



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



DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS POR BACTÉRIAS

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Eliane Brígida das Neves**, aprovada pela Comissão Julgadora em 29 de julho de 2002.

Eliane Brígida das Neves

Orientador: Profa. Dra. Lucia Regina Durrant

Campinas, 29 de julho de 2002.

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos,
da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção de
Título de Doutor em Ciência de Alimentos

2002

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE 30
Nº CHAMADA T/UNICAMP
N414d
V _____ EX _____
TOMBO BCI 50291
PROC 16-837102
C _____ D X _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA 13/08/02
Nº CPD _____

CM00171946-5

BIB ID 250717

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

N414d Neves, Eliane Brigida das
Degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por
bactérias / Eliane Brigida das Neves. – Campinas, SP: [s.n.],
2002.

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

1.Bactérias. 2.Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.
3.Biodegradação. 4.Consorcios. I.Durrant, Lucia Regina.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

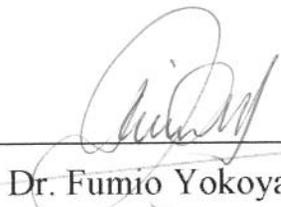


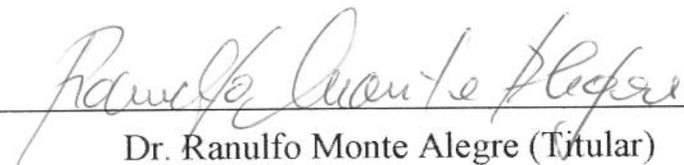
Dra. Lucia Regina Durrant (Orientador)



Dr. Marcos Roberto de Vasconcelos Lanza (Titular) *USF*

Dra. Maria Bernadete de Medeiros (Titular) *Laura*


Dr. Fumio Yokoya (Titular)


Dr. Ranulfo Monte Alegre (Titular)



Dra. Tânia Akiko Anasawa (Suplente) *unip/Boa Vista*

Dr. José Luiz Pereira (Suplente)

**“ Não temo a nossa extinção.
O que realmente me assusta é que o
homem arruine o Planeta antes de partir.”**

(Loren Aiseley)

Aos meus pais,
João e Anita, pelas lições de vida que nenhuma
Universidade foi ou será capaz de me oferecer,

As minhas irmãs Silmara e Priscila,
pela amizade,

Ao meu noivo, Leonardo,
pelo carinho,

Às forças Espirituais, pelos caminhos de Luz !

DEDICO

AGRADECIMENTOS

“As pessoas sempre chegam na hora exata e nos lugares onde estão sendo esperadas.”

Foi através desta filosofia e do auxílio de muitas pessoas que este trabalho se concretizou. Agradeço a cada um, em especial:

À Profa. **Lucia** pela oportunidade na pesquisa científica e pelas críticas e sugestões que objetivou meu enriquecimento profissional e pessoal. Sou grata pelo carinho e amizade durante este convívio.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP**, pelo apoio financeiro.

Aos professores da banca examinadora, **Marcos, Tânia, Bernadete e Ranulfo**, pelas valiosas sugestões.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pela infraestrutura cedida e por possibilitarem a complementação de minha formação.

Aos funcionários da Biblioteca e da Secretaria do Departamento de Ciência de Alimentos – UNICAMP, pela atenção e auxílio prestados.

À todos os meus amigos do laboratório, agradeço com um poema:

“ Quisera armar uma árvore belíssima dentro do meu coração e nela pendurar o nome de todos os meus “amigos” de longe e de perto, os amigos antigos (**Andrea, Fabiana, Gabriela, Erika**) e os mais recentes (**Ana Claudia**), os que vejo a cada dia (**Ísis, Rose, Luciana, Ani, Márcia**) e os que raramente encontro (**Hamilton, Karla**), os sempre lembrados (**Cíntia**) e os que ficam esquecidos (**Carla**), os das horas amargas e difíceis e os das horas boas e alegres. Os que sem querer magoei ou aqueles que sem querer me magoaram. Aqueles a quem conheço profundamente e aqueles de que são conhecidos a não ser as aparências. Os que pouco me devem e aqueles a quem devo muito. Meus amigos humildes e meus amigos importantes. Uma árvore de raízes muito profundas para que seus nomes nunca sejam arrancados do meu coração. De sombra muito agradável para que nossa amizade seja sempre, um momento eterno de Amor e Paz, em todas as lutas de nossas vidas.”

Ao **Leo**, pelo apoio, incentivo, emoções sempre compartilhadas e pela amizade, ...“cada passo que damos é um passo a mais na ponte que devemos atravessar para nos encontrar” ...

Por nunca limitar esforços, é com imensa gratidão que agradeço a minha mãe, pelo auxílio, apoio e compreensão nesta caminhada.

Estendo os agradecimentos à todos os quais não citei os nomes, mas que de algum modo me auxiliaram, mesmo que com um simples sorriso.

A DEUS por tudo !

ÍNDICE

CAPÍTULO I	01
1. Resumo	03
1.1. Abstract	05
2. Introdução	07
3. Objetivos	11
4. Revisão Bibliográfica	12
4.1. Hidrocarbonetos	13
4.2. Degradação dos HAPs	16
4.2.1 Oxidantes fotoquímicos	17
4.2.2. Adsorção	18
4.2.3. Lixiviação	19
4.2.4. Biodegradação	19
4.2.4.1. Algas	20
4.2.4.2. Fungos	21
4.2.4.3. Bactérias	23
4.3. Surfactantes.....	26
4.4 Potencial Microbiano	27
5. Referências	30

CAPÍTULO II	41
1. Resumo	43
1.1. Abstract.	44
2. Introdução	45
3. Objetivo	46
4. Revisão Bibliográfica	47
4.1. Hidrocarbonetos Aromáticos	47
4.1.1. Tolueno	48
4.1.2. Xileno	49
4.1.3. Naftaleno	50
4.1.4. Antraceno	51
4.1.5. Fluoreno	52
4.1.6. Pireno	53
4.2. Microrganismos	54
5. Metodologia	55
5.1. Microrganismos	55
5.2. Crescimento e manutenção das linhagens	57
5.3. Fonte de carbono	57
5.4. Crescimento bacteriano em placas	57
5.5. Seleção das linhagens bacterianas cultivadas em HAPs, em compostos monoaromáticos (CAs), em mistura de HAPs e CAs, e em cristais de HAPs	58

5.5.1 Meio de cultivo	58
5.5.1.a. HAPs	58
5.5.1.b. CAs	59
5.5.1.c. Mistura de HAPs e CAs	59
5.5.1.d. Cristais de HAPs	59
5.5.2. Determinação da degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias	60
5.5.2.1. Análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	60
5.5.2.2. Espectroscopia de Absorção	60
5.5.3. Determinação de atividade de emulsificação	61
6. Resultados e Discussão	63
6.1. Crescimento bacteriano em placas de Petri	63
6.2. Seleção das linhagens bacterianas cultivadas em HAPs	63
6.3. Seleção das linhagens bacterianas cultivadas em CA	65
6.4. Seleção das linhagens bacterianas cultivadas em misturas de HAPs e CAs	68
6.5. Determinação de atividade de emulsificação por bactérias cultivadas em mistura de HAPs e CAs	72
6.6. Seleção das linhagens bacterianas cultivadas em cristais de HAPs	76
7. Conclusão	80
8. Referências	81

CAPÍTULO III	85
1. Resumo	87
1.1. Abstract	87
2. Introdução	88
3. Objetivo	89
4. Revisão Bibliográfica	90
4.1. Microrganismos	90
4.1.1. Bactérias	91
4.1.1.1. Bacillus	92
4.1.1.2. Enterobacter	93
5. Metodologia	94
5.1. Identificação das linhagens bacterianas	94
5.1.1. Coloração de Gram	94
5.1.2. Kit Api 50 CHB – Bacillus.....	95
5.1.3. Kit Api 50 CH – carboidratos	95
5.2. Microrganismos	96
5.3. Meio de crescimento bacteriano	97
5.4. Degradação dos HAPs	97
5.4.1. Meio de cultivo	97
5.4.2. Coleta do sobrenadante	98
5.4.3. Análise da degradação dos HAPs por CLAE	98
5.4.3.1. Extração dos HAPs	98
5.4.3.2. Condições cromatográficas	99

6. Resultados	100
6.1. Identificação das linhagens bacterianas	100
6.2. Estudo da degradação dos HAPs	102
6.2.1. HAPs solubilizados em acetona	102
6.2.2. HAPs em cristais	107
7. Conclusão	114
8. Referências	115

CAPÍTULO IV	117
1. Resumo	119
1.1. Abstract	120
2. Introdução	121
3. Objetivos	122
4. Revisão Bibliográfica	123
4.1. Mecanismos de degradação dos HAPs por bactérias	124
4.2. Enzimas	133
4.2.1 Catecol 2,3-dioxigenase	133
4.2.2. Protocatecol 3,4-dioxigenase	134
4.2.3. Catecol 1,2-dioxigenase	134
4.3. Surfactantes	135
4.3.1. Tween 20	135
4.3.2. Tween 80	136
4.3.3. Triton X-100	137
4.4. Consórcio bacteriano	137
5. Metodologia	138
5.1. Microrganismos	138
5.2. Meio de crescimento bacteriano	138

ETAPA I: Estudo das Atividades Enzimáticas	138
5.I.1. Meio de cultivo	138
5.I.2. Extração	139
5.I.3. Catecol 2,3-dioxigenase	140
5.I.4. Protocatecol 3,4-dioxigenase	140
5.I.5. Catecol 1,2-dioxigenase I	141
5.I.6. Catecol 1,2-dioxigenase II	141
5.I.7. Determinação proteica	142
ETAPA II: Estudo das Atividades de Biosurfactantes	143
5.II.1. Determinação da produção de biosurfactantes	143
5.II.2. Efeito dos surfactantes na degradação dos HAPs.	143
ETAPA III: Estudo da Degradação dos HAPs por Consórcio de	
Bactérias	144
5.III.1. Cultivo	144
ETAPA IV: Determinação das Degradação dos HAPs por	
Cromatografia Gasosa	145
5.IV.1. Meio de cultivo	145
5.IV.2. Extração	146
5.IV.3. Condições cromatográficas	146

6. Resultados e Discussão	147
ETAPA I: Estudo das Atividades Enzimáticas	147
ETAPA II: Estudo das Atividades de Biosurfactantes	155
A) Primeira Fase	155
B) Segunda Fase	161
C) Teceira Fase	171
ETAPA III: Estudo da Degradação dos HAPs por Consórcio das Linhagens Bacterianas	174
ETAPA IV: Determinação da Degradação de HAPs por Cromatografia Gasosa	179
7. Referências	187
CAPÍTULO V	195
1. Considerações Finais	197
2. Conclusão Geral	198
3. Referências	200

LISTA FIGURAS

Figura I.1. Estrutura de alguns hidrocarbonetos causadores de poluição ambiental	13
Figura I.2. Via catabólica para a utilização de hidrocarbonetos aromáticos por fungos	23
Figura II.1. Isômeros de xileno	49
Figura III.1. pH do meio BH, contendo HAPs (solubilizado, concentração final 0,3% v/v) como fonte de carbono, fermentado pelas linhagens bacterianas	103
Figura III.2. Porcentagem de degradação dos HAPs (solubilizado) como fonte de carbono, fermentado pelas linhagens bacterianas	104
Figura III.3. Porcentagem de degradação de HAPs entre as linhagens após seis dias de cultivo	107
Figura III.4. Porcentagem de degradação dos HAPs pelas linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo cristais	108
Figura IV.1. Mecanismo de oxidação dos compostos armáticos por componentes enzimáticos da dioxigenase	124
Figura IV.2. Biodegradação aeróbica do naftaleno	126
Figura IV.3. Biodegradação aeróbica do antraceno	127
Figura IV.4. Biodegradação aeróbica do fluoreno	128
Figura IV.5. Biodegradação aeróbica do pireno	129
Figura IV.6. Via de degradação do catecol – clivagem orto e meta ..	131

Figura IV.7. Esquema geral da degradação de hidrocarbonetos, mostrando a convergência para produtos comuns a degradação de carboidratos	132
Figura IV.8. Clivagem extradiol – via meta	133
Figura IV.9. Clivagem intradiol – via orto	134
Figura IV.10. Estrutura química do Tween 20	136
Figura IV.11. Estrutura química do Tween 80	136
Figura IV.12. Estrutura química do Triton X-100	137
Figura IV.13. Atividades enzimáticas das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo cristais de naftaleno ..	148
Figura IV.14. Atividades enzimáticas das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo cristais de antraceno .	149
Figura IV.15. Atividades enzimáticas das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo cristais de fluoreno ...	1150
Figura IV.16. Atividades enzimáticas das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo cristais de pireno	151
Figura IV.17. Concentração de proteína produzida pelas linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo cristais de HAPs	152
Figura IV.18. Porcentagem de degradação dos cristais de HAPs por linhagens bacterianas cultivadas durante nove dias ...	160
Figura IV.19. Porcentagem de degradação de naftaleno pelas linhagens bacterianas, cultivadas durante nove dias	167
Figura IV.20. Porcentagem de degradação de antraceno pelas linhagens bacterianas, cultivadas durante nove dias	168

Figura IV.21. Porcentagem de degradação de fluoreno pelas linhagens bacterianas, cultivadas durante nove dias	169
Figura IV.22. Porcentagem de degradação de pireno pelas linhagens bacterianas, cultivadas durante nove dias	170
Figura IV.23. Atividades enzimáticas e % de degradação das linhagens bacterianas em consórcio e cultivadas durante nove dias em cristais de naftaleno.....	174
Figura IV.24. Atividades enzimáticas e % de degradação das linhagens bacterianas em consórcio e cultivadas durante nove dias em cristais de antraceno	175
Figura IV.25. Atividades enzimáticas e % de degradação das linhagens bacterianas em consórcio e cultivadas durante nove dias em cristais de fluoreno	176
Figura IV.26. Atividades enzimáticas e % de degradação das linhagens bacterianas em consórcio e cultivadas durante nove dias em cristais de pireno	177
Figura IV.27. Cromatograma do catecol e HAP da linhagem <i>B. sphaericus</i> cultivada por nove dias em cristais de antraceno	181
Figura IV.28. Cromatograma do catecol e HAP da linhagem <i>B. sphaericus</i> cultivada por nove dias em cristais de fluoreno	182
Figura IV.29. Cromatograma do catecol e HAP da linhagem <i>B. badius</i> cultivada por nove dias em cristais de pireno	183

LISTA TABELAS

Tabela I.1. Oxidação de hidrocarbonetos aromáticos por diferentes espécies de algas e cianobactérias	21
Tabela I.2. Oxidação de compostos aromáticos por diferentes espécies de fungos	22
Tabela I.3. Oxidação de compostos aromáticos por diferentes espécies de bactérias	24
Tabela II.1. Linhagens bacterianas utilizadas no estudo de degradação de compostos aromáticos	55
Tabela II.2. Meio de sais minerais (pH7,0)	58
Tabela II.3. Meio de produção de biosurfactante (pH 7,0)	62
Tabela II.4. Porcentagem de degradação de HAPs das linhagens bacterianas, cultivadas por seis dias	64
Tabela II.5. ABS das culturas bacterianas em meio contendo tolueno e m-xileno	66
Tabela II.6. ABS das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo HAPs e CAs	69
Tabela II.7. Porcentagem de degradação de cada HAP contido na misturas de HAPs. Seis dias de cultivo	70
Tabela II.8. Porcentagem de degradação de cada HAP da mistura de HAPs e CAs. Seis dias de cultivo	71
Tabela II.9. Atividade de emulsificação (ABS e halo) do sobrenadante de bactérias cultivadas em meio contendo mistura de HAPs e CAs	73

Tabela II.10. Atividade de emulsificação (ABS e halo) do sobrenadante de bactérias cultivadas em meio contendo mistura de HAPs, separadamente	74
Tabela II.11. Atividade de emulsificação (ABS e halo) do sobrenadante de bactérias cultivadas em meio contendo CAs, separadamente.....	75
Tabela II.12. Porcentagem de degradação de cristais de HAPs pelas linhagens bacterianas cultivadas durante seis dias	77
Tabela III.1. Linhagens bacterianas	96
Tabela III.2. Meio Bushnell-Haas (pH 7,0)	97
Tabela III.3. Leitura do Kit Api 50 CHB – Identificação de linhagens <i>Bacillus</i>	100
Tabela III.4. Porcentagem de degradação de HAPs das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo naftaleno solubilizado ou em cristal	109
Tabela III.5. Porcentagem de degradação de HAPs das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo antraceno solubilizado ou em cristal	110
Tabela III.6. Porcentagem de degradação de HAPs das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo fluoreno solubilizado ou em cristal	111
Tabela III.7. Porcentagem de degradação de HAPs das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo pireno solubilizado ou em cristal	112
Tabela IV.1. Consórcio das linhagens bacterianas	145

Tabela IV.2. Atividades de emulsificação e de biosurfactantes, das linhagens bacterianas cultivadas durante nove dias em meio contendo cristais de naftaleno	156
Tabela IV.3. Atividades de emulsificação e de biosurfactantes, das linhagens bacterianas cultivadas durante nove dias em meio contendo cristais de antraceno	157
Tabela IV.4. Atividades de emulsificação e de biosurfactantes, das linhagens bacterianas cultivadas durante nove dias em meio contendo cristais de fluoreno	158
Tabela IV.5. Atividades de emulsificação e de biosurfactantes, das linhagens bacterianas cultivadas durante nove dias em meio contendo cristais de pireno	159
Tabela IV.6. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação, das linhagens bacterianas cultivadas por seis dias em meio contendo cristais de naftaleno e com adição de surfactantes	160
Tabela IV.7. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação, das linhagens bacterianas cultivadas por nove dias em meio contendo cristais de naftaleno e com adição de surfactantes	162
Tabela IV.8. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação, das linhagens bacterianas cultivadas por seis dias em meio contendo cristais de antraceno e com adição de surfactantes	163

Tabela IV.9. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação, das linhagens bacterianas cultivadas por nove dias em meio contendo cristais de antraceno e com adição de surfactantes	163
Tabela IV.10. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação, das linhagens bacterianas cultivadas por seis dias em meio contendo cristais de fluoreno e com adição de surfactantes	164
Tabela IV.11. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação, das linhagens bacterianas cultivadas por nove dias em meio contendo cristais de fluoreno e com adição de surfactantes	165
Tabela IV.12. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação, das linhagens bacterianas cultivadas por seis dias em meio contendo cristais de pireno e com adição de surfactantes	166
Tabela IV.13. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação, das linhagens bacterianas cultivadas por nove dias em meio contendo cristais de pireno e com adição de surfactantes	166
Tabela IV.14. Porcentagem de degradação e atividades de emulsificação (O/A e A/O) das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo surfactantes por seis dias	172

Tabela IV.15	Porcentagem de degradação e atividades de emulsificação (O/A e A/O) das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo surfactantes por nove dias	172
Tabela IV.16	Porcentagem de degradação de HAPs pelas bactérias cultivadas durante nove dias. Análise em CG	179

“Onde Tudo Começa...”

