

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

***DEGRADAÇÃO DE BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs)
E ÁCIDOS CLOROBENZÓICOS POR BACTÉRIAS
AERÓBIAS ISOLADAS DE AMBIENTES
CONTAMINADOS***

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Josemar Gurgel da Costa**, aprovada pela Comissão Julgadora em 11 de fevereiro de 2004.

Campinas, 11 de fevereiro de 2004.

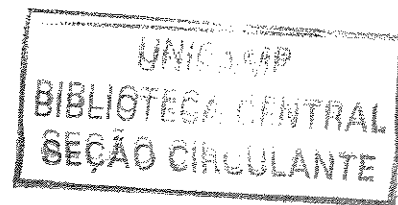

Prof. Dra. Lucia Regina Durrant
Presidente da Banca

JOSEMAR GURGEL DA COSTA

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação, em Ciência de Alimentos, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof.^ª Dr.^ª Lúcia Regina Durrant

Campinas
Fev/2004



NIDADE Bc
P CHAMADA T/UNICAMP
C823d
/ _____ EX _____
OMBO BC/ 57788
PROC 16 - 117 - 04
C _____ D X
PREÇO 11,00
DATA 17/04/2004
Nº CPD _____

CM00196180-0

BIBID 3/62/2

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

C823d Costa, Josemar Gurgel da
Degradação de bifenilos policlorados (PCBs) e ácidos
clorobenzoicos por bactérias aeróbias isoladas de
ambientes contaminados / Josemar Gurgel da Costa. –
Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Lúcia Regina Durrant
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Bifenilos policlorados. 2.Biodegradação.
3.Biorremediação. 4.Poluentes ambientais. I.Durrant,
Lúcia Regina. II.Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

COMISSÃO EXAMINADORA



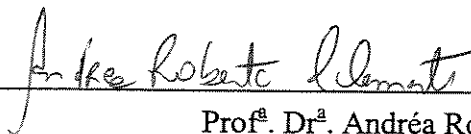
Prof.^a Dr.^a Lúcia Regina Durrant
Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezzi
Universidade Estadual de Campinas

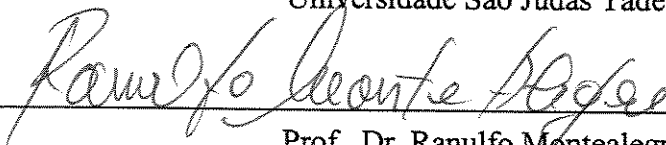


Prof.^a Dr.^a Tânia Akiko Anazawa
Universidade Paulista - UNIP



Prof.^a Dr.^a Andréa Roberta Clemente
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Dr. Hamilton Roberto Fortes Bavutti
Universidade São Judas Tadeu



Prof. Dr. Ranulfo Montealegre
Universidade Estadual de Campinas

Prof.^a Dr.^a Vivian Helena Pellizari
Universidade de São Paulo

Campinas, ____ de ____ de 2004



TERMO DE AUTORIZAÇÃO - TESE

Eu, JOSEMMAR GUSMÃO DA COSTA,
Nacionalidade: BRASILEIRA, estado civil: SOLTEIRO,
Profissão: Engenheiro, residente e domiciliado na (endereço): RUA
DELFINO CINTRA, 107 APT 033, Cidade: CAMPINAS - SP
_____, Estado: SP, portador do documento de identidade 36438809, 2
número SSP/SP, na qualidade de titular dos direitos morais e patrimoniais de autor da
OBRA (título) DEGRADAÇÃO DE BIFENÍLOS POLICLORADOS (PCBs) E
ÁCIDOS CLOREBENZOÍCOS POR BACTÉRIAS AERÓBIAS ISOLADAS
DE AMBIENTES CONTAMINADOS, apresentada a Universidade Estadual de Campinas
tese de (nível) DOUTORADO, em (data) 15.01.2004, com base no disposto na Lei Federal N. 9.160, de 1
Fevereiro de 1998:

1 - ☐ AUTORIZO a Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, a reproduzir, e/ou disponibilizar na rede mundial de computadores - Internet - e permitir a reprodução por meio eletrônico, da OBRA, a partir desta data e até que manifestação em sentido contrário de minha parte determine a cessação desta autorização.

2 - ☒ AUTORIZO, a partir de dois anos após esta data, a Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, a reproduzir, disponibilizar na rede mundial de computadores - Internet - e permitir a reprodução por meio eletrônico, da OBRA, até que manifestação contrária de minha parte determine a cessação desta autorização.

3 - ☐ CONSULTE-ME, dois anos após esta data, quanto a possibilidade de minha AUTORIZAÇÃO à Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, a reproduzir, disponibilizar na rede mundial de computadores - Internet - e permitir a reprodução por meio eletrônico, da OBRA.

Campinas, 15 de junho de 2004

Assinatura do Aluno: Joemar Gusmão da Costa

Ciente do Orientador: Dinora R. D. Vazant



DIRETORIA ACADÊMICA
AUTORIZAÇÃO DE CÓPIAS DE TESE A INTERESSADOS
PÓS-GRADUAÇÃO

FOLHAS

52

PROCESSO

RUBRICA

01119055/18
8

RA	NOME DO ALUNO(A)		
984983	JOSEMAR GURGEL DA COSTA		
CURSO CÓDIGO	NÍVEL	NOME	
06	D	CIÊNCIA DE ALIMENTOS	
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CÓDIGO	NOME		
ORIENTADOR(A)		DATA DA DEFESA	
LUCIA REGINA DURRANT		33.02.2004	
TÍTULO DA TESE			
DEGRADAÇÃO DE BIFENÍLOS POLICLORADOS (PCBs) E ÁCIDOS CICLOBENZÔICOS POR BACTÉRIAS AERÓBIAS ISOLADAS DE AMBIENTES CONTAMINADOS			

O aluno deverá assinalar um dos 3 itens abaixo

☐ Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a partir desta data, fornecer a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

☒ Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a partir de dois anos desta data, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou Tese a interessados.

☐ Solicito que a Universidade Estadual de Campinas consulte-me, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o fornecimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a interessados.

ORIENTADOR	
DATA	ASSINATURA
	Lúcia Regina Durrant
ALUNO	
DATA	ASSINATURA
20.01.04	Josemar Gurgel da Costa

Aos meus pais:

Francisco Sabino Sobrinho
Maria de Oliveira Gurgel

Minha gratidão e reconhecimento pela
dedicação, ensinamentos e tudo de
bom que me proporcionaram.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Lúcia Regina Durrant, pela amizade, ensinamentos e confiança depositada em mim, o que me permitiu desenvolver este trabalho com tranquilidade e liberdade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo suporte financeiro e, à CAPES, pela bolsa concedida nos primeiros meses deste projeto.

♪...♪...♪... Os mais especialíssimos agradecimentos para: Helga Loos, a querida amiga que, incansavelmente, me encorajou e me ajudou a superar muitos desafios e obstáculos; também, para Isis Serrano, Alexandre Lopes, Takeshi Matsuura e Rogério, por terem contribuído em momentos difíceis e decisivos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, pelos bons momentos que tivemos juntos, em especial, Marcelo, pela colaboração no trabalho; Renato, por muitos momentos de descontração e, à Suelma, por todo o apoio que recebi.

Aos colegas do Laboratório de Cromatografia Gasosa (IQ/UNICAMP), em especial, Ana Maria, a quem devo grande parte do meu aprendizado em Química Analítica; também, à Gláucia Pinni, por muitas dicas valiosas em procedimentos analíticos e, ao Cássio Riedo, Ana Lúcia e Ana Cláudia, pelo companheirismo.

+...*in memoriam*....Ao Prof. Dr. Antônio Pires Valente (IQ/UNICAMP), pela confiança, ensinamentos e envolvimento com este trabalho.

Ao Prof. Dr. Fábio Augusto (IQ/UNICAMP), pela colaboração na etapa analítica deste projeto.

À Prof^ª. Dr^ª. Vivian Pellizari (ICB/USP) por ter me recebido em seu laboratório para treinamento e por ensinamentos importantes sobre os PCBs.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Ciência de Alimentos, em especial, à Prof^ª. Dr^ª. Helena Godoy, por valiosos ensinamentos em cromatografia; à Norma, Rosinha e Ana Cláudia, pela solicitude e apoio técnico; a Rodrigo e Gisele, por ensinamentos em cromatografia; à Jardete, Cosme e Marquinhos pelo auxílio em etapas burocráticas.

♪...♪...♪...À minha família, pela torcida e vibração; aos queridos amigos escritores Eli Celso, Nonato Gurgel e Iracema Macedo, pelos textos da epígrafe, e aos amigos queridos Giovanni Loos, Luciano Armiliato, Gilberto Guittman, Willi Gleich e Thomas Zeller, pela alegria de muitos momentos juntos.

Observar as sombras é a ciência.

Eli Celso A. D. Silveira

Quem nada rios navega oceanos.

Nonato Gurgel

Quando eu morrer
mesmo em tristeza devastada
morrerei da alegria de terem sido possíveis:
o amor, a tristeza e a aventura de ser carne
em meio a tantas pedras

Iracema Macedo

RESUMO

Os bifenilos policlorados (PCBs) são compostos organoclorados xenobióticos, distribuídos globalmente como poluentes do solo, da água e do ar. Estão incluídos entre os 10 poluentes orgânicos com maior potencial de toxicidade no mundo. O seu caráter lipofílico parece ser a base para a bioacumulação e biomagnificação na cadeia biológica. A eliminação dos PCBs do meio ambiente pode ocorrer por incineração, fotólise ou biotransformação. Este último mecanismo tem se revelado promissor e vantajoso como estratégia de biorremediação de áreas contaminadas. No Brasil, há registro de contaminação ambiental desde o litoral norte (Pará) até a Região Sul do país. No estado de São Paulo, ocorrem áreas contaminadas, notificadas pela CETESB. Os objetivos deste trabalho foram a) isolar e identificar bactérias capazes de degradar PCBs (os 17 isômeros mais tóxicos para os seres humanos), oriundas de áreas contaminadas com este poluente ou com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos; b) quantificar a degradação de PCBs e ácidos clorobenzoicos (ACBs), pelas linhagens selecionadas e c) investigar a utilização de PCBs e ACBs de forma não-cometabólica por tais bactérias. Os microrganismos foram isolados de amostras ambientais mediante cultivo em meio mineral mínimo, contendo o bifenilo como única fonte de carbono. A extração de PCBs de amostras ambientais foi feita com o emprego da técnica de microextração em fase sólida (SPME) e, do meio de cultura, com o auxílio de solventes orgânicos. As análises de PCBs foram feitas utilizando-se um cromatógrafo a gás, equipado com um detector de captura de elétrons. Para os ACBs, as análises foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados obtidos sugerem que a) 58 isolados degradaram o bifenilo pela rota do catecol e são potencialmente degradadores de PCBs; b) As linhagens RP1B (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) e RP2A (*Arthrobacter sp.*) degradaram PCBs de modo não-cometabólico; c) A linhagem IP16 degradou os PCBs: PCB138; PCB153; PCB170 e PCB180, utilizando o bifenilo como co-substrato e d) As linhagens IP24; IP27 e RCN2 degradaram, respectivamente, 3, 2 e 1 dos 7 ACBs suplementados ao meio de cultivo, com percentuais que variaram de 6 a 100%. A contribuição desse trabalho vem se somar às poucas pesquisas realizadas no Brasil, nesta área de estudo e ressaltar a existência, em nosso país, de recursos microbianos capazes de degradar PCBs e ACBs.

ABSTRACT

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are xenobiotic and recalcitrant organochlorinated compounds spread worldwide as a contaminant of air, water, soil and sediments. They are included among the 10 pollutants with most biotoxicity potential in the world. Hydrophobic properties seems to be the base for bioaccumulation and biomagnification in the food chain. Although they can be eliminated from the environment by incineration and photodegradation, microbial transformation has been revealed as a promising and advantageous strategy for remediation of contaminated areas. In Brasil, there are records for PCB occurrence from Pará to South Region. In the State of São Paulo, the Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB) has notified some contaminated areas with these pollutants. This work is concerned with a) isolation and identification of bacteria able to degrade PCBs; b) quantitate biodegradation of PCBs and chlorobenzoic acids (CBAs) by selected bacterial strains; c) investigate if selected strains are able to use PCBs and CBAs by non-cometabolic means. Microorganisms were isolated from environmental samples by cultivation on mineral medium supplemented with biphenyl as sole carbon source. PCBs were extracted from environmental matrices by using solid phase microextraction (SPME) technique and from cultivation media by using organic solvents. PCBs were analysed by a gas chromatograph equipped with an electron capture detector. CBA analysis were carried out with high pressure liquid chromatography. Our results suggest that a) 58 isolates degraded biphenyl by the catechol route and are potentially degraders for PCBs; b) the strains RP1B (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) and RP2A (*Arthrobacter sp.*) degraded PCBs by non-cometabolic means; c) the strain IP16 degraded the PCBs: PCB138; PCB153; PCB170 and PCB180, using biphenyl as cosubstrate and, d) the strains IP24; IP27 e RCN2 degraded, respectively, 3, 2 and 1 of the 7 CBAs supplemented to the cultivation medium; with percentages ranging from 6 to 100%. This work adds to the little research carried out in Brasil in this field and points out to the existence of microbial resources able to degrade PCBs and CBAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de PCB.....	15
Figura 2. Ciclagem dos PCBs no meio ambiente.....	21
Figura 3. Rota enzimática envolvida na biodegradação de PCBs por bactérias.....	29
Figura 4. Fluxograma ilustrativo das etapas deste trabalho.....	35
Figura 5. Fotos da subestação de Pantojo.....	37
Figura 6. Fotos da subestação de Iperó.....	38
Figura 7. Protocolo para o isolamento de bactérias.....	42
Figura 8. Perfil cromatográfico da amostra da subestação de Pantojo.....	53
Figura 9. Perfil cromatográfico da amostra da subestação de Iperó.....	54
Figura 10. Biodegradação de 17 PCBs pela linhagem RP1B.....	65
Figura 11. Cromatograma de ACBs (linhagem IP24).....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura oficial e estrutura dos 209 isômeros de PCBs.....	17
Tabela 2. Composição de alguns produtos comerciais contendo PCBs.....	18
Tabela 3. Produção global de PCBs em toneladas, de 1930 até 1993.....	18
Tabela 4. Os 17 PCBs estudados neste trabalho.....	40
Tabela 5. Relação dos ACBs que foram estudados neste projeto.....	45
Tabela 6. Os 7 ácidos clorobenzóicos testados quanto à biodegradação.....	49
Tabela 7. Reisolamento de linhagens RTs em 17 PCBs	59
Tabela 8. Reisolamento de linhagens IPs em 17 PCBs.....	59
Tabela 9. Grupos de isolados cultivados na presença de 17 PCBs ou 12ACBs.....	60
Tabela 10. Reisolamento de linhagens RTs em 12 ACBs.....	62
Tabela 11. Biodegradação não-cometabólica de PCBs pelas linhagens IP1, RP2A e RP1B.....	65
Tabela 12. Biodegradação cometabólica de PCBs pelas linhagens IP13, IP16, IP24, IP27, RCN2 e IPN4B.....	69
Tabela 13. Biodegradação de ACBs pelas linhagens IP13, IP16, IP24, IP27, RCN2 e IPN4B.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACBs: Ácidos clorobenzóicos

CETESB: Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo

CG: Cromatografia em fase gasosa

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DO: Densidade óptica

ECD: Detector de captura de elétrons

HAPs: Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada

LSFM: Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCBs: Bifenilos policlorados

PCDFs: Dibenzofuranos policlorados

PDMS: Polidimetilsiloxano

ppb: parte por bilhão

ppm: parte por milhão

QI: Coeficiente de inteligência

SPME: Microextração em fase sólida

USEPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

UNEP: Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente

SUMÁRIO

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xi
I. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Origem, Propriedades e Aplicações dos PCBs.....	14
1.2. O Problema Ambiental.....	20
1.3. Efeitos Sobre os Seres Vivos.....	22
1.4. Eliminação dos PCBs do Meio Ambiente.....	26
1.5. Degradação Microbiológica de PCBs.....	26
1.6. Pesquisas Brasileiras.....	30
II. OBJETIVOS.....	32
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1. Coleta de Amostras em Áreas Contaminadas com PCBs.....	36
3.2. Extração e Análise Cromatográfica de PCBs das Amostras Ambientais...	39
3.3. Isolamento de Microrganismos a Partir de Amostras de Campo.....	40
3.4. Seleção Não-cometabólica de Bactérias na Presença de 17 PCBs.....	43
3.5. Seleção Não-cometabólica de Bactérias na Presença de 12 Ácidos Clorobenzóicos.....	44
3.6. Seleção de Bactérias Produtoras de Biossurfactantes Capazes de Crescer na Presença de Bifenilo.....	45
3.7. Biodegradação Não-cometabólica de PCBs.....	46
3.8. Biodegradação Cometabólica de PCBs.....	48

3.9. Biodegradação de Ácidos Clorobenzóicos.....	48
3.10. Identificação das Linhagens Bacterianas Utilizadas nos Testes de Biodegradação.....	50
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 Perfil Cromatográfico das Amostras Ambientais.....	51
4.2. Isolamento de Microrganismos a Partir de Amostras de Campo.....	55
4.3. Seleção Não-cometabólica de Bactérias Aeróbias em Mistura de 17 Congêneres de PCBs.....	56
4.4. Seleção Não-cometabólica de Bactérias Aeróbias em Mistura de 12 Ácidos Clorobenzóicos.....	61
4.5. Seleção de Bactérias Produtoras de Biossurfactantes Capazes de Crescimento na Presença de Bifenilo.....	62
4.6. Biodegradação Não-cometabólica de PCBs.....	64
4.7. Biodegradação Cometabólica de PCBs.....	67
4.8. Biodegradação de Ácidos Clorobenzóicos.....	69
4.9. Identificação das Linhagens Utilizadas nos Ensaios de Biodegradação....	73
V. CONCLUSÕES.....	74
VI. REFERÊNCIAS.....	76
VI. ANEXOS.....	84

I

*INTRODUÇÃO***1.1. Origem, Propriedades e Aplicações dos PCBs**

Os bifenilos policlorados (PCBs) constituem uma classe de compostos organoclorados sintéticos que têm como unidade básica a molécula do bifenilo. Foram descobertos no final do século XIX, mas somente passaram a ser utilizados em larga escala por volta de 1930 (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 1993; BREIVIK et al., 2002a;). O sucesso tecnológico e a diversidade de usos dos PCBs foram conferidos pelas suas notáveis propriedades químicas e físicas, isto é, são quimicamente pouco reativos, não inflamáveis, termicamente estáveis e têm alta resistência elétrica. Foram amplamente empregados como fluido dielétrico em transformadores e capacitores, fluidos hidráulicos,

retardadores de fogo e isolantes térmicos; também foram usados na composição de graxas e óleos lubrificantes, tintas, papéis copiativos sem carbono, tintas de impressão e pesticidas (CAIRNS et al., 1986; WHO, 1993; PELIZZARI, 1995; BREIVIK et al., 2002b).

Cada molécula de PCB (Fig. 1) é formada por cloração direta do bifenilo, na presença de catalisadores. Neste processo, ocorre a substituição de átomos de hidrogênio por átomos de cloro nos anéis da molécula do bifenilo (CAIRNS et al., 1986; ERICKSON, 1992; BREIVIK, et al., 2002a). O número e a posição dos átomos de cloro na molécula determina suas propriedades físicas e químicas. As 10 posições possíveis para substituições são numeradas de 2 a 6 em um anel e de 2' a 6' no outro anel. As posições 2, 6, 2' e 6', adjacentes à ligação entre os dois anéis são chamadas posições *orto*; 3, 5, 3' e 5', posições *meta*; 4 e 4', posições *para*. A estrutura tridimensional dos PCBs está fortemente ligada ao ângulo de torção entre os dois anéis. O ângulo de torção, por sua vez, depende do grau de

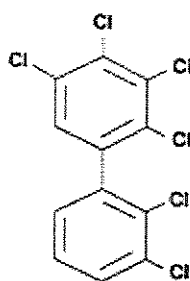


Figura 1. Molécula de PCB. A inserção de átomos de Cl na estrutura do duplo anel do bifenilo permite um total de 209 congêneres diferentes. Aqui, a molécula representada é o 2,2',3,3',4,5-hexaclorobifenilo (PCB 129).

cloração das posições *orto* (LEHMLER; PARKIN; ROBERTSON, 2002). Assim, são chamados de *coplanares* os PCBs que apresentam os dois anéis no mesmo plano e não são substituídos nas posições *orto*. Os mono *orto*, di *orto* e tetra *orto* substituídos têm ângulos

de torção de 49-58°, 58-67° e 86-87°, respectivamente. Os PCBs coplanares têm propriedades semelhantes às dioxinas e estão entre os mais tóxicos para os seres vivos. A fórmula molecular dos PCBs é $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, onde n é o número (1 a 10) de átomos de cloro. Assim, são possíveis 209 congêneres (Tab.1) e um total de 10 homólogos diferentes (Tab.2). A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) adotou um sistema de numeração seqüencial, de 1 a 209, para a nomenclatura oficial dos PCBs (Tab.1). Em misturas comerciais existem, provavelmente, de 70 (ERICKSON, 1992) a 130 congêneres (WHO, 1993).

