, J.B., Hood, M.A., White, D.C., 1986. Phospholipid ester-linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: Increases in the ratio and proportions of cyclopropyl fatty acids. *Applied Environmental Microbiology* 52: 794-801.
- Hinojosa, M.B., Carreira, J.A., García-Ruíz, R., Dick, R.P., 2005. Microbial response to heavy metal-polluted soils: Community analysis from phospholipid-linked fatty acids and ester-linked fatty acids extracts. *Journal of Environmental Quality* 34:1789-1800.
- Joergensen, R.G, Emmerling, C., 2006. Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169: 295-309.

- Kaur, A., Chaudhary, A., Kaur, A., Choudhary, R., Kaushik, R., 2005. Phospholipid fatty acid – A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science* 89: 1103-1112.
- Kelly, J.J., Häggblom, M., Tate III, R.L., 1999. Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biology & Biochemistry* 31: 1455-1465.
- Kindler R, Miltner A, Thullner M, Richnow H-H, Kastner M., 2009. Fate of biomass derived fatty acids in soil and their contribution to soil organic matter. *Organic Geochemistry* 40: 29-37.
- Leemings, R., Ball, A., Ashbolt, N., Nichols, P., 1996. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Research* 30: 2893-2900.
- Liang C., Fujinuma R., Balser T.C., 2008. Comparing PLFA and amino sugars for microbial analysis in an upper Michigan old growth forest. *Soil Biology & Biochemistry* 40: 2063-2065.
- Macalady, J.L., Mack, E.E., Nelson, D.C., Scow, K.M., 2000. Sediment microbial community structure and mercury methylation in mercury-polluted Clear Lake, California. *Applied Environmental Microbiology* 66: 1479-1488.
- Mesman, M., Rutgers, M., Jensen, J., 2006. Using the TRIAD in site specific assessment of contaminated soil. In *Ecological Risk Assessment of Contaminated Land. Decision support for site specific investigations. Chapter 4.* Ed. por John Jensen and Miranda Mesman. RIVM report number 711701047. Liberation Project. Pp. 41-54.
- Mille-Lindblom, C., von Wachenfeldt, E., Tranvik, L.J., 2004. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. *Journal of Microbiological Methods* 59: 253-262.
- Miller JN, Miller JC (2005) *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Prentice Hall, New York
- Myers, R.T., Zak, D.R., White, D.C., Peacock, A., 2001. Landscape-level patterns of microbial community composition and substrate use in upland forest ecosystems. *Soil Science Society of American Journal* 65: 359-367.
- Mummey, D.L., Stahl, P.D., Buyer, J.S., 2002a. Soil microbiology properties 20 years after surface mine reclamation: spatial analysis of reclaimed and undisturbed sites. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 1717-1725.
- Mummey, D.L., Stahl, P.D., Buyer, J.S., 2002b. Microbial biomarkers as an indicator of ecosystem recovery following surface mine reclamation. *Applied Soil Ecology* 21: 251-259.
- Nash, D., Leeming R., Clemow, L., Hannah M., Halliwell, D., Allen, D., 2005. Quantitative determination of sterols and other alcohols in overland flow from grazing land and possible source of materials. *Water Research* 39: 2964-2978.
- Pennanen, T., Frostegard, A., Fritze, H., Bååth, E., 1996. Phospholipid fatty acid composition and heavy metal tolerance of soil microbial communities along two heavy metal-polluted gradients in coniferous forests. *Applied Environmental Microbiology* 62: 420-428.



- Pereira, R., Antunes, S.C., Marques, S.M., Gonçalves, F., 2008. Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (central Portugal). I. Soil chemical characterization. *Science of Total Environment* 390: 377–386.
- Pereira, R., Marques, C.R. Silva Ferreira, M.J., Neves, M.F.J.V., Caetano, A.L., Antunes, S.C., Mendo, S., Gonçalves, F., 2009. Phytotoxicity and genotoxicity of soils from an abandoned uranium mine area *Applied Soil Ecology* 42: 209-220.
- Piotrowska-Seget, Z., Mrozik, A., 2003. Signature lipid biomarker (SLB) analysis in determining changes on community structure of soil microorganisms. *Polish Journal of Environmental Studies* 12: 669-675.
- Ren, D., Li, L., Schwabacher, A.W., Young, J.W., Beitz, D.C., 1996. Mechanism of cholesterol reduction to coprostanol by *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222. *Steroids* 61: 33-40.
- Rutgers, M., Breure, A.M., 1999. Risk Assessment, Microbial Communities, and Pollution-Induced Community Tolerance. *Human and Ecological Risk Assessment* 5 (4): 661-670.
- Schimdt, I.K., Ruess, L. Bååth, E., Michelsen, A., Ekelund, F., Johansson, S., 2000. Long-term manipulation of the microbes and micro fauna of two subarctic heaths by addition of fungicide, bactericide, C an fertilizer. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 707-720.
- Schutter, M.E., Dick, R.P., 2000. Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. *Soil Science Society of American Journal* 64: 1659-1668.
- Shah, V.G., Dunstan, R.H., Geary, P. M., Coombes, P., Roberts, T. K., Rothkirch, T., 2007. Bacterial source tracking from diverse land use catchments by sterols ratios. *Water Research* 41: 3667-3674.
- Souza, J.I., Schoenlein-Crusius, I.H., Pires-Zottarelli, C.L.A. e Schoenlein, N.C., 2008. Biossorção de cobre, manganês e cádmio por biomassas de *Saprolegnia subterranea* (Dissmann) R.L. Seym. e *Pythium torulosum* Coker & P. Patt. (Oomycetes). *Acta Botânica Brasileira* 22(1): 217-223.
- Weeks, J.M., Comber, D.W., 2005. Ecological risk assessment of contaminated soil. *Mineralogical Magazine* 69: 601–13.



**Conclusão**



## **Conclusão**

Os ácidos gordos e esteróis analisados neste estudo demonstram grande potencial em distinguir solos mais afectados a partir de resíduos recolhidos numa área junto a uma mina de urânio. Apesar de alguma influência sazonal, a análise por PCA de ácidos gordos e esteróis biomarcadores permitiu separar os solos mais afectados dos que ficam mais longe da zona de exploração mineira. Os locais menos contaminados foram particularmente correlacionados com bactérias gram-positivas, conforme indica a elevada presença de iC15:0 e iC17:0, e com fungos, de acordo com o biomarcador ergosterol. Não se detectaram biomarcadores fúngicos nos solos contaminados, (locais D, F e G), facto que pode estar relacionado, pelo menos em parte, com a ausência de uma cobertura vegetal nestas áreas ou com a presença de plantas fisiologicamente comprometidas. Os locais contaminados também se caracterizaram pela predominância de biomarcadores de bactérias gram-negativas (cyC17: 0).