CAPÍTULO I

RESUMO
INTRODUÇÃO
REVISÃO

1. RESUMO

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), pertencem a uma classe de poluentes orgânicos que são liberados no meio ambiente em grande quantidade. São formados pela fusão de dois ou mais anéis benzênicos. Ocorrem como resultado do uso de combustíveis fósseis; como subprodutos de processamento industrial ou durante o cozimento de alimentos. No meio ambiente, podem ser introduzidos por muitas fontes que incluem: vazamento industrial; descarga acidental durante o transporte; uso e disposição de produtos de petróleo; fogo de florestas e pradarias; entre outros. São compostos hidrofóbicos e sua persistência em ecossistemas ocorre devido a sua baixa solubilidade em água. Associam-se rapidamente aos sedimentos, onde podem persistir até sua degradação, ressuspensão ou bioacumulação. A lipofilicidade, genotoxicidade e persistência ambiental aumentam de acordo com o número de anéis dos HAPs, ou seja, acima de três anéis benzênicos. A possibilidade de degradá-los incluem: volatilização, fotooxidação, oxidação química, bioacumulação, adsorção das partículas pelo solo e degradação microbiana. Os microrganismos apresentam uma importante função na degradação de HAPs em ecossistemas aquáticos e terrestres. Estes compostos podem ser totalmente degradados (mineralizados), ou parcialmente transformados por uma comunidade de microrganismos ou por apenas um. As bactérias, os fungos e as algas têm a capacidade de metabolizar os HAPs. O mecanismo de biodegradação de procarióticos e eucarióticos requer a presença de oxigênio molecular para iniciar o ataque enzimático aos anéis aromáticos de HAPs. Estas enzimas são conhecidas como oxigenases. As oxigenases que catalisam a incorporação de uma molécula de oxigênio no substrato são denominadas de monooxigenases, já as que catalisam a incorporação de duas moléculas de oxigênio

no substrato são denominadas de dioxigenases. Devido a sua baixa solubilidade em água os HAPs são difíceis de serem degradados. Estudos utilizando surfactantes demonstraram que estes podem aumentar a biodegradação de compostos insolúveis em água em ambientes contaminados. São compostos que tem a função de solubilizar ou emulsificar hidrocarbonetos insolúveis e, assim aumentar potencialmente sua acessibilidade aos microrganismos.

Este trabalho teve como objetivo selecionar bactérias que utilizam hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno) como fonte de carbono e energia; identificar os compostos formados pela degradação microbiana; estudar a ação de surfactantes no processo de degradação de HAPs e as enzimas envolvidas. Para atingir os objetivos, foram utilizadas linhagens bacterianas, as quais foram isoladas de amostras de solo contaminado com óleo diesel. Inicialmente foram testadas 48 linhagens de bactérias quanto a sua capacidade de utilizar HAPs, além de compostos monoaromáticos (tolueno e xileno), como fonte de carbono e energia. As linhagens que se mostraram com maior capacidade de degradar os compostos mencionados acima, foram utilizadas em experimentos posteriores. Uma vez selecionadas, as linhagens foram analisadas quanto: a) produção enzimática (dioxigenases); b) produção de biosurfactantes e; c) degradação através de cromatografia líquida de alta eficiência e por cromatografia gasosa.

1.1. ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), constitute a class of hazardous organic chemicals consisting of three or more fused benzene rings. PAHs mostly occur as a result of fossil fuel combustion, as by-products of industrial processing, and during the cooking of foods. PAHs enter the environment from a multiplicity of sources which include: accidental discharges during the transport; use and disposal of petroleum products; surface water run-off from forest and prairie fire sites. PAHs are hydrophobic compounds and their persistence within ecosystems is due chiefly to their low water solubility. They rapidly become associated with sediments, where they may become buried and persistent until degraded, bioaccumulated or removed by dredging. The lipophilicity, genotoxicity and environmental persistence increase as the molecular size of PAHs. The possible fates of PAHs in the environment include volatilization, photooxidation, chemical oxidation, bioaccumulation, adsorption to soil particles and microbial degradation. The microbial degradation of PAHs is the major process that results in the decontamination of sediment and surface soil. These compounds can be totally degraded (mineralized) or be partially transformed by either a community of microorganisms or by single microorganisms. A wide variety of bacteria, fungi and algae have the ability to metabolize PAHs. Both prokaryotic and eukaryotic require the presence of molecular oxygen to initiate enzymatic attack on the PAH rings. These enzymes are known as oxygenases. Oxygenases that catalyze the incorporation of only one atom of dioxygen into the substrates are termed monooxygenases. Oxygenases that catalyze the incorporation of both atoms of dioxygen are known as dioxygenases.

Due to their low water solubility the PAHs are difficult to be degraded. The use of surfactants to increase their biodegradation in polluted environments may

increase the concentration of hydrophobic PAHs in the aqueous phase and enhance the rate of microbial growth and degradation of these compounds.

The aim of this work was to select bacterial strains able to use polycyclic aromatic hydrocarbon (naphthalene, anthracene, fluorene and pyrene) as sole carbon and energy sources; identify the compounds formed during microbial degradation; study the effect of surfactants on the degradation of PAHs and the enzymes involved.

Initially, 48 bacterial strains, which were isolated from oil-contaminated soils, were tested for their capacity to use PAHs and aromatic compounds as carbon and energy sources. The strains showing highest levels of PAHs degradation and of growth on aromatic compounds (toluene and m-xylene), were selected and used in studies where the conditions of cultivation varied and the posterior experiments. Production of dioxygenases, production of biosurfactant and their degradation by HPLC and CG were determined.

2. INTRODUÇÃO

A vida na terra é mantida através da reciclagem de vários elementos químicos juntamente com fluxo contínuo de energia proveniente do sol. Através da conversão da energia solar pela fotossíntese, o CO₂ e outros compostos inorgânicos são assimilados do meio ambiente e acumulados como constituintes orgânicos nos seres vivos. Essa matéria orgânica acumulada serve, então, como fonte de energia para várias formas de vida, e é reciclada através de ciclos, que se mantêm em equilíbrio (Stanier *et al.*, 1986).

Com o aumento da população humana e o desenvolvimento industrial, principalmente após a Segunda Guerra Mundial, novos compostos orgânicos têm sido sintetizados e continuamente introduzidos em grande quantidade no meio ambiente, interrompendo, assim, o equilíbrio natural. Entre os compostos sintéticos mais poluentes pode-se citar aqueles presentes em detergentes, preservantes de madeira, pesticidas e resíduos industriais (Crapez *et al.*, 1989). Grande parte destes compostos é considerado recalcitrante, não desaparecendo da biosfera por mecanismos naturais, podendo causar sérios transtornos ecológicos (Godsy *et al.*, 1983; Kasuga *et al.*, 1997).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) pertencem a uma classe de poluentes orgânicos que são liberados no meio ambiente em grande quantidade. São formados pela fusão de um ou mais anéis benzênicos em uma conformação linear, angular ou em arranjos. Ocorrem como resultado da combustão de fósseis; como subprodutos de processamento industrial ou durante o cozimento de alimentos. No meio ambiente, podem ser introduzidos de diferentes maneiras (Lijinsk, 1991; Li *et al.*, 1995; Jenkins *et al.*, 1996), como:

- vazamento de compostos estocados em tanques subterrâneos, podendo causar contaminação do solo e lençol freático;
- derramamento acidental de óleos, causando contaminação dos ecossistemas marinho e terrestre;
- uso e disposição de produtos de petróleo;
- fogo em florestas e pradarias;
- gaseificação de carvão e processos de liquefação; entre outros.

Os HAPs são compostos hidrofóbicos e sua persistência em ecossistemas é devido à sua baixa solubilidade em água (Hughes *et al.*, 1997; Atlas, 1995), onde podem persistir até sua degradação, ressuspensão ou bioacumulação. A lipofilicidade, genotoxicidade e persistência ambiental aumentam com o aumento do tamanho da molécula dos HAPs, ou seja, acima de três anéis aromáticos.

A concentração dos hidrocarbonetos aromáticos no meio ambiente depende do nível de desenvolvimento industrial e da contaminação por produtos petrolíferos (Jones *et al.*, 1989), podendo variar desde 5 ng/g de solo em áreas não desenvolvidas até $1,79 \times 10^6$ ng/g em locais próximos a refinarias de óleo (Cerniglia, 1992). Devido à sua configuração, os HAPs podem inserir-se na estrutura do DNA, causando como consequência, o câncer, constituindo, assim, um risco à população, principalmente àquelas que residem próximas a áreas industriais (Dipple *et al.*, 1990; Wild *et al.*, 1991; Sutherland *et al.*, 1995).

A possibilidade de degradação dos HAPs envolvem: volatilização, fotooxidação, bioacumulação, adsorção das partículas pelo solo e degradação microbiana. Os microrganismos apresentam uma importante função na degradação de hidrocarbonetos aromáticos presentes em ecossistemas aquáticos e terrestres. Estes compostos podem ser degradados ou parcialmente transformados por uma comunidade de microrganismos ou por apenas um (Cerniglia & Heitkamp, 1989;

Ellis *et al.*, 1991, Tongpim & Pickard, 1996; Poupin *et al.*, 1999; Leblond *et al.* 2001).

Bactérias, fungos e algas têm a capacidade de metabolizar HAPs. A degradação é inversamente proporcional ao número de anéis presentes na molécula, ou seja, HAPs de menor massa molar são degradados mais facilmente que compostos de alta massa molar (Cerniglia & Heitkamp, 1989; Juhasz *et al.*, 1996).

O mecanismo de biodegradação por microrganismos procarióticos e eucarióticos requer a presença de oxigênio molecular para iniciar o ataque enzimático aos anéis aromáticos de HAPs (Chapman, 1979; Gibson *et al.*, 1995; Han *et al.*, 1995). Durante a respiração, os microrganismos utilizam o oxigênio para hidrolisar o anel benzênico (abertura do anel), resultando compostos intermediários que entram em vias metabólicas como ciclo de Krebs e β -oxidação (Wilson & Bouwer, 1997). As enzimas que participam deste processo são conhecidas como oxigenases e utilizam metais, cofatores ou flavina / pteridina para ativar o oxigênio que está na sua forma inativa. Oxigenases que catalisam a incorporação de uma molécula de oxigênio no substrato são denominadas de monooxigenases (Trenz *et al.*, 1994); já as que catalisam a incorporação de duas moléculas de oxigênio no substrato são chamadas de dioxigenases (Reineke & Knackmuss, 1984).

O principal problema na degradação dos HAPs pelos microrganismos está na sua baixa solubilidade em água. Para aumentar a porcentagem de degradação dos HAPs, muitos pesquisadores tem adicionado surfactantes ao meio de cultivo (Efroymsen & Alexander, 1991; Tiehm, 1994; Hunt *et al.*, 1994; Burd & Ward, 1996; Bardi *et al.*, 2000). Os surfactantes são moléculas anfipáticas, e têm a função de solubilizar ou emulsificar hidrocarbonetos insolúveis, aumentando sua área superficial e concentração aquosa e, conseqüentemente sua acessibilidade aos microrganismos (Rouse *et al.*, 1994; Yeom *et al.*, 1996).

A importância de se estudar a degradação de compostos aromáticos está na sua produção e utilização por mais de 100 anos, e que têm causado poluição e por consequência, o comprometimento de todo o meio ambiente. Hoje, estes poluentes afetam as atividades humanas, assim como a produção de alimentos, e podem ameaçar o seres vivos saudáveis e sua reprodutibilidade - por serem recalcitrantes e tóxicos (Carlsen *et al.*, 1992; Auger *et al.*, 1995; Trzesicka-Mlynarz & Ward, 1996; Dagher *et al.*, 1997).

Estudos recentes têm demonstrado que a degradação microbiológica de HAPs é o principal processo responsável pela descontaminação de ecossistemas terrestres e aquáticos (Bundy *et al.*, 2001; Uz *et al.*, 2000; Gennaro, *et al.*, 2000; Shimura *et al.*, 1999; Wilson & Bouwer, 1997; Casellas *et al.*, 1997; Tongpin & Pickard, 1996), tornando evidente a capacidade microbiana de catabolizar diferentes compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, e inorgânicos, extraindo desses compostos fontes nutricionais e energéticas, possibilitando assim, o emprego desses agentes biológicos como solução aos problemas gerados pelos rejeitos lançados no meio ambiente

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram selecionar bactérias que utilizassem hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como fonte de carbono e energia. Uma vez selecionadas, estudou-se:

- o sistema enzimático envolvido na degradação dos HAPs, como as dioxigenases;
- a degradação dos HAPs por cromatografia líquida de alta eficiência e gasosa;
- o efeito dos surfactantes no processo de degradação; e
- o consórcio bacteriano em relação a degradação dos HAPs.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Muitas vezes há um conflito entre a necessidade de manter um nível de atividade de um xenobiótico no ambiente e o desejo de degradar esse composto químico a moléculas menos tóxicas. Com a descoberta de que alguns desses xenobióticos não estavam sendo degradados, mas acumulados no ambiente ou mesmo sendo degradados a intermediários mais tóxicos, veio o descrédito desses conceitos e os estudos sobre degradação dos mesmos por microrganismos (Silva & Fay, 1997).

Os xenobióticos são químicos poluentes da biosfera tendo estruturas moleculares e seqüências de ligações químicas que muitas vezes não são reconhecidas pelas enzimas degradativas existentes e, portanto, resistem a biodegradação ou não são completamente metabolizados, resultando num acúmulo de alguns desses compostos no meio ambiente. Entre eles estão incluídos os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) que são derivados de petróleo. Se esse produto traz um benefício evidente, causa em contrapartida problemas por sua grande persistência no ambiente, a qual pode chegar a anos de duração, afetando a flora, fauna e microrganismos (Semple *et al.*, 2001, Richter & Howard, 2000, Langenbach, 1995). Por este motivo existe um interesse crescente de se entender o destino e as formas de desaparecimento de tais compostos, para que haja o desenvolvimento de métodos mais eficientes de remoção dos mesmos do meio ambiente (Bressler & Fedorak, 2000; Doddamani & Ninnekar, 2000; Ahamad & Kunhi, 1999; Manohar *et al.*, 1999; Ellis *et al.*, 1991).

4.1. Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos constituem uma grande família de substâncias orgânicas compostas de hidrogênio e carbono. Os combustíveis fósseis, gasolina e o óleo diesel, têm centenas de hidrocarbonetos formados por longas cadeias de carbono.