Comercialmente, estes compostos receberam diversas denominações: *Aroclor*, *Pyranol*, *Pyroclor* (Estados Unidos); *Phenochlor*, *Pyralene* (França); *Clophen*, *Elaol* (Alemanha); *Kanechlor*, *Santotherm* (Japão); *Fenchlor*, *Apirolino* (Itália) e *Sovol* (Rússia) (WHO, 1993). A Tabela 3 mostra a produção mundial de 1930 até 1993, ano em que a Rússia parou a sua fabricação e que, portanto, os PCBs, presumivelmente, deixaram de ser sintetizados em larga escala ao redor do mundo (BREIVIK, et al., 2002a). Globalmente, conforme mostra a Tabela 3, mais de 1,3 milhões de toneladas de PCBs foram produzidas no referido período, sendo que mais de 70% corresponde a tri, tetra e pentaclorobifenilo. Este número, de fato, pode ser bem maior, uma vez que fábricas na Polônia, Alemanha Oriental e Áustria produziram PCBs em quantidades não conhecidas (BREIVIK, et al., 2002a). Cerca de 50% de todo PCB produzido no mundo foi empregado como fluido dielétrico (isolante) em transformadores e capacitores (WHO, 1993). A empresa Monsanto (USA), sozinha, foi responsável por quase 50% do total de PCBs produzido enquanto a Bayer (Alemanha), Prodelec (França) e Orgsteklo (Rússia) contribuíram, cada uma, com cerca de 10% do total produzido (BREIVIK, et al., 2002a). O produto *Aroclor* da Monsanto

Tabela 1. Nomenclatura oficial (IUPAC) e estrutura dos 209 isômeros de PCBs.

nº	monoclorobifenílios	nº	tetraclorobifenílios	nº	pentaclorobifenílios	nº	hexaclorobifenílios
1	2	52	2, 2', 5, 5'	105	2, 3, 3', 4, 4'	161	2, 3, 3', 4, 5', 6
2	3	53	2, 2', 5, 6'	106	2, 3, 3', 4, 5	162	2, 3, 3', 4', 5, 5'
3	4	54	2, 2', 6, 6'	107	2, 3, 3', 4', 5	163	2, 3, 3', 4', 5, 6
	diclorobifenílios	55	2, 3, 3', 4	108	2, 3, 3', 4, 5'	164	2, 3, 3', 4', 5', 6
4	2, 2'	56	2, 3, 3', 4'	109	2, 3, 3', 4, 6	165	2, 3, 3', 5, 5', 6
5	2, 3	57	2, 3, 3', 5	110	2, 3, 3', 4', 6	166	2, 3, 4, 4', 5, 6
6	2, 3'	58	2, 3, 3', 5'	111	2, 3, 3', 5, 5'	167	2, 3', 4, 4', 5, 5'
7	2, 4	59	2, 3, 3', 6	112	2, 3, 3', 5, 6	168	2, 3', 4, 4', 5', 6
8	2, 4'	60	2, 3, 4, 4'	113	2, 3, 3', 5', 6	169	3, 3', 4, 4', 5, 5'
9	2, 5	61	2, 3, 4, 5	114	2, 3, 4, 4', 5		heptaclorobifenílios
10	2, 6	62	2, 3, 4, 6	115	2, 3, 4, 4', 6	170	2, 2', 3, 3', 4, 4', 5
11	3, 3'	63	2, 3, 4', 5	116	2, 3, 4, 5, 6	171	2, 2', 3, 3', 4, 4', 6
12	3, 4	64	2, 3, 4', 6	117	2, 3, 4', 5, 6	172	2, 2', 3, 3', 4, 5, 5'
13	3, 4'	65	2, 3, 5, 6	118	2, 3', 4, 4', 5	173	2, 2', 3, 3', 4, 5, 6
14	3, 5	66	2, 3', 4, 4'	119	2, 3', 4, 4', 6	174	2, 2', 3, 3', 4, 5, 6'
15	4, 4'	67	2, 3', 4, 5	120	2, 3', 4, 5, 5'	175	2, 2', 3, 3', 4, 5', 6
	triclorobifenílios	68	2, 3', 4, 5'	121	2, 3', 4, 5', 6	176	2, 2', 3, 3', 4, 6, 6'
16	2, 2', 3	69	2, 3', 4, 6	122	2', 3, 3', 4, 5	177	2, 2', 3, 3', 4', 5, 6
17	2, 2', 4	70	2, 3', 4', 5	123	2', 3, 4, 4', 5	178	2, 2', 3, 3', 5, 5', 6
18	2, 2', 5	71	2, 3', 4', 6	124	2', 3, 4, 5, 5'	179	2, 2', 3, 3', 5, 6, 6'
19	2, 2', 6	72	2, 3', 5, 5'	125	2', 3, 4, 5, 6'	180	2, 2', 3, 4, 4', 5, 5'
20	2, 3, 3'	73	2, 3', 5', 6	126	3, 3', 4, 4', 5	181	2, 2', 3, 4, 4', 5, 6
21	2, 3, 4	74	2, 4, 4', 5	127	3, 3', 4, 5, 5'	182	2, 2', 3, 4, 4', 5, 6'
22	2, 3, 4'	75	2, 4, 4', 6		hexaclorobifenílios	183	2, 2', 3, 4, 4', 5', 6
23	2, 3, 5	76	2', 3, 4, 5	128	2, 2', 3, 3', 4, 4'	184	2, 2', 3, 4, 4', 6, 6'
24	2, 3, 6	77	3, 3', 4, 4'	129	2, 2', 3, 3', 4, 5	185	2, 2', 3, 4, 5, 5', 6
25	2, 3', 4	78	3, 3', 4, 5	130	2, 2', 3, 3', 4, 5'	186	2, 2', 3, 4, 5, 6, 6'
26	2, 3', 5	79	3, 3', 5, 5'	131	2, 2', 3, 3', 4, 6	187	2, 2', 3, 4', 5, 5', 6
27	2, 3', 6	80	3, 3', 5, 5'	132	2, 2', 3, 3', 4, 6'	188	2, 2', 3, 4', 5, 6, 6'
28	2, 4, 4'	81	3, 4, 4', 5	133	2, 2', 3, 3', 5, 5'	189	2, 3, 3', 4, 4', 5, 5'
29	2, 4, 5		pentaclorobifenílios	134	2, 2', 3, 3', 5, 6	190	2, 3, 3', 4, 4', 5, 6
30	2, 4, 6	82	2, 2', 3, 3', 4	135	2, 2', 3, 3', 5, 6'	191	2, 3, 3', 4, 4', 5', 6
31	2, 4', 5	83	2, 2', 3, 3', 5	136	2, 2', 3, 3', 6, 6'	192	2, 3, 3', 4, 5, 5', 6
32	2, 4', 6	84	2, 2', 3, 3', 6	137	2, 2', 3, 4, 4', 5	193	2, 3, 3', 4', 5, 5', 6
33	2', 3, 4	85	2, 2', 3, 4, 4'	138	2, 2', 3, 4, 4', 5'		octaclorobifenílios
34	2', 3, 5	86	2, 2', 3, 4, 5	139	2, 2', 3, 4, 4', 6	194	2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5'
35	3, 3', 4	87	2, 2', 3, 4, 5'	140	2, 2', 3, 4, 4', 6'	195	2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 6
36	3, 3', 5	88	2, 2', 3, 4, 6	141	2, 2', 3, 4, 5, 5'	196	2, 2', 3, 3', 4, 4', 5', 6
37	3, 4, 4'	89	2, 2', 3, 4, 6'	142	2, 2', 3, 4, 5, 6	197	2, 2', 3, 3', 4, 4', 6, 6'
38	3, 4, 5	90	2, 2, 3, 4', 5	143	2, 2', 3, 4, 5, 6'	198	2, 2', 3, 3', 4, 5, 5', 6
39	3, 4', 5	91	2, 2', 3, 4', 6	144	2, 2', 3, 4, 5', 6	199	2, 2', 3, 3', 4, 5, 6, 6'
	tetraclorobifenílios	92	2, 2', 3, 5, 5'	145	2, 2', 3, 4, 6, 6'	200	2, 2', 3, 3', 4, 5', 6, 6'
40	2, 2', 3, 3'	93	2, 2', 3, 5, 6	146	2, 2', 3, 4', 5, 5'	201	2, 2', 3, 3', 4', 5, 5', 6
41	2, 2', 3, 4	94	2, 2', 3, 5, 6'	147	2, 2', 3, 4', 5, 6	202	2, 2', 3, 3', 5, 5', 6, 6'
42	2, 2', 3, 4'	95	2, 2', 3, 5', 6	148	2, 2', 3, 4', 5, 6'	203	2, 2', 3, 4, 4', 5, 5', 6
43	2, 2', 3, 5	96	2, 2', 3, 6, 6'	149	2, 2', 3, 4', 5', 6	204	2, 2', 3, 4, 4', 5, 6, 6'
44	2, 2', 3, 5'	97	2, 2', 3', 4, 5	150	2, 2', 3, 4', 6, 6'	205	2, 3, 3', 4, 4', 5, 5', 6
45	2, 2', 3, 6	98	2, 2', 3', 4, 6	151	2, 2', 3, 5, 5', 6		nonaclorobifenílios
46	2, 2', 3, 6'	99	2, 2', 4, 4', 5	152	2, 2', 3, 5, 6, 6'	206	2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5', 6
47	2, 2', 4, 4'	100	2, 2', 4, 4', 6	153	2, 2', 4, 4', 5, 5'	207	2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 6, 6'
48	2, 2', 4, 5	101	2, 2', 4, 5, 5'	154	2, 2', 4, 4', 5, 6'	208	2, 2', 3, 3', 4, 5, 5', 6, 6'
49	2, 2', 4, 5'	102	2, 2', 4, 5, 6'	155	2, 2', 4, 4', 6, 6'		decaclorobifenílios
50	2, 2', 4, 6	103	2, 2', 4, 5', 6	156	2, 3, 3', 4, 4', 5	209	2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5', 6, 6'
51	2, 2', 4, 6'	104	2, 2', 4, 6, 6'	157	2, 3, 3', 4, 4', 5'		
				158	2, 3, 3', 4, 4', 6		
				159	2, 3, 3', 4, 5, 5'		
				160	2, 3, 3', 4, 5, 6		

Fonte: Pellizari (1995).

Tabela 2. Composição típica de alguns produtos comerciais (% , com arredondamentos). De 1950 a 1977, quando parou a produção de PCBs, a Monsanto produziu Aroclor, 1242; 1254; 1016; 1260 e 1248 nos respectivos percentuais: 52%; 16%; 13%; 11% e 7% (USEPA, 1996).

Homólogos de PCBs	Aroclor					Clophen		Kanechlor		
	1016	1242	1248	1254	1260	A30	A60	300	400	500
Monoclorobifenilo	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Diclorobifenilo	19	13	1	-	-	20	-	17	3	-
Triclorobifenilo	57	45	21	1	-	52	-	60	33	5
Tetraclorobifenilo	22	31	49	15	-	22	1	23	44	26
Pentaclorobifenilo	-	10	27	53	12	3	16	1	16	55
Hexaclorobifenilo	-	-	2	26	42	1	51	-	5	13
Heptaclorobifenilo	-	-	-	4	38	-	28	-	-	-
Octaclorobifenilo	-	-	-	-	7	-	4	-	-	-
Nonaclorobifenilo	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Decaclorobifenilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3. Produção global de PCBs em toneladas, de 1930 até 1993 (BREIVIK, et al., 2002a).

Empresa	País	Início	Fim	Quantidade
Monsanto	Estados Unidos	1930	1977	641.246,00
Geneva Ind.	Estados Unidos	1971	1973	454,00
Kanegafuchi	Japão	1954	1972	56.326,00
Mitsubishi	Japão	1969	1972	2.461,00
Bayer AG	Alemanha	1930	1983	159.062,00
Prodelec	França	1930	1984	134.654,00
S.A. Cros	Espanha	1955	1984	29.012,00
Monsanto	Reino Unido	1954	1977	66.542,00
Caffaro	Itália	1958	1983	31.092,00
Chemko	Tchecoslováquia	1959	1984	21.482,00
Orgsteklo	URSS (Rússia)	1939	1990	141.800,00
Orgsintez	URSS (Rússia)	1972	1993	32.000,00
Xi'an	China	1960	1979	8.000,00
Total				1.324.131,00

foi o mais difundido pelo mundo, assim, mesmo os produtos comerciais de outras empresas possuíam uma composição semelhante aos desta companhia americana, sugerindo que o processo de síntese dominado pela Monsanto era empregado, de modo semelhante, em várias outras empresas (BREIVIK, et al., 2002a). Uma consequência direta deste fato é que, em ambientes contaminados, quase sempre é possível associar a composição de congêneres de PCBs com algum produto desta empresa, mesmo tendo sido produzido por outra companhia. O *Aroclor* apresenta um sistema de identificação numérico de 4 dígitos, onde os dois primeiros indicam a quantidade de átomos de carbono por molécula de PCB e, os outros dois, o percentual de cloro presente. Por exemplo, *Aroclor 1242*, *1254* e *1260* possuem, respectivamente, 42%, 54% e 60% de cloro em relação ao peso total (PELLIZARI; RODRIGUES, 1997). No Brasil, a mais difundida classe de produtos contendo PCBs, parece ser a dos óleos do tipo *Askarel*, empregados como isolantes em transformadores e capacitores. Os óleos *Askarel* para capacitores eram constituídos de *Aroclor 1242*, *1254*, *1016* puros ou uma mistura de 75% de *Aroclor 1254* e 25% de triclorobenzeno. Já os óleos *Askarel* mais comuns para transformadores consistiam de 60% de *Aroclor 1260* e 40 % triclorobenzeno (tipo A), e 70% *Aroclor 1254* e 30% triclorobenzeno (tipo D) (ERICKSON, 1992). A comercialização de PCBs no Brasil foi proibida pela portaria interministerial 19, de 29 de janeiro de 1981 (NOGUEIRA et al., 1987), a qual proíbe, também, utilização de PCBs como fluidos dielétricos em novos capacitores e transformadores, mas permite o uso em equipamentos que estejam em funcionamento, até que sejam desativados ou substituídos (BANDEIRANTE ENERGIA, 2003).

1.2. O Problema Ambiental

Os PCBs foram incluídos entre os 10 produtos com maior potencial de biotoxicidade no mundo (PELLIZARI; RODRIGUES, 1997) e fazem parte da lista de 12 poluentes prioritários do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME - UNEP, 2002; 2003), o qual visa à redução e/ou eliminação de poluentes orgânicos persistentes. Estão disseminados globalmente como poluentes do ar, do solo e da água (Fig. 2). Por serem hidrofóbicos, lipofílicos, semivoláteis, quimicamente inertes e pouco biodegradáveis, têm grande propensão à persistência generalizada na natureza. Sofrem adsorção em sedimentos e na matéria orgânica do solo e da água (SHAW; CONNEL, 1986); acumulam-se na cadeia alimentar em moluscos, crustáceos, peixes, aves, répteis, mamíferos marinhos em animais selvagens e nos seres humanos (WHO, 1993). As propriedades lipofílicas são a base para a bioacumulação e biomagnificação destes compostos (SHAW; CONNEL, 1986). A bioacumulação é geralmente maior no homem e outros animais que ocupam o topo da cadeia alimentar (BUCHOLSKY et al., 1996).

Os PCBs chegam ao meio ambiente pela deposição intencional ou acidental em solos, rios, lagos, lagoas e aterros sanitários de óleos, detritos contaminados ou artefatos como antigos transformadores e capacitores. Também, por volatilização, a partir dos locais de produção, uso e armazenamento e, ainda, durante o processo de incineração de lixo urbano que contenha artefatos ou detritos contaminados com PCBs (LAUBER, 1986).

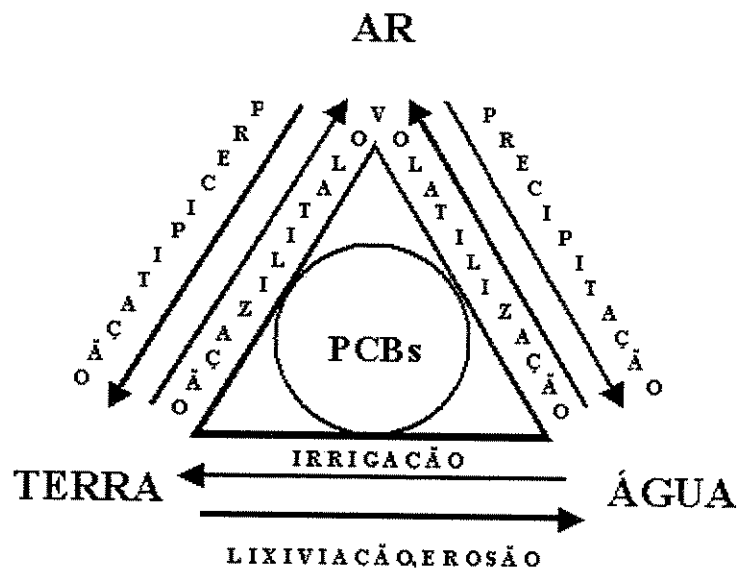


Figura 2. Ciclagem dos PCBs no meio ambiente (modificado de PELLIZARI, 1995).

No Brasil, assim como no mundo, a principal fonte de contaminação ambiental parece estar associada ao emprego de óleos contendo PCBs em sistemas elétricos, especialmente em transformadores. Vale salientar que antes da legislação brasileira entrar em vigor em 1981, presumivelmente, o descarte de produtos contendo PCBs era feito de forma indiscriminada em sistemas de esgotos ou aterros sanitários (NOGUEIRA et al., 1987). A depredação de antigas subestações de eletricidade, por vândalos, a fim de roubarem bobinas de cobre dos transformadores tem ocasionado o derramamento de grandes quantidades de óleo contaminado com PCBs e parece ser uma fonte importante de contaminação. Estima-se que haja cerca de 200 mil toneladas de PCBs (resíduos de óleo do tipo ascarel) no Brasil e que apenas 1.500 a 2.000 toneladas, ou cerca de 1%, são tratadas por ano.

O primeiro estudo a detectar a presença de PCBs no ambiente foi conduzido por Jensen e colaboradores, em 1966. Desde então, a comunidade científica tem

investigado os níveis de contaminação ambiental, bem como o grau de toxicidade deste produto para os seres vivos, especialmente o homem. A detecção destes poluentes em escala mundial, incluindo lugares remotos como a Antártida (FUOCO et al., 1996; MONTONE, 1995) e o Mar Glacial Ártico (VAN OOSTDAM et al., 1999), assim como alguns incidentes envolvendo seres humanos, como por exemplo, o caso do óleo de arroz contaminado, ingerido por quase 2.000 japoneses na localidade de Kyusho, em 1968 (AOKI, 2001; YAO et al., 2002) e na Província de Taiwan, em 1979 (KASHIMOTO; MIYATA, 1986; YU et al., 1997; AOKI, 2001), levaram diversos países a regulamentar a produção, comercialização, uso e destinação final de PCBs e, por fim, à descontinuidade de sua fabricação.

1.3. Efeitos Sobre os Seres Vivos

Para os seres humanos, a fonte mais importante de exposição aos PCBs é o alimento contaminado, especialmente peixes (WHO, 1993; DOUGHERTY et al., 2000; TSUTSUMI et al., 2001; CHOI et al., 2002), mas também crustáceos, moluscos, carne bovina e de aves, leite, ovos, cereais e hortaliças (WHO, 1993). Outras vias de contaminação são a inalação pelo trato respiratório e o contato com a pele, principalmente em exposições ocupacionais e acidentais (WHO, 1993). A contaminação de recém-nascidos pelo leite materno contendo PCBs é de especial importância (ÂNGULO; MARTINEZ; JORDAL, 1999; WINNEKE; WALKOWIAK; LILIENTHAL, 2002;), assim como a transferência destes compostos para o feto através da placenta (LANTING et al., 1998; SALA et al., 2001; COVACI et al., 2002; WINNEKE; WALKOWIAK; LILIENTHAL, 2002).

Diversos efeitos biológicos dos PCBs sobre os seres humanos têm sido relatados: aumento de mortalidade por câncer hepático, da vesícula biliar, do trato gastrointestinal (WHO, 1993) e melanoma maligno (LOOMIS et al., 1997); aumento do fígado e de doenças hepáticas crônicas (YU et al., 1997); distúrbios respiratórios e do sistema nervoso central (WHO, 1993); alterações imunológicas (LU; WU, 1985) e endócrinas (BROWER et al., 1999); fadiga, náuseas e vômitos, inchaço das pálpebras, irritação de conjuntivas, edema dos membros inferiores e superiores, hiperqueratoses, escurecimento da pele e alterações foliculares, erupções cutâneas e prurido (WHO, 1993). Em crianças, foram encontrados os seguintes efeitos: calcificação anormal do crânio, pigmentação escura da pele e de membranas mucosas, hiperplasia gengival, baixo peso ao nascimento, crescimento reduzido e baixo QI (WHO, 1993; WINNEKE; WALKOWIAK; LILIENTHAL, 2002;). Embora a indução de câncer em animais de laboratório esteja comprovada (NASARETNAM et al., 1998), o pequeno número de mortes nos estudos sobre a incidência de câncer em humanos é uma das principais limitações a um desfecho conclusivo sobre os efeitos carcinogênicos dos PCBs. Muitos dos efeitos relatados acima estiveram presentes nas vítimas dos acidentes ocorridos em 1968 na localidade de Kyusho – Japão (AOKI, 2001; YAO et al., 2002), e em 1979, em Taiwan (KASHIMOTO; MIYATA, 1986; YU et al., 1997; AOKI, 2001) onde foram contaminadas nos dois acidentes aproximadamente 3.900 pessoas, após o consumo de óleo de arroz contendo PCBs. Por volta de 1990, 149 das 1860 vítimas japonesas já haviam morrido (AOKI, 2001). Outros efeitos, como erupções cutâneas, prurido e irritação de conjuntivas são encontrados em exposições ocupacionais agudas. O nível médio de PCBs encontrados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em populações de diversos países foi de 1 mg/kg de peso (NOGUEIRA et al., 1987). No Brasil, Wassermann e colaboradores, em 1976,

detectaram, pela primeira vez, a presença de PCBs entre brasileiros (mulheres da cidade de São Paulo, portadoras de neoplasias mamárias). Em 1987, na grande São Paulo, foram encontrados índices de PCBs da ordem de 2 mg/kg – o dobro do índice médio encontrado pela OMS em cidades industrializadas (NOGUEIRA et al., 1987). O número relativamente pequeno da amostra (189 casos) não foi suficiente para se estabelecer uma média extensível à população da cidade de São Paulo. A falta de um sistema eficiente de fiscalização contribui para a destinação inadequada desta fonte de poluição (NOGUEIRA et al., 1987) e, por este motivo, dentre outros, níveis elevados de PCBs serão encontrados, provavelmente, entre habitantes de outras grandes cidades brasileiras. Em relação a outros animais, os principais efeitos encontrados foram: câncer do fígado em ratos (aproximadamente 5 mg/kg de peso em misturas de *Aroclor 1260* e *Clophen A60* na dieta) e camundongos (15-25 mg/kg de peso em misturas de *Aroclor 1254* e *Kanechlor 500* na dieta) (WHO, 1993); câncer de mama em ratos (NASARETNAM et al., 1998); redução da capacidade reprodutiva (efeito na implantação do embrião, degeneração do trofoblasto e da vasculatura fetal) em mamíferos marinhos (WHO, 1993; BÄCKLIN et al., 1998). Em macacos *Rhesus* (uma das espécie mais sensíveis aos PCBs) sob dieta contendo *Aroclor 1248* ao nível de 2,5 mg/Kg de peso, durante 6 meses, houve aumento da taxa de mortalidade, retardamento do crescimento, aumento do fígado com necroses focais, dentre outros. (WHO, 1993). Há relatos, também, da indução de enzimas (citocromos P450 e P448) no fígado de animais (rato, camundongo, coelho, cachorro, macaco, entre outros) expostos a *Aroclor 1248*, *1254*, *1260* e *Kanechlor 400*, sendo que a indução aumenta com o conteúdo de cloro da molécula e é dependente da composição de congêneres com átomos de cloro nas posições *meta* e *para*. Há pesquisas que mostram efeitos de PCBs sobre o sistema endócrino (alterações na ligação hormônio-receptor e no equilíbrio de hormônios esteróides) de ratos cuja dieta

continha *Aroclor 1242* e *1254* ao nível de 25 a 200 mg/kg de peso, duante períodos de 2 semanas a 36 meses (WHO, 1993); efeitos imunossupressivos têm sido relatados para animais de várias espécies, sendo macacos e coelhos os mais sensíveis. Outros efeitos, tais como depressão da atividade motora em camundongos e diminuição dos níveis de vitaminas A, B₁, B₂ e B₆ em ratos e camundongos têm sido relatados (WHO, 1993).