Na queima dos combustíveis fósseis, os gases de emissão de gasolina e do óleo diesel contém muitos hidrocarbonetos distintos, entre eles uma família especial, a dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Dá-se nome de aromáticos a todos os compostos orgânicos que têm núcleo benzênico (benzeno) na molécula. Chamam-se de cíclicos compostos que apresentam mais de um anel em sua estrutura.

Os hidrocarbonetos aromáticos são compostos orgânicos de carbono e hidrogênio que possuem mais de uma estrutura em anel e pelo menos um núcleo benzênico (Figura I.1.).

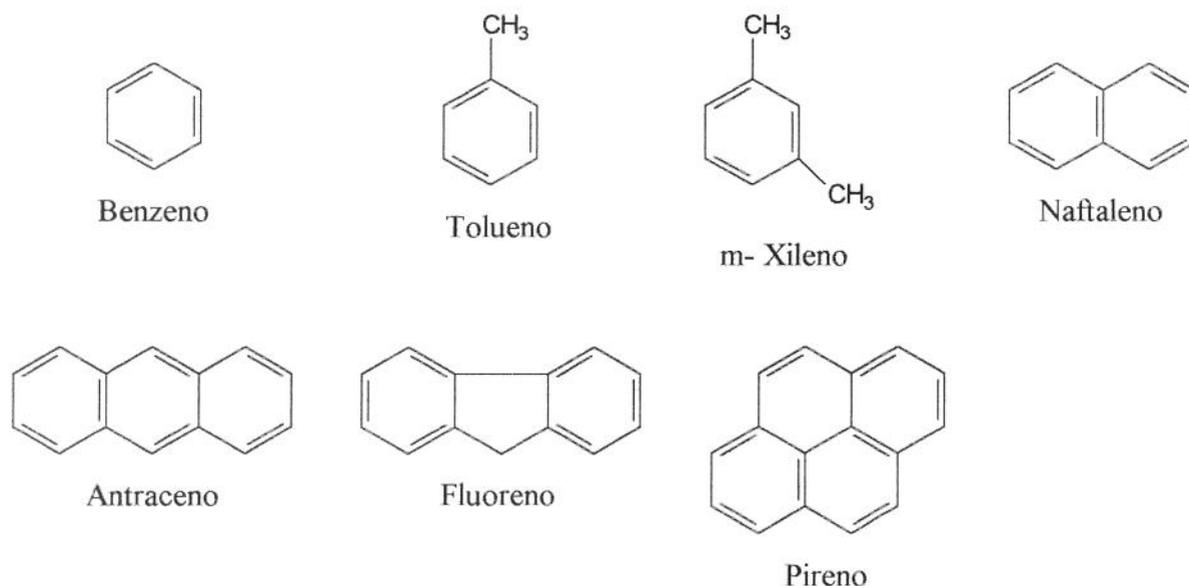


Figura I.1. Estrutura de alguns hidrocarbonetos causadores de poluição ambiental.

Estes compostos surgem no meio ambiente, devido tanto aos processos naturais quanto aos de natureza antropogênica. Resultam principalmente da queima de combustíveis fósseis (gasolina, querosene, óleo diesel) e do alcatrão, como subproduto de processamento industrial (efluentes petroquímicos, resíduos de refinarias, indústria de embarcações), da queima de florestas, da incineração de resíduos industriais, da exaustão de motores automobilísticos, da fumaça de cigarro e do tabaco, entre outros (LaFlamme & Hites, 1984; Lijinsky, 1991).

Os HAPs, também, ocorrem como contaminantes em diferentes grupos de alimentos incluindo vegetais, frutas, carnes, óleos e gorduras, grãos, bebidas, alimentos grelhados, torrados e de origem marinha (Larsson, 1986; Bartle, 1991). São provenientes principalmente de processamentos de defumação, secagem, torrefação, alguns tipos de cozimento, embalagens, assim como poluição ambiental (Bartle, 1991).

Uma vez que a combustão incompleta dos componentes da madeira gera grandes quantidades de HAPs, produtos defumados são inevitavelmente contaminados com esses hidrocarbonetos (Larsson, 1986; Bartle, 1991). A contaminação dos alimentos grelhados por HAPs provém principalmente da presença de gordura na carne. Esta pela ação do calor, pinga sobre o fogo, pirolisa e retorna na forma de fumaça, carregando os compostos carcinogênicos, que contaminam a carne. Foi constatado que quanto maior o teor de gordura maior é a contaminação por HAPs (Noll & Toledo, 1997).

Os vegetais estão entre as principais fontes de benzo(a)pireno na dieta humana, especialmente quando cultivados em áreas com maior poluição ambiental. Os particulados da poluição do ar depositam na superfície dos vegetais e das frutas, onde são concentrados pela camada de cera através da adsorção superficial (Coates *et al.*, 1986). De maneira análoga aos vegetais e frutas, a contaminação dos cereais

por HAPs no meio ambiente varia em função da localização das áreas de cultivo (Larsson, 1986).

Alimentos de origem marinha são os que parecem concentrar maior quantidade de HAPs. Estes são absorvidos e acumulados por organismos marinhos em função da poluição das águas, decorrente, entre outros, do derramamento de petróleo, efluentes industriais e águas de esgoto (Thompson *et al.*, 1993).

Os compostos aromáticos são moléculas hidrofóbicas que apresentam baixa solubilidade em água, o que contribui para a sua persistência no meio ambiente. Segundo o Ibama (1990), a classificação dos compostos químicos quanto a sua persistência é dada pela porcentagem de desprendimento de gás carbônico em 28 dias. Sendo assim, persistência alta se dá de 0 a 1%, apresentando meia-vida acima de 180 dias; persistência média varia de 1 a 10 % com meia-vida entre 90 – 180 dias e persistência reduzida entre 10 a 25 % com meia-vida variando de 30 a 90 dias.

Muitos dos HAPs são considerados pelo Ato Americano “1976 Resource Conservation and Recovery” como resíduos perigosos a saúde humana e ao meio ambiente (Ehrlich *et al.*, 1982). A agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos lista vários desses compostos como poluentes de prioridade nacional, que devem ser freqüentemente monitorados em efluentes industriais (Keith & Telliard, 1979), devido ao fato de serem considerados carcinogênicos, mutagênicos, além de possuírem efeitos tóxicos aos seres vivos (You *et al.*, 1996, Varanasi, 1989; Lijinsky *et al.*, 1963) e terem a capacidade de se bioacumularem nas diferentes cadeias alimentares (Wagrowshi & Hites, 1997; Colleran, 1997; Godsy *et al.*, 1983).

Muitos hidrocarbonetos são irritantes, agem sobre a medula óssea provocando anemia e leucopenia, isto é, diminuindo o número de glóbulos

vermelhos e brancos, e, portanto, provocam o câncer. Na indústria petroquímica existe o risco das leucemias (câncer do sangue), e por isso, os níveis de HAPs são constantemente controlados. Nas poluições atmosféricas por automóveis, a correlação entre os níveis de HAPs, densidade de tráfego e incidência de câncer pulmonar foi demonstrada e, em consequência, foram desenvolvidos catalisadores que reduzem a quantidade de HAPs emitida pela queima de gasolina e óleo diesel.

Pelo fato dos HAPs apresentarem potencialidades neoplásticas ou carcinogênicas, ou seja, capacidade de induzirem câncer, os mesmos foram e são intensivamente investigados (Meyer & Steinhart, 2000; Li *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2000, Ghoshal *et al.*, 1999, Geiselbrecht *et al.*, 1998).

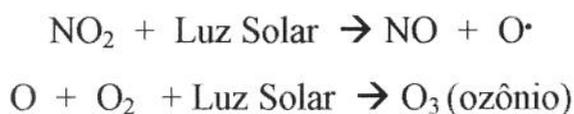
4.2. Degradação dos HAPs

Embora vários hidrocarbonetos aromáticos sejam considerados como recalcitrantes no meio ambiente, seu desaparecimento pode ocorrer através de uma variedade de processos abióticos, como volatilização, fotodegradação, lixiviação e adsorção (Morgan & Watkinson, 1989). No entanto, a biodegradação representa a principal rota pela qual esses compostos são removidos do meio ambiente (Sims *et al.*, 1990). O entendimento da sorção, biodegradação e transporte de produtos químicos orgânicos no solo e aquíferos é essencial para predizer o destino e o impacto desses produtos no ambiente.

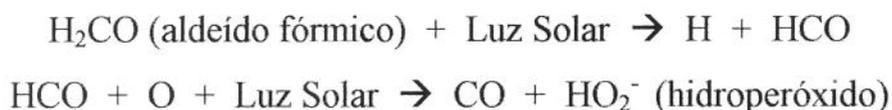
4.2.1. Oxidantes Fotoquímicos

A luz solar causa uma série de reações entre substâncias existentes na atmosfera que, muito apropriadamente, são chamadas de reações fotoquímicas. Aqueles compostos que são resultantes da ação de luz solar e de oxidações químicas foram denominados de oxidantes fotoquímicos. Os principais são: ozônio, aldeídos, cetonas e peróxidos.

As reações foto-oxidantes são complexas e, geralmente, têm várias etapas. O ozônio é considerado o oxidante fotoquímico mais importante e forma-se do seguinte modo:



Os aldeídos também produzem oxidantes fotoquímicos da seguinte maneira:



Os aldeídos e outros oxidantes fotoquímicos formam o famoso “smog” fotoquímico, parte daquela nuvem marrom-avermelhada em dia quente de inverno que irrita os olhos e garganta (“smog” vem da contração das palavras inglesas “smoke”, fumaça, e “fog”, neblina, e expressa uma poluição atmosférica típica). Sua ação tóxica deve-se, principalmente, à capacidade de oxidar proteínas, lipídeos e outras substâncias químicas integrantes da células, lesando ou matando as mesmas, dependendo da concentração e do tempo de exposição. Assim, os oxidantes fotoquímicos agravam a ação irritante dos outros poluentes e intensificam as inflamações e infecções do sistema respiratório.

4.2.2. Adsorção

Adsorção é o processo pelo qual a molécula do HAP é transferida da fase aquosa (líquida ou gasosa), para a fase estacionária (sólida). É um processo reversível e pode seguir ambas as direções, adsorção ou desorção. Regida pela lei geral da dispersão, segundo a qual, em determinada composição do adsorvente e do adsorvido e sob certas condições externas, como temperatura e pressão, cada substância se distribui de tal forma que seu nível de concentração, em ambas as fases, permanece constante.

As duas características mais importantes na adsorção do HAP são o conteúdo de matéria orgânica no solo e a solubilidade do composto orgânico (Triegel & Guo, 1994). Sendo que a adsorção é um processo chave no comportamento do HAP no solo, pois está diretamente relacionado com a translocação, persistência, mobilidade e bioatividade desses produtos (Luchini, 1987).

A adsorção às superfícies tem sido considerada como fator limitante da degradação dos HAPs no solo. Allen & Walker (1987) encontraram forte correlação entre a quantidade de composto aromático absorvido e sua degradação, havendo relação significativa entre respiração microbiana e a quantidade do composto na solução do solo. Portanto, a biodisponibilidade do produto pode determinar o metabolismo microbiano.

4.2.3. Lixiviação

Outro tipo de transporte é o movimento dos HAPs dissolvidos ou adsorvidos à partículas do solo. Esse processo, denominado de lixiviação, têm sido relacionado com a contaminação de águas subterrâneas. Diversas vias têm sido descritas, mostrando o movimento dos HAPs dissolvidos na solução do solo (Monteiro, 1997). A tendência natural é que os HAPs e os produtos de sua degradação comecem a penetrar no solo, levados pela água de chuva.

4.2.4. Biodegradação

A utilização de microrganismos no saneamento básico e ambiental é uma prática comum desde os primórdios do desenvolvimento dos processos biológicos de tratamentos de ecossistemas. É evidente, que a capacidade microbiana de catabolizar diferentes compostos orgânicos, naturais ou sintéticos, e inorgânicos, extraindo desses compostos fontes nutricionais e energéticas, é o que possibilitou o emprego desses agentes biológicos como solução aos problemas gerados pelos HAPs, os quais são lançados no meio ambiente (Lui & Sulfito, 1993).

A habilidade notável de degradação de compostos por microrganismos é consequência da evolução dos sistemas enzimáticos de células procariotas e eucariotas, as quais vêm coexistindo durante bilhões de anos, com enorme variedade de substâncias naturais de diferentes origens. Esta diversidade de substratos potenciais ao crescimento microbiano resultou, no aparecimento de enzimas aptas a transformar moléculas orgânicas com estruturas bastante distintas.

Os “arsenais” enzimáticos microbianos têm sido também capazes de atuar sobre substâncias químicas sintéticas, oriundas das atividades antropogênicas. Esta

resposta do metabolismo de certos microrganismos, sem dúvida, confere algumas vantagens adicionais às células microbianas, tais como a exploração de novos nichos ecológicos e fontes energéticas (Vazoller, 2002).

Vários estudos descrevem a biodegradação dos compostos aromáticos por uma ampla variedade de microrganismos, tais como algas (Cerniglia *et al.*, 1980; Narro *et al.*, 1992), bactérias (Hedlund *et al.*, 1999; Shim & Yang, 1999; Manohar *et al.*, 1999; Dean-Ross & Cerniglia, 1996; Barbieri, 1994) e fungos (Field *et al.*, 1992; Cerniglia *et al.*, 1978), presentes em culturas puras ou mistas.

4.2.4.1. Algas

Muitos compostos aromáticos podem ser oxidados por diferentes cianobactérias e algas verdes (Tabela I.1.), no entanto, a maioria destes organismos não são capazes de utilizar os mesmos como única fonte de carbono e energia. Relatos sobre a oxidação de naftaleno por *Oscillatoria* sp., com conversão de 1-naftol têm sido descritos, enquanto outra cianobactéria, *Agmenellum quadruplicatum*, é capaz de oxidar fenantreno, formando *trans*-9,10-dihidroxi-9,10-dihidrofenantreno e 1-metoxifenantreno como metabólitos principais (Cerniglia *et al.*, 1980; Cerniglia, 1992).

Tabela I.1. Oxidação de hidrocarbonetos aromáticos por diferentes espécies de algas e cianobactérias

Composto	Organismo	Referência
Benzo(a)pireno	<i>Selenastrum capricornatum</i>	Warshawsky <i>et al.</i> , 1990
Fenantreno	<i>Oscillatoria sp.</i> , <i>Agmenellum quadriplicatum</i>	Narro <i>et al.</i> , 1992
Naftaleno	<i>Oscillatoria sp.</i> , <i>Microcoleus chthonoplastes</i> , <i>Nostoc sp.</i> , <i>Anabaena sp.</i> , <i>Agmenellum quadriplicatum</i> , <i>Coccochloris elabens</i> , <i>Aphanocapsa sp.</i> , <i>Chlorella sorokiniana</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> .	Cerniglia <i>et al.</i> , 1980, Narro <i>et al.</i> , 1992

4.2.4.2. Fungos

Entre os fungos mais citados (Tabela I.2.), tem sido reportado que *Cunninghamella elegans* e *Phanaerochaete chrysosporium* apresentam capacidade de oxidar e degradar vários compostos aromáticos, tais como antraceno, fenantreno e fenol (Hammel *et al.*, 1992; Sutherland *et al.*, 1995). Esses microrganismos têm sido usados em processos de biorremediação, na despoluição de solos e sedimentos contaminados por tais compostos (Bumpus, 1989; Aust, 1990; Dietrich *et al.*, 1995).

Tabela I.2. Oxidação de compostos aromáticos por diferentes espécies de fungos

Compostos	Organismos	Referência
Antraceno	<i>Cunninghamella elegans</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Remaria sp.</i> , <i>Trametes sp.</i>	Cerniglia, 1982, Hammel <i>et al.</i> 1991, Field <i>et al.</i> 1992
Benzo(a)pireno	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Candida maltosa</i> , <i>Chrysosporium pannorum</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>S. cerevisiae</i> .	Cerniglia & Crow 1981, Ghosh <i>et al.</i> 1983, Bumpus <i>et al.</i> 1985, Field <i>et al.</i> 1992
Naftaleno	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Choanephora campincta</i> , <i>Circinella sp.</i> , <i>C. elegans</i> , <i>Mucor hiemalis</i> , <i>S cerevisiae</i> , entre outros	Cerniglia & Gibson, 1977, Cerniglia <i>et al.</i> 1978, Cerniglia <i>et al.</i> 1980

Embora pouco tenha sido descrito sobre a capacidade de utilizar compostos aromáticos como única fonte de carbono, reações semelhantes a dos mamíferos são realizadas pelos fungos no metabolismo dos HAPs. Estes organismos também se utilizam do sistema citocromo P-450 monooxigenase para incorporar uma molécula de oxigênio no núcleo aromático. O óxido de areno formado, como produto de reação, é hidrolisado por uma epóxido hidrolase produzindo *trans*-dihidrodióis ou fenol, através de rearranjos não enzimáticos, o qual pode ser conjugado com o sulfato, ácido glucurônico ou a glicose (Figura I.2.).



Figura I.2. Via catabólica para utilização de hidrocarbonetos aromáticos por fungos.

4.2.4.3. Bactérias

O metabolismo de compostos aromáticos por bactérias tem sido bastante estudado e entre os gêneros mais comumente observados (Tabela I.3.), como degradadores de compostos aromáticos, pode-se citar o *Achromobacter*, *Actinobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, entre outros (Cerniglia, 1984; Mahaffey *et al.*, 1988; Narro *et al.*, 1992; Barbieri, 1994).

Tabela I.3. Oxidação de compostos aromáticos por diferentes espécies de bactérias.

Compostos	Organismos	Referências
Antraceno	<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Flavobacterium sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>Rhodococcus sp</i>	Evans <i>et al.</i> 1965, Foght & Westlake, 1988
Benzo(a)pireno	<i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Beijerinckia sp.</i> , <i>P. putida</i>	Mahaffey <i>et al.</i> 1988
Fluoranteno e Fluoreno	<i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. cepacia</i> , <i>Rhodococcus sp.</i>	Mueller <i>et al.</i> 1990, Grifoll <i>et al.</i> 1992, Boldrin <i>et al.</i> , 1993.
Naftaleno	<i>Bacillus sp.</i> , <i>Corynebacterium</i> <i>renale</i> , <i>Moraxella sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>P.</i> <i>fluorescens</i>	Ryu <i>et al</i> 1989, Barnsley, 1983, Grund <i>et al.</i> 1992
Pireno	<i>Alcaligenes denitrificans</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Rhodococcus sp.</i>	Heitkamp <i>et al.</i> 1988, Walter <i>et al.</i> 1991, Boldrin <i>et al.</i> 1993.

Na degradação aeróbica de HAPs por bactérias, os substratos são degradados via clivagem do anel aromático por dioxigenases. O primeiro passo na degradação envolve a introdução de um ou dois grupos hidroxila no anel aromático.

A introdução de um grupo hidroxila é geralmente catalisada por monooxigenases (monohidroxilação):



A introdução de dois grupos hidroxila no anel aromático é catalisada pelas dioxigenases (dihidroxilação):



onde: S = substrato, H₂X = cosubstrato

No metabolismo dos compostos aromáticos pelas bactérias tem-se uma oxidação inicial que permite a incorporação da molécula de oxigênio ao anel benzênico para formar o composto *cis*-dihidrodiol. Após vários passos enzimáticos envolvendo desidrogenase; dioxigenase; isomerase; aldolase; e uma outra desidrogenase; ocorrerá a formação de catecol ou protocatecol (Gibson & Subramaniam, 1984). Esses compostos hidroxilados servirão de substratos para outras dioxigenases que podem clivá-los e formar intermediários da rota central da célula, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Harayama *et al.*, 1992).

4.3. Surfactantes

O principal problema da degradação dos HAPs pelos microrganismos está na sua baixa solubilidade em água.

Os surfactantes desempenham um papel importante para a remediação e também como uma medida auxiliar para estimular a biodegradação dos HAPs. São moléculas anfipáticas, contendo um grupo polar hidrofílico e um grupo apolar hidrofóbico. A palavra surfactante é a contração de “SURFace ACtive AgeNT”, e este termo sugere que os surfactantes tendem a migrar para superfícies e interfaces ou criar novas moléculas de superfície através da formação de agregados ou micelas (About-Kassim & Simoneit, 1993). Estes compostos se acumulam como gás/líquido; líquido/líquido ou líquido/sólido, e têm a função de solubilizar ou emulsificar hidrocarbonetos insolúveis, aumentando a área superficial e concentração aquosa e, conseqüentemente sua acessibilidade aos microrganismos (Rouse *et al.*, 1994; Yeom *et al.*, 1996). A emulsificação também permite uma maior aeração e dispersão dos nutrientes.

Ocorrem três tipos de interação entre o composto aromático e o surfactante (Prince 1993):

- a) interação com os baixos níveis de material dissolvido;
- b) contato direto com as gotas ou superfícies da fase insolúvel; ou
- c) interação com hidrocarbonetos pseudo-solubilizados pela interação com o surfactante.

4.4. Potencial Microbiano

Os microrganismos estão expostos a uma imensa variedade de compostos orgânicos nos ambientes naturais, incluindo os originados de matéria viva e dos processos geoquímicos. Virtualmente, cada um desses compostos podem ser utilizados como fonte de energia e/ou carbono por certos tipos microbianos. A versatilidade de bactérias e fungos é atualmente explorada pelo menos em duas áreas do saneamento ambiental: tratamento biológico de resíduos líquidos e sólidos e degradação de compostos xenobióticos (Vazollerr, 2002).

- Os microrganismos nos sistemas biológicos de tratamento de rejeitos podem atuar de maneira particular, ou seja, realizando transformações de certas moléculas por mecanismos específicos de seu metabolismo. Assim, biorreatores podem ser operados de modo a selecionar a atividade de uma bactéria em particular. Alguns exemplos são os sistemas biológicos que favorecem prioritariamente a nitrificação, ou aqueles que conduzem a desnitrificação. A composição dos resíduos poluentes, somada às modificações na operação ou construção dos biorreatores constituem a base para a seleção do microrganismo em questão (Vazoller, 2002).
- Mais recentemente, a atenção de vários pesquisadores no mundo está voltada para a problemática de compostos xenobióticos altamente tóxicos ao meio ambiente (Field *et al.*, 1995). A atividade combinada de bactérias nos biotratamentos, através de reatores aeróbios e anaeróbios alternados, resulta na estabilização de poluentes aromáticos e nitroaromáticos. Os microrganismos responsáveis pela biodegradação de tais compostos podem ser selecionados de diferentes fontes naturais, ou dos tanques de aeração e biodigestão anaeróbia. Esta ação microbiana é de extrema importância para as tecnologias da

biorremediação. A adaptação de bactérias a poluentes ambientais tem sido verificada em vários estudos sobre as comunidades microbianas, que após longos períodos de incubação, são capazes de degradar compostos como os HAPs (Kennedy *et al.*, 2000; Bundy *et al.*, 2001; Leblond *et al.*, 2001).

- A existência de materiais poluentes antropogênicos tem favorecido o desenvolvimento de tecnologias que adotam biorreatores com células microbianas especializadas na degradação eficiente de um composto. Além disso, estimula o uso da biologia molecular na engenharia de novas células com o objetivo de alterar as propriedades enzimáticas celulares, modificar os mecanismos regulatórios e reunir em um único organismo os sistemas enzimáticos de interesse, encontrados em espécies microbianas filogeneticamente distintas. Um exemplo descrito por Glazer & Nikaido (1995), é a bactéria *Pseudomonas putida* modificada, que é hábil na degradação de uma gama de alquilbenzoatos.
- A utilização de microrganismos na agroindústria pode consistir no emprego direto dos mesmos como inoculantes de processos microbiológicos *in loco* ou na utilização de produtos microbianos processados. A utilização direta de microrganismos *in loco* verifica-se na forma de produtos probióticos, inoculantes para a fixação de nitrogênio e inoculantes para biorremediação ou aumento da fertilidade de solos. Inoculantes para biorremediação ou aumento da fertilidade de solos consistem de consórcio de bactérias e fungos capazes de promover a deterioração de poluentes, agregação de partículas (melhoria da textura do solo), e ciclagem de matéria orgânica no solo para a liberação de nutrientes. O emprego de microrganismos na agricultura vem ganhando maior atenção devido aos esforços no sentido de desenvolvimento de formas de agricultura

sustentável em substituição ao uso de fertilizantes químicos em plantações (Manfio e Lemos, 2002).

- Os benefícios científicos de um maior conhecimento sobre os microrganismos incluem, entre outros, a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres. Os benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de novos microrganismos, potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos para: novos antibióticos e agentes terapêuticos; probióticos; produtos químicos; enzimas, polímeros para aplicações industriais e tecnológicas e mais recentemente, biorremediação de poluentes (Canhos *et al.*, 2002).
- No Brasil, atualmente, os esforços desenvolvidos para a elucidação da microbiologia ambiental são incipientes se comparados àqueles nos países desenvolvidos. Os estudos se concentram mais na microbiologia de águas de abastecimento, portanto, controle de qualidade de mananciais e avaliação da biodegradação de compostos poluentes, do que na microbiologia dos processos de tratamento de resíduos. Porém, nota-se o aparecimento de interesse nas linhas de pesquisa que contemplam a avaliação da microbiologia aplicada ao tratamento de resíduos, não somente pela sua importância intrínseca, mas também devido ao melhor entendimento da biodiversidade microbiana existente nos ecossistemas brasileiros (Vazoller, 2002).

A tendência no Brasil é o desenvolvimento de processos biológicos de tratamento de baixo custo, que permitam a sua utilização em larga escala, atendendo às necessidades inerentes à qualidade ambiental e de saúde pública, além da preservação dos recursos naturais, notadamente os ecossistemas aquáticos.

5. REFERÊNCIAS

- About-Kassim, T. A., Simoneit, B. R. T. Detergents - a review of the nature, chemistry, and behavior in the aquatic environment chemical-composition and analytical techniques. **Critical Review Environment Science Technology**. 1993. v. 23, p. 325.
- Ahamad, P.Y. A., Kunhi, A. A. M. Degradation of high concentration of cresols by *Pseudomonas* sp. CP4. **World Journal Microbiology Biotechnology**. 1999. v. 15, p. 321–323.
- Allen, R., Walker, A. The influence of soil properties on the rates of degradation of metamitron, metazachlor and metribuzin. **Pesticide Science**. 1987. v. 18, p. 95 – 111.
- Atlas, R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Mar. Poll. Bull.** 1995. v. 31, p. 178-182.
- Auger, J. J.; Kunstmann, M.; Czyglik, F., Jouannet, P. New Engl. **Journal Medicine**. 1995 v. 332, p. 282-285.
- Aust, S.D. Degradation of environment pollutants by *Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiology Ecology**. 1990. v. 20, p. 197 – 209.
- Barbieri, S. M. **Estudos da biodegradação de compostos aromáticos por linhagens bacterianas**. São Carlos: USFCAR. 1994. 213p. Tese Doutorado.
- Bardi, L.; Mattei, A.; Steffan, S.; Marzona, M. Hydrocarbon degradation by soil microbial population with β -cyclodextrin as surfatant to enhance bioavailability. **Enzyme Microbial Technology**. 2000. v. 27, p. 709 – 713.
- Barnsley, E. A. Bacterial oxidation of naphthalene and phenanthrene. **Journal Bacteriology**. 1983, v. 153, p. 1069 – 1071.
- Bartle, K. D. Analysis and occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbon in food. In: Colin, C.; Purchase, R. (Eds). **Food Contaminants: Sources and Surveillance**. Chapter 3. 1991. p. 41-60.
- Boldrin, B.; Tiehm, A., Fritsche, C. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by a *Mycobacterium* sp. **Applied Environment Microbiology**. 1993. v. 59, p. 1927–1930.
- Bressler, D.C., Fedorak, P. M. Bacterial metabolism of fluorene, dibenzofuran, dibenzothiophene, and carbazole. **Canadian Journal Microbiology**. 2000. v. 46, p. 397 – 409.

- Bumpus, J. A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Environment Microbiology**. 1989. v. 55, p. 1434 – 1436.
- Bumpus, J. A.; Tien, M.; Wright, D., Aust, S. D. Oxidation of persistent environment pollutants by a white rot fungus. **Science**. 1985, v. 228, p. 1434 – 1436.
- Bundy, J. G.; Morriss, A. W. J.; Durham, C. D.; Campbell, C. D.; Paton, G. I. Development of QSARs to investigate the bacterial toxicity and biotransformation potential of aromatic heterocyclic compounds. **Chemosphere**. 2001, v. 42, p. 885 – 892.
- Burd, G., Ward, O. P. Bacterial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons on agar plates: The role of biosurfactants. **Biotechnology Technology**. 1996 v. 10, p. 371-374.
- Canhos, V. P.; Coutinho, H.L.C.; Vazoller, R. **Microrganismos e biodiversidade de solos**. In: Estratégia Nacional de Diversidade Biológica. http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/politica/gtt/gtt_10 Acesso em: 23 abril 2002.
- Carlsen, E. A.; Giwerzman, A.; Keiding, N., Skakkebac, N. E. **Br. Medicine Journal**. 1992. v. 305, p. 609-613.
- Casellas, M.; Grifoll, M.; Bayona, J. M., Solanas, A. M. New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp strain F101. **Applied Environmental Microbiology**. 1997. v. 63, p. 819-826.
- Cerniglia, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**. 1992. v. 3, p. 351 – 368.
- Cerniglia, C. E. Initial reactions in the oxidation of anthracene by *Cunninghamella elegans*. **Journal General Microbiology**. 1982. v. 128, p. 2055 – 2061.
- Cerniglia, C. E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Adv. Applied Microbiology**. 1984. v.30, p. 31 – 71.
- Cerniglia, C. E., Crow, S. A. Metabolism of aromatic hydrocarbon by yeast. **Archives Microbiology** 1981, v. 129, p. 9 – 13.
- Cerniglia, C. E., Gibson, D. T. Metabolism of naphthalene by cell extract of *Cunninghamella elegans*. **Applied Environment Microbiology**. 1977, v. 34, p. 363 – 370.
- Cerniglia, C. E., Heitkamp, M. A. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: Varanasai U. (Ed) **Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment**. Boca Raton, CRC Press. 1989. p. 41-68.

- Cerniglia, C. E.; Gibson, D. T., Van Baalen, C. Oxidation of naphthalene by Cyanobacteria and Microalgae. **Journal General Microbiology**. 1980. v. 116, p. 495 – 500.
- Cerniglia, C. E.; Hebbert, R. L.; Dodge, R. H.; Szanisklo, P. J., Gibson, D. T. Fungal Transformation of naphthalene. **Archives Microbiology**. 1978. v. 117, p. 135 – 143.
- Chapman, P. J. Degradation mechanisms. *In*: Bourquian, A. W. & Pritchard P. H. (Eds). *Proceedings of the workshop: Microbial Degradation of Pollutants in Marine Enviroments*. U. S. Enviroment Protection Agency, Gulf Breeze, 1979. p. 28-66.
- Coates, J. T.; Elzerman, A. T.; Garrison, A. W. Extraction and determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in plant tissues. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**. 1986. v. 69, p. 110 – 114.
- Colleran, E. Uses of bacteria in bioremediation. *In*: Sheehan, D. (Ed), **Methods in Biotechnology**. Vol. 2, Bioremediation Protocols. Humana Press, New Jersey. 1997. p. 322.
- Crapez, M. A. C.; Tosta, Z. T., Bispo, M. G. S. Filtros Biológicos. **Ciência Hoje**. 1989.v 1, p. 1-11.
- Dagher, F.; Déziel, E.; Liviette, P.; Paquette, G.; Bisailon, J-G., Villermur, R. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. **Canadian Journal Microbiology**. 1997. v.43, p. 368-377.
- Dean-Ross, D., Cerniglia, C. E. Degradation of pyrene by Mycobacterium flavescens. **Applied Microbiology Biotechnology**. 1996. v. 46, p. 307 – 312.
- Dietrich, D.; Hickey, W. J., Lamar, R. Degradation 4,4-dichlorobiphenyl, 3,3,4,4-tetrachlorobiphenil, and 2,2,4,4,5,5-hexaclorobiphenil by the white rot fungus Phanerochaete chrysosporium. **Applied Environmental Microbiology**. 1995, v. 145, p. 3904 – 3909.
- Dipple, A.; Cheng, S. C., Bigger, C. A. H. Polycyclic aromatic hidrocarbon carcinogenes. *In*: Pariza, N. M.; Aeschbacher, H. U.; Felton, J. S. & Sato, S. (Eds) **Mutagens and Carcinogens in the Diet**. Wiley-Liss, New York. 1990. p. 109-127.
- Doddamani, H. P., Ninnekar, H. J. Biodegradation of phenanthrene by a Bacillus species. **Current Microbiology**. 2000. v. 41, p. 11 – 14.
- Efroymsen, R. A., Alexander, M. Biodegradation by an arthrobacter species of hydrocarbons partitioned into an organic-solvent **Applied Environment Microbiology**. 1991. v. 57, p. 1441 – 1447.