Pouco ainda é conhecido sobre os mecanismos de ação dos PCBs sobre os seres vivos, todavia o mais estudado diz respeito a ação desses poluentes (e outros: dioxinas; β -hexaclorociclohexano; o,p,p'-DDT; 4-nonylphenol) como hormônios ambientais (MENDES, 2002; PORTIGAL et al., 2002; TAPIERO; NGUYEN; TEW, 2002). Disruptores endócrinos ou hormônios ambientais são substâncias exógenas ou misturas que alteram funções do sistema endócrino e, conseqüentemente, causam efeitos à saúde de um organismo ou à sua progênie (BAKER, 2001). Inicialmente acreditava-se que os hormônios ambientais atuassem apenas simulando a ação do hormônio natural estrógeno. Hoje, todavia, considera-se o fato de que tais substâncias possam atuar sobre o sistema endócrino como um todo. As várias maneiras pelas quais os hormônios ambientais podem interagir com o sistema endócrino são: 1) simulando o efeito natural do hormônio através da ligação com o seu receptor; 2) exercendo o efeito antagônico ao do hormônio natural mediante bloqueio da ligação deste com o seu receptor; 3) reagindo diretamente com a estrutura do hormônio para alterá-la; 4) interferindo na síntese do hormônio ou 5) interferindo no transporte ou eliminação do hormônio (BAKER, 2001).

1.4. Eliminação dos PCBs do Meio Ambiente

De acordo com o exposto acima, a eliminação dos PCBs do meio ambiente é uma questão de importância fundamental no que diz respeito à preservação do meio ambiente e à saúde dos seres humanos. Os meios pelos quais os PCBs desaparecem do ambiente são: a) fotólise; b) combustão e c) degradação por microorganismos (SAWHNEY, 1986; PELLIZARI; RODRIGUES, 1997). No processo fotolítico ocorre detoxificação de algumas formas de PCBs, no entanto, a principal dificuldade, neste caso, reside no fato de a maior parte dos PCBs estar adsorvida em sedimentos aquáticos e materiais orgânicos do solo, portanto, abrigada da luz. Também, um fator que limita a eliminação de PCBs por esta via é a necessidade de fótons com comprimento de onda da ordem de 280 nm, cujos níveis de energia são maiores do que aqueles que normalmente chegam à atmosfera terrestre. Um outro aspecto negativo deste processo é a formação de dibenzofuranos policlorados (PCDFs), ainda mais tóxicos do que os PCBs). A combustão de PCBs deve ser feita sob temperaturas elevadas (cerca de 1.200 °C), do contrário, pode ocorrer a formação de PCDFs e dioxinas. As elevadas temperaturas requeridas neste processo o torna bastante oneroso. Finalmente, a degradação microbiana tem se revelado como a forma mais promissora de eliminação de PCBs de ambientes contaminados (PELLIZARI; RODRIGUES, 1997).

1.5. Degradação Microbiológica de PCBs

Iwata e colaboradores, e Ahmed e Focht, em 1973, foram os primeiros pesquisadores a constatar a degradação de PCBs por microrganismos. Iwata e seus

colaboradores adicionaram *Aroclor 1254* em vários tipos de solo e observaram, após um ano, que em solos contendo baixo teor de matéria orgânica (0,1 – 3,3%) havia ocorrido biotransformação, resultando no desaparecimento de moléculas de PCBs pouco cloradas. O percentual restante de matéria orgânica (aproximadamente 0,1%) consistia, principalmente, de isômeros de PCBs com 5 ou 6 átomos de cloro. Já Ahmed e Focht constataram a oxidação por 2 espécies de *Achromobacter*, de *para*-clorobifenilo (mono e diclorobifenilo), resultando em ácido *para*-clorobenzóico. Também, a oxidação do bifenilo, tendo como produto o ácido clorobenzóico. Neste caso, bifenilo e *para*-clorobifenilo foram as únicas fontes de carbono disponíveis. A partir destes estudos, a biotransformação de PCBs tem sido contemplada em uma grande quantidade de pesquisas. Temas como a seleção de microrganismos competentes, determinação de rotas metabólicas, isolamento e clonagem de genes que codificam enzimas degradadoras, modificação de microrganismos via engenharia genética, consórcios entre espécies e estratégias de biorremediação *in situ* já estão descritos na literatura, conforme demonstrado a seguir.

Foram isoladas diversas linhagens bacterianas capazes de degradar PCBs, como: *Pseudomonas aeruginosa* 142, *Arthrobacter globiformis*, KZT, *Comamonas* sp. (PELLIZARI; RODRIGUES, 1997), *Alcaligenes eutrophus* A4, *Achromobacter xylosoxidans* KF701, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707, *Pseudomonas putida* KF715, *Pseudomonas paucimobilis* Q1 (FURUKAWA, 2000a, 2000b; FURUKAWA, 1994). Embora menos freqüentemente relatados, alguns fungos (*Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Coriolopsis polyzona*) também são capazes de degradar PCBs (KUBÁTOVÁ; MATUCHA; SEVCIK, 1996; KRCMAR et al., 1999; RUIZ-AGUILAR et al., 2002). A degradação destes poluentes por bactérias é relatada como sendo essencialmente do tipo cometabólica, embora, provavelmente, possam

existir bactérias capazes de transformá-los de modo não-cometabólico (COSTA; DURRANT, 2002). Na biotransformação cometabólica dos PCBs o bifenilo é o substrato análogo normalmente adicionado. Ele deve estar presente para induzir as enzimas que farão, competitivamente, a transformação de ambos, bifenilo e PCBs (ADRIAENS; VOGEL, 1995; HERNANDEZ; ARENSDORF; FOCHT, 1995). As enzimas comumente envolvidas no processo são 2,3-dioxigenase e 3,4- dioxigenase, cujos genes foram clonados e seqüenciados em diversas espécies (MASAI et al., 1995; FURUKAWA, 1994, 2000a, 2000b). PCBs são degradados, principalmente, pela enzima 2,3-dioxigenase (Fig. 3), a qual inicia o processo inserindo o oxigênio molecular em um anel não clorado ou em um anel que ofereça um par de sítios adjacentes, não clorados, nas posições 2, 3 ou 5, 6 (FURUKAWA, 1994). Apesar disto, dioxigenases quiméricas que reúnem a capacidade degradativa de ambas as dioxigenases, foram recentemente criadas em laboratório, em cepas híbridas (KIMURA et al., 1997; KUMAMARU et al., 1998; SUENAGA *et al.*, 1999; FURUKAWA, 2000a; 2000b). De um modo ou de outro, os produtos finais destas vias são os ácidos clorobenzóicos, os quais, normalmente, não são degradados pelos mesmos microrganismo que catabolizam PCBs (BRENNER; ARENSDORF; FOCHT, 1994) e podem se acumular no ambiente, constituindo uma fonte de poluição para diversos organismos. Assim, a mineralização aeróbica de PCBs é feita, geralmente, por dois tipos diferentes de microorganismos, aqueles que utilizam o bifenilo e co-metabolizam PCBs e aqueles que degradam ácidos clorobenzóicos (BRENNER; ARENSDORF; FOCHT, 1994; FURUKAWA, 1994; HERNANDEZ; ARENSDORF; FOCHT, 1995). Tentativas para solucionar este problema têm sido feitas em laboratório, com a construção de linhagens híbridas de bactérias capazes de mineralizar totalmente moléculas de PCBs. Já foram construídas cepas capazes de degradar completamente 2-clorobifenilo, 3-clorobifenilo, 4-

clorobifenilo, 2,5-diclorobifenilo, 2,4-diclorobifenilo (FURUKAWA, 1994; HERNANDEZ; ARENSDORF; FOCHT, 1995; HRYWNA et al., 1999). Em outras palavras, os genes para a degradação total dos PCBs já existem na natureza, mas ainda não foram encontrados em um único organismo.

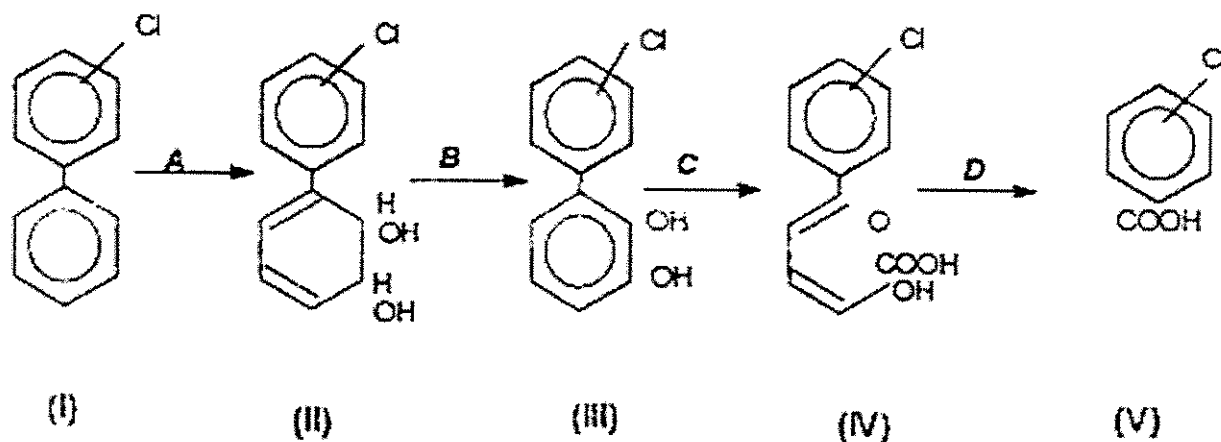


Figura 3. Rota enzimática envolvida na biodegradação de PCBs por bactérias (PELLIZARI, 1995): I = PCB; II = 2,3-dihidroxi-4-fenilhexa-4,6-dieno (dihidrodiol); III = 2,3-dihidroxibifenilo; IV = ácido 2-hidroxi-6-oxo-6-fenilhexa-2,4-dienóico; V = ácido clorobenzóico; A = bifenilo dioxigenase; B = dihidrodiol desidrogenase; C = 2,3-dihidroxibifenilo dioxigenase; D = composto de metaclivagem hidrolase.

As bactérias anaeróbias embora não quebrem as ligações do anel aromático, contribuem para a biotransformação de PCBs removendo átomos de cloro da estrutura do bifenilo (CHANG et al., 1999). Este processo torna os congêneres mais facilmente degradáveis por bactérias aeróbicas (ADRIENS; VOGEL, 1995; BEDARD; QUENSEN, 1995).

De um modo geral, um resumo da discussão feita acima e uma síntese dos avanços das pesquisas quanto à biodegradação de PCBs pode ser enumerada abaixo, conforme FURUKAWA (2000a): 1) Os PCBs são degradados oxidativamente por bactérias aeróbicas e outros microrganismos como os fungos de degradação branca. Também podem ser desalogenados por bactérias anaeróbicas; 2) a biodegradação de PCBs é extremamente dependente do número de cloro, bem como da posição que eles ocupam nos anéis do bifenilo; 3) a capacidade de degradação e desalogenação é altamente linhagem-dependente; 4) bactérias utilizadoras de bifenilo podem co-metabolizar muitos congêneres de PCBs até ácidos clorobenzóicos pelas mesmas enzimas que catabolizam o bifenilo; 5) enzimas envolvidas na degradação de PCBs foram purificadas e caracterizadas; 6) o *cluster* de genes *bph* responsáveis pelas enzimas de degradação de PCBs foram clonados a partir de várias linhagens bacterianas; 7) a engenharia genética tem permitido a construção de enzimas quiméricas, as quais exibem capacidade mais ampla e maior eficiência de degradação de PCBs e outros compostos aromáticos.

Na discussão apresentada acima, fica claro que os microrganismos são potencialmente importantes na remoção de PCBs do meio ambiente e que estes podem ser um eficiente recurso estratégico para a despoluição de áreas contaminadas.

1.6. Pesquisas Brasileiras

No Brasil, há relatos da existência de vários locais contaminados com PCBs (MONTONE, 1987; TANIGUCHI, 1995; COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB), 1997, 2002; COSTA et al., 2001; PELLIZARI, 2002; PIZA; MANFIO, 2002; DEL GRANDE;

REZENDE, 2003) e de níveis elevados deste poluente no organismo de brasileiros (NOGUEIRA et al., 1987). Apesar disso, há poucos estudos que tenham selecionado organismos competentes para a degradação de PCBs a partir de amostras de solos e sedimentos brasileiros. PIZA e MANFIO (2002), mediante extração direta de DNA de amostras de lama/sedimentos do Estuário da Baixada Santista no Estado de São Paulo – uma área altamente poluída com hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e PCBs, encontraram alta diversidade bacteriana (embora menor que a da área não contaminada, usada como controle). Isso sugere que a comunidade microbiana desses locais pode apresentar grande potencial para a biorremediação. Foi o que constatou PELLIZARI (2002), a partir de amostras de lama/sedimentos do estuário citado acima, quando isolou bons degradadores de PCBs. Em outro estudo, PELLIZARI e colaboradores (1996), analisaram amostras de solos coletadas em algumas localidades do estado de São Paulo (Cubatão, Jabaquara) e sedimentos do Rio Pinheiros. Apesar de suas amostras não apresentarem resíduos de PCBs, microrganismos selecionados a partir delas (*Comamonas testosteroni* e *Xanthomonas maltophilia*) mostraram boa capacidade para degradar este poluente.

No presente trabalho, o interesse está voltado para a biodegradação dos 17 PCBs mais tóxicos em relação aos seres humanos e que apresentam grande persistência no meio ambiente (SAFE, S.; SAFE, L.; MULLIN, 1985; DUINKER; SCHULTZ; PETRICK, 1988; McFARLAND; CLARKE, 1989; WHO, 1993; ANGULO; MARTINEZ; JODRAL, 1999).

II

OBJETIVOS

- 1). Isolar e identificar bactérias capazes de degradar PCBs, presentes em amostras (borra de óleo de transformador) contaminadas com este poluente, coletadas no Estado de São Paulo.
- 2). Testar as bactérias produtoras de biossurfactantes da Coleção de Culturas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana quanto à capacidade de degradar PCBs.
- 3). Quantificar, via cromatografia em fase gasosa, o potencial das bactérias selecionadas quanto à degradação dos 17 congêneres de PCBs mais tóxicos e persistentes para os seres humanos.

- 4). Quantificar, via cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o potencial das bactérias selecionadas quanto à degradação de ácidos clorobenzoicos (o produto final da biotransformação de PCBs).
- 5). Avaliar a capacidade das bactérias selecionadas utilizarem PCBs e ACBs de forma não-cometabólica.

III

MATERIAL E MÉTODOS

O fluxograma mostrado na próxima página (Fig. 4) permite visualizar, de um modo geral, as etapas deste trabalho bem como aspectos metodológicos envolvidos na sua execução. Em resumo, bactérias isoladas de áreas contaminadas com PCBs ou produtoras de biossurfactantes (Coleção de Culturas do LSFM), selecionadas a partir do substrato bifenilo foram empregadas em 4 testes: 1) crescimento cometabólico bifenilo/PCBs; 2) crescimento cometabólico bifenilo/ACBs; 3) crescimento em mistura de 17 PCBs e 4) crescimento em ACBs. Na identificação das bactérias selecionadas para os testes de biodegradação de PCBs e ACBs foram empregados testes bioquímicos clássicos. A quantificação da biodegradação de PCBs e ACBs foi feita com o auxílio das cromatografias CG/ECD e CLAE, respectivamente. Os detalhes dos procedimentos metodológicos de todas as etapas deste trabalho serão apresentados a seguir.

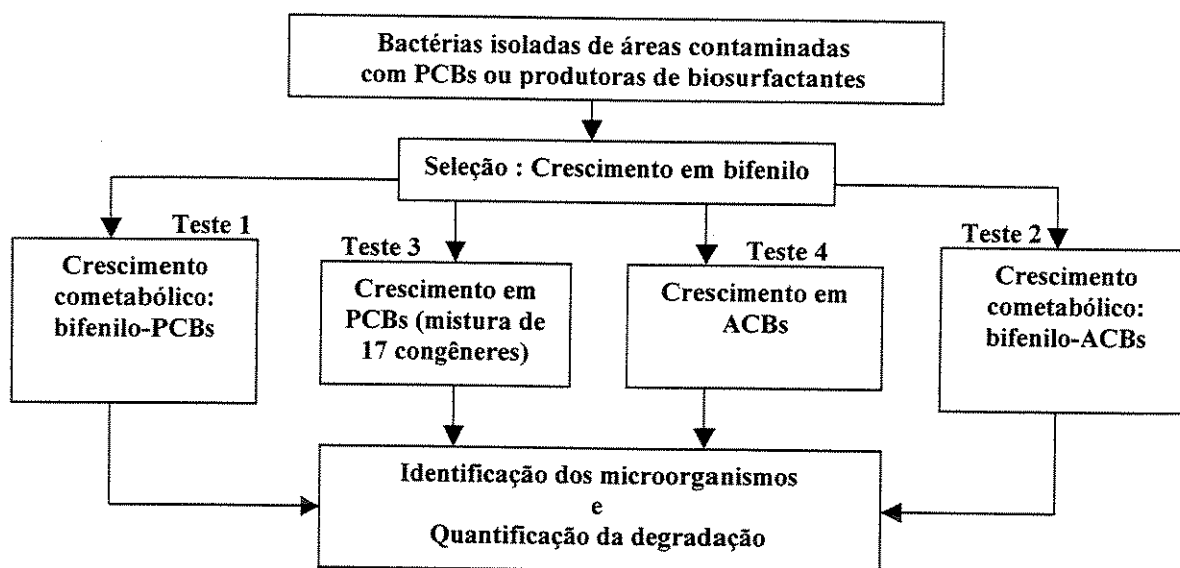


Figura 4. Fluxograma ilustrativo das etapas deste trabalho: 4 testes foram aplicados às bactérias que cresceram na presença do bifenilo, ou seja: degradação cometabólica de PCBs (teste 1); degradação cometabólica de clorobenzoatos (teste 2); utilização de PCBs como única fonte de carbono (teste 3) e utilização de ácidos clorobenzóicos como única fonte de carbono (teste 4).

PCBs foram adquiridos da *AccuStandard* (New Haven, CT), com pureza superior a 99,5 %, exceto os PCBs 105 e 156, com grau de pureza de 99,0 %.

Tabela 4. Os 17 PCBs estudados neste trabalho.

Nº IUPAC	PCBs
28	2,4,4'-Tricloro bifenilo
52	2,2',5,5'-Tetracloro bifenilo
74	2,4,4',5- Tetracloro bifenilo
77	3,3',4,4'- Tetracloro bifenilo
99	2,2',4,4',5-Pentacloro bifenilo
101	2,2',4,5,5'- Pentacloro bifenilo
105	2,3,3',4,4'- Pentacloro bifenilo
118	2,3',4,4',5- Pentacloro bifenilo
126	3,3',4,4',5- Pentacloro bifenilo
128	2,2',3,3',4,4'-Hexacloro bifenilo
138	2,2',3,4,4',5'- Hexacloro bifenilo
153	2,2',4,4',5,5'- Hexacloro bifenilo
156	2,3,3',4,4',5- Hexacloro bifenilo
169	3,3',4,4',5,5'- Hexacloro bifenilo
170	2,2',3,3',4,4',5-Heptacloro bifenilo
179	2,2',3,3',5,6,6'- Heptacloro bifenilo
180	2,2',3,4,4',5,5'- Heptacloro bifenilo

3.3. Isolamento de Microrganismos a Partir de Amostras de Campo

Os Microrganismos foram isolados em meio mineral mínimo contendo 0,05% (p/v) de bifenilo como única fonte de carbono e (g/L) K_2HPO_4 , 1,6; KH_2PO_4 , 0,2; $(NH_4)_2SO_4$, 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01; NaCl, 0,1; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,02 e preparado conforme descrito por Pellizari (1995; 2000), isto é, os reagentes foram adicionados a 1 litro de água deionizada ou destilada, homogenizados e autoclavados a 121°C por 15 minutos. Antes da autoclavagem, o pH final foi ajustado para o valor 7,0. O

bifenilo foi adicionado após a autoclavagem em forma de cristais ou dissolvido em acetona (BEDARD et al., 1986).

O protocolo experimental de isolamento de microrganismos do material coletado em campo está esquematizado na Figura 7. Dez gramas de material (borra de óleo de transformador) foram colocados em Erlenmeyer de 500 mL e diluídos em 100 mL de solução salina (NaCl 0,85%). Após cerca de meia hora de agitação branda, intercalada com intervalos de repouso (5 minutos), 10 mL do sobrenadante desta solução foram adicionados a 90 mL do meio mineral descrito acima. O Erlenmeyer foi mantido em plataforma de agitação (150 rpm, 30°C) por 4 dias. Após este período, 10 mL foram transferidos para um meio novo, a cada quatro dias, três vezes consecutivas. O tempo total de cultivo em meio líquido foi, portanto, de 16 dias. O próximo passo foi a preparação de diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) e subsequente plaqueamento, ou seja, alíquotas de 100 μ L de cada diluição foi espalhadas com alça de Drigalsky na superfície de placas de Petri, contendo o mesmo meio de cultivo adicionado de Agar (20 g/ L). Incubaram-se as placas a 30°C e, após 24 horas de cultivo, iniciou-se a observação do crescimento de colônias morfolologicamente diferentes, bem como a coloração amarela típica que se difunde no agar, quando o bifenilo é transformado a catecol. A partir do quarto dia de cultivo deu-se início ao isolamento das colônias diferentes, quando estas já apresentavam bom crescimento. Os sais foram obtidos da *Synth* (Diadema, SP) e, o bifenilo foi fornecido puro, pela *Supelco* (Bellefonte, PA), ou com pureza de 99.8 %, pela *Chem Service* (West Chester, PA).