- Elhrlich, G. G., Goerlitz, D. F., Godsy, E. M., Hult, M. F. Degradation of phenolic contaminants in ground water by anaerobic bacteria. St. Louis Park, Minnesota. **Ground Water**. 1982. v. 20, p. 703 – 710.
- Ellis, B.; Harold, P., Kronberg, H. Bioremediation of Creosoto Contaminated Site. **Environment Technology**. 1991. v. 12, p. 447-459.
- Evans, W. C.; Ferneley, H. N., Griffiths, E. Oxidative Metabolism of phenanthrene and anthracene by soil pseudomonads. **Biochemistry Journal**. 1965, v. 95, p. 819 – 831.
- Field, J. A., Stams, A. J. M., Kato, M., Schraa, G. Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1995. v. 67, p. 47-77.
- Field, J. A.; Dejong, E.; Costa, G. F., Debont, J. A. M. Biodegradation of polycyclic hydrocarbon by new isolates of white rot fungi. **Applied Environment Microbiology**. 1992, v. 58, p. 2219 – 2226.
- Foght, J. M., Westlake, D. W. S. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon and aromatic heterocycles by a *Pseudomonas* species. **Canadian Journal Microbiology**. 1988, v. 34, p. 1135 – 1141.
- Geiselbrecht, A. D., Hedlund, B. P., Tichi, M. A.; Staley, J. T. Isolation of marine polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading *Cycloclasticus* strains from the Gulf of Mexico and comparison of their PAH degradation ability with that of Puget Sound *Cycloclasticus* strain. **Applied Environment Microbiology**. 1998. v. 64, p. 4703 – 4710.
- Gennaro, Di F., Galli, E., Orsini, F., Pelizzoni, F., Sello, G., Bestetti, G. Development of biocatalysts carrying naphthalene dioxygenase and dihydrodiol dehydrogenase genes inducible in aerobic and anaerobic conditions. **Research Microbiology**. 2000. v. 151, p. 383 – 391.
- Ghosh, D. K.; Dutta, D.; Samanta, T. B., Mishra, A. K. Microsomal benzo (a) pyrene hydrolases in *Aspergillus ochraceus* TS: Assay and Characterization of the enzyme system. **Biochemistry Biophysics Res. Com.** 1983, v. 113, p. 497 – 505.
- Ghoshal, S.; Weber, W.J.; Rummel, A.M.; Trosko, J.E.; Upham, B.L. Epigenetic toxicity of a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbon on gap junctional intercellular communication before and after biodegradation. **Environment Science Technology**. 1999. v. 33, p. 1044 – 1050.

- Gibson, D. T., Resnick, S. M., Lee, K., Brand, J. M., Torok, D. S., Wackett, L. P., Schocken, M. J., Haigler, B. E. Desaturation dioxygenation and monooxygenation reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain 9816-4. **Journal Bacteriology**. 1995. v. 177, p. 2615-2621.
- Gibson, D. T., Subramanian, V. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. In: **Microbial Degradation of Organic Compounds**. D. T. Gibson (Ed). Marcel Dekker, New York. 1984. p. 181 – 252.
- Glazer, A. N., Nikaido, H. Environmental applications. In: **Microbial Biotechnology**. Eds. W. H. Freeman & Co. New York. 1995. P. 561 – 620.
- Godsy, E. M.; Goerlitz, D. F., Ehrlich, G. G. Methanogenesis of Phenolic Compounds by a Bacterial Consortium from a Contaminated Aquifer in St. Louis Park, Minesota. **Bull. Environment Contamin. Toxicology**. 1983. v. 30, p. 261 – 268.
- Grifoll, M.; Casellas, M.; Bayona, J. M., Solanas, A. M. Isolation and characterization of a fluorene – degrading bacterium: Identification of ring oxidation and ring fission products. **Applied Environment Microbiology**. 1992. v. 58, p. 2910 – 2917.
- Grund, E.; Deneke, B.; Eichenlaub, R. Naphthalene degradation via salicylate and gentisate by *Rhodococcus* sp. strain B4. **Applied Environment Microbiology**. 1992, v. 58, p. 1874–1877.
- Hammel, K. E., Green, B., Gai, W. Z. Ring fission of anthracene by a Eukaryote. **Proceed. National Academy Sciences**. 1991. v. 88, p. 10605-10608.
- Hammel, K. E.; Gai, W. Z.; Green, B., Moen, M. A. Oxidative Degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanaerochaetes crhysosporium*. **Applied Environment Microbiology**. 1992. v. 58, p. 1831-1832.
- Han, S., Eltis, L. D., Tim min, K. N. Muchmore, S. W., Bolin, J. T. Crystal structure of the biphenyl-cleaving extradiol dioxygenase from a PCB-degrading pseudomonad. **Science**. 1995. v. 270, p. 976-980.
- Harayama, S., Kok, M., Neidle, E. L. Functional and evolutionary relationship among diverse oxygenases. **Annu. Review Microbiology**. 1992. v. 46, p. 565 – 601.
- Hedlund, B. P.; Geiselbrecht, A. D.; Bair, T. J.; Staley, J. T. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. Nov., sp. nov. **Applied Environment Microbiology**. 1999. v. 65, p. 251 – 259.

- Heitkamp, M. A., Frankilin, W., Cerniglia, C. E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. **Applied Environment Microbiology**. 1988. v. 54, p. 2549-2555.
- Hughes, J. B.; Beckles, D. M.; Chandra, S. D., Ward, C. H. Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**. 1997. v. 18, p.152-160.
- Hunt, W. P.; Robinson, K. G., Ghosh, M. M. The role of biosurfactants in biotic degradation of hydrophobic organic compounds. *In: Hydrocarbon Bioremediation*. Heinchee, R. E.; Alleman, B. C.; Hoepfel, R. E. & Miller, R. N. (Eds). 1994. p. 318-322..Lewis Publishers, Boca Raton.
- Ibama. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. 2 ed. Brasília. 1990. 351p.
- Jenkins, B. M., Jones, A. D., Turn, S. Q., Williams, R. B. Particle concentrations, gas-particle partitioning, and species intercorrelation for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emitted during biomass concentration. **Environment Science Technology**. 1996. v. 30, p. 3825–3835.
- Jones, A. C.; Stratford, A.; Waterhouse, K. S., Vogt, N. B. Organic Contaminants in Welsh Soils: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. **Environment Science Technology**. 1989. v. 13, p. 540–550.
- Juhasz, A. L.; Britz, M.L., Stanley, G.A. Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*. **Biotechnology Letter**. 1996. v.18, p. 577-582.
- Kasuga, K., Nojiri, H., Yamane, H., Omori, T. Genes of enzymes involved in the biodegradation of carbazole, dibenzofuran, fluorene and dibenzo-p-dioxin by bacteria. **Water Science Technology**. 1997. v. 36, p. 9-16.
- Keith, L. H., Telliard, W. A. Priority Pollutants I: A Perspective View. **Environment Science Technology**. 1979. v. 13, p. 416 – 423.
- Kennedy, R. D.; Baldwin, C.; Keshavarz-Moore, E. Effect of growth medium selection on plasmid DNA production and initial processing steps. **Journal Biotechnology**. 2000, v. 76, p. 175 – 183.

- La Flamme, R. E., Hites, R. A. The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Geochemical Cosmochemical Acta**. 1984. v. 42, p. 289 – 303.
- Langenbach, T. **III Simpósio Brasileiro sobre Microbiologia do Solo**. Londrina: Anais... IAPAR / Embrapa – CNPSo, 1995. p. 119 – 136.
- Larsson, B. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Swedish foods – Aspects on analysis, occurrence and intake. **Doctoral thesis**, Swedish University of Agricultural Sciences. 1986.
- Leblond, J. D.; Schultz, T. W.; Sayler, G. S. Observations on the preferential biodegradation of selected components of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. **Chemosphere**. 2001, v. 42, p. 333 – 343.
- Li, C. T., Lee, W.J., Mi, H. H., Su, C. C. PAH emission from the incineration of waste oily sludge and PE plastic mixtures. **Science Total Environment**. 1995. v. 170, p. 171 – 183.
- Li, G.; Huang, W.; Lerner, D. N., Zhang, X. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. **Water Research**. 2000. v. 34, p. 3845 – 3853.
- Lijinsky, W. The Formation and Occurrence of Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Associates with Food. **Mutat. Research**. 1991. v. 259, p. 251-261.
- Lijinsky, W.; Domsky, I.; Manson, G.; Ramahi, H. Y., Safavi, T. The chromatographic determination of trace amounts of polynuclear aromatic hydrocarbon in petrolatum, mineral oil, and coal tar. **Analytical Chemistry**. 1963. v. 35, p. 952 – 956.
- Luchini, L. C. **Adsorção-dessorção dos herbicidas paraquat, diuron e 2,4-D em seis solos brasileiros**. Piracicaba: Esalq/USP, 1987. 91 p. Dissertação de Mestrado.
- Lui, S., Sulita, J. M. Ecology and evolution of microbial populations of bioremediation. **Biototechnology**. 1993. v. 11, p. 344 – 352.
- Mahaffey, W. R.; Gibson, D. T., Cerniglia, C. E. Bacterial oxidation of chemical carcinogens: Formation of polycyclic aromatic acids from benz(a)anthracene. **Applied Environment Microbiology**. 1988, v. 54, p. 2415 – 2423.
- Manfio, G. P.; Lemos, M. F. Microorganismos e Aplicações industriais. In: **Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas**.
http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap_9/4/gilson.html Acesso em: 23 abril 2002.

- Manohar, S. Kim, C. K., Karegoudar, T. B. Degradation of anthracene by a *Pseudomonas* strain, NGK1. **Journal Microbiology**. 1999. v. 37, p. 73 – 79.
- Meyer, S.; Steinhart, H. Effects of heterocyclic PAHs (N, S, O) on the biodegradation of typical tar oil PAHs in a soil / compost mixture. **Chemosphere**. 2000. v. 40, p. 359 – 367.
- Monteiro, R. T. Degradação de Pesticidas. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. (eds). **Microbiologia Ambiental**. Embrapa – CNPMA. 1997. Cap. 4, p. 107 – 124.
- Morgan, P., Watkinson, R. J. Hydrocarbon degradations in soils and methods for soil biotreatment. **Critical Review Biotechnology**. 1989. v. 8, p. 305 – 333.
- Mueller, J. G.; Chapman, P. J.; Blattmann, B. O., Pritchard, P. H. 1990. Isolation and characterization of a fluoranthene – utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. **Applied Environment Microbiology**. 1990. v. 56, p. 1079 – 1086.
- Narro, M. L.; Cerniglia, C. E.; Baalen, C. V., Gibson. Metabolism of phenanthrene by the Marine Cyanobacterium *Agmenellum quadruplicatum* PR-6. **Applied Environment Microbiology**. 1992. v. 58, p. 1351 – 1359.
- Noll, I. B.; Toledo, M. C. F. Benzo(a)pireno em carnes defumadas pelos processo caseiros e industrial. **Revista Brasileira de Toxicologia**. 1997. v. 10, p. 19-23.
- Poupin, P.; Godon, J.J.; Zumstein, E., Truffaut, N. Degradation of morpholine, piperidine, and pyrrolidine by mycobacteria: evidences for the involvement of a cytochrome P450 **Canadian Journal Microbiology**. 1999. v. 45, p. 209-216.
- Prince, R. C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. **Critical Review Microbiology**. 1993. v. 19, p. 217 – 242.
- Reineke, W., Knackmuss, H-J. Microbial-metabolism of haloaromatics - isolation and properties of a chlorobenzene-degrading bacterium. **Applied Environment Microbiology**. 1984. v. 47, p. 395-402.
- Richter, H.; Howard, J. B. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbon and their growth to soot – a review of chemical reaction pathways. **Progress Energy. Combustion Science** 2000, v. 26, p. 565-608.
- Rouse, J. D; Sabatini, D. A.; Sufliita, J. M., Harwell, J. H. Influence of surfactants on microbial-degradation of organic-compounds. **Critical Review Environment Science Technology**. 1994. v.24, p.325-370.

- Ryu, B. H.; OH, Y. K.; Bin, J. H. Biodegradation of naphthalene by *Acinetobacter calcoaceticus* R-88. **Journal Koryan Agriculture Chemical Society**. 1989, v. 32, p. 315 – 320.
- Semple, K. T., Reid, B. J., Fermor, T. R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. **Environment Pollution**. 2001. v. 12, p. 269–283.
- Shim, H; Yang, S. T. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. **Journal Biotechnology**. 1999. v. 67, p. 99 – 112.
- Shimura, M., Mukerjee-Dhar, G., Kimbara, K., Nagato, H.; Kiyohara, H., Hatta, T. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. JF8 capable of degradating polychlorinated biphenyls and naphthalene. **FEMS Microbiology Letter**. 1999. v. 178, p. 87 – 93.
- Silva, C. M. M. S., Fay, E. F. Persistência e Biomagnificação de moléculas Xenobióticas. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. (Eds). **Microbiologia Ambiental**. Embrapa – CNPMA. 1997. Cap. 3, p. 67 - 105
- Sims, J. L.; Sims, R. C., Mathews, J. E. Approach to bioremediation of contaminated soil. **Hazardous Wastes Hazardous Material**. 1990. v. 7, p. 117 – 149.
- Stanier, R. Y.; Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. **The Microbiol World**. 5 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1986. 689p.
- Sutherland, J. B.; Raffi, F.; Kham, A. A. and Cerniglia, C. E. Mechanisms of polycyclic hydrocarbon degradation. In **Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals**. L. Y. Young and C. E. Cerniglia (Eds). Wiley-Liss, Inc New York. 1995. p. 269–306.
- Thompson, D., Jolley, D., Maher, W. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in oyster tissues by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. **Microchemical Journal**. 1993. v. 47, p. 351 – 361.
- Tiehm, A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactant. **Applied Environment Microbiology**. 1994. v. 60, p. 258 – 263.
- Tongpim, S.; Pickard, M. A. Growth of *Rhodococcus* S1 on anthracene. **Canadian Journal Microbiology**. 1996. v. 42, p. 289 – 294.

- Trenz, S. P.; Engesser, K. H.; Fischer, P., Knackmuss, H-J. Degradation of fluorene by *brevibacterium* sp strain dpo-1361 - a novel c-c bond-cleavage mechanism via 1,10-dihydro-1,10-dihydroxyfluoren-9-one **Journal Bacteriology**. 1994. v.176, p. 789-795.
- Triegel, E. K., Guo, L. Overview of the fate of pesticides in the environment, water balance; runoff vs. leaching. In: Honeycutt, R. C.; Schalacker, D. J. **Mecanismos of pesticide movement into grounds water**. Boca Raton: CRC Press, 1994, p. 1 – 13.
- Trzesicka-Mlynarz, D., Ward, O. P. Degradation of fluoranthene in a soil matrix by indigenous and introduced bacteria. **Biotechnology Letter**. 1996. v. 18, p. 181-186.
- Uz, I., Duan, Y.P., Orgram, A. Characterization of naphthalene-degrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213. **FEMS Microbiology Letter**. 2000. v. 185, p. 231 – 238.
- Varanasi, U. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the **Aquatic Environment**. CRC Press, Florida. 1989.
- Vazoller, R. F. Microbiologia e Saneamento ambiental In: **Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas**.
<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap9/3/rosana.html> Acesso em: 18 abril 2002.
- Wagrowski, D. M.; Hites, R. A. polycyclic aromatic hydrocarbon accumulation in urban, suburban, and rural vegetation. **Environment Science Technology**. 1997. v. 31, p. 279 – 282.
- Walter, V.; Beyer, M.; Klein, J., Rehm, H-J. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. VW1. **Applied Microbiology Biotechnology**. 1991. v. 34, p. 671 – 676.
- Warshawsky, D.; Keenan, T. M.; Reilman, R.; Gody, T., Radike, M. J. Conjugation of benzo(a)pyrene metabolites by the freshwater green algae *Selenastrum capricornutum*. **Chemical Biology International**. 1990. v. 73, p. 93 – 105.
- Wild, S. R.; Berrow, M. L., Jones, K. C. The persistence of polynuclear aromatic-hydrocarbons (pahs) in sewage-sludge amended agricultural soils **Environment Pollution**. 1991. v.72, p. 141-157.
- Wilson, L. P., Bouwer, E. J. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: A review. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**. 1997. v.18, p. 116-130.

- Yeom, I. T.; Ghosh, M. M., Cox, C. D. Micellar solubilization of polynuclear aromatic hydrocarbons in coal tar-contaminated soils (vol 29, pg 3015, 1995). **Environment Science technology**. 1996. v. 30, p. 1589-1595.
- You, J. H., Chiang, P. C., Chang, S. C., Wu, S. W. polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and mutagenicity in air emissions from the two-stage incineration of polystyrene with various metallic salt additives. **Journal Hazard. Matter**. 1996. v. 48, p. 69 – 82.
- Yuan, S. Y.; Wei, S. H.; Chang, B. V. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by mixed culture. **Chemosphere**. 2000. v. 41, 1463 – 1468.

“Uma longa viagem começa com um único passo.”

CAPÍTULO II

SELEÇÃO
DAS LINHAGENS
BACTERIANAS

1. RESUMO

Este capítulo teve como objetivo selecionar linhagens bacterianas que utilizem HAPs (naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno), e compostos aromáticos-CAs (tolueno e xileno) como fonte de carbono e energia. Foi utilizado, para este fim, quarenta e oito linhagens de bactérias isoladas de amostras de solo contaminados com óleo diesel, preto ou borra oleosa (mistura de óleos). As linhagens foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio de sais minerais e HAPs, numa concentração final de 0,3 % (p/v). O tempo de incubação foi de seis dias e após este período, as amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A degradação do HAP foi analisada através da diferença da área dos respectivos controles pela área das amostras. As linhagens bacterianas que degradam tolueno e xileno (CAs), foram selecionadas utilizando-se a diferença de absorvância a 590 nm da amostra controle (linhagem cultivada em meio de sais minerais, sem o composto aromático), menos a amostra cultivada com o composto aromático. A absorvância foi medida no tempo zero (logo após a inoculação da bactéria) e após 24, 48 e 96 horas. Após os resultados obtidos através dos cromatogramas para HAPs e absorvância para CAs, foi possível selecionar 15 linhagens bacterianas pela porcentagem de compostos degradados. Para restringir este número de 15, para no máximo 5 linhagens; as mesmas foram cultivadas em uma mistura de HAPs e CAs e, também, em cristais de HAPs. Após análises dos resultados foi possível selecionar 4 linhagens (11-*Bacillus badius*, 24- *Entrobacter aglomerans*, linhagem L28- não identificada e 40- *Bacillus* sp.), as quais foram estudadas nos experimentos posteriores (Capítulo III).

1.1. ABSTRACT

The objective of the work describe in this chapter was to select bacterial strains capable to use PAHs (naphthalene, anthracene, fluorene and pyrene) and aromatic (toluene and m-xylene) as carbon and energy sources. 48 bacterial strains, which were isolated from oil-contaminated soils were cultivated in test tubes containing a mineral salt medium and PAHs or CA at the final concentration of 0,3%. Following incubation at 30 °C for 6 days the degradation of the PAHs was determined by reverse phase HPLC using a C₁₈ column. Growth on toluene and m-xylene was monitored by the increase in the absorbance at 590 nm at 24, 48 and 96 hours. 15 bacterial strains showing the highest degradation of PAHs and growth on CA were selected and cultivated in test tubes containing solubilized PAHs; AC; AC plus PAHs and PAH crystal. Four strains showing the best results for degradation an growth were identified as *Bacillus badius*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus* sp. and L 28, and used in further studies (see next chapter).

2. INTRODUÇÃO

Com o avanço da tecnologia e dos processos industriais surgiram novos compostos químicos sintéticos chamados xenobióticos, os quais têm sido lançados indiscriminadamente no meio ambiente, causando distúrbios ao mesmo. Entre estes compostos podemos citar os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) (Richter & Howard, 2000).

Os HAPs são compostos aromáticos e devido às suas propriedades químicas e térmicas, possuem persistência generalizada na natureza, principalmente, perto de locais de produção, uso ou armazenamento. Sua natureza hidrofóbica indica acumulação primária em solos e sedimentos aquáticos, onde são adsorvidos na matéria orgânica ou sofrem volatilização (Rodrigues & Pellizar, 1997).

Atualmente se conhecem mais de 70 compostos classificados como HAPs contendo de 2 a 7 anéis aromáticos, sendo que eles podem apresentar propriedades carcinogênicas.

O problema causado pela poluição dos HAPs é mundial e, portanto, é de grande importância elucidar o processo de sua biodegradação, assim como conhecer os microrganismos nele envolvidos, visando inclusive a obtenção de cepas e técnicas adequadas para a aplicação dos mesmos em ambientes contaminados. Sendo assim, o uso de microrganismos tem a sua finalidade em processos de biorremediação, cujo objetivo é recuperar áreas degradadas pela disposição de resíduos, particularmente os resíduos químicos tóxicos (Colleran, 1997; Head, 1998).

3. OBJETIVO

Esta primeira fase do trabalho teve como objetivo selecionar dentre quarenta e oito linhagens bacterianas, isoladas de amostras de solo contaminados com óleo diesel, preto ou borra oleosa (mistura de óleos), aquelas que apresentaram maior capacidade de degradação ou habilidade de crescerem em meio com maior número de hidrocarbonetos aromáticos – tolueno, m-xileno, naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno.

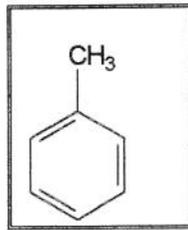
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Desde o início da década 90, há um consenso científico sobre o extenso impacto de contaminantes químicos de origem antropogênica. Todos esses resíduos têm um só destino: os solos e as águas. Os solos tornaram-se reservatórios de resíduos tóxicos. O que seria do planeta se não fossem os microrganismos? Estes sim, embora também vulneráveis à extinção, desenvolveram mecanismos enzimáticos capazes de degradar hidrocarbonetos de ocorrência natural. A ação de enzimas sobre a maioria das substâncias químicas orgânicas e inorgânicas têm sido, geralmente, reportada sob o termo biodegradação. Decorre, pois, dessa adaptabilidade microbiana o interesse pelos estudos de biorremediação, que fornece tecnologia baseada no uso de microrganismos vivos para remover poluentes de solos e águas (Karegoudar & Kim, 2000; Cenci *et al.*, 1999; Churchill *et al.*, 1999; Bidaurd & Minh-T, 1998).

4.1. Hidrocarbonetos Aromáticos

Um numeroso grupo de substâncias pelo seu cheiro agradável foram tradicionalmente designadas com o nome aromático. O composto fundamental desta série é o hidrocarboneto de fórmula C_6H_6 a que se chamou benzeno. Dois ou mais anéis benzênicos condensados formam os compostos polianelares. São naftaleno e antraceno, que possuem 2 e 3 anéis condensados de forma linear, respectivamente. Fluoreno apresenta dois anéis benzênicos e um pentagonal, formando um composto naftenoaromático. Pireno possui 4 anéis condensados de forma angular.

4.1.1. Tolueno



Tolueno, solvente aromático, incolor, de estreita faixa de destilação, média taxa de evaporação e elevado poder de solvência, apresenta fórmula C_7H_8 e massa molar de $92,13 \text{ g mol}^{-1}$.

As aplicações do tolueno são:

- Formulações de tintas (principalmente de secagem rápida), thinners e redutores (como diluente) ou solvente ativo, adesivo à base de borracha;
- Produto de limpeza;
- Desinfetante e detergentes;
- Matéria-prima para indústria química (produção de ácido benzóico); e
- Indústria farmacêutica e de perfumaria.

O tolueno é liberado na atmosfera, água e solo por diferentes mecanismos; na atmosfera através da volatilização de combustível de petróleo e solventes a base de tolueno; em águas e solos devido ao derramamento durante a estocagem , transporte e disposição de óleos e combustíveis.

A remoção do mesmo, pode ser rápida ou durar várias semanas, dependendo da temperatura, condições da mistura e aclimação dos microrganismos. Se liberado na atmosfera poderá ser degradado por reações fotoquímicas produzindo radicais hidroxila (tempo de meia-vida leva de 3 horas a 1 dia).

O tolueno penetra rapidamente no organismo humano, principalmente pela via respiratória, onde atua como irritante (Bandeirante química(a), 2002; Química ufpr, 2002; Spectrum(a), 1999; Verschueren, 1996).

4.1.2. Xileno

Xileno, solvente aromático, incolor, insolúvel em água, mas miscível com a maioria dos solventes orgânicos, de fórmula C_8H_{10} e massa molar de 106,16 $g\ mol^{-1}$. Apresenta-se sob a forma de três isômeros (Figura II.1.).

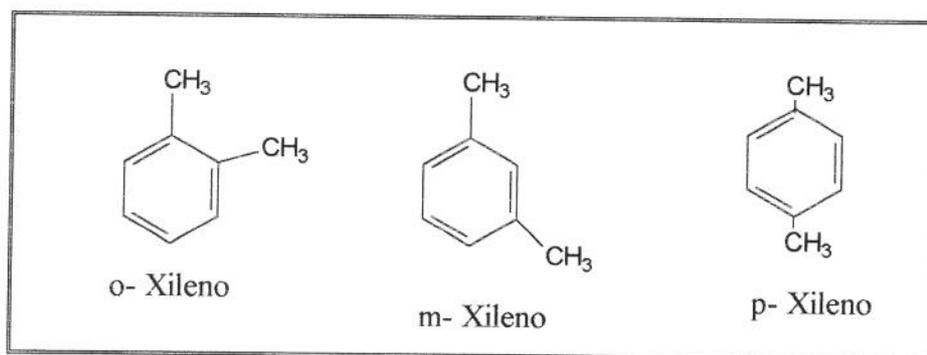


Figura II.1. Isômeros de xileno

As aplicações do xileno são:

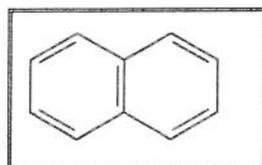
- Formulações de tintas e vernizes;
- Tinta para secagem em estufa, tinta para impressão, têxteis e silkscreen, thinner e redutores (como diluente);
- Em substituição ao tolueno, caso se necessite de uma menor taxa de evaporação;
- Solvente para borracha, resinas e gomas; e
- Matéria-prima para indústria química (produção de anidridoftálico).

O xileno é liberado na atmosfera através da exaustão de motores, emissão em postos de gasolina e como solventes e intermediários químicos. O mesmo pode ser degradado na atmosfera fotoquimicamente com a produção de radicais hidroxila (o tempo de meia-vida leva de 1 a 18 horas). O processo dominante da remoção em

água é a volatilização. Em solos, esses compostos são moderadamente móveis, podendo ser levados a águas subterrâneas onde persistem por muitos anos, uma vez que estão incorporados em sedimentos presentes no fundo de rios ou lagos, onde a taxa de oxigênio é baixa.

Os xilenos são absorvidos por via respiratória, podendo, todavia, penetrar em pequenas quantidades através da pele (Os xilenos, 2002; Bandeirante química(b), 2002; Spectrum(b), 1999; Verschueren, 1996).

4.1.3. Naftaleno



Naftaleno apresenta-se sob a forma de cristais brancos, com um forte odor de alcatrão. Solúvel na maior parte dos solventes orgânicos, dissolve-se ligeiramente em água, de fórmula $C_{10}H_8$ e massa molar de $128,16 \text{ g mol}^{-1}$. Por sublimação, emite vapores a partir de temperatura ambiente.

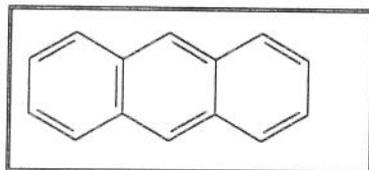
O naftaleno apresenta as seguintes aplicações:

- intervém como produto de base na síntese de numerosos compostos orgânicos: solventes (tetrahidronaftaleno, decahidronaftaleno), corantes, anidrido ftálico, cloronaftaleno, etc.; e
- Também empregado diretamente na conservação de madeira.

Liberado por emissão e exaustão de automóveis; durante estocagem, transporte e disposição de óleo diesel, carvão, entre outros. Uma vez na atmosfera o naftaleno é rapidamente foto-degradado (meia-vida de 3 a 8 horas). Quando liberado na água pode sofrer volatilização, fotólise, adsorção e biodegradação. O tempo de meia-vida depende do local e das condições, variando de dias a meses.

O naftaleno é uma substância inflamável, podendo os seus vapores e poeiras formar misturas explosivas com o ar; a ingestão provoca perturbações digestivas e quando inalado em altas concentrações provoca mal-estar e cefaléias (O naftaleno, 2002; Spectrum(c), 1999; Verschueren, 1996).

4.1.4. Antraceno



O hidrocarboneto sólido é extraído do alcatrão da hulha. Apresenta fluorescência azul-violeta; funde-se a 216 °C; ponto de ebulição 351 °C. Além de meios naturais de extração, pode ser obtido sinteticamente mediante reação com a benzina e o tetrametano. Possui fórmula $C_{14}H_{10}$ e massa molar de 178,22 g mol⁻¹.

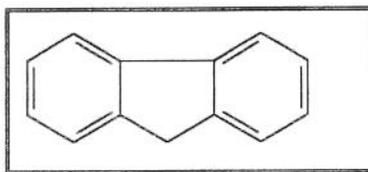
As aplicações do antraceno são:

- Manufatura de antroquinona e da alizarina; e
- Produção de fibras sintéticas, plásticos e monocristais.

Liberado no meio ambiente a partir da combustão incompleta de combustível, está largamente associado com substâncias, solos e sedimentos. Liberado no solo é adsorvido, tendo tempo de meia-vida de 3,3 a 139 dias. Na água pode ser fortemente adsorvido no sedimento, não sendo hidrolisado. Na atmosfera pode sofrer fotólise, tendo tempo de meia-vida de 1,67 dias, resultando radicais hidroxila.

A exposição humana pode ser através de inalação ou consumo de alimentos ou água contaminados. Pode causar irritação nos olhos, na pele e no trato respiratório (Antraceno, 2002; Spectrum(d), 1999; Verschueren, 1996).

4.1.5. Fluoreno



O fluoreno é um composto naftenoaromático que apresenta fórmula $C_{13}H_{10}$ e massa molar de $166,21 \text{ g mol}^{-1}$. Funde-se à $115\text{-}116 \text{ }^\circ\text{C}$ e ponto de ebulição $295 \text{ }^\circ\text{C}$.

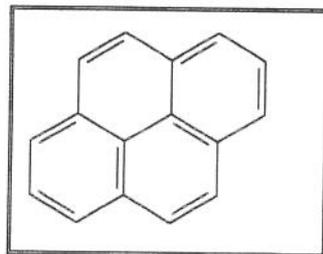
Suas aplicações são:

- Aplicações químicas na formação de poliradicaís para resinas;
- Derivados de fluoreno demonstram atividade como herbicidas; e
- Regulatórios de crescimento.

Ocorre no ambiente através da incompleta combustão de matéria orgânica. Na atmosfera é liberado pela emissão da combustão de óleo, gasolina, carvão e madeira. O fluoreno na forma de vapor é rapidamente degradado fotoquimicamente produzindo radicais hidroxila (meia-vida estimada em 29 horas). Já em formas de partículas, associa-se com cinzas e pode ser removido fisicamente. O fluoreno têm sido detectado em chuva, névoa e neve. Algumas partículas podem ser estáveis para a fotooxidação. Se liberado como sólido ou líquido, o mesmo pode ser biodegradado rapidamente aerobicamente. A meia vida do fluoreno no solo pode ser em torno de 2 a 64 dias.

Os humanos são expostos ao fluoreno através de fumaça de tabaco, inalação de ar poluído ou por ingestão de alimentos e águas contaminados (Spectrum(e), 1999; Fluorene, 1999; Verschueren, 1996).

4.1.6. Pireno



Hidrocarboneto que apresenta-se sob a forma de cristais amarelados, de fórmula $C_{16}H_{10}$ e massa molar de $202,26 \text{ g mol}^{-1}$. Funde-se a $150,4 \text{ }^\circ\text{C}$; ponto de ebulição $393 \text{ }^\circ\text{C}$.

A aplicação do pireno consiste em ser o precursor na síntese de benzo (a) pireno.

Ocorre no ambiente por combustão incompleta. Associa-se a solos e sedimentos. Quando liberado no ar pode estar sujeito a fotólise direta, embora sua adsorção a partículas pode retardar este processo. O tempo de meia-vida para reações da fase vapor do pireno com poluentes atmosféricos são de 0,3 a 0,67 dias. Se liberado na água, pode ser fortemente adsorvido aos sedimentos e bioconcentrando em organismos aquáticos, não sendo hidrolisado.

A exposição de humanos pode se dar através da inalação e consumo de alimentos e águas contaminados. Alta exposição pode ser pela fumaça de cigarros (Spectrum(f), 1999; Pyrene, 1999; Verschueren, 1996).

4.2. Microrganismos

Os microrganismos apresentam imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos.

Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 5% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (Canhos, 2002).

É importante ressaltar que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e da agricultura são derivados das descobertas recentes nas áreas genética, fisiológica e metabolismo de microrganismos.

Os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana incluem, entre outros, a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres. Os benefícios econômicos e estratégicos estão relacionados com a descoberta de microrganismos potencialmente exploráveis nos processos biotecnológicos, que incluem aplicações industriais e tecnológicas; biorremediação de poluentes; biolixiviação e recuperação de minérios. Outros benefícios incluem a otimização da capacidade microbiana para a fertilização dos solos e despoluição das águas.