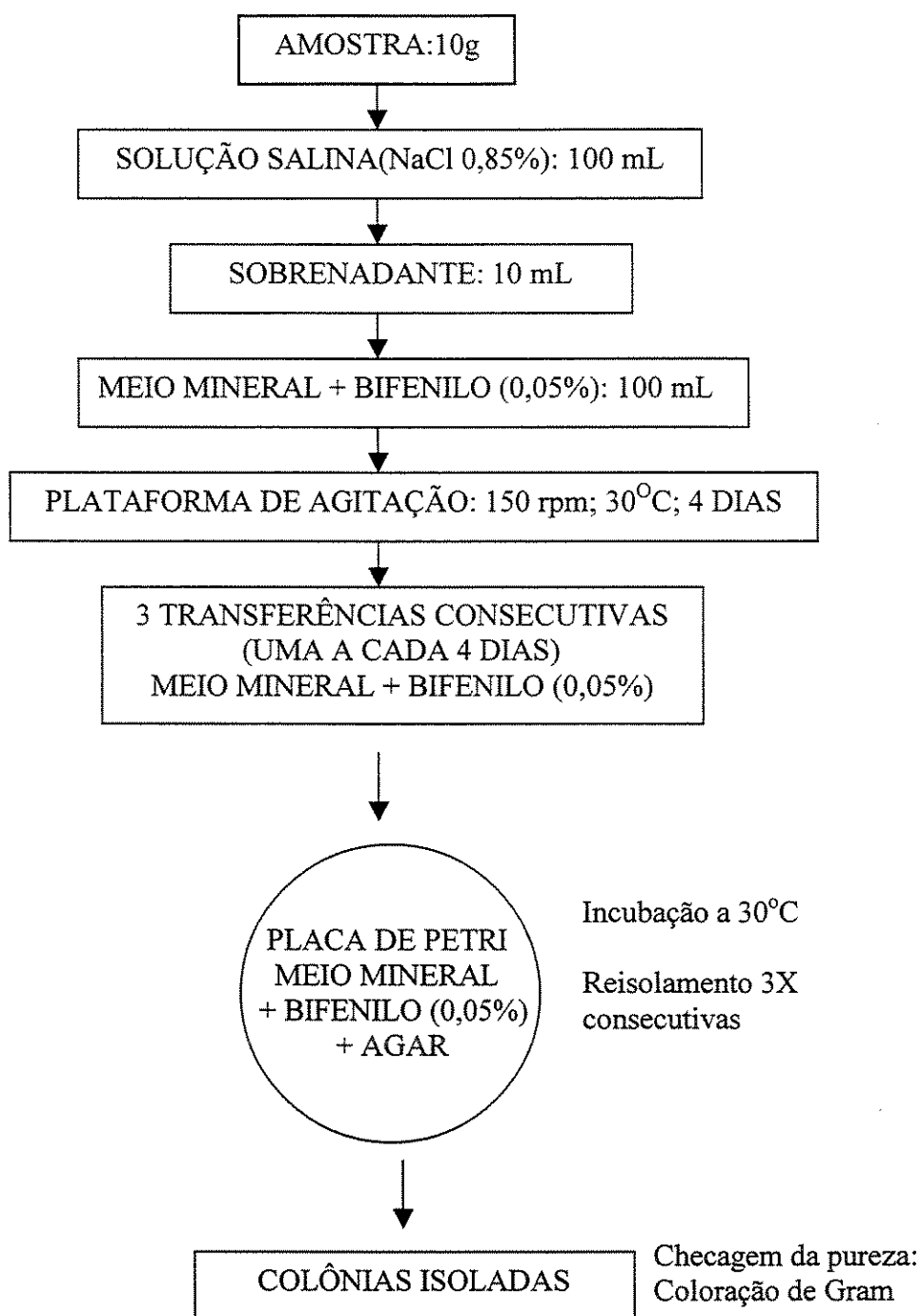


Figura 7. Protocolo experimental para isolamento de linhagens em meio mineral mínimo contendo o bifênilo como única fonte de carbono.

3.4. Seleção Não-cometabólica de Bactérias na Presença de 17 PCBs

Culturas de enriquecimento – Todas as linhagens isoladas na primeira e segunda coletas, selecionadas em bifenilo como única fonte de carbono (Anexo A, p.85; Anexo B, p.87), foram inoculadas em meio mineral mínimo, tendo os PCBs como única fonte de carbono. Células entre 24 e 36 horas de cultivo em agar nutritivo foram ressuspensas em solução salina, até a densidade óptica (DO) de 1 ($\lambda=615\text{nm}$) (PELLIZARI, 1995). Uma alíquota de 1mL foi transferida para 9 mL do meio mineral, contendo os 17 congêneres de PCBs mostrados na página 40 (Tab. 4), cada um na concentração final de 2 ppm. O cultivo foi feito sob agitação (150 rpm), em tubos de 60 mL selados e incubados a 30 °C. Como se pode ver, a etapa de enriquecimento descrita aqui segue, em linhas gerais, o mesmo procedimento utilizado para isolamento destas linhagens em bifenilo (Fig. 7, p.42) a partir das amostras ambientais coletadas, porém, com um detalhe importante, após cada transferência, o frasco do qual se retirou a alíquota transferida, permaneceu incubado nas mesmas condições (30°C, 150 rpm). Assim, no final da fase de enriquecimento seletivo, foi possível avaliar a existência de células viáveis ao longo do processo, mediante transferência de alíquotas de cada etapa (cultivo inicial, 1^a, 2^a e 3^a transferência) para meio sólido contendo apenas PCBs como fonte de carbono e para meio nutritivo (agar nutritivo). As transferências foram feitas a cada 6 dias.

3.5. Seleção Não-cometabólica de Bactérias na Presença de 12 Ácidos Clorobenzóicos

Culturas de enriquecimento – Linhagens RTs e IPs (códigos atribuídos às bactérias isoladas de amostras das subestações de Pantojo e Iperó, respectivamente), entre 24 e 36 horas de cultivo em agar nutritivo foram ressuspensas em solução salina, até a densidade óptica (DO) de 0,75 ($\lambda=600\text{nm}$) (FAVA, 1996). Após este procedimento, foram inoculadas em meio mineral mínimo, tendo como única fonte de carbono 12 dos 14 ACBs mostrados na Tabela 5. Os ácidos 2,3,5,6 – tetraclorobenzóico e 2,3,4,5,6 – pentaclorobenzóico, por estarem em pequenas quantidades, não foram usados nestes ensaios. Uma alíquota de 5 mL foi transferida para 45 mL do meio mineral descrito na tabela 2, contendo os 12 ACBs que queríamos estudar, cada um, na concentração final de 1 mM. O cultivo foi feito sob agitação (150 rpm), em Erlenmeyers de 200 mL, incubados a 30°C. A etapa de enriquecimento seletivo, neste caso, também segue as linhas gerais do procedimento mostrado na página 42 (Fig. 7). Em outras palavras, após o cultivo em meio líquido, com 3 transferências seriadas, realizou-se o plaqueamento em meio sólido (agar+ meio mineral + fonte de carbono), contendo a mesma fonte de carbono, para isolamento de células. Aqui, também, após cada transferência, o frasco do qual se retirou a alíquota transferida, permaneceu incubado nas mesmas condições (30°C, 150 rpm). Assim, no final da fase de enriquecimento seletivo, foi possível avaliar a existência de células viáveis ao longo do processo, mediante transferência de alíquotas de cada etapa (cultivo inicial, 1ª transferência, 2ª transferência e 3ª transferência) para meio sólido contendo apenas ACBs como fonte de carbono e para meio nutritivo (agar nutritivo). As transferências foram feitas a cada 7 dias. Os ACBs foram obtidos da *Supelco* (Bellefonte,PA)

Tabela 5. Relação dos ACBs que foram estudados neste projeto.

Ácidos Clorobenzóicos
4 – ácido clorobenzóico
3 – ácido clorobenzóico
2 – ácido clorobenzóico
3,5 – ácido diclorobenzóico
3,4 – ácido diclorobenzóico
2,6 – ácido diclorobenzóico
2,5 – ácido diclorobenzóico
2,4 – ácido diclorobenzóico
2,3 – ácido diclorobenzóico
2,4,6 – ácido triclorobenzóico
2,3,6 – ácido triclorobenzóico
2,3,5 – ácido triclorobenzóico
2,3,5,6 – ácido tetraclorobenzóico*
2,3,4,5,6 – ácido pentaclorobenzóico*

* Estes ACBs não foram empregados no estudo descrito acima por não estarem disponíveis nas quantidades requeridas para os experimentos.

3.6. Seleção de Bactérias Produtoras de Biossurfactantes Capazes de Crescer na Presença de Bifenilo

Setenta e duas linhagens de bactérias da Coleção de Culturas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp (Anexo C, p.89), preservadas sob congelamento em solução de glicerol/caldo nutriente (10% v/v), foram submetidas a reativação com o intuito de serem testadas quanto à capacidade de crescimento na presença do bifenilo. Todas as linhagens foram isoladas de borra de óleo diesel e são produtoras de biossurfactantes (JACOBUCCI, 2000). A reativação se deu por cultivo direto em agar nutritivo ou caldo nutriente, para linhagens de difícil crescimento em meio sólido. Após a reativação, foi checada a pureza através da coloração de Gram.

Etapas de enriquecimento – Uma alçada de cada linhagem, cultivada por 24hs em meio agar nutritivo, foi transferida para o meio mineral contendo o bifenilo como única fonte de carbono (5 mL, em tubos largos, fechados com tampões de algodão). Os tubos foram mantidos em plataforma de agitação (160 rpm, 30°C) por 4 dias. Após este período, 500 µL de cada tubo foram transferidos para um meio novo (de composição igual ao meio mineral inicial) por três vezes consecutivas. O tempo total da fase de enriquecimento foi, portanto, de 16 dias. O próximo passo foi a transferência de uma alíquota de cada tubo para placas de Petri, contendo o mesmo meio de cultivo mais agar, seguido de incubação a 30°C. Após 24 horas de cultivo, observou-se a presença ou não da coloração amarela típica que se difunde no agar, quando o bifenilo é, enzimaticamente, degradado a produtos de metaclivagem (FURUKAWA, 2000a; 2000b) e catecol (FURUKAWA, 2000a; 2000b; PELLIZARI, 1995). Neste estudo, 56 das 72 linhagens de bactérias (Anexo C, p.89) reativadas do congelamento foram testadas quanto à capacidade de utilização do bifenilo como fonte de carbono.

3.7. Biodegradação Não-cometabólica de PCBs

Três linhagens (RP1B; RP2A e IPP1) isoladas de meio sólido contendo 17 PCBs como única fonte de carbono, conforme o procedimento descrito no item 3.4 (p.43), foram cultivadas por 24 – 36 horas em agar nutritivo. Em seguida, foram centrifugadas (~ 4.430 x g; 10 min; 4 °C) e ressuspensas 4 vezes: 3 vezes em tampão fosfato-salina PBS (0,05 M) e, finalmente, em meio mineral. A absorbância foi ajustada para o valor 1 ($\lambda=615$ nm). Alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos de vidro de 25 mL (em triplicatas) e os 17 PCBs (solubilizados em acetona) foram suplementados na concentração final de 2

ppm para cada PCB. Após 1 h (para evaporação da acetona), os tubos foram fechados hermeticamente. Nos tubos do grupo controle, as células foram mortas por aquecimento a 70 °C por 20 minutos, antes da adição dos PCBs. Os tubos foram incubados sob agitação de 150 rpm e 30 °C. A linhagem RP1B foi analisada após 18 dias de incubação e as demais (RP2A e IPP1), após 33 dias. Para encerrar o experimento, os tubos (incluindo os controles) foram aquecidos em banho-maria por 20 minutos, a 70 °C.

Extração e análise cromatográfica de PCBs – Os PCBs foram extraídos 3 vezes com 3 volumes de n-hexano em cada extração e concentrados para 1 mL em evaporador rotatório (PELLIZARI et al., 1996). A etapa de concentração em evaporador rotatório foi feita apenas para a linhagem RP1B. Para as linhagens RP2A, IPP1, bem como para as demais extrações de PCBs feitas neste trabalho, esta última etapa foi suprimida porque constatou-se que ela reduz muito o rendimento da extração; ao invés disso, após a extração com n-hexano, fez-se a diluição direta dos PCBs para a concentração final de 80 ppb, da qual foram retiradas alíquotas de 0,2 µL para injeção no cromatógrafo. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás, equipado com um detector de captura de elétrons (*Perkin Elmer*, Shelton, CT). Para a linhagem RP1B, foi empregada uma coluna capilar com fase estacionária apolar, 100% dimetil polisiloxano, PE-1HT de 30m x 0,25mm x 0,10µm. Para todas as outras análises a coluna foi, também, uma PE-1HT do mesmo fabricante, porém com dimensões diferentes, 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm. Antes das injeções, as amostras da linhagem RP1B foram diluídas para 60 ppb (80 ppb para todas as demais linhagens deste trabalho) e 0,2 µL foram injetados, no modo *splitless*. Para a linhagem RP1B, as condições cromatográficas foram as mesmas apresentadas no item 3.2 (p.39), exceto no que se refere à programação de temperatura, a qual foi como descrita a

seguir: 80°C – 180°C (15°C/min); 180°C (1 min); 180°C – 190°C (0,5°C/min); 190°C – 280°C (20°C/min). A avaliação da biodegradação foi feita mediante comparação das diferenças entre as áreas dos picos dos cromatogramas dos grupos controle e experimental. O teste t foi empregado para avaliar a significância estatística ($P = 0,05$) das diferenças de média entre os grupos experimental e controle.

3.8 Biodegradação Cometabólica de PCBs

Neste estudo, as linhagens RCN2; IPN4B; IP13; IP16; IP24 e IP27, foram cultivadas em bifenilo (0,05%), suplementado com extrato de levedura (0,005%), até atingirem bom crescimento (4 a 8 dias); a seguir, foram centrifugadas ($\sim 4.430 \times g$; 10 min; 4°C) e submetidas aos mesmos procedimentos descritos no item anterior. Após 18 dias de cultivo procedeu-se a análise cromatográfica como descrita no item anterior. Aqui, também, o teste t foi utilizado para avaliar a significância estatística ($P = 0,05$) das diferenças de média entre os grupos experimental e controle.

3.9. Biodegradação de Ácidos Clorobenzóicos

As mesmas bactérias utilizadas no estudo de biodegradação cometabólica de PCBs (item anterior) foram testadas quanto à biodegradação de ácidos clorobenzóicos. Para esta etapa, as linhagens RCN2; IPN4B; IP13; IP16; IP24 e IP27 foram cultivadas previamente em bifenilo, suplementado com extrato de levedura (0,005%) e preparadas exatamente como descrito no item (3.7, p.46), exceto no que se refere à concentração de ACBs, que foi de 0,5 mM para cada um dos 7 ACBs empregados (Tab. 6). Também, o

volume final das alíquotas de cultivo foi de 2 mL e não de 1 mL, como no caso dos PCBs. O experimento foi encerrado após 18 dias de cultivo.

Tabela 6. Os 7 ácidos clorobenzóicos testados quanto à biodegradação.

Ácidos Clorobenzóicos
3,5 – ácido diclorobenzóico
3,4 – ácido diclorobenzóico
2,4 – ácido diclorobenzóico
2,3,6 – ácido triclorobenzóico
2,3,5 – ácido triclorobenzóico
2,3,5,6 – ácido tetraclorobenzóico
2,3,4,5,6 – ácido pentaclorobenzóico

Análise cromatográfica de ACBs – Antes das análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), as amostras foram acidificadas (HCl, 1M) a pH 2 e centrifugadas a $\sim 9.960 \times g$, por 10 minutos, a 4°C (ADRIAENS; FOCHT, 1991). Após isso, o sobrenadante foi coletado com auxílio de pipeta pasteur e o volume completado com água deionizada para 5 mL. Alíquotas de 20 μ L foram injetadas, em cromatógrafo Shimadzu LC-6A, equipado com detector espectrofotométrico UV Shimadzu SPD-6A, ajustado para o comprimento de onda de 229 nm. A coluna empregada foi uma C-18 (*Varian*) de fase reversa, com 15 cm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro. A fase móvel utilizada foi uma mistura 1:1 de ácido acético (1%) e metanol, degaseificada com degaseificador DGU-2A (*Shimadzu*). A vazão da fase móvel foi de 1 mL por minuto. Os cromatogramas foram gerados pelo integrador C-R7A *Plus*, também da *Shimadzu*. A

avaliação da biodegradação foi feita mediante comparação das diferenças entre as áreas dos picos dos cromatogramas dos grupos controle e experimental. O teste t foi empregado para avaliar a significância estatística ($P = 0,05$) das diferenças de média entre os grupos experimental e controle.

3.10. Identificação das Linhagens Bacterianas Utilizadas nos Testes de Biodegradação

As linhagens bacterianas selecionadas para os ensaios de biodegradação de PCBs e ACBs foram identificadas com o auxílio de testes bioquímicos clássicos (MAC FADDIN, 1980) e do *Bergey's manual of determinative bacteriology* (HOLT et al., 1994).

IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perfil Cromatográfico das Amostras Ambientais

Dez dos 17 PCBs estudados neste trabalho parecem estar presentes na borra de óleo de transformador da segunda coleta de campo (subestação de Iperó), conforme mostra a Figura 9 (p.54). Nota-se que os tempos de retenção dos PCBs 28; 52; 74; 101; 99; 118; 153; 179; 138 e 180 coincidem com picos correspondentes no cromatograma da amostra ambiental (Fig. 9 B e C, p.54). Na Figura 9 B, os picos aumentados devido à adição de padrões à amostra correspondem, supostamente, aos PCBs que têm os mesmos tempos de retenção em C. No cromatograma C foi usada uma baixa concentração de padrões de PCBs, por isso, os dois primeiros picos estão depreciados em relação aos

demais. A ordem de eluição dos PCBs no cromatograma C é: PCB 28; PCB 52; PCB 74; PCB 101; PCB 99; PCB 77; PCB 118; PCB 105 e PCB 153 (co-eluídos); PCB 179; PCB 138; PCB 126; PCB 128; PCB 156; PCB 180; PCB 169 e PCB 170. Já no caso do material proveniente da primeira coleta de campo, as análises cromatográficas não sugerem a presença de nenhum dos PCBs estudados, mesmo quando a amostra foi aquecida a 60°C e a fibra de extração (SPME) ficou exposta por 40 minutos no *headspace* (Fig. 8).

Embora a CETESB tenha relatado a existência de PCBs no local onde foi realizada a primeira coleta de campo (subestação de Pantojo), as análises realizadas não revelaram a presença de nenhum dos PCBs estudados neste projeto. Vale salientar que em conversas mantidas com o gerente da agência ambiental da CETESB, que conduzia o processo, ficou evidente que os locais amostrados (Fig. 5 c e d, p. 37) para este estudo e para a análise da CETESB foram diferentes. No entanto, levando-se em consideração a grande quantidade de isolados bacterianos obtidos, quando cultivados seletivamente em bifenilo, pode-se apontar a biodegradação destes compostos pela comunidade microbiana como uma possibilidade para a ausência de PCBs nos locais amostrados. Reforçando-se ainda esta linha de argumentação, pode-se ressaltar que foram originárias deste local as duas únicas linhagens bacterianas (RP1B e RP2A) capazes de degradar PCBs, de forma não-cometabólica, conforme sugerido pelos resultados obtidos (ver item 4.6, p.64).

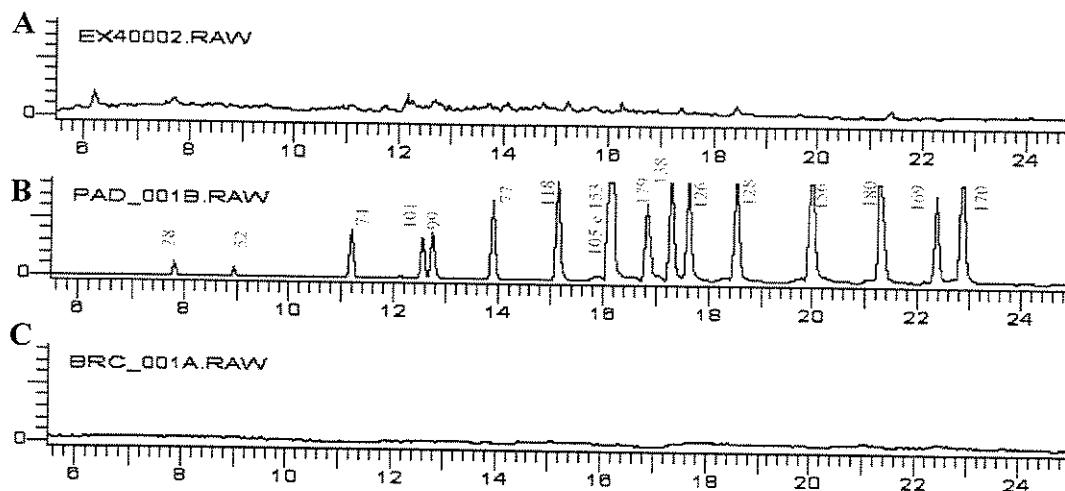


Figura 8. Perfil cromatográfico do material (borra de óleo de transformador) da primeira coleta de campo e comparação com o cromatograma da mistura de padrões de PCBs. A) cromatograma da amostra; B) cromatograma da mistura de padrões de PCBs. C) branco da fibra de extração (SPME). A ordem de eluição dos PCBs está indicada no cromatograma B.

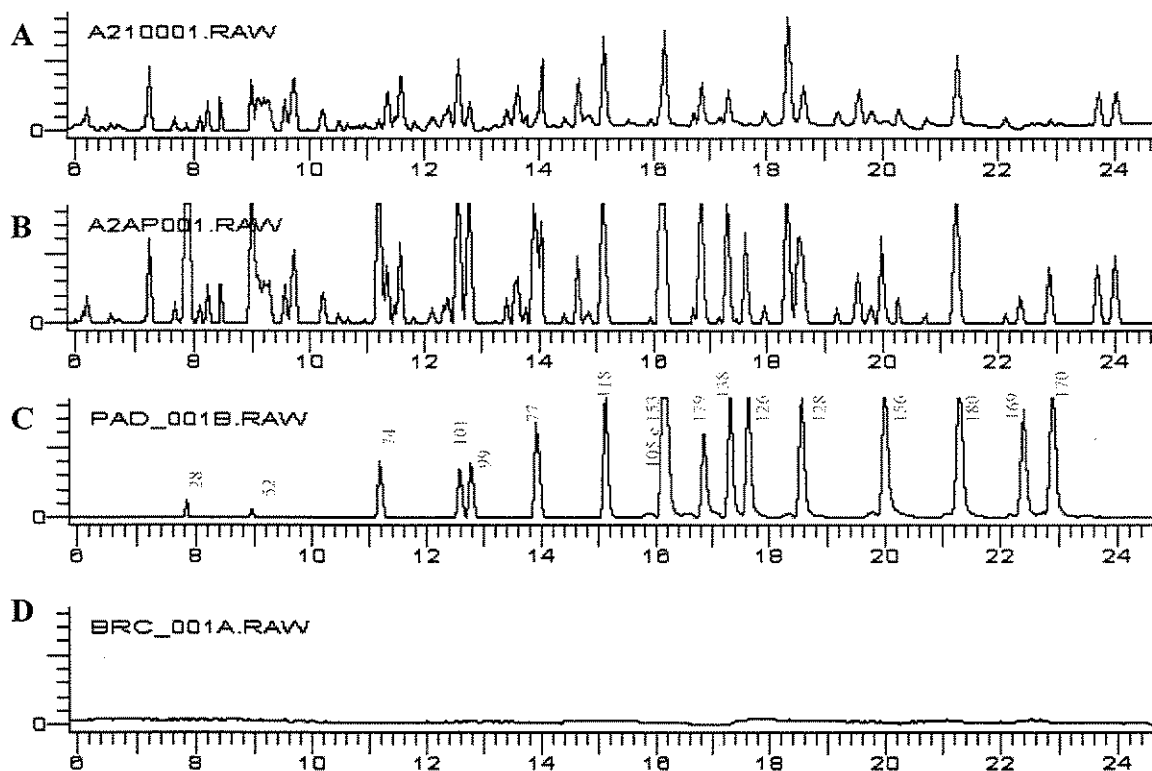


Figura 9. Perfil cromatográfico do material (borra de óleo de transformador) da segunda coleta de campo e comparação com o cromatograma da mistura de padrões de PCBs. A) cromatograma da amostra; B) cromatograma da amostra + mistura de padrões de PCBs; C) ordem de eluição de cada PCB na mistura de padrões; D) Branco da fibra de extração (SPME).