Entre os vários gêneros de bactérias mais observados como degradadores de compostos aromáticos, isolados de amostras de solos contaminados com óleos e identificadas no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana foram *Bacillus*, *Clostridium*, *Chromobacterium*, *Planococcus*, *Aeromonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacterias*, entre outros.

5. METODOLOGIA

5.1. Microrganismos

Quarenta e oito linhagens de bactérias isoladas de amostras provenientes de solos contaminados com óleo diesel, preto ou borra oleosa (mistura de óleos), e identificadas no Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana (DCA / FEA / UNICAMP), as quais apresentaram capacidade de crescer em meio com compostos alifáticos e aromáticos foram utilizadas no estudo de degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) – Tabela II.1.

Tabela II.1. Linhagens bacterianas utilizadas no estudo de degradação de compostos aromáticos.

Número de identificação das linhagens	Local de isolamento	Coloração de Gram	Identificação
1	Borra oleosa	Gram +	<i>Bacillus polymya</i>
2	Piche	Gram +	<i>Bacillus firmus</i>
3	Óleo diesel	Gram +	<i>Bacillus firmus</i>
4	Óleo diesel	Gram +	<i>Bacillus circulans</i>
5	Óleo diesel	Gram +	<i>Bacillus megaterium</i>
6	Óleo diesel	Gram +	<i>Bacillus brevis</i>
7	Óleo diesel	Gram +	<i>Bacillus brevis</i>
8	Óleo diesel	Gram +	<i>Bacillus sp</i>
9	Óleo diesel	Gram +	<i>Bacillus sp</i>
10	Óleo diesel	Gram +	<i>Bacillus sphaericus</i>
11	Borra oleosa	Gram +	<i>Bacillus badius</i>
12	Óleo diesel	Gram +	<i>Bacillus badius</i>
13	Borra oleosa	Gram +	<i>Bacillus subtilis</i>
14	Piche	Gram +	<i>Clostridium plagarum</i>
15	Piche	Gram -	<i>Chromobacterium sp.</i>
16	Piche	Gram -	<i>Chromobacterium sp.</i>

Tabela II.1. Continuação

17	Óleo diesel	Gram +	<i>Planococcus citrus</i>
18	Óleo preto	Gram +	<i>Aeromonas sp.</i>
19	Óleo diesel	Gram +	<i>Micrococcus varians</i>
20	Borra oleosa	Gram -	<i>Micrococcus lutuis</i>
21	Óleo diesel	Gram -	<i>Enterobacter aerogenes</i>
22	Óleo diesel	Gram +	<i>Enterobacter aerogenes</i>
23	Óleo diesel	Gram +	<i>Staphylococcus sp.</i>
24	Borra oleosa	Gram +	<i>Enterobacter aglomerans</i>
25	Borra oleosa	Gram +	
26	Borra oleosa	Gram +	
27	Borra oleosa	Gram +	
28	Borra oleosa	Gram +	
29	Borra oleosa	Gram +	
30	Borra oleosa	Gram -	
31	Borra oleosa	Gram +	
32	Borra oleosa	Gram +	<i>Bacillus mycoides</i>
33	Borra oleosa	Gram +	
34	Borra oleosa	Gram +	
35	Borra oleosa	Gram +	
36	Borra oleosa	Gram +	
37	Borra oleosa	Gram +	
38	Borra oleosa	Gram +	
39	Borra oleosa	Gram +	
40	Borra oleosa	Gram +	<i>Bacillus sp.</i>
41	Borra oleosa	Gram +	
42	Borra oleosa	Gram +	
43	Borra oleosa	Gram +	
44	Borra oleosa	Gram -	
45	Borra oleosa	Gram +	
46	Borra oleosa	Gram -	<i>Flavobacterium sp.</i>
47	Borra oleosa	Gram -	<i>Actinobacillus lignieressi</i>
48	Borra oleosa	Gram -	<i>Actinobacter caecoaceticua</i>

5.2. Crescimento e Manutenção das Linhagens

As linhagens bacterianas foram cultivadas em placas de Petri ou em tubos de ensaio, contendo meio NA (agar nutriente – Merck) ou meio NB (caldo nutritivo – Becton Dickinson) a 30 °C em cultura estática. Estas culturas foram utilizadas como inóculos em meio contendo HAPs e compostos monoaromáticos.

A manutenção se deu por congelamento em meio NB contendo glicerol 10%.

5.3. Fonte de Carbono

Utilizou-se os compostos monoaromáticos – tolueno e m-xileno, bem como os HAPs – naftaleno antraceno, fluoreno e pireno, como fonte de carbono. Os HAPs foram preparados separadamente em condições estéreis como soluções estoques de 5% (m/v), diluídos em acetona.

5.4. Crescimento Bacteriano em Placas

Com este experimento pretendeu-se determinar a concentração máxima de HAPs a ser utilizada pelas bactérias e o melhor período para o ocorrido.

Para este fim, utilizou-se o método de Kiyohara *et al.* (1982) - modificado, que consiste em adicionar diferentes concentrações (0,1%; 0,3% e 0,5%) de HAPs (solubilizados em acetona) em meio NA. A solução de meio de cultura foi homogeneizada e vertida em placas de Petri. Após a evaporação do solvente (acetona), as culturas bacterianas foram inoculadas e incubadas a 30°C no escuro. Observou-se o crescimento bacteriano, diariamente.

5.5. Seleção das Linhagens Bacterianas Cultivadas em HAPs

5.5.1. Meio de Cultivo

5.5.1.a. HAPs

As linhagens foram crescidas e mantidas em meio agar nutriente, como descrito no item 5.2. Após crescimento (24 horas), as linhagens foram repicadas em meio NB e após atingirem densidade óptica DO_{590nm} igual 1,0, 0,2 mL foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio de sais minerais (Tabela II.2.) e HAPs, numa concentração final de 0,3% (v/v). Em seguida, os tubos foram incubados a 30°C, no escuro e sem agitação.

Tabela II.2. Meio de sais minerais (pH 7,0)

Quantidade (g/L)	Conteúdo
2,0	Na ₂ SO ₄
0,2	MgSO ₄ .7H ₂ O
0,65	K ₂ HPO ₄
1,0	NH ₄ Cl
2,0	KNO ₃
0,01	Fe SO ₄ . 7H ₂ O

5.5.1.b. CAs

Para selecionar as linhagens que degradam tolueno e m-xileno, as mesmas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo meio de sais minerais (Tabela II.2.) e tolueno ou m-xileno, em uma concentração final de 1,0 % (v/v); e incubadas a 30°C, sem agitação.

5.5.1.c. Mistura de HAPs e CAs

Como os HAPs e CAs não se encontram isolados na natureza, mas sim em misturas, esta etapa teve como objetivo selecionar linhagens bacterianas capazes de utilizar esta “mistura” como fonte de carbono e energia. Para tal procedimento, inoculou-se 500 µL de cultura bacteriana em tubos de ensaio contendo 10,0 mL de meio de sais minerais e uma mistura de HAPs, numa concentração final de 0,3 % (m/v). Realizou-se três testes, um com mistura só de HAPs (naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno), outro com mistura de m-xileno e tolueno (CAs), concentração final de 1,0% (v/v) e por último, mistura de HAPs e CAs. Os tubos foram incubados a 30°C, no escuro e sem agitação.

5.5.1.d. Cristais de HAPs

Transferiu-se 500 µL de cultura bacteriana, cultivada em meio NB, para tubos de ensaio contendo meio sais minerais (Tabela II.2.), em seguida adicionou-se cristais de HAPs (naftaleno, antraceno, fluoreno ou pireno), em concentração final de 0,3% (m/v).

5.5.2. Determinação da Degradação de Hidrocarbonetos Aromáticos por Bactérias

5.5.2. 1. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os sobrenadantes das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo HAPs, ou misturas de HAPs e CAs ou cristais de HAPs foram analisados por CLAE.

Após o período de cultivo (seis dias), as amostras foram centrifugadas a 15000 g (5°C), durante 15 min. e o sobrenadante foi analisado quanto a degradação dos HAPs por CLAE, utilizando-se uma coluna com fase reversa, ZORBAX C₁₈, um sistema isocrático de solventes com fase móvel constituído de acetonitrila : água, na proporção 70:30 (v/v); vazão de 0,6 mL/min e detecção em 254 nm. O volume injetado foi de 20 µL e os compostos foram identificados através do tempo de retenção, comparando-os com substâncias padrões.

5.5.2.2. Espectroscopia de Absorção

Após seis dias de cultivo, as linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo CAs ou mistura de HAPs e CAs ou cristais de HAPs foram centrifugadas a 15000 g, durante 10 min. e o sobrenadante analisado por espectrofotometria no UV-Visível (Shimadzu).

A degradação de tolueno e m-xileno foi determinada através da diferença de absorbância a 590 nm da amostra controle (linhagem cultivada em meio de sais minerais sem o composto aromático), pela amostra cultivada no composto aromático.

A absorvância foi medida no tempo zero (ABS_{t0} - logo após a inoculação bacteriana) e após 24, 48 e 96 horas de incubação (ABS_{t1}).

Para selecionar as linhagens que apresentaram maior crescimento em meio contendo o composto aromático, seguiu-se a diferença descrita abaixo:

$$(ABS_{t1} amostra - ABS_0 amostra) - (ABS_{t1} controle - ABS_0 controle)$$

Para as bactérias cultivadas em meio contendo mistura de HAPs e CAs foram medidas absorvâncias nos tempos 0, 24 e 48 horas.

5.5.2.3. Determinação de Atividade de Emulsificação

Como o principal problema da degradação dos HAPs pelos microrganismos está na sua baixa solubilidade em água, Tiehm (1994), sugeriu que a degradação dos hidrocarbonetos pode ser acelerada através da presença de surfactantes, já que estes apresentam o potencial de aumentar a concentração de compostos hidrofóbicos em fase aquosa.

Sendo assim, a produção de emulsificantes foi investigada para as linhagens bacterianas.

Para determinar a atividade de emulsificação, realizou-se 4 experimentos:

1. Linhagens bacterianas cultivadas em mistura de HAPs.
2. Linhagens bacterianas cultivadas em mistura de HAPs e CAs.
3. Linhagens bacterianas cultivadas em misturas de CAs.
4. Linhagens bacterianas cultivadas em HAPs ou CAs, separadamente.

Para tal procedimento, 500 μ L de cultura bacteriana foram cultivadas em meio NB e inoculadas em meio para produção de biosurfactantes (Tabela II.3.). Em seguida adicionou-se HAPs e CAs (misturados ou sozinhos), em concentração final de 0,3% (m/v) para HAPs e 1,0 % (v/v) para CAs. Após seis dias de incubação a 30°C no escuro e sem agitação, as amostras foram centrifugadas e 3,0 mL do sobrenadante foi utilizado para medir a atividade de emulsificação. A esses 3,0 mL, adicionou-se 2,0 mL de tolueno (como substrato), lendo a absorbância em 610 nm (tempo zero). Em seguida, os tubos foram agitados vigorosamente em agitador Vortex, durante 1 min. Após uma hora, a densidade óptica da emulsão óleo em água foi determinada a 610 nm e relatada como atividade de emulsificação (Johnson *et al.*, 1992). Após 24 horas (em repouso), as emulsões água em óleo foram expressas em centímetros, medindo a altura do halo formado (Cooper & Goldenberg, 1987).

Tabela II.3. Meio de produção de biosurfactantes (pH 7,0)

Quantidade (g/L)	Componentes
0,5	MgSO ₄
3,0	NaNO ₃
1,0	KH ₂ PO ₄
1,0	Extrato de Levedura
0,3	Peptona

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Crescimento Bacteriano em Placas

Com a metodologia de Kiyohara *et al.* (1982), foi possível visualizar crescimento bacteriano em toda placa de Petri a partir do segundo dia após inoculação, com 0,1% de HAPs. Quando se utilizou 0,3% de HAPs, observou-se crescimento a partir do quarto dia.

O fato das linhagens não crescerem em concentração final de 0,5% pode estar relacionado ao efeito tóxico que esta concentração pode ter causado às bactérias.

Com este experimento foi possível determinar a concentração máxima a ser utilizada (0,3%) e o melhor período para as análises (seis dias).

6.2. Seleção das Linhagens Bacterianas Cultivadas em HAPs

Os resultados listados na Tabela II.4., foram obtidos através da área dos HAPs.

Tabela II.4. Porcentagem de degradação de HAPs das linhagens bacterianas, cultivadas por seis dias.

Linhagens	Degradação (%)			
	Naftaleno	Antraceno	Fluoreno	Pireno
1	96	18	ND	49
2	97	18	81	80
3	96	82	94	34
4	96	94	71	ND
5	97	96	82	ND
6	98	99	95	5
7	98	97	84	29
8	99	98	94	ND
9	99	99	93	21
10	99	98	95	ND
11	99	98	98	99
12	99	99	91	26
13	99	98	93	4
14	99	98	97	ND
15	99	99	91	59
16	99	99	90	70
17	99	99	95	99
18	99	99	93	99
19	93	99	95	73
20	82	99	95	71
21	66	99	94	5
22	93	99	76	ND
23	31	99	89	99
24	58	99	95	63
25	77	99	95	99
26	65	98	84	69
27	34	97	90	53
28	55	99	85	99
29	46	99	93	99
30	50	98	87	99

Tabela II.4. Continuação

31	36	97	89	99
32	32	99	89	64
33	27	98	86	99
34	21	97	ND	84
35	25	99	88	63
36	64	99	87	99
37	37	85	88	99
38	39	98	ND	74
39	14	99	95	49
40	13	99	88	99
41	16	99	88	38
42	54	99	87	41
43	26	99	88	53
44	5	99	92	19
45	28	99	93	21
46	68	99	62	99
47	25	98	95	8
48	44	99	91	76

ND = Não Degradado

6.3. Seleção das Linhagens Bacterianas Cultivadas em CAs

Para selecionar as linhagens que apresentaram maior crescimento em meio contendo compostos aromáticos, utilizou-se a diferença de ABS (590 nm) do controle pela amostra. As absorbâncias foram medidas nos tempos 0, 24, 48 e 96 horas, sendo 48 horas o tempo no qual se obteve o máximo de crescimento bacteriano (fase exponencial). Os dados estão demonstrados na Tabela II.5 .

Tabela II.5. ABS das culturas bacterianas em meio contendo tolueno e m-xileno.

ABS (590 nm) – 48 h		
Linhagens	Tolueno	m-Xileno
1	0	0,0269
2	0,2342	0,0349
3	0,1109	0,0922
4	0,1805	0
5	0,2458	0
6	0,0972	0,073
7	0,0084	0,0768
8	0	0,1678
9	0	0
10	0,4384	0,0698
11	0	0,0788
12	0	0
13	0,1698	0,1272
14	0	0
15	0	0
16	0	0
17	0	0
18	0	0
19	0	0
20	0,0562	0,2453
21	0,0676	0
22	0,0426	0
23	0,1364	0
24	0,1202	0,023
25	0	0
26	0,0405	0,2145
27	0,156	0
28	0,1612	0,0803
29	0,1372	0
30	0,063	0,038

Tabela II.5. Continuação

31	0,0786	0,0811
32	0	0
33	0	0
34	0,1532	0
35	0,0338	0,0164
36	0,1372	0,0396
37	0,2374	0,1654
38	0	0
39	0,0297	0,0764
40	0,1039	0,232
41	0	0
42	0,0106	0
43	0,108	0,174
44	0	0
45	0,038	0,317
46	0	0
47	0	0
48	0	0

As linhagens foram selecionadas de acordo com a maior porcentagem de compostos degradados (Tabelas II.4 e II.5).

- Linhagem 3 (*Bacillus firmus*), mesmo apresentando baixa degradação de pireno (34%), para os demais compostos apresentou resultados satisfatórios.
- Linhagem 7 (*Bacillus brevis*), apresentou degradação semelhante a linhagem 3, ou seja, alto índice de gradação de naftaleno, antraceno e fluoreno (acima de 80%) e baixa degradação de pireno (em torno de 30 %).
- Linhagem 10 (*Bacillus sphaericus*), mesmo não degradando o composto pireno, apresentou altos índices de degradação dos demais compostos, principalmente tolueno. Foi a linhagem para a qual se obteve maior ABS (0,4384).

- Linhagem 11 (*Bacillus badius*), apresentou altas degradações dos HAPs. Esta linhagem destaca-se por apresentar alta degradação de HAPs superior a 97% e crescimento em tolueno (0,0788 ABS).
- As linhagens 24 (*Enterobacter agglomerans*); 26, 28, 30, 31, 35, 36, 37, 43 e 45 (não identificadas) e 40 (*Bacillus* sp.) apresentaram degradação semelhantes entre si.