4.2. Isolamento de Microrganismos a Partir de Amostras de Campo

A partir das duas coletas de campo, foram isoladas 80 linhagens bacterianas (Anexos A e B, p.85 e 87), sendo 47 da primeira coleta (subestação de Pantojo, Fig. 5, p.37) e 33 da segunda (subestação de Iperó, Fig. 6, p.38). Não houve crescimento de fungos filamentosos ou leveduras nas condições de cultivo empregadas, mesmo sem a utilização de antibióticos para inibir o crescimento deles. Com 24 horas de incubação já se observava a coloração amarela que surge quando o bifenilo é transformado a produtos de meta clivagem (KIYOHARA; NAGAO; YANA, 1982; FURUKAWA, 2000a; 2000b) e catecol (PELLIZARI et al., 1995;). O isolamento da maioria das colônias deu-se com 4 dias (96 horas), quando já apresentavam bom crescimento, porém, algumas colônias de crescimento lento foram isoladas até o oitavo dia de cultivo. Considerando-se todos os 80 isolados, 39 da primeira coleta de campo e 16 da segunda produziram a coloração amarela, em decorrência da transformação do bifenilo (Anexos A e B, p.85 e 87). Comparativamente, as bactérias presentes no material da segunda coleta (linhagens IPs), produziram uma coloração amarela de intensidade muito mais forte no meio líquido do que as da primeira coleta de campo (linhagens RTs), durante a fase de enriquecimento seletivo, sugerindo que, potencialmente, seriam melhores degradadores de PCBs do que as linhagens RTs. No entanto, não foi feito teste de biodegradação de PCBs com os dois consórcios, para esclarecer esta possível relação.

4.3. Seleção Não-cometabólica de Bactérias Aeróbias em Mistura de 17 Congêneres de PCBs

A biodegradação de PCBs é descrita essencialmente como sendo do tipo cometabólica (BRENNER; ARENSDORF; FOCHT, 1994; FURUKAWA, 1994, 2000; HERNANDEZ; ARENSDORF; FOCHT, 1995; FOCHT; SEARLE; KOH, 1996). Isso significa que a presença de um análogo dos PCBs, como o bifenilo, por exemplo, seria um pré-requisito para induzir a síntese das enzimas oxidativas envolvidas no processo. Assim, o análogo e os PCBs seriam, competitivamente, degradados pelas mesmas enzimas (BRENNER; ARENSDORF; FOCHT, 1994).

Não se tem conhecimento de nenhum trabalho que tenha tido sucesso no isolamento de microrganismos de amostras ambientais capazes de utilizar PCBs, com ambos os anéis clorados, como única fonte de carbono. Brenner e colaboradores (1994), comentam que estes microrganismos parecem mesmo não existir na natureza, mas esta informação, em princípio, não deve ser aceita, uma vez que não leva em consideração o fato de uma grande quantidade de microrganismos não serem cultiváveis em meios convencionais de cultivo laboratoriais (PONEZZI, 2003).

O fato de não se ter encontrado ainda nenhum microrganismo de amostras ambientais capaz de usar PCBs, contendo cloro em ambos os anéis, como única fonte de carbono, não significa, necessariamente, que eles não existam na natureza e que não possam ser isolados. Um dos desafios deste trabalho foi a busca de tais microrganismos (COSTA et al, 2003). Ao final dos testes de adaptação (aclimatação) e enriquecimento seletivo feitos neste trabalho (item 3.4, p.43), três tipos de isolados bacterianos (RP A e B;

e IPP) foram obtidos do meio sólido contendo apenas PCBs como única fonte de carbono (Tabs. 7 e 8, p.59).

Em princípio, para ser executado este teste, e aquele descrito no próximo tópico, ou seja, dois dos quatro testes fundamentais deste projeto (testes 3 e 4, p.35), uma dificuldade deveria ser contornada, isto é: como testar todas as linhagens isoladas da primeira e segunda coletas, da forma menos dispendiosa possível, em relação ao tempo e custos operacionais? A solução foi a formação de dois grandes consórcios: a) reunindo todas as linhagens da primeira coleta de campo e b) todas as linhagens da segunda coleta. A seguir, estão apresentados os resultados de isolamento de linhagens bacterianas dos dois consórcios estudados, cultivados em meio mineral mínimo, tendo 17 congêneres de PCBs como única fonte de carbono. As tabelas 7 e 8 (p.59) mostram os isolados obtidos de cada etapa (cultivo inicial, 1ª transferência, 2ª transferência e 3ª transferência), no final da fase de enriquecimento seletivo (24 dias), quando do cultivo em meio sólido contendo PCBs como única fonte de carbono ou no meio nutritivo (agar nutritivo). A Tabela 7 diz respeito ao reisolamento de linhagens RTs e, a Tabela 8, às linhagens IPs.

Os isolados RP1A, RP2A RP3A são triplicatas de colônias que apresentavam o mesmo aspecto macroscópico, assim como RP1B, RP2B e, RP3B. Foram isoladas do meio sólido contendo apenas PCBs como única fonte de carbono. Pelo fato de terem crescido em tais condições, provavelmente, são capazes de degradar estes substratos. Os resultados de biodegradação de PCBs para RP1B e RP2A, (item 4.6, p.64), sugerem que estas linhagens são degradadoras de PCBs.

As linhagens do tipo RPN foram isoladas no final do experimento, em agar nutriente. RPN1 e RPN2 apresentam colônias amareladas, pequenas, com relevo, circulares e com forte brilho. Já as RPN3 e RPN4 compartilham das mesmas características das duas

anteriores, porém, formaram colônias grandes. RPN5 tem coloração bege e forte brilho. RPN6 é caracterizada pela cor branca, sem relevo, e por espalhar-se em forma de tapete na superfície do agar nutriente.

Os isolados IPP1, IPP2 e IPP3 têm aparência idêntica às IPN1, IPN2 e IPN3, porém as três últimas foram isoladas de meio contendo agar nutritivo, enquanto que as três primeiras foram isoladas do meio sólido contendo somente PCBs como única fonte de carbono. Formam, no agar nutritivo, colônias amareladas, grandes, brilhantes e circulares; são muito parecidas entre si e, possivelmente, correspondem a um mesmo tipo de bactéria. Além dessas, foram isolados mais três tipos diferentes de bactérias: IPN4A, IPN4B e RPN6.

Como os 26 isolados foram, na medida do possível, isolados em triplicata, eles constituem, com base em semelhanças microscópicas e macroscópicas, provavelmente, apenas 10 tipos diferentes de bactérias agrupados na Tabela 9 (p.60). Vale salientar, contudo, que apenas os isolados RP (A e B) e IPP foram obtidos do meio sólido contendo PCBs como única fonte de carbono.

Tabela 7. Reisolamento de linhagens RTs (1ª coleta de campo), após cultura de enriquecimento em meio mineral mínimo, contendo 17 congêneres de PCBs como única fonte de carbono.

ETAPAS DO CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO	CULTIVO EM MEIO SÓLIDO	
	PCBs: ÚNICA FONTE DE CARBONO	AGAR NUTRITIVO
Inicial	RP1A, RP1B, RP2A, RP2B, RP3A, RP3B	RPN1, RPN2
1ª transferência	-	RPN3, RPN4, RPN5A, RPN5B
2ª transferência	-	RPN6
3ª transferência	-	-

Tabela 8. Reisolamento de linhagens IPs (2ª coleta de campo), após cultura de enriquecimento em meio mineral mínimo, contendo 17 congêneres de PCBs como única fonte de carbono.

ETAPAS DO CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO	CULTIVO EM MEIO SÓLIDO	
	PCBs: ÚNICA FONTE DE CARBONO	AGAR NUTRITIVO
Inicial	IPP1; IPP2; IPP3	IPN1; IPN2; IPN3; IPN4A; IPN4B; IPN5
1ª transferência	-	-
2ª transferência	-	-
3ª transferência	-	-

Tabela 9. Grupos de isolados obtidos após cultivo das bactérias oriundas da 1ª e 2ª coletas foram cultivados de forma não-cometabólica na presença de 17 PCBs ou 12ACBs.

GRUPOS	ISOLADOS/DESCRIÇÃO
Grupo 1	RP1A; RP2A; RP3A Gram -; bastonetes pequenos a médio, com arranjo predominante em pares.
Grupo 2	RP1B; RP2B; RP3B; RPN5B:Gram -; bastonetes pequenos a médio, colônias com tamanho de médio a grande, já com 24 horas; cor bege, circulares, com relevo e forte brilho. RP1B:G+
Grupo 3	RPN1; RPN2; RPN3; RPN4 Gram -; com 24 hs têm bom crescimento de massa celular nas estrias do agar nutriente, mas as colônias são pequenas, amareladas, com relevo, circulares e com forte brilho. Cocos ou cocobacilos.
Grupo 4	RPN5A Gram -; as colônias são de tamanho médio com 24 hs, amareladas, com relevo, circulares e com forte brilho.
Grupo 5	RPN6; RCN4 Gram -; com 24 hs têm pouco crescimento e não há colônias visíveis; são bastonetes médios e finos. Branco leitosas, sem relevo e espalham-se em forma de tapete. Para RCN4, ver item 4.4.
Grupo 6	RCN1; RCN2; RCN3 (ver item 4.4, p.61) Gram -; colônias muito pequenas com 24 hs, porém médias com 48 hs, esbranquiçadas e circulares. Espalhamento em forma de tapete entre as colônias, dando a impressão de contaminação. Bastonetes pequenos e finos, lembram cocos enfileirados.
Grupo 7	IPP1; IPP2; IPP3; IPN1; IPN2; IPN3 Gram -; bastonetes pequenos a médios, de cor amarelada a bege claro, circulares e com brilho.
Grupo 8	IPN4A Gram -; cocos ou cocobacilos, quase sem espalhamento.
Grupo 9	IPN4B Gram -; bastonetes médios; colônias bege claro com forte espalhamento pela superfície do agar nutriente; massa celular densa.
Grupo 10	IPN5 Gram -; colônias brancas, circulares, pouco brilho, com espalhamento, mas a massa celular é muito rala, sem relevo.

4.4. Seleção Não-cometabólica de Bactérias Aeróbias em Mistura de 12 Ácidos Clorobenzóicos

Neste trabalho, tentou-se isolar degradadores de ACBs em culturas de enriquecimento em meio mineral mínimo contendo 12 ACBs como única fonte de carbono. Não se tem conhecimento de trabalhos que tenham cultivado microrganismos na presença de mais de 7 ACBs como única fonte de carbono (VRANA et al., 1996).

Com as linhagens IPs, não se obteve nenhum sucesso nas tentativas de reisolamento, por outro lado, a Tabela 10 mostra algumas linhagens reisoladas a partir do consórcio composto pelas linhagens RTs. Em agar nutriente, os isolados RCN1, RCN2 e RCN3 apresentam as mesmas características macroscópicas (Tab. 9, p.60) e parece se tratar do mesmo microrganismo. Já a linhagem RCN4 tem cor branca, sem relevo e espalha-se em forma de tapete sobre a superfície do agar nutriente, sendo semelhante à RPN6.

Assim como no caso dos ensaios anteriores (PCBs como única fonte de carbono), também não foi possível isolar nenhum microrganismo ao final da última etapa de cultivo (3ª transferência). A escassez de microrganismos nestes resultados pode estar associada ao fato de que os degradadores de ACBs parecem ser menos frequentes na natureza do que os degradadores de bifenilo (FOCHT; SEARLE; KOH, 1996). Além disso, as linhagens RTs e IPs foram isoladas de matrizes ambientais contaminadas com PCBs e sabe-se que, normalmente, os degradadores de PCBs acumulam ACBs por não conseguirem metabolizá-los (BRENNER; ARENSDORF; FOCHT, 1994; FURUKAWA 2000). Em outras palavras, o ambiente contaminado com PCBs, de onde vieram as linhagens IPs e RTs pode ter selecionado degradadores de bifenilo/PCBs, e nenhum ou poucos degradadores de ACBs. Outro fator a ser considerado é a quantidade de ACBs

utilizados (12), pois vários deles podem ser tóxicos para determinados tipos de microrganismos (STRATFORD et al., 1996; VRANA et al., 1996;).

Tabela 10. Reisolamento de linhagens RTs (1ª coleta de campo), após cultura de enriquecimento em meio mineral mínimo, contendo 12 ácidos clorobenzóicos (ACBs) como única fonte de carbono.

ETAPAS DO CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO	CULTIVO EM MEIO SÓLIDO	
	ACBs: ÚNICA FONTE DE CARBONO	AGAR NUTRITIVO
Inicial	-	RCN1; RCN2
1ª transferência	-	RCN3; RCN4
2ª transferência	-	-
3ª transferência	-	-

4.5. Seleção de Bactérias Produtoras de Biossurfactantes Capazes de Crescimento na Presença de Bifenilo

Neste estudo, 72 linhagens de bactérias (Anexo C, p.89) da Coleção de Culturas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, produtoras de biossurfactantes e isoladas de solo contaminado com óleo diesel (JACOBUCCI, 2000) foram submetidas a reativação do congelamento; sendo que um total 65 linhagens foram reativadas com sucesso e, destas, 56 foram testadas quanto à capacidade de crescimento na presença de bifenilo.

A justificativa para se testar as linhagens isoladas de solo contaminado com óleo diesel baseia-se no fato desta substância ser rica em hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Sendo o bifenilo um HAP relativamente simples (apenas 2 anéis), esperava-se que tais bactérias fossem capazes de degradá-lo facilmente e, deste modo, serem consideradas potencialmente capazes de transformar, também, PCBs. Uma motivação adicional para testá-las foi o fato de serem produtoras de biossurfactantes, os quais, aumentam a disponibilidade de substâncias de natureza oleosa (como é o caso do bifenilo e PCBs) que podem ser usadas pela célula. Inicialmente, foram testadas 8 linhagens (4016; 4018; 4009; 5BII; 5B4; 5C2; 5D2 e 5E2) dentre as melhores produtoras de biossurfactantes (CARVALHO; MARCHI; DURRANT, 1997; CARVALHO et al., 1999;). Todas apresentaram crescimento muito escasso e não produziram a coloração amarela típica, que surge quando o bifenilo é transformado a catecol (KIYOHARA; NAGAO; YANA, 1982; PELLIZARI, 1995;); portanto, foram consideradas não degradadoras de bifenilo. O próximo passo foi testar as 48 linhagens restantes, reativadas do congelamento. Nenhuma dessas linhagens foi capaz de transformar o bifenilo até catecol (ausência de coloração amarela). Embora tenham sido isoladas de uma matriz (borra de óleo diesel) na qual estavam em contato com HAPs, as linhagens aqui testadas parecem não ser capazes de degradar o bifenilo, provavelmente pela ausência ou pela não ativação das enzimas que degradam este composto, ou seja, bifenilo dioxigenases (FURUKAWA 2000; PELLIZARI, 1995).

4.6. Biodegradação Não-cometabólica de PCBs

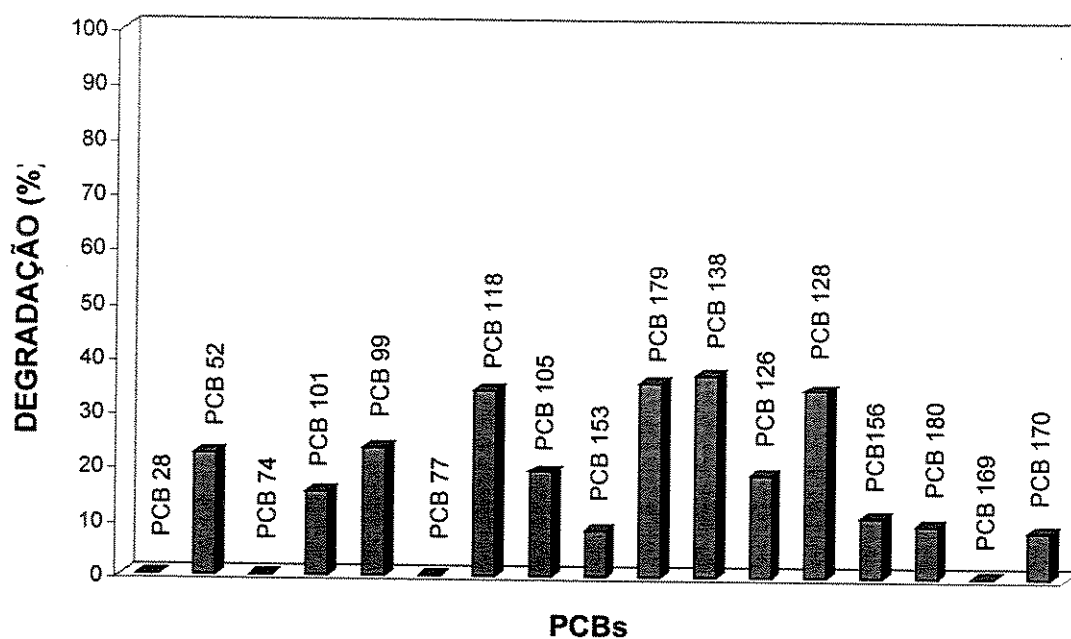
Um dos desafios deste trabalho foi a busca de microrganismos nativos, capazes de usar PCBs clorados em ambos os anéis, de modo não-cometabólico. A descoberta deles é de grande importância prática, quando considerados os custos de implementação de tecnologias de biorremediação e o impacto ambiental da adição de co-substratos (outros poluentes!).

Neste estudo, 3 linhagens (RP1B; RP2A e IPP1) isoladas de meio sólido contendo 17 PCBs como única fonte de carbono (item 4.3, p.56) foram testadas quanto à competência para degradar PCBs de forma não-cometabólica. A linhagem RP1B foi analisada após 18 dias de cultivo, mediante comparação das médias das áreas dos picos dos cromatogramas dos grupos controle e experimental. O resultado está mostrado na Figura 10, na Tabela 11 e no Anexo D (p.93). Apesar dos dados desta linhagem não terem sido submetidos a teste de hipóteses (teste t), devido à perda de dois controles, os baixos percentuais dos desvios padrões do grupo experimental indicam a confiabilidade dos procedimentos experimentais e, deste modo, os resultados podem ser considerados um indício da ação de RP1B sobre 13, dos 17 PCBs adicionados ao meio de cultivo, mesmo em condições nutricionais extremamente pobres, isto é, ausência de extrato de levedura ou qualquer co-substrato e do padrão altamente clorado dos congêneres empregados (3 a 7 átomos de cloro em cada PCB). As linhagens RP2A e IPP1 foram, também, analisadas mediante comparação das médias das áreas dos picos dos cromatogramas dos grupos controle e experimental, porém, após 33 dias. Conforme mostrado no Anexo E, para os PCBs 28 e 52 há uma diferença significativa ($P=0,05$) entre as médias das áreas dos picos dos grupos controle e experimental, respectivamente. Isto sugere que a linhagem RP2A

Tabela 11. Biodegradação não-cometabólica de PCBs pelas linhagens IPP1, RP2A e RP1B

PCB	IPP1	RP2A	RP1B
28	-	19,11%	-
52	-	19,03%	22,17%
74	-	-	-
101	-	-	15,47%
99	-	-	23,58%
77	-	-	-
118	-	-	34,01%
105	-	-	19,23%
153	-	-	8,26%
179	-	-	35,48%
138	-	-	37,00%
126	-	-	18,61%
128	-	-	34,24%
156	-	-	11,07%
180	-	-	9,56%
169	-	-	-
170	-	-	8,47%

Nota: RP1B foi cultivada durante 18 dias e, IPP1e RP2A, durante 33 dias.

**Figura 10.** Biodegradação de 17 PCBs pela linhagem RP1B após 18 dias de cultivo.

seria capaz de degradar estes dois PCBs de forma não-cometabólica. Os percentuais de degradação para os dois PCBs foram de ~ 19 % (Tabela 11). Para a linhagem IPP1, não houve diferenças significativas ($P=0,05$) entre as médias das áreas dos picos dos grupos controle e experimental (Tab.11; Anexo F, p.95); portanto, esta linhagem não seria capaz de degradar os PCBs suplementados ao meio de cultivo, nas condições apresentadas aqui.

Coincidentemente, as linhagens RP1B e RP2A que, de acordo com os resultados deste trabalho são, supostamente, degradadoras de PCBs, pertencem a dois gêneros importantes no que se refere à biodegradação de PCBs. Ambas as linhagens foram identificadas por testes bioquímicos clássicos e os resultados (Anexo P, p.105) sugerem que RP1B e RP2A pertencem aos gêneros *Arthrobacter* e *Pseudomonas*, respectivamente. No caso da linhagem RP2A, os testes bioquímicos sugerem que se trata da espécie *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Já a linhagem IPP1 pertence ao gênero *Aminobacter*, do qual, não há conhecimento de que tenha sido citado em estudos de biodegradação de PCBs.

A biodegradação de PCBs depende do número, e do padrão de substituição de átomos de cloro nos anéis do bifenilo (FURUKAWA, 2000a, BEDARD et al., 1986). Particularmente, a existência de sítios 2,3 ou 3,4 não clorados facilitam a ação de 2,3-dioxigenases ou 3,4 dioxigenases, respectivamente; mas está claro que a ausência de cloro nas posições 2,3 ou 3,4 não é o único critério para haver biodegradação (BEDARD, 1986). De fato, BEDARD e colaboradores (1986) relataram duas linhagens bacterianas (*A. eutrophus* H850 and *P. putida* LB400) com excepcional competência degradativa de PCBs, ambas com capacidade para degradar 2,2',4,4',5,5'-hexacloro bifenilo, um PCB sem sítios adjacentes livres de cloro. Além disso, o grau de coplanaridade, o qual é afetado pela presença de cloro na posição *orto*, promove torções na molécula de PCB e pode facilitar a

degradação (BEDARD et al., 1986), exceto em alguns casos específicos (FURUKAWA, 2000b).

Os PCBs mais degradados pela linhagem RP1B foram os congêneres 138; 179; 118; 128; e 99; 52; 105; 126; 101. Em todos estes congêneres há posições 2,3 ou 3,4 livres de cloro, sugerindo a presença de ambas as dioxigenases (2,3-dioxigenase e 3,4-dioxigenase) ou outra enzima (ou enzimas) com ampla competência degradativa, uma vez que dois PCBs (153, 180) sem sítios adjacentes livres foram degradados pela linhagem RP1B. Por outro lado, PCB 28 e PCB 74, ambos com as posições 2,3 livres de cloro, não foram degradados. Além disso, a linhagem RP1B degradou dois congêneres coplanares (PCB 126 e PCB 169), mas não o fez em relação ao PCB 77.

A linhagem RP2A degradou cerca de 19% dos PCBs 28 e 52, ambos com sítios 2,3 e 3,4 livres de cloro, respectivamente, o que sugere, a ação das enzimas 2,3-dioxigenase e 3,4-dioxigenase.

Os percentuais de degradação envolvendo as linhagens RP1B e RP2A não ultrapassaram 38% durante os períodos de incubação considerados (18 e 33 dias, respectivamente), entretanto, os resultados aqui discutidos indicam que nas condições experimentais empregadas, a biodegradação de PCBs pode ter ocorrido de forma não-cometabólica.

4.7. Biodegradação Cometabólica de PCBs

A biodegradação de PCBs, como já mencionada anteriormente, é relatada na literatura científica como sendo essencialmente cometabólica (BRENNER; ARENSDORF; FOCHT, 1994; FURUKAWA, 1994, 2000; HERNANDEZ; ARENSDORF; FOCHT, 1995;



FOCHT; SEARLE; KOH, 1996). Desse modo, um análogo dos PCBs (bifenilo, por exemplo), induziria a síntese de enzimas oxidativas envolvidas no processo e, competitivamente, o análogo e os PCBs seriam degradados por estas mesmas enzimas.

Neste estudo, tal possibilidade foi testada com as linhagens RCN2; IPN4B; IP13; IP16; IP24; IP27. Dessas 6 linhagens, as duas primeiras não produzem coloração amarela na presença do bifenilo (FURUKAWA, 2000a; 2000b; PELLIZARI, 1995), entretanto, as demais cresceram abundantemente em bifenilo, com forte produção de cor amarela. Em outras palavras, seria esperado que pelo menos essas 4 linhagens tivessem competência metabólica para degradar os PCBs suplementados ao meio de cultivo, porém, como apresentado nos Anexos de G (p.96) a L (p.101), isso não aconteceu, exceto para a linhagem IP16 (Tab. 12; Anexo H, p.97), onde, provavelmente, ocorreu a degradação dos PCBs 153 (46,76 %), 138 (47,91 %), 180 (44,55 %) e 170 (50,43 %).

Os PCBs estudados neste trabalho são altamente recalcitrantes no meio ambiente e representam os congêneres mais tóxicos e persistentes para os seres humanos e outros animais (SAFE, S.; SAFE, L.; MULLIN, 1985; DUINKER; SCHULTZ; PETRICK, 1988; McFARLAND; CLARKE, 1989; WHO, 1993; ANGULO; MARTINEZ; JODRAL, 1999). Tal fato, por si só já reflete a escassez de microrganismos para degradar estes poluentes no ambiente. Neste trabalho, foi testado apenas cerca de 11 % (9 linhagens) de todos os isolados coletados nas duas amostras ambientais (cerca de 80 linhagens). É possível que dentre os isolados restantes ocorram mais degradadores destes PCBs. Em todo caso, as linhagens que utilizam o bifenilo com produção de coloração amarela, têm, sabidamente, “potencial” para degradar PCBs e, portanto, poderiam ser modificadas geneticamente em estudos futuros no que diz respeito à aquisição de competência enzimática para metabolizar PCBs.

Tabela 12. Biodegradação cometabólica de PCBs pelas linhagens IP13, IP16, IP24, IP27, RCN2 e IPN4B.

PCB	IP13	IP16	IP24	IP27	RCN2	IPN4B
28	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-
101	-	-	-	-	-	-
99	-	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	-	-
118	-	-	-	-	-	-
105	-	-	-	-	-	-
153	-	46,76%	-	-	-	-
179	-	-	-	-	-	-
138	-	47,91%	-	-	-	-
126	-	-	-	-	-	-
128	pi	pi	pi	pi	pi	pi
156	-	-	-	-	-	-
180	-	44,55%	-	-	-	-
169	-	-	-	-	-	-
170	-	50,43%	-	-	-	-

LEGENDA: pi=padrão interno.

4.8. Biodegradação de Ácidos Clorobenzóicos

Os ácidos clorobenzóicos (ACBs) se acumulam no ambiente devido ao uso como pesticidas ou como metabólitos intermediários da biodegradação de PCBs, daí o interesse do presente trabalho no estudo da sua biodegradação. O desafio seria encontrar microrganismos que, além de degradar PCBs também tivessem competência metabólica para degradar os ACBs, o que seria um resultado inédito para o conhecimento científico nesta área de estudo. De fato, Brenner e colaboradores (1994), discutem que os genes para a degradação completa de PCBs estão no ambiente, porém em microrganismos diferentes, isto é, os degradadores de PCBs acumulam ACBs e estes compostos, por sua vez, são

degradados por outros microrganismos, diferentes dos primeiros. Isso, contudo, não significa que não possam ocorrer na natureza degradadores com ambas as competências.

Aqui, foram testadas as mesmas linhagens utilizadas no estudo de degradação cometabólica (item 3.8, p.48), ou seja, RCN2; IPN4B; IP13; IP16; IP24; IP27. Os resultados estão mostrados na Tabela 13 e nos Anexos M (p.102), N (p.103) e O (p.104). Como se pode observar, os dados sugerem que as linhagens IP24, IP27 e RCN2 degradaram, respectivamente, 3, 2 e 1 dos 7 ACBs suplementados ao meio de cultivo (COSTA; SERRANO; DURRANT, 2003). Os percentuais de biodegradação variaram de 6 a 100% (Tab. 13; Anexos M, N e O). A linhagem IP24 degradou 100% do composto 2,3,6-triclorobenzoato (Fig.11, p.72); 48,75% do composto 3,4-diclorobenzoato e 23,94% do ACB 2,3,4,5,6-pentaclorobenzoato. A linhagem IP27 degradou, respectivamente, 20,38% e 6,03% dos ACBs 2,3,4,5,6-pentaclorobenzoato e 2,3,5,6-tetraclorobenzoato. Já a linhagem RCN2 degradou 38,71% do composto 2,3,6-triclorobenzoato. Por outro lado, as linhagens IP13; IP16 e IPN4B não degradaram nenhum dos 7 ACBs presentes no meio de cultivo.

Apesar deste trabalho ter, possivelmente, encontrado degradadores de ACBs, nenhuma dessas linhagens degradou PCBs nas condições que foram testadas. Isso reforça a idéia de Brenner e colaboradores (1994), de que a degradação de PCBs e ACBs é feita por microrganismos diferentes; contudo, as linhagens IP24 e IP27 cresceram muito bem na presença de bifenilo, produzindo forte coloração amarela devido à degradação do bifenilo a produtos de metaclivagem (FURUKAWA, 2000a; 2000b) e catecol (PELLIZARI, 1995; FURUKAWA, 2000a; 2000b). Já que são, provavelmente degradadoras de ACBs e, potencialmente, degradadoras de PCBs, estas bactérias poderiam, futuramente, ser modificadas por técnicas de engenharia genética, na tentativa de aquisição de competência para metabolizar ambos os compostos (PCBs e ACBs).

Tabela 13. Biodegradação de ACBs pelas linhagens IP13, IP16, IP24, IP27, RCN2 e IPN4B.

ACB	IP13	IP16	IP24	IP27	RCN2	IPN4B
2,4	-	-	-	-	-	-
3,4	-	-	48,75%	-	-	-
3,5	-	-	-	-	-	-
2,3,5	-	-	-	-	-	-
2,3,6	-	-	100%	-	38,71%	-
2,3,5,6	-	-	-	6,03%	-	-
2,3,4,5,6	-	-	23,94%	20,38%	-	-

Legenda: ACBs: 2,4-diclorobenzoato; 3,4-diclorobenzoato; 3,5-diclorobenzoato; 2,3,5-triclorobenzoato; 2,3,6-triclorobenzoato; 2,3,5,6-tetraclorobenzoato; 2,3,4,5,6-pentaclorobenzoato.

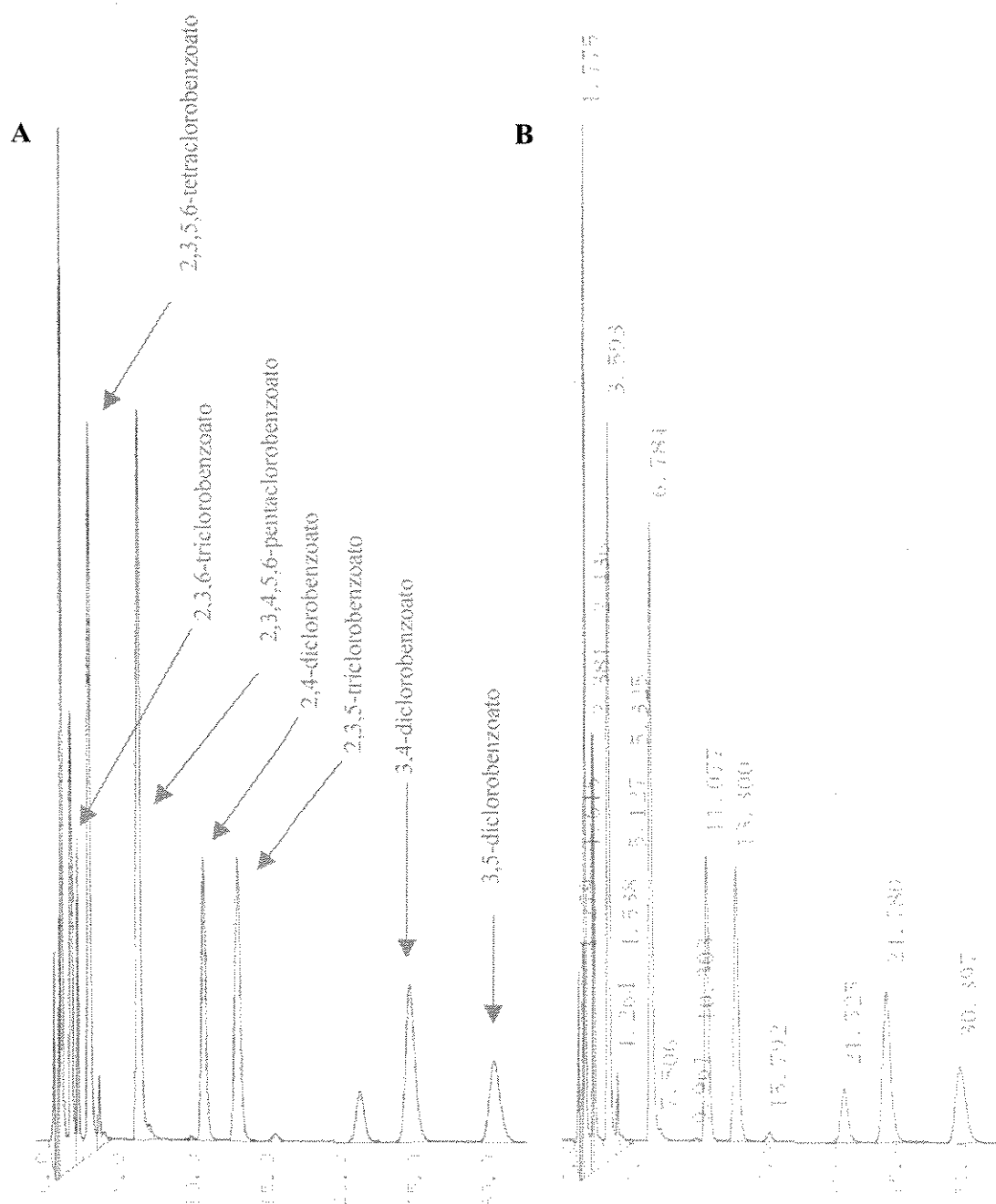


Figura 11. Cromatograma gerado por CLAE, mostrando a sequência de eluição para os ACBs testados quanto à biodegradação. Aqui, a linhagem exemplificada é a IP24. A, controle; B, experimental. Note-se em B que o ACB 2,3,6-triclorobenzoato foi totalmente degradado por esta linhagem. Os tempos de retenção estão em minutos.

V

CONCLUSÕES

- 1) Trinta e nove isolados oriundos da subestação de Pantojo e 19 da subestação de Iperó degradaram o bifenilo pela rota metabólica do catecol (produção de cor amarela), indicando que são potencialmente degradadores de PCBs.
- 2) Dentre as 56 linhagens da Coleção de Culturas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, produtoras de biossurfactante e isoladas de área contaminada com óleo diesel, nenhuma utilizou o bifenilo como fonte de carbono.
- 3) *Seleção não-cometabólica de bactérias na presença de 17 PCBs*: das 80 linhagens reunidas em 2 consórcios, apenas 3 tipos de isolados (RP1A, B, e C; RP2A, B e C; e IPP1,

2 e 3) foram obtidos, no final do processo, do meio sólido contendo unicamente PCBs como fonte de carbono.

4) *Seleção não-cometabólica de bactérias na presença de 12 ácidos clorobenzóicos (ACBs)*: Nenhum isolado foi obtido no final do processo, no meio sólido contendo ACBs como fonte de carbono.

5) *Biodegradação não-cometabólica de PCBs*: as linhagens RP1B (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*) e RP2A (*Arthrobacter sp.*) foram capazes de degradar PCBs sem a adição de co-substratos.

6) *Biodegradação cometabólica de PCBs*: dentre 6 isolados selecionados, apenas a linhagem IP16 foi capaz de degradar PCBs (PCB 138; PCB 153; PCB 170 e PCB 180), tendo o bifenilo como co-substrato.

7) *Biodegradação de ácidos clorobenzóicos (ACBs)*: das 6 linhagens testadas, 3 delas, a saber, IP24, IP27 e RCN2 (*Bacillus sp.*), degradaram respectivamente, 3, 2 e 1 dos 7 ACBs suplementados ao meio de cultivo, com percentuais que variaram de 6 a 100% de degradação.

A contribuição desse trabalho vem se somar às poucas pesquisas realizadas no Brasil, nesta área de estudo e ressaltar a existência, em nosso país, de recursos microbianos capazes de degradar PCBs e ACBs. Tais recursos podem vir a ser de grande valia no tratamento de resíduos contendo PCBs e ACBs, bem como na recuperação de áreas contaminadas por estes poluentes.

VI

REFERÊNCIAS

ADRIAENS, P.; FOCHT, D. D. Cometabolism of 3,4-dichlorobenzoate by *Acinetobacter* sp. strain 4-CB1. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 57, n. 1, p. 173-179, 1991.

ADRIAENS, P.; VOGEL, T. M. Biological treatment of chlorinated organics. In: YOUNG, L. Y.; CERNIGLIA, C. E. (Eds.) *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. New York: Wiley-Liss, 1995.

AHMED, M.; FOCHT, D. D. Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achromobacter*. *Can. J. Microbiol.*, v. 19, p. 47-52, 1973.

ANGULO, R.; MARTINEZ, P.; JODRAL, M. L. PCB congeners transferred by human milk, with an estimate of their daily intake. *Food Chem. Toxicol.*, v. 37, p. 1081-1088, 1999.

AOKI, Y. Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters – what we have learned from yusho disease? *Environmental Research Section A*, v. 86, p. 2-11, 2001.

BÄCKLIN, B. M. et al. Polychlorinated biphenyl (PCB) exposure produces placental vascular and trophoblastic lesions in the mink (*Mustela vison*): a light and electron microscopic study. *APMIS*, v. 106, p. 785-799, 1998.

BAKER, V. A. Endocrine disrupters – Testing strategies to assess human hazard. *Toxicology in Vitro*, v. 15, p. 413-419, 2001.

BANDEIRANTE ENERGIA. *Programa de Investimentos da Bandeirante Energia (BR-0401): Relatório de impacto ambiental e social*. São Paulo, 2003.

BEDARD, D. L.; QUENSEN III, J. F. Microbial reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls. In: YOUNG, L. Y.; CERNIGLIA, C. E. (Eds.). *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. New York: Willey-Liss, 1995.

BEDARD, D. L et al. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyl. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 51, p. 761-768, 1986.

BREIVIK, K. et al. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congenere – a mass balance approach. 1. Global production and consumption. *The Science of the Total Enviroment*, n. 290, p. 181-198, 2002a.

BREIVIK, K. et al. Towards a global historical emission inventory for selected PCB congenere – a mass balance approach. 2. Emissions. *The Science of the Total Enviroment*, n. 290, p. 199-224, 2002b.

BRENNER, V.; ARENSDORF, J. J.; FOCHT, D. D. Genetic construction of PCB degraders. *Biodegradation*, n. 5, p. 359-377, 1994.

BROWER, A. et al. Characterization of potential endocrine-related health effects at low-dose levels of exposure to PCBs. *Environ. Health Perspect.*, v. 107, p. 639-649, 1999.

BUCHOLSKY, K. A. et al. Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in human body fluids and tissues. *J. Chromat. A*, v. 754, p. 479-485, 1996.

CAIRNS, T. et al. Analytical chemistry of PCBs. In: Waid, J. S., ed. *PCBs and the environment*. Boca Raton: CRC Press, 1986.

CARVALHO, D. F et al. Diesel oil: a source for the production of biosurfactants. In: ALLEMAN, B. C.; LEESON, A. (Eds.). *In situ bioremediation of petroleum hydrocarbon and other organic compounds*. Columbus: Battelle Press, 1999.

CARVALHO, D. F.; MARCHI, D. D.; DURRANT, L. R. Production of extracellular surface-active compounds by microorganisms grown on hydrocarbons. In: ALLEMAN, B. C.; LEESON, A. (Eds.). *In situ and on-site bioremediation*. Columbus: Battelle Press, 1997. v. 4.

CHANG, B. V.; CHOU, S. W.; YUAN, S. Y. Dechlorination of polychlorinated biphenyls by an anaerobic mixed culture. *J. Environ. Sci. Health A.*, v. 34, p. 1299-1316, 1999.

CHOI, D. et al. Determining dioxin-like compounds in selected Korean food. *Chemosphere*, v. 46, p.1423-1427, 2002.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). Processo nº 33/00647/97. São Paulo, 1997.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). *Áreas contaminadas no Estado de São Paulo* (relatório técnico). São Paulo, 2002.

COSTA, J. G.; MACHADO, M. L.; DURRANT, L. R. Aerobic bacteria isolated from a PCB-contaminated site are capable of growing on biphenyl. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001. Foz do Iguaçu. *Anais ...*, Rio de Janeiro: Armazém das Letras, 2001. p. 11.

COSTA, J. G.; DURRANT, L. R. Isolamento de bactérias aeróbicas em 17 bifenilos policlorados (PCBs) e 12 ácidos clorobenzóicos como únicas fontes de carbono. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 8., 2002. Rio de Janeiro. *Anais....*, 2002. p. 70.

COSTA, J. G. et al. Non-Cometabolic PCB Biodegradation: Does it occur in nature?. In: PROCEEDINGS OF THE IN SITU AND ON-SITE BIOREMEDIATION, 7., 2003. Orlando. *Anais...* Orlando: Battelle Press. 2003.

COSTA, J. G.; SERRANO, I. S.; DURRANT, L. R. (2003).. Biodegradação de ácidos clorobenzóicos por bactérias isoladas de ambientes contaminados por PCBs. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2003. Florianópolis. *Anais ...*, 2003.

COVACI, A. et al. Distribution of PCBs and organochlorine pesticides in umbilical cord and maternal serum. *The Science of the Total Environment*, v. 298, p. 45-53, 2002.

DEL GRANDE, M.; REZENDE, M. O. O. Distribuição de compostos organoclorados nas águas e sedimentos da bacia do rio piracicaba/SP – Brasil. *Quim. Nova*, v. 26, n. 5, p. 678-686. 2003.

DOUGHERTY, C. et al. Dietary exposures to food contaminants across the United States. *Environmental Research Section A*, v. 84, p. 170-185, 2000.

DUINKER, J. C., SCHULTZ, D. E., PETRICK, G. Selection of chlorinated biphenyl congeners for analysis in environmental samples. *Mar Pollut. Bull.*, v. 19, p. 19-25, 1988.

ERICKSON, D. *Analytical Chemistry of PCBs*. Heidelberg:Springer-Verlag, 1992.

FAVA, F. Aroclor 1221 aerobic dechlorination by a bacterial co-culture: role of chlorobenzoic acid degrading bacteria in the process. *Chemosphere*, v. 32, n. 8, p. 1447-1483, 1996.

FOCHT, D. D.; SEARLES, D. B.; KOH, S. Genetic exchange in soil between introduced chlorobenzoate degraders and indigenous biphenyl degraders. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, n. 10, p. 3910-3913, 1996.

FUOCO, R. et al. Polychlorobiphenyls in Antarctica. *Microchemical J.*, v. 54, p. 384-390, 1996.

FURUKAWA, K. Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). *J. Gen. Appl. Microbiol.*, v. 46, p. 283-296, 2000a.

FURUKAWA, K. Engineering dioxygenases for efficient degradation of environmental pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, p. 244-249. 2000b.

FURUKAWA, K. Molecular genetics and evolutionary relationship of PCB-degrading bacteria. *Biodegradation*, v. 5, p. 289-300, 1994.

HERNANDEZ, B. S.; ARENSDORF, J. J.; FOCHT, D. D. Catabolic characteristics of biphenyl-utilizing isolates which cometabolize PCBs. *Biodegradation*, v. 6, p. 75-82, 1995.
HOLT, J. G. et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HRYWNA, Y. et al. Construction and characterization of two recombinant bacteria that grow on ortho- and para-substituted chlorobiphenyls. *App. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 2163-2169, 1999.

IWATA, Y.; WESTLAKE, W. E.; GUNTHER, F. A. Varying persistence of polychlorinated biphenyls in six California soils under laboratory conditions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v.9, p. 204-211, 1973.

JACOBUCCI, D. F. C. *Estudo da influência de biossurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos*. 2000. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

KASHIMOTO, T.; MIYATA, H. Differences between yusho and other kinds of poisoning involving only PCBs. In: WAID, J. S. (Ed.). *PCBs and the environment*. Boca Raton: CRC Press, 1986.

KIMURA, N. et al. Functional analyses of a variety of chimeric dioxygenases constructed from two biphenyl dioxygenases that are similar structurally but different functionally. *J. Bacteriol.*, v. 179, p. 3936-3943, 1997.

KIYOHARA, H.; NAGAO, K.; YANA, K. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 43, n. 2, p. 454-457, 1982.

KRCMAR, P. et al. Degradation of polychlorinated biphenyls by extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a perforated plate bioreactor. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 15, p. 269-276, 1999.

KUBÁTOVÁ, A.; MATUCHA, M.; SEVCIK, J. G. K. Application of correlation analysis for identification of polychlorinated biphenyls. *J. Chromatogr. A.*, v. 752, p. 197-207, 1996.

KUMAMARU, T. et al. Enhanced degradation of polychlorinated biphenyls by directed evolution of biphenyl dioxygenase. *Nat. Biotechnol.*, v. 16, p. 663-666, 1998.

LANTING, C. I. et al. Polychlorinated biphenyl in adipose tissue, liver, and brain from nine stillborns of varying gestational ages. *Pediatr Res*, v. 44, p. 222-225, 1998.

LAUBER, J. D. Disposal and destruction of waste PCBs. In: WAID, J. S. (Ed.). *PCBs and the environment*. Boca Raton: CRC Press, 1986.

LEHMLER, H. J.; PARKIN, S.; ROBERTSON, L. W. The three-dimensional structure of 3,3', 5'-trichloro-4-methoxybiphenyl (PCB) derivative. *Chemosphere*, v. 46, p. 485-488, 2002.

LOOMIS, D. et al. Cancer mortality among electric utility workers exposed to polychlorinated biphenyls. *Occup. Environ. Med.*, v. 54, p. 720-728, 1997.

LU, Y. C.; WU, Y. C. Clinical findings and immunological abnormalities in Yu-Cheng patients. *Environ. Health Perspect.*, v. 59, p. 17-25, 1985.

MAC FADDIN, J. F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2. ed. Baltimore: William and Wilkins, 1980.

MASAI, E. et al. Characterization of biphenyl catabolic genes of gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 61, p. 2079-2085, 1995.

McFARLAND, V. A.; CLARKE, J. U. Environmental occurrence, abundance and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis. *Environ. Health Perspect.*, v. 81, p. 225-239, 1989.

MENDES, J. J. A. The endocrine disrupters: A major medical challenge. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, p. 781-788, 2002.

MONTONE, R. C. *Determinação de bifenilos policlorados (PCBs) no ambiente antártico marinho*. 1995. 98 p. Tese de Doutorado – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MONTONE, R. C. *Hidrocarbonetos clorados no litoral do Estado de São Paulo*. 1987. 102 p. Dissertação de Mestrado – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.

NASARETNAM, K. et al. 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) can enhance DMBA-induced mammary carcinogenesis in the rat. *Eur. J. Cancer*, v. 34, n. 3, p. 389-393, 1998.

NOGUEIRA, D. P. et al. Acúmulo de policloretos de bifenila na população da grande São Paulo, Brasil. *Rev. Saúde Públ.*, v. 21, n. 4, p. 279-290, 1987.

PAWLISZYN, J. *Solid phase microextraction*. New York: Willey-UCH, Inc, 1997.

PELLIZARI, V. H. Biodegradação de xenobióticos no estuário santista: uma abordagem polifásica. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 8., 2002. Rio de Janeiro. *Anais...*, 2002. p. 168.

PELLIZARI, V. H. Biodegradação de PCBs. In: SILVA, C. M. M. S.; ROQUE, M. R. A.; MELO, I. S. (Eds.). *Microbiologia ambiental: manual de laboratório*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 98 p.

PELLIZARI, V. H.; RODRIGUES, J. M. Biodegradação de PCBs. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1997.

PELLIZARI, V. H. et al. Evaluation of naphtalene and biphenyl isolated strains for hybridization to dioxygenases probes and PCB degrading ability. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 62, n. 6, p. 2053-2058, 1996.

PELLIZARI, V. H. *Aspectos moleculares e fenotípicos de bactérias isoladas do ambiente e envolvidas na biodegradação de bifenilos policlorados – PCBs*. 1995. 67 p. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PIZA, F. F.; MANFIO, G. P. Evidence for reduced archaeal and bacterial diversity in polluted estuarine sediments in Baixada Santista (SP, Brazil). In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 8., 2002. Rio de Janeiro. *Anais...*, 2002, p. 182.

PONEZZI, A. N. Comunicação pessoal (2003).

PORTIGAL, C. L. et al. Polychlorinated biphenyls interfere with androgen-induced transcriptional activation and hormone binding. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 179, p. 185-194, 2002.

RUIZ-AGUILAR, G. M. L. et al. Degradation by white-rot fungi of high concentrations of PCB extrated from a contaminated soil. *Advances in Environmental Research*, v. 6, p. 559-568, 2002.

SAFE, S.; SAFE, L.; MULLIN, M. Polychlorinated biphenyls: congener-specific analysis of a commercial mixture and human milk. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 33, p. 24-29, 1985.

SALA, M. et al. Levels of hexachlorobenzene and others organochlorine compounds in cord blood: Exposure across placenta. *Chemosphere*, v. 43, p. 895-901, 2001.

SAWHNEY, B. L. Chemistry and properties of PCBs in relation to environmental effects. In: WAID, J. S. (Ed.). *PCBs and the environment*. Boca Raton: CRC Press, 1986.

SHAW, G. R.; CONNEL, D. W. Factors controlling bioaccumulation of PCBs. In: WAID, J. S. (Ed.). *PCBs and the environment*. Boca Raton: CRC Press, 1986.

STRATFORD, J. et al. Influence of chlorobiphenyls and chlorobenzoate mixtures by chlorobiphenyls/chlorobenzoate-mineralising hybrid bacterial strains. *Arch. Microbiol.*, v. 165, p. 213-218, 1996.

SUENAGA, H. et al. Engineering a hybrid pseudomonad to acquire 3,4-dioxygenase activity for polychlorinated biphenyls. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 87, p. 430-435, 1999.

TANIGUCHI, S. *Pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em bivalves ao longo da costa brasileira – International mussel watch*. 1995. 65 p. Dissertação de Mestrado – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TAPIERO, H.; NGUYEN, G.; TEW, K. D. Estrogens and environmental estrogens. *Biomed Pharmacother.*, v. 56, p. 36-44, 2002.

TSUTSUMI, T. et al. Uptake of daily intake of PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs from food in Japan. *Chemosphere*, v. 45, p. 1129-1137, 2001.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME - UNEP. *Evaluación regional sobre sustancias tóxicas persistentes: informe regional de sudamerica oriental y occidental*. Geneva: UNEP Chemicals. 2002.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME - UNEP. *Master list of actions: on the reduction and/or elimination of the releases of persistent organic pollutants*. 5 ed. Geneva: UNEP Chemicals. 2003.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. *PCBs: cancer dose-response assessment and application to environmental mixtures*. Report No. EPA/600/P-96/001F. Washington, 1996.

VAN OOSTDAM, J. et al. Human health implications of environmental contaminants in arctic Canada: a review. *Sci. Total Environ.*, v. 230, p. 1-82, 1999.

VRANA, B. et al. Effect of chlorobenzoates on the degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by *Pseudomonas stutzeri*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 12, p. 323-326, 1996.

WASSERMANN, M. et al. Organochlorine compounds in neoplastic and adjacent apparently normal breast tissue. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 15, p. 478-484, 1976.

WINNEKE, G. ; WALKOWIAK, J.; LILIENTHAL, H. PCB-induced neurodevelopmental toxicity in humans infants and its potential mediation by endocrine dysfunction. *Toxicology*, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. *Polychlorinated biphenyls and terphenyls: Environmental Health Criteria 140*. 2. ed. Geneva: World Health Organization, 1993.

YAO, Y. et al. Detailed study on the levels of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polichlorinated dibenzofurans and polychlorinated biphenyls in Yusho rice oil. *Chemosphere*, v. 46, p. 1461-1469, 2002.

YU, M. L. et al. Increased mortality from chronic liver diseases and cirrhosis 13 years after the Taiwan “yucheng” (“oil disease”) incident. *Am. J. Ind. Med.*, v. 31, p. 172-175, 1997.

VII

ANEXOS

ANEXO – A

Linhagens isoladas a partir de amostra de solo/sedimento coletada em uma área contaminada com PCBs (sub-estação de eletricidade desativada, localizada na região de Sorocaba – SP). É apresentada aqui a classificação quanto à coloração de Gram e à morfologia. Também é mostrada uma escala arbitrária, de acordo com a intensidade da cor amarela produzida na presença do bifenilo, a qual, varia de fraco (+) até muito forte (+++++).

LINHAGENS	GRAM	MORFOLOGIA	INTENSIDADE DA COLORAÇÃO AMARELA PRODUZIDA NA PRESENÇA DO BIFENILO
RT1	–	Bastonetes curtos	+++++
RT2	–	Bastonetes curtos	+++++
RT3	–	Bastonetes médios	++
RT4	–	Bastonetes médios	+
RT5A	–	Bastonetes médios	*
RT5B	–	Bastonetes longos	*
RT6	–	Bastonetes médios	+
RT7	–	Bastonetes muito curtos	+
RT8	–	Bastonetes longos e finos	+
RT9	+	Bastonetes médios	++++
RT10	–	Bastonetes médios	+++++
RT11	–	Bastonetes curtos	+++++
RT12	–	Bastonetes curtos e finos	+++++
RT13	–	Bastonetes médios e muito finos	++++
RT14	–	Bastonetes curtos	++++
RT15	–	Bastonetes médios	++++
RT16	–	Bastonetes médios e finos	++++
RT17	–	Bastonetes curtos	+++++
RT18	–	Bastonetes médios	+++++
RT19	–	Bastonetes médios	+++++

RT20	—	Bastonetes curtos	+++++
RT21	—	Bastonetes médios e finos	+++
RT22	—	Bastonetes médios e finos	+++
RT23	+	Bastonetes curtos e finos	+++
RT24	+	Bastonetes médios	+++
RT25	—	Bastonetes médios	+++++
RT26	—	Bastonetes médios	+++++
RT27	—	Bastonetes médios	++
RT28	+	Bastonetes médios	++++
RT29	+	Bastonetes médios	++
RT30	+	Bastonetes longos e finos	++
RT31	—	Bastonetes médios	++
RT32	—	Bastonetes curtos	++
RT33	—	Bastonetes curtos	++
RT34	—	Bastonetes médios e finos	++
RT35	—	Bastonetes médios	++
RT36	—	Bastonetes curtos e finos	+++
RT37	—	Bastonetes extremamente curtos	Ausente
RT38	—	Bastonetes curtos	Ausente
RT39	—	Bastonetes extremamente curtos	Ausente
RT40	—	Bastonetes extremamente curtos	Ausente
RT41	—	Bastonetes médios	Ausente
RT42	—	Bastonetes médios	Ausente
RT43	+	Bastonetes longos e finos	++
RT44	—	Bastonetes longos e finos	
RT45	—	Bastonetes extremamente curtos	Ausente
RT46	—	Bastonetes médios	+++

* As linhagens RT5A e RT5B não foram testadas isoladamente, no meio mineral contendo bifenilo para se avaliar a intensidade da cor amarela produzida, todavia, quando as duas se encontravam juntas (RT5), a intensidade desta cor correspondia ao nível 1 (+) da escala.

ANEXO – B

Linhagens isoladas a partir de amostra da segunda coleta de campo. É apresentada aqui a classificação quanto à coloração de Gram e à morfologia. Também é mostrada uma escala arbitrária, de acordo com a intensidade da cor amarela produzida na presença do bifenilo, a qual, varia de fraco (+) até muito forte (+++++). (*)As linhagens IP11, IP12 e IP28 não foram testadas separadamente para checagem da intensidade da cor amarela.

LINHAGENS	GRAM	MORFOLOGIA	INTENSIDADE DA COLORAÇÃO AMARELA PRODUZIDA NA PRESENÇA DO BIFENILO
IP1	+	Bastonetes curtos	Ausente
IP2	—	Bastonetes muito curtos	++++
IP3	—	Bastonetes médios	+++++
IP4	—	Bastonetes médios	+++++
IP5	—	Bastonetes médios	+++++
IP6	—	Bastonetes muito curtos e finos	+
IP7	—	Bastonetes curtos e finos	Ausente
IP8	—	Bastonetes curtos	Ausente
IP9	—	Bastonetes curtos	Ausente
IP10	—	Bastonetes longos e finos	++++
IP11A*	—	Bastonetes muito curtos	+++++
IP11B*	—	Bastonetes curtos e finos	+++++
IP12A*	—	Bastonetes médios	+++++
IP12B*	—	Bastonetes muito curtos	+++++
IP13	—	Bastonetes muito curtos	+++++
IP14	—	Bastonetes muito curtos	+++++
IP15	—	Bastonetes muito curtos	+++++
IP16	—	Bastonetes médios	+++++

IP17	+	Bastonetes curtos	Ausente
IP18	—	Bastonetes curtos e finos	Ausente
IP19	—	Bastonetes curtos e finos	+ + + + +
IP20	—	Bastonetes curtos e finos	Ausente
IP21	—	Bastonetes curtos e finos	Ausente
IP22	—	Bastonetes curtos e finos	Ausente
IP23	—	Bastonetes muito curtos	Ausente
IP24	—	Bastonetes curtos	+ + + + +
IP25	—	Bastonetes curtos	Ausente
IP26A	—	Bastonetes curtos e finos	Ausente
IP26B	—	Bastonetes médios	Ausente
IP27	—	Bastonetes muito curtos	+ + + + +
IP28A*	—	Bastonetes curtos e finos	+ + + + +
IP28B*	—	Bastonetes curtos e finos	+ + + + +

ANEXO – C

Linhagens da coleção de culturas do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, isoladas de solo contaminado com óleo diesel. Todas as linhagens foram testadas quanto ao uso de bifenilo como fonte de carbono, exceto aquelas que aparecem em negrito, com as quais não se obteve sucesso na reativação do congelamento ou cresciam lentamente.

LINHAGEM	CARACTERÍSTICAS DA CULTURA	IDENTIFICAÇÃO
4001		<i>Bacillus polymyxa</i>
4001V		
4002		<i>Bacillus firmus</i>
4003		<i>Bacillus firmus</i>
4004		<i>Bacillus circulans</i>
4005		<i>Bacillus megaterium</i>
4006		<i>Bacillus brevis</i>
4007		<i>Bacillus brevis</i>
4008		<i>Bacillus sp.</i>
4009		<i>Bacillus sp.</i>
4010		<i>Bacillus sphaericus</i>
4011		<i>Bacillus badius</i>
4012		<i>Bacillus badius</i>
4013		<i>Bacillus subtilis</i>
4014		<i>Clostridium plagarum</i>
4015		<i>Chromobacterium sp.</i>
4016		<i>Chromobacterium sp.</i>
4017		
4018		<i>Planococcus citreus</i>
4019		<i>Aeromonas sp.</i>
4020		<i>Micrococcus varians</i>
4021		<i>Micrococcus luteus</i>
4022		<i>Enterobacter aerogenes</i>

4022V		
4023		<i>Enterobacter aerogenes</i>
4024		<i>Staphylococcus sp.</i>
B1A	cultura amarela, rugosa, bastonetes curtos,	<i>Enterobacter agglomerans</i>
	Gram -	
B1B (B)	cultura creme com borda rugosa, circular,	
	bastonetes Gram +	
B1B (C)	cultura creme com borda rugosa, circular,	
	bastonetes Gram + espora central, com	
	filamentos	
B1B		
B1D	cultura amarela com borda rugosa,	
	circular, bastonetes esporulados, Gram +	
B1E	cultura branca, circular, borda rugosa,	
	bastonetes esporulados, Gram +	
B1F	cultura branca, cremosa, bastonetes finos	
	esporulados, Gram +	
B1G	cocobacilos, Gram -	
B1H	cocos, Gram +	
B2A	cultura creme-amarelada, aspecto	
	floculento, bastonetes finos, formando	
	longos filamentos, Gram +	
B2B	cultura branca, circular, borda rugosa,	
	bastonetes grandes, esporulados, Gram +	
B3A	cultura creme, cremosa, circular, borda	
	rugosa, bastonetes curtos, Gram +	
B3B	cultura creme com borda rugosa, circular,	
	bastonetes Gram + espora central, com	
	filamentos	
B3C	cultura branca, circular, cremosa,	

	bastonetes compridos, esporulados Gram +
B3D	cultura branca, cremosa, borda rugosa, bastonetes esporulados, Gram +
B3E	cultura branca, cremosa, borda rugosa, bastonetes grandes, esporulados, Gram +
B3F	cultura branca, cremosa, bastonetes esporulados, Gram +
B3G	cultura creme, borda rugosa, bastonetes curtos, Gram +
B3H	cultura grande, branca, cremosa, borda rugosa, bastonetes grandes, esporulados, Gram +
B3I	cultura branca, cremosa, borda rugosa, bastonetes grandes, esporulados, Gram +
B3J	cultura amarela, pequena, bordas rugosas, cocos, Gram +
B5A	creme, bastonetes curtos muito finos, Gram -
B6B	bactéria G+ esporo central
V2	
4F1	cultura amarela
4F3	cultura creme
5A1	bastonetes G+ esporo central
5A2	cocobacilo G-
5A3	cocos G+
5A4	bastonete G+
5A6	cocos G+
5B1	bastonetes G-
5B3	bastonete curto G+

5B4	bastonete G-	<i>Flavobacterium sp</i>
5BII	bastonetes G-	<i>Actinobacillus lignieresii</i>
5C2	bastonete G-	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
5C3	bastonete G+ esporo central	
5C3B		
5C4	cocobacilo G+	
5D1	bastonete G+ esporo central	
5D2	bastonete G+	<i>Bacillus megaterium</i>
5E1	cocobacilo G- (cultura creme deixa o meio de cultura amrronzado ou esverdeado)	
5E2	cocobacilo G-	<i>Moraxella nonliquefaciens</i>
5E3	bastonete curto G-	
DL4	cocos G+	
DL5	bastonete G+	

ANEXO – D

Degradação de PCBs pela linhagem RP1B após 18 dias de cultivo.

PCB	TR	RP1B1	RP1B2	RP1B.2b	Média	Desv Pad	%Desv	%degrad.
28	8,21	624510	719042	769483	744262,5	35667,17	4,79	0
52	8,97	702860	548869	545157	547013	2624,78	0,47	22,17
74	10,46	640227	705080	748485	726782,5	30691,97	4,22	0
101	11,6	576181	473771	500207	486989	18693,07	3,83	15,47
99	11,7	943168	693730	747799	720764,5	38232,56	5,30	23,58
77	12,9	230273	228955	234795	231875	4129,504	1,78	0
118	14,38	439313	289627	290162	289894,5	378,3021	0,13	34,01
105	15,66	604351	476953	499290	488121,5	15794,64	3,23	19,23
153	15,75	816581	760123	738092	749107,5	15578,27	2,07	8,26
179	16,52	595798	392040	376732	384386	10824,39	2,81	35,48
138	17,49	851405	537081	535610	536345,5	1040,154	0,19	37,00
126	17,88	459738	368833	379501	374167	7543,415	2,01	18,61
128	19,05	768019	497170	512892	505031	11117,13	2,20	34,24
156	21,37	1085649	944916	985926	965421	28998,45	3,00	11,07
180	23,48	1041109	963195	919852	941523,5	30648,13	3,25	9,56
169	25,44	592321	606504	678999	642751,5	51261,71	7,97	0
170	26,14	1090993	964807	1032162	998484,5	47627,18	4,76	8,47

LEGENDA: RP1B1=áreas(μ vxs) do controle; RP1B2 e RP1B.2b= duplicata de áreas(μ vxs) do grupo experimental; Média=média do grupo experimental; Desv Pad=desvio padrão do grupo experimental; %Desv=percentual do desvio padrão; %Degrad=percentual de degradação= $1-(\text{área média experimental}/\text{área do controle}) \times 100$. Não foi feito teste de hipóteses (teste t) para esta linhagem, devido a perda de dois controles. Os percentuais de degradação apenas sugerem que RP1B foi capaz de degradar os PCBs em questão.

ANEXO – E

Teste t para a linhagem RP2A: biodegradação de PCBs após 33 dias de cultivo. O teste t foi aplicado sobre médias de valores de áreas dos picos dos compostos nos cromatogramas.

PCB	Tr	Média Controle	Média Experim	Desvpad Controle	Desvpad Experiment	Erro Padrão da Diferença	Graus de Liberdade	t calculado	t tabelado (P=0,05)	Resultado	Resultado % degradado
28	7,8	271933	219968	3925	6476	7572	2	6,86	4,303	DEGRADADO	19,11
52	8,9	189241	153218	6182	4739	7789	2	4,62	4,303	DEGRADADO	19,03
74	11,2	348569	300180	30	18898	17251	3	2,80	3,182	NÃO DEGRADADO	
101	12,6	471785	380496	38534	17918	42497	2	2,15	4,303	NÃO DEGRADADO	
99	12,8	418839	360252,5	12919	12490	17969	2	3,26	4,303	NÃO DEGRADADO	
77	13,96	334985	346377	13050	18967	19859	3	-0,57	3,182	NÃO DEGRADADO	
118	15,17	856073,5	775073	16140	48732	46084	3	1,76	3,182	NÃO DEGRADADO	
105	16,15	661469,5	651514,7	23468	37892	38762	3	0,26	3,182	NÃO DEGRADADO	
153	16,23	765836	718896	8777	33203	31008	3	1,51	3,182	NÃO DEGRADADO	
179	16,89	632037	602232	46579	55205	61197	3	0,49	3,182	NÃO DEGRADADO	
138	17,36	863234,5	746990	93429	46679	104441	2	1,11	4,303	NÃO DEGRADADO	
126	17,69	670779	765889	34556	61101	70196	2	-1,35	4,303	NÃO DEGRADADO	
128	18,6	959576	789876,3	183736	53195	145303	3	1,17	3,182	NÃO DEGRADADO	
156	20,05	1309777	1322275	904	69788	63711	3	-0,20	3,182	NÃO DEGRADADO	
180	21,37	1207400	1246085	19388	62224	58612	3	-0,66	3,182	NÃO DEGRADADO	
169	22,47	673709,5	903877,7	3136	65490	59830	3	-3,85	3,182	NÃO DEGRADADO	
170	22,96	1165673	1220833	11454	69848	64331	3	-0,86	3,182	NÃO DEGRADADO	

LEGENDA: Tr=tempo de retenção; Desvpad=desvio padrão. Os valores de área são dados em microvolts x segundo.

ANEXO – F

Teste t para a linhagem IPP1: biodegradação de PCBs após 33 dias de cultivo. O teste t foi aplicado sobre médias de valores de áreas dos picos dos compostos nos cromatogramas.

PCB	Tr	Média Controle	Média Experim	Desvpad Controle	Desvpad Experiment	Erro Padrão da Diferença	Graus de Liberdade	t calculado	t tabelado (P=0,05)	Resultado
28	7,8	271173	218634	12784	549	12796	2	4,11	4,303	NÃO DEGRADADO
52	8,9	188693	163872	17681	17334	20675	3	1,20	3,182	NÃO DEGRADADO
74	11,2	370932	316586	24405	15249	25011	3	2,17	3,182	NÃO DEGRADADO
101	12,6	381533	333703	49840	6590	45762	3	1,05	3,182	NÃO DEGRADADO
99	12,8	384273	337645	51899	1729	47394	3	0,98	3,182	NÃO DEGRADADO
77	13,96	424011	359855	41202	2840	41299	2	1,55	4,303	NÃO DEGRADADO
118	15,17	833728	752968	95005	27481	89113	3	0,91	3,182	NÃO DEGRADADO
105	16,15	698356	652662	56154	59234	81621	2	0,56	4,303	NÃO DEGRADADO
153	16,23	784020	714323	69424	10607	63867	3	1,09	3,182	NÃO DEGRADADO
179	16,89	587651	569684	56044	5143	51304	3	0,35	3,182	NÃO DEGRADADO
138	17,36	814488	768787	63283	27808	61375	3	0,74	3,182	NÃO DEGRADADO
126	17,69	962557	862679	99457	13552	100376	2	1,00	4,303	NÃO DEGRADADO
128	18,6	798319	782471	72912	17639	67845	3	0,23	3,182	NÃO DEGRADADO
156	20,05	1467519	1348535	88301	47259	100152	2	1,19	4,303	NÃO DEGRADADO
180	21,37	1249305	1235329	76861	27224	73039	3	0,19	3,182	NÃO DEGRADADO
169	22,47	1140932	999646	74984	10991	75785	2	1,86	4,303	NÃO DEGRADADO
170	22,96	1198677	1207572	84472	30570	80408	3	-0,11	3,182	NÃO DEGRADADO

ANEXO – G

Teste t para a linhagem IP13: biodegradação de PCBs após 18 dias de cultivo. O teste t foi aplicado sobre médias de valores de áreas dos picos dos compostos nos cromatogramas.

PCB	Tr	Média Controle	Média Experim	Desvpad Controle	Desvpad Experiment	Erro Padrão da Diferença	Graus de Liberdade	t calculado	t tabelado (P=0,05)	Resultado
28	7,8	326718	366764	6659	24443	22859	3	-1,75	3,182	NÃO DEGRADADO
52	8,9	226186	235689	7022	16542	15982	3	-0,59	3,182	NÃO DEGRADADO
74	11,2	541629	553681	10836	31576	29935	3	-0,40	3,182	NÃO DEGRADADO
101	12,6	525480	496475	56286	21193	46199	3	0,63	3,182	NÃO DEGRADADO
99	12,8	519280	490416	46326	24306	41044	3	0,70	3,182	NÃO DEGRADADO
77	13,96	470416	468418	25792	22485	28123	3	0,07	3,182	NÃO DEGRADADO
118	15,17	946499	952441	28980	30566	35287	3	-0,17	3,182	NÃO DEGRADADO
105	16,15	902627	905704,3	48522	49874	58145	3	-0,05	3,182	NÃO DEGRADADO
153	16,23	923585,5	908889	17796	70986	66145	3	0,22	3,182	NÃO DEGRADADO
179	16,89	669536,5	649109,7	12259	39508	37206	3	0,55	3,182	NÃO DEGRADADO
138	17,36	941479,5	948227	9682	41396	38472	3	-0,18	3,182	NÃO DEGRADADO
126	17,69	991970,5	1000952	5762	22167	20686	3	-0,43	3,182	NÃO DEGRADADO
128	18,6	1941319	1899943	6374	75977	69519	3	0,60	3,182	PADRÃO INTERNO
156	20,05	1611846	1597188	14351	86954	80095	3	0,18	3,182	NÃO DEGRADADO
180	21,37	1331692	1285805	27484	81524	77189	3	0,59	3,182	NÃO DEGRADADO
169	22,47	1170301	1183424	50805	79614	81951	3	-0,16	3,182	NÃO DEGRADADO
170	22,96	1346615	1288457	41218	118815	112730	3	0,52	3,182	NÃO DEGRADADO

ANEXO – H

Teste t para a linhagem IP16: biodegradação de PCBs após 18 dias de cultivo. O teste t foi aplicado sobre médias de valores de áreas dos picos dos compostos nos cromatogramas.

PCB	Tr	Média Controle	Média Experim	Desvpad Controle	Desvpad Experiment	Erro Padrão da Diferença	Graus de Liberdade	t calculado	t tabelado (P=0,05)	Resultado	Resultado % degradado
28	7,8	990592	708572	28611	171961	174325	2	1,62	4,303	NÃO DEGRADADO	
52	8,9	591650	354712,5	95732	60004	112983	2	2,10	4,303	NÃO DEGRADADO	
74	11,2	1188193	855328	185316	44894	190677	2	1,75	4,303	NÃO DEGRADADO	
101	12,6	458172	206451,5	164939	22812	166509	2	1,51	4,303	NÃO DEGRADADO	
99	12,8	492131	243080	142784	6115	142915	2	1,74	4,303	NÃO DEGRADADO	
77*	13,96										
118	15,17	671718,5	365344	151664	11262	152081	2	2,01	4,303	NÃO DEGRADADO	
105	16,15	692553,5	381355,5	115952	19351	117556	2	2,65	4,303	NÃO DEGRADADO	
153	16,23	995396,5	529945,5	39503	15468	42423	2	10,97	4,303	DEGRADADO	46,76
179*	16,89	80453									
138	17,36	488775,5	254598	35374	14054	38064	2	6,15	4,303	DEGRADADO	47,91
126	17,69	339106,5	63647	77382	15494	78918	2	3,49	4,303	NÃO DEGRADADO	
128	18,6	3475700	2789370	88394	166095	188152	2	3,65	4,303	PADRÃO INTERNO	
156	20,05	2075800	1411272	209132	11771	209464	2	3,17	4,303	NÃO DEGRADADO	
180	21,37	1260825	699126,5	29932	91298	96079	2	5,85	4,303	DEGRADADO	44,55
169	22,47	212771,5	38034	92093	8028	92442	2	1,89	4,303	NÃO DEGRADADO	
170	22,96	790033	391623,5	3746	17547	17942	2	22,21	4,303	DEGRADADO	50,43

*Os PCBs 77 e 179 não foram computados devido a flutuações e instabilidades na resposta do detector

ANEXO – I

Teste t para a linhagem IP24: biodegradação de PCBs após 18 dias de cultivo. O teste t foi aplicado sobre médias de valores de áreas dos picos dos compostos nos cromatogramas.

PCB	Tr	Média Controle	Média Experim	Desvpad Controle	Desvpad Experiment	Erro Padrão da Diferença	Graus de Liberdade	t calculado	t tabelado (P=0,05)	Resultado
28	7,8	381752	380609	17798	23664	20937	4	0,05	2,776	NÃO DEGRADADO
52	8,9	256071	259233,3	8965	16368	13196	4	-0,24	2,776	NÃO DEGRADADO
74	11,2	582886	580726	2070	34858	24692	4	0,09	2,776	NÃO DEGRADADO
101	12,6	530473	536671,7	12631	18801	16016	4	-0,39	2,776	NÃO DEGRADADO
99	12,8	530457	533666	19557	15904	17824	4	-0,18	2,776	NÃO DEGRADADO
77	13,96	508693	514879	7521	29775	21715	4	-0,28	2,776	NÃO DEGRADADO
118	15,17	992001	987950	37504	50711	44599	4	0,09	2,776	NÃO DEGRADADO
105	16,15	894009	948055	18812	81064	58844	4	-0,92	2,776	NÃO DEGRADADO
153	16,23	958132	912811,3	67432	12861	48541	4	0,93	2,776	NÃO DEGRADADO
179	16,89	652389,3	663464	35425	30050	32848	4	-0,34	2,776	NÃO DEGRADADO
138	17,36	946949,3	956814,3	56476	38036	48147	4	-0,20	2,776	NÃO DEGRADADO
126	17,69	1036258	1035800	39012	41765	40412	4	0,01	2,776	NÃO DEGRADADO
128	18,6	1971783	1912560	56667	48443	52715	4	1,12	2,776	PADRÃO INTERNO
156	20,05	1596720	1616704	119697	64479	96138	4	-0,21	2,776	NÃO DEGRADADO
180	21,37	1248140	1272594	116350	44491	88082	4	-0,28	2,776	NÃO DEGRADADO
169	22,47	1367005	1236282	93473	42421	72584	4	1,80	2,776	NÃO DEGRADADO
170	22,96	1318402	1304356	91574	34308	69148	4	0,20	2,776	NÃO DEGRADADO

ANEXO – J

Teste t para a linhagem IP27: biodegradação de PCBs após 18 dias de cultivo. O teste t foi aplicado sobre médias de valores de áreas dos picos dos compostos nos cromatogramas.

PCB	Tr	Média Controle	Média Experim	Desvpad Controle	Desvpad Experiment	Erro Padrão da Diferença	Graus de Liberdade	t calculado	t tabelado (P=0,05)	Resultado
28	7,8	384782	334597	21176	37349	37571	3	1,34	3,182	NÃO DEGRADADO
52	8,9	261693	241229,7	19407	21191	24154	3	0,85	3,182	NÃO DEGRADADO
74	11,2	597487	580044	48707	8127	37054	3	0,47	3,182	NÃO DEGRADADO
101	12,6	538669	523506,3	39664	41564	48101	3	0,32	3,182	NÃO DEGRADADO
99	12,8	537677	525612,7	41340	44502	50988	3	0,24	3,182	NÃO DEGRADADO
77	13,96	516928	499596	25744	24810	29684	3	0,58	3,182	NÃO DEGRADADO
118	15,17	958648,3	981811	90087	47661	72067	4	-0,32	2,776	NÃO DEGRADADO
105	16,15	887417,3	957804,3	125393	47687	94861	4	-0,74	2,776	NÃO DEGRADADO
153	16,23	982088,7	920401,3	84132	103924	94548	4	0,65	2,776	NÃO DEGRADADO
179	16,89	710922,3	638608,3	63732	64983	64361	4	1,12	2,776	NÃO DEGRADADO
138	17,36	977008	955114,7	87176	75645	81614	4	0,27	2,776	NÃO DEGRADADO
126	17,69	1054994	1029452	66817	51537	59668	4	0,43	2,776	NÃO DEGRADADO
128	18,6	2052428	1936755	127843	152692	140817	4	0,82	2,776	PADRÃO INTERNO
156	20,05	1683428	1626907	163762	129298	147540	4	0,38	2,776	NÃO DEGRADADO
180	21,37	1403065	1285444	142288	156446	149535	4	0,79	2,776	NÃO DEGRADADO
169	22,47	1277874	1264326	106197	63126	87358	4	0,16	2,776	NÃO DEGRADADO
170	22,96	1452681	1325274	166492	154100	160416	4	0,79	2,776	NÃO DEGRADADO

ANEXO – K

Teste t para a linhagem IPN4B: biodegradação de PCBs após 18 dias de cultivo. O teste t foi aplicado sobre médias de valores de áreas dos picos dos compostos nos cromatogramas.

PCB	Tr	Média Controle	Média Experim	Desvpd Controle	Desvpd Experiment	Erro Padrão da Diferença	Graus de Liberdade	t calculado	t tabelado (P=0,05)	Resultado
28	8,01	1414787	1972394	159464	35640	163398	2	-3,41	4,303	NÃO DEGRADADO
52	9,17	828237	1172833	94832	2291	94859	2	-3,63	4,303	NÃO DEGRADADO
74	11,422	1377055	1607282	84955	38117	93114	2	-2,47	4,303	NÃO DEGRADADO
101	12,81	454845	578076	6003	21202	22035	2	-5,59	4,303	NÃO DEGRADADO
99	13,01	519986	637153	15200	34819	37992	2	-3,08	4,303	NÃO DEGRADADO
77*	14,19									
118	15,38	430954,3	632924	132105	83397	135673	3	-1,49	3,182	NÃO DEGRADADO
105	16,38	474533	459887,5	145950	40415	151442	2	0,10	4,303	NÃO DEGRADADO
153	16,44	798905,5	1214754	259416	54666	265113	2	-1,57	4,303	NÃO DEGRADADO
179	17,11	113072	123033	58	57049	57049	2	-0,17	4,303	NÃO DEGRADADO
138	17,59	308762,7	374305,5	141991	77840	142012	3	-0,46	3,182	NÃO DEGRADADO
126	17,96	162674	125175,5	121040	32379	113099	3	0,33	3,182	NÃO DEGRADADO
128	18,87	3407692	3343577	609655	298896	530035	3	0,12	3,182	PADRÃO INTERNO
156	20,37	1434844	1677747	361692	218916	298953	4	-0,81	2,776	NÃO DEGRADADO
180	21,67	1124049	1256780	356355	142984	271508	4	-0,49	2,776	NÃO DEGRADADO
169	22,78	75394	92296		32776	32776				NÃO DEGRADADO
170	23,24	479396,3	729748	285340	70219	265685	4	-0,94	2,776	NÃO DEGRADADO

*O PCB77 não foi computado devido a flutuações e instabilidades na resposta do detector

ANEXO – L

Teste t para a linhagem RCN2: biodegradação de PCBs após 18 dias de cultivo. O teste t foi aplicado sobre médias de valores de áreas dos picos dos compostos nos cromatogramas.

PCB	Tr	Média Controle	Média Experim	Desvpad Controle	Desvpad Experiment	Erro Padrão da Diferença	Graus de Liberdade	t calculado	t tabelado (P=0,05)	Resultado
28	7,8	1972336	1880389	109856	68132	129269	2	0,71	4,303	NÃO DEGRADADO
52	8,9	1246946	1104032	67647	108141	101540	3	1,41	3,182	NÃO DEGRADADO
74	11,2	1839462	1463925	248232	199923	271209	3	1,38	3,182	NÃO DEGRADADO
101	12,6	845679	615289	149614	77792	148376	3	1,55	3,182	NÃO DEGRADADO
99	12,8	893389	643440,7	153523	93514	156523	3	1,60	3,182	NÃO DEGRADADO
77*	13,96	146134		22323		22323				
118	15,17	940542,7	730534	123310	74978	125675	3	1,67	3,182	NÃO DEGRADADO
105	16,15	1048138	664732		52190	52190	2	7,35	4,303	NÃO DEGRADADO
153	16,23	2248163	1508612	175750	439251	364595	3	2,03	3,182	NÃO DEGRADADO
179	16,89	334179,3	224184,7	103842	51867	102374	3	1,07	3,182	NÃO DEGRADADO
138	17,36	723755	583205,3	160940	83851	159658	3	0,88	3,182	NÃO DEGRADADO
126	17,69	502181,7	313569	153128	98766	182217	2	1,04	4,303	NÃO DEGRADADO
128	18,6	3172492	3253345	280715	361329	371753	3	-0,22	3,182	PADRÃO INTERNO
156	20,05	1770962	1551752	320304	147710	352722	2	0,62	4,303	NÃO DEGRADADO
180	21,37	1164111	1088032	431321	156204	410593	3	0,19	3,182	NÃO DEGRADADO
169	22,47	322868,5	171056,3	276420	70859	285358	2	0,53	4,303	NÃO DEGRADADO
170	22,96	420243,5	592017,7	90427	147647	137569	3	-1,25	3,182	NÃO DEGRADADO

*O PCB77 não foi computado devido a flutuações e instabilidades na resposta do detector

ANEXO – M

Teste t para a linhagem IP13: biodegradação de ACBs após 18 dias de cultivo. O teste t foi aplicado sobre médias de valores de áreas dos picos dos compostos nos cromatogramas.

ACB	Tr	Média Controle	Média Experim	Desvpad Controle	Desvpad Experiment	Erro Padrão da Diferença	Graus de Liberdade	t calculado	t tabelado (P=0,05)	Resultado
2,3,6	2,7	502172	513110	29767	88962	93810	2	-0,12	4,303	NÃO DEGRADADO
2,3,5,6	3,5	1463430	1343435	8583	50294	51021	2	2,35	4,303	NÃO DEGRADADO
2,3,4,5,6	6,7	1631521	1336494	26818	92579	96385	2	3,06	4,303	NÃO DEGRADADO
2,4	11,1	781953	719267	6044	45857	46254	2	1,36	4,303	NÃO DEGRADADO
2,3,5	13,2	964675	851156	19004	90699	92669	2	1,22	4,303	NÃO DEGRADADO
3,4	24,6	903322	750839	25478	153899	155994	2	0,98	4,303	NÃO DEGRADADO
3,5	30,2	576714	518399	8292	68649	69148	2	0,84	4,303	NÃO DEGRADADO

Teste t para a linhagem IP16: biodegradação de ACBs após 18 dias de cultivo. O teste t foi aplicado sobre médias de valores de áreas dos picos dos compostos nos cromatogramas.

ACB	Tr	Média Controle	Média Experim	Desvpad Controle	Desvpad Experiment	Erro Padrão da Diferença	Graus de Liberdade	t calculado	t tabelado (P=0,05)	Resultado
2,3,6	2,7	782762	459561	58355	110726	125162	3	2,58	3,18	NÃO DEGRADADO
2,3,5,6	3,5	1490411	1456523	35451	51687	50314	2	0,67	4,303	NÃO DEGRADADO
2,3,4,5,6	6,7	1755008	1500454	44110	112967	93333	2	2,73	4,303	NÃO DEGRADADO
2,4	11,1	794036	783011	18238	32072	29131	2	0,38	4,303	NÃO DEGRADADO
2,3,5	13,2	995583	956861	27504	56257	48874	2	0,79	4,303	NÃO DEGRADADO
3,4	24,6	975662	929655	21477	74290	58741	2	0,78	4,303	NÃO DEGRADADO
3,5	30,2	600061	598207	17018	50169	40492	2	0,05	4,303	NÃO DEGRADADO

ANEXO – N

Teste t para a linhagem IP24: biodegradação de ACBs após 18 dias de cultivo. O teste t foi aplicado sobre médias de valores de áreas dos picos dos compostos nos cromatogramas.

ACB	Tr	Média Controle	Média Experim	Desvpad Controle	Desvpad Experiment	Erro Padrão da Diferença	Gr Liber	t calculado	t tabelado (P=0,05)	Resultado	Resultado % degradado
2,3,6	2,7	352770	0	22040	0	16428	3	21,47	3,18	DEGRADADO	100
2,3,5,6	3,5	1399261	1370724	6681	51609	47374	3	0,60	3,18	NÃO DEGRADADO	
2,3,4,5,6	6,7	1602247	1218745	16901	116164	106788	3	3,59	3,18	DEGRADADO	23,94
2,4	11,1	750322	707557,333	9770	44679	41431	3	1,03	3,18	NÃO DEGRADADO	
2,3,5	13,2	917827	830348,667	18160	54346	51424	3	1,70	3,18	NÃO DEGRADADO	
3,4	24,6	891919	457117,5	28455	34588	44789	2	9,71	4,303	DEGRADADO	48,75
3,5	30,2	552022	510294	18820	47007	45146	3	0,92	3,18	NÃO DEGRADADO	

Teste t para a linhagem IP27: biodegradação de ACBs após 18 dias de cultivo. O teste t foi aplicado sobre médias de valores de áreas dos picos dos compostos nos cromatogramas.

ACB	Tr	Média Controle	Média Experim	Desvpad Controle	Desvpad Experiment	Erro Padrão da Diferença	Gr Liber	t calculado	t tabelado (P=0,05)	Resultado	Resultado % degradado
2,3,6	2,7	796175	856849	54785	20547	52304	3	-1,16	3,18	NÃO DEGRADADO	
2,3,5,6	3,5	1464641	1376308	19176	9858	18985	3	4,65	3,18	DEGRADADO	6,03
2,3,4,5,6	6,7	1614827	1285671	59900	101620	93418	3	3,52	3,18	DEGRADADO	20,38
2,4	11,1	770232	732819	30175	22313	32177	3	1,16	3,18	NÃO DEGRADADO	
2,3,5	13,2	979009	865856,5	38016	39623	45569	3	2,48	3,18	NÃO DEGRADADO	
3,4	24,6	927973	750705,5	49232	131524	107843	3	1,64	3,18	NÃO DEGRADADO	
3,5	30,2	577745	540307	47570	14192	44695	3	0,84	3,18	NÃO DEGRADADO	

ANEXO – O

Teste t para a linhagem IPN4B: biodegradação de ACBs após 18 dias de cultivo. O teste t foi aplicado sobre médias de valores de áreas dos picos dos compostos nos cromatogramas.

ACB	Tr	Média Controle	Média Experim	Desvpad Controle	Desvpad Experiment	Erro Padrão Diferença	Graus de Liberdade	t calculado	t tabelado (P=0,05)	Resultado
2,3,6	2,7	500349	508220	2476	25847	25965	2	-0,30	4,303	NÃO DEGRADADO
2,3,5,6	3,5	1500444	1417148,5	53381	27197	59910	2	1,39	4,303	NÃO DEGRADADO
2,3,4,5,6	6,7	1656509	1470742	77168	39441	86663	2	2,14	4,303	NÃO DEGRADADO
2,4	11,1	808735	746389	33347	19597	38679	2	1,61	4,303	NÃO DEGRADADO
2,3,5	13,2	989057	911613	49002	16879	51828	2	1,49	4,303	NÃO DEGRADADO
3,4	24,6	964746	738455,5	64325	205886	215701	2	1,05	4,303	NÃO DEGRADADO
3,5	30,2	594992	530408	33596	23161	40806	2	1,58	4,303	NÃO DEGRADADO

Teste t para a linhagem RCN2: biodegradação de ACBs após 18 dias de cultivo. O teste t foi aplicado sobre médias de valores de áreas dos picos dos compostos nos cromatogramas.

ACB	Tr	Média Controle	Média Experim	Desvpad Controle	Desvpad Experiment	Erro Padrão Diferença	Graus de Liberdade	t calculado	t tabelado (P=0,05)	Resultado	Resultado % degradado
2,3,6	2,7	1016574	623071	61956	16666	64158	2	6,13	4,303	DEGRADADO	38,71
2,3,5,6	3,5	1362204	1430218	136823	28090	139677	2	-0,49	4,303	NÃO DEGRADADO	
2,3,4,5,6	6,7	1436246	1490704	179126	85185	198350	2	-0,27	4,303	NÃO DEGRADADO	
2,4	11,1	743441	769063	81198	27551	85745	2	-0,30	4,303	NÃO DEGRADADO	
2,3,5	13,2	880614	928658	117888	38283	123949	2	-0,39	4,303	NÃO DEGRADADO	
3,4	24,6	847800	809735	131351	168512	213657	2	0,18	4,303	NÃO DEGRADADO	
3,5	30,2	530661	555208	78980	34137	86041	2	-0,29	4,303	NÃO DEGRADADO	

ANEXO – P

Testes bioquímicos empregados na identificação das linhagens selecionadas para testes de biodegradação de PCBs e ACBs.

Testes/Características	IP13	IP16	IP24	IP27	IPN4B	IPP1	RP1B	RP2A	RCN2
Características Microscópicas	bast. mto Ct	bast. Md	bast. Ct	bast. mto Ct	bast. Md	bast. Md finos	bast. Md	bast. Md	bast. Ct finos esporulados
Teste do KOH	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Motilidade	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Oxidase	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em Trioglicolato de Sódio	Micro	Micro	Aero	Aero	Anaero fac.	Aero	ND	ND	Anaero fac.
Oxidação da Glicose em meio O/F	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Fermentação da Glicose em meio O/F	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Produção anaeróbia de ácido a partir da glicose (teste TSI)	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Produção aeróbia de ácido a partir de:									
Frutose	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	ND
Xilose	-	+	-	-	-	-	ND	-	-
Sacarose	-	-	-	-	+	ND	ND	-	ND
Arabinose	-	-	-	-	-	-	ND	-	+
Manose	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND
Ramnose	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
Manitol	-	-	-	-	+	+	ND	-	+
Galactose	-	-	-	-	+	ND	ND	ND	ND
Melezebiose	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND
Dextrina	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND

Testes bioquímicos (continuação).

Testes/Características	IP13	IP16	IP24	IP27	IPN4B	IPP1	RP1B	RP2A	RCN2
Fermentação sacarose/lactose (teste TSI)	-	+	-	+	+	-	-	+	-
Utilização preferencial aeróbia de peptona como fonte de carbono (teste TSI)	+	-	+	-	-	+	+	-	+
Produção de H ₂ S (teste TSI)	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Produção de outros gases (teste TSI)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise do Amido	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Hidrólise da Gelatina	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Teste da Urease	-	-	-	+	+	-	+	-	-
Hidrólise da Esculina	+	+	-	-	+	-	-	+	+
Redução de Nitrato	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Vermelho de Metila	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Voges-Proskauer (produção de acetoina)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Descarboxilação da Lisina/ornitina/arginina	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND
Teste do Citrato de Simmons	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Produção de Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sugestão do gênero					<i>Pseudomonas. oleovorans</i>	<i>Aminobacter sp</i>	<i>Arthrobacter sp</i>	<i>Pseudomonas pseudocaligenes</i>	<i>Bacillus sp</i>

LEGENDA: bast=bastonetes; mto=muito; Ct=curto; Md=médio; Micro=microaeróbio; Aero=aeróbio; Anaero fac=anaeróbio facultativo; ND=não determinado.