Com exceção das linhagens 10 e 11, todas as demais que não degradaram algum composto, não foram selecionadas. Aquelas linhagens que apresentaram degradação de HAPs inferior a 20%, também não foram selecionadas. Sendo assim, com estes dois experimentos, selecionou-se 15 linhagens, as quais foram utilizadas nos experimentos posteriores, a fim de restringir este número para no máximo cinco linhagens.

6.4. Seleção de Linhagens Bacterianas Cultivadas em Mistura de HAPs e CAs

Neste experimento, foi utilizado as 15 linhagens, selecionadas nos experimentos anteriores (6.2 e 6.3), para verificar se as mesmas utilizariam “misturas” de hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia. Os experimentos foram conduzidos em três etapas, a) linhagens bacterianas cultivadas em HAPs; b) linhagens bacterianas cultivadas em HAPs + CAs e c) linhagens bacterianas cultivadas em CAs, e analisados por espectrofotometria no UV-Visível após quarenta e oito horas de cultivo e por cromatografia líquida de alta eficiência, após seis dias de incubação. Os resultados estão demonstrados nas Tabelas II.6. a II.8.

Tabela II.6. ABS das culturas bacterianas em meio contendo HAPs e/ou CAs.

ABS (590 nm) – 48 horas			
Linagens	CAs	HAPs	CAs e HAPs
3	0,0643	0	0
7	0	0	0
10	0,0422	0	0
11	0	0	0
24	0	0	0
26	0,0356	0	0
28	0	0	0
30	0	0	0
31	0	0	0
35	0	0	0
36	0,2864	0	0
37	0	0	0
40	0	0	0
43	0	0	0
45	0,0572	0	0

Com relação aos resultados demonstrados na Tabela II.6., nenhuma das linhagens crescidas em HAPs e HAPs + CAs foram selecionadas, uma vez que não se registrou absorvância neste período de cultivo (48 horas). Este fato está relacionado com tempo curto dado as bactérias para utilizarem estes compostos como fonte de carbono, além disso, os mesmos, estando misturados, podem ter apresentado ação tóxica. A adaptação de microrganismos a muitos compostos orgânicos exerce importante fator nas taxas de degradação. Respostas adaptativas

tem sido observadas em culturas puras, ambientes aquáticos, solos e aquíferos (Moorman, 1990).

As linhagens 3, 10, 26, 36 e 45 apresentaram absorvância, quando cultivadas em meio contendo CAs.

Tabela II.7. Porcentagem de degradação de cada HAP presente na mistura de HAPs. Seis dias de cultivo, por CLAE.

Linhagens	Degradação (%)			
	Naftaleno	Antraceno	Fluoreno	Pireno
3	0	95	93	73
7	0	97	90	61
10	39	99	94	85
11	66	98	98	84
24	23	98	95	82
26	0	77	80	0
28	73	98	98	85
30	0	8	95	71
31	3	98	95	83
35	1	98	93	76
36	82	98	98	55
37	0	98	94	77
40	0	98	94	74
43	10	99	96	85
45	72	98	96	86

Tabela II.8. Porcentagem de degradação de cada HAP presente na mistura de HAPs e CAs. Seis dias de cultivo, por CLAE.

Linhagens	Degradação (%)			
	Naftaleno	Antraceno	Fluoreno	Pireno
3	88	99	93	95
7	96	99	99	98
10	45	98	98	90
11	51	99	98	97
24	21	99	99	95
26	37	98	98	88
28	10	98	97	87
30	13	98	96	83
31	5	98	96	77
35	24	99	94	85
36	18	43	97	0
37	0	99	85	77
40	52	99	96	88
43	47	99	98	89
45	92	99	97	98

Para análises por CLAE, apenas os picos correspondentes aos HAPs foram detectados, nas condições estabelecidas para este experimento.

As linhagens cultivadas em HAPs e CAs apresentaram altas porcentagens de degradação para todos os compostos, com exceção das linhagens 36 e 37 que não degradaram pireno e naftaleno respectivamente (Tabela II.8.). Observou-se, também

que os menores índices de degradação foram obtidos com naftaleno, talvez devido a interferência dos outros compostos.

Quando as linhagens foram cultivadas em mistura de HAPs, um menor número de linhagens utilizaram todos os compostos como fonte de carbono (3, 7, 26, 30, 37 e 40) – Tabela II.7.

Essa diferença de degradação observadas entre as Tabelas II.7. e II.8., pode estar relacionada com a presença de tolueno e m-xileno no meio, uma vez que esses compostos são solventes e de certo modo podem estar interferindo na solubilidade dos HAPs estudados e, conseqüentemente, tornando-os mais acessíveis as bactérias.

Em sua grande maioria, a mistura de compostos apresentou um efeito sinérgico para as linhagens avaliadas.

6.5. Determinação de Atividade de Emulsificação por Bactérias Cultivadas em Mistura de HAPs e CAs

Esta fase do trabalho, teve como objetivo detectar a produção de atividade de emulsificação das 15 linhagens bacterianas, cultivadas em meio para produção de biosurfactantes contendo 4 diferentes fontes de carbono (mistura de CAs; mistura de HAPs; mistura de CAs + HAPs e HAPs ou CAs utilizados separadamente). Os resultados estão apresentados nas Tabelas II.9. a II.11.

Tabela II.9. Atividade de emulsificação (ABS e halo) por bactérias cultivadas em meio contendo misturas de HAPs e CAs.

Linhagens	ABS (610 nm)			Halo (cm)		
	HAPs + CAs	HAPs	CAs	HAPs + CAs	HAPs	CAs
3	0,055	0,071	0,091	0	0	0,1
7	0,036	0	0,076	0	0	0,9
10	0,187	0,018	0,222	0	0	0,3
11	0	0,018	0,102	0	0	0,4
24	0,108	0,004	0,120	0	0	1
26	0,131	0,119	0,125	0	0	1,6
28	0,022	0,022	0,108	0	0	0,1
30	0,023	0,168	0,097	0	0	1,5
31	0,022	0	0,167	0	0	0,7
35	0,046	0,027	0,505	0	0	0,5
36	0,108	0,076	0,125	0	0	0,7
37	0,156	0,137	0,108	0	0	1,9
40	0,119	0,222	0,208	0	0	1,8
43	0,131	0,022	0,862	0	0	1,8
45	0,174	0,120	0,147	0	0	1,7

Analisando os resultados demonstrados acima, pode-se observar que apenas as linhagens 7, 11 e 31 não apresentaram atividade de emulsificação de óleo em água (ABS), quando cultivadas em meio contendo HAPs e HAPs + CAs, respectivamente. Com relação a atividade de emulsificação de água em óleo (halo), somente as linhagens cultivadas em meio contendo mistura de CAs apresentaram halo. Isso prova que as linhagens bacterianas podem apresentar diferentes atividades de emulsificação (água em óleo ou óleo em água), de acordo com o substrato utilizado.

Tabela II.10. Atividades de emulsificação por bactérias cultivadas em meio contendo HAPs, separadamente.

Linhagens	Naftaleno		Antraceno		Fluoreno		Pireno	
	ABS	Halo (cm)	ABS	Halo (cm)	ABS	Halo (cm)	ABS	Halo (cm)
3	0,009	0	0,041	0	0,091	0	0	0
7	0,004	2,1	0	2,2	0,021	2,3	0,113	2,0
10	0,022	0	0	0	0,051	0	0,013	0
11	0,013	0,3	0,013	0,6	0	1,5	0	1,0
24	0	0	0,022	1,8	0,027	1,9	0	1,9
26	0	0	0	0,3	0	0	0	0
28	0	0	0	0,4	0	0,3	0	0,3
30	0	0	0	0	0,071	0	0	0
31	0	0	0	0,3	0,060	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0,009	0,3	0	0,5	0,071	0,4	0	0,3
37	0,022	0	0	0,6	0,041	0,5	0	1,0
40	0,009	0,5	0	0	0,031	2,4	0	2,3
43	0,012	0	0	0	0,065	0	0	0
45	0	0	0,050	0	0,004	0,9	0	0

A linhagem 07 apresentou altos valores de atividade de emulsificação de água em óleo, para todos os compostos avaliados.

As linhagens 24, 26, 28, 30, 31, 35 e 45 não apresentaram nenhum tipo de emulsificação, quando cultivadas em meio com naftaleno. Somente as linhagens 11 e 24 apresentaram os dois tipos de emulsificação, quando crescidas em meio com antraceno. Utilizando o fluoreno como fonte de carbono, obteve-se mais atividade de emulsificação do tipo óleo em água do que água em óleo. Ao contrário do

fluoreno, quando as linhagens foram cultivadas em pireno, obteve-se mais atividade de emulsificação do tipo água em óleo. As maiores atividades de emulsificação água em óleo foram obtidas pela linhagem 40, cultivada em fluoreno (2,4 cm) e pireno (2,3 cm).

Tabela II.11. Atividades de emulsificação (ABS e halo), por bactérias cultivadas em meio contendo CAs, separadamente.

Linhagens	Tolueno		m-Xileno	
	ABS	Halo (cm)	ABS	Halo (cm)
3	0	0	0	0
7	0	0	0	0,5
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
24	0	1,8	0,022	1,5
26	0	0	0,018	0,3
28	0	1,4	0	0,2
30	0	0,3	0	0,5
31	0	0	0	0
35	0	0	0,023	0
36	0	0,3	0,015	0,6
37	0	0	0	0,5
40	0,018	2,2	0	2,1
43	0,071	0	0	0
45	0,212	0	0	0,8

A tabela acima mostra que poucas linhagens apresentaram atividade de emulsificação (água/óleo ou óleo/água), quando cultivadas em meio contendo tolueno ou m-xileno. Como os compostos fornecidos como fonte de carbono para as linhagens, são monoaromáticos, a produção de emulsão não seria necessária uma vez que os mesmos estariam mais acessíveis as bactérias, quando comparados com os outros compostos aromáticos policíclicos.

6.6. Seleção das Linhagens Bacterianas Cultivadas em Cristais de HAPs

Como os HAPs não são encontrados na natureza solubilizados, pelo contrário, tendem a se adsorver aos sedimentos; esta etapa teve como objetivo, selecionar entre as 15 linhagens bacterianas, aquelas que conseguiram crescer em meio com maior número de HAPs ou que apresentaram maior taxa de degradação dos mesmos. Os resultados, após seis dias de cultivo e analisados por CLAE, estão mostrados na Tabela II.12.

Tabela II.12. Porcentagem de degradação de cristais de HAPs, pelas linhagens bacterianas cultivadas durante seis dias, por CLAE.

Linhagens	Degradação (%)			
	Naftaleno	Antraceno	Fluoreno	Pireno
3	44	0	98	0
7	56	0	99	80
10	39	0	99	92
11	59	84	96	85
24	44	99	96	89
26	0	97	99	92
28	49	98	99	90
30	45	70	99	34
31	63	96	99	80
35	67	97	99	89
36	0	97	99	96
37	65	98	99	91
40	54	0	99	96
43	59	0	99	97
45	63	97	99	0

Os resultados listados na Tabela II.12 mostram que apenas as linhagens 26 e 36 não utilizaram naftaleno como fonte de carbono e energia. Apesar das demais linhagens apresentarem degradação, esta foi menor quando comparado com a primeira seleção (Tabela II.4.). Isso pode ser devido aos cristais de naftaleno, pois na primeira seleção os mesmos estavam dissolvidos em acetona. Todas as linhagens testadas apresentaram altos valores de degradação de fluoreno, quando o mesmo foi adicionado como fonte de carbono.

Quando se utilizou antraceno como fonte de carbono, as linhagens 3, 7, 10, 40 e 43 não conseguiram degradá-lo. Este fato também pode estar relacionado aos cristais, como ocorreu com naftaleno.

É importante ressaltar que os HAPs têm baixa solubilidade em água, sendo assim, uma parte dos cristais pode não ter se “solubilizado” no meio de saís, acarretando, portanto, difícil acesso das culturas bacterianas aos mesmos.

Os resultados obtidos com fluoreno foram diferentes dos demais (todas as linhagens apresentaram degradação superior a 95 %). Este fato pode estar relacionado à forma em que foi utilizado, ou seja, em pó, o que pode ter acarretado maior “solubilização” do composto ao meio, visto que os demais HAPs apresentam-se na forma de cristais.

A degradação microbiana dos HAPs é um dos processos envolvidos na biorremediação (Reardon *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 1999; Casellas *et al.*, 1998). O número de compostos aromáticos conhecidos por serem biodegradados, têm aumentado; no entanto, o número de microrganismos isolados que podem mineralizar HAPs, principalmente de alta massa molar, como pireno e benzo (a) pireno é limitada (Mcnally *et al.*, 1999; England, *et al.*, 1998; Rehmann *et al.*, 1997), o que se deve a complexidade da estrutura química do HAP e suas correspondentes propriedades físico-química (Gauger *et al.*, 1990; Walton & Anderson, 1988).

Após análises em relação a degradação dos HAPs pelas 15 linhagens, foi possível selecionar dentre estas, quatro, as quais estão relacionadas abaixo:

- Linhagens 11 (*Bacillus badius*); 24 (*Enterobacter agglomerans*) e 28 (não identificada) utilizaram todos os HAPs testados como fonte de carbono, apesar de uma menor porcentagem de degradação do naftaleno, quando comparado com os demais compostos;
- Linhagem 40 (*Bacillus* sp.) foi selecionada, mesmo não apresentando degradação de naftaleno e antraceno, quando cultivada em mistura de HAPs e cristais, respectivamente. No entanto, apresentou formação de halo, considerável, quando cultivada em mistura de CA e em cristais de naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno.

7. CONCLUSÃO

As linhagens bacterianas foram selecionadas de acordo com o maior número de compostos degradados. E de acordo com os resultados obtidos conclui-se que:

- Com o método de Kiyohara *et al.* (1982), foi possível estabelecer concentração máxima dos HAPs, quando solubilizados em acetona, de 0,3 % e o melhor período de cultivo das linhagens – seis dias.
- As quarenta e oito linhagens conseguiram utilizar pelo menos um dos hidrocarbonetos (tolueno, m-xileno, naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno) estudados, como fonte de carbono e energia.
- Com os experimentos de cultivo bacteriano em meios contendo HAPs e CAs, foi possível realizar uma pré-seleção das melhores linhagens, ou seja, das quarenta e oito, quinze mostraram-se mais promissoras no processo de degradação dos hidrocarbonetos.
- Das 15 linhagens selecionadas, quatro se destacaram nos experimentos de cultivo bacteriano em meios contendo mistura de HAPs, HAPs + CAs, CAs; produção de atividades de emulsificação e crescimento em cristais de HAPs.
- As quatro linhagens selecionadas, as quais foram utilizadas nos experimentos posteriores (Capítulo III) são: *Bacillus badius*, *Bacillus sp.*, *Enterobacter agglomerans* e uma linhagem não identificada, denominada L28.

8. REFERÊNCIAS

- Allen, C. C. R.; Boyd, D.R.; Hempenstall, F.; Larkin, M. J.; Sharma, N. D. Contrasting effects of a nonionic surfactant on the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons to cis-dihydrodiols by soil bacteria. **Applied Environment Microbiology**. 1999. v. 65, p. 1355–1339.
- Antraceno. **Citações e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em:
<<http://ftp.ibilce.unesp.br/servicos/prevencao/produtos/antraceno.html>> Acesso em: 22 abril 2002.
- Bandeirante química(a). **Citações e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em:
<<http://www.bandeirantequimica.com,br/produtos/tolueno.htm>> Acesso em: 22 abril 2002.
- Bandeirante química(b). **Citações e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em:
<<http://www.bandeirantequimica.com,br/produtos/xileno.htm>> Acesso em: 22 abril 2002.
- Bidaud, C.; Minh-T, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons (HAPs) biodegradation in the soil of a former gasworks site: selection and study of PAHs-degrading microorganisms. **Journal Molecular Catal. B-Enzymatic**. 1998. v. 5, p. 417 – 421.
- Canhos, V. P.; Coutinho, H.L.C.; Vazoller, R. Microorganismos e biodiversidade de solos. In: **Estratégia Nacional de Diversidade Biológica**.
<<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/politica/gtt/gtt10>> Acesso em: 23 abril 2002.
- Casellas, M.; Grifoll, M; Sabate, J.; Solanas, A. M. Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. **Canadian Journal Microbiology**. 1998. v. 44, p. 734 – 742.
- Cenci, G.; Galdini, G.; Boari, L. Dioxygenase activity relative behaviour of Pseudomonas strains from soil in the presence of different aromatic compounds. **World Journal Microbiology Biotechnology**. 1999. v. 15, p. 47 – 52.
- Churchill, S. A.; Harper, J. P.; Churchill, P. F. Isolation and characterization of a Mycobacterium species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. **Applied Environment Microbiology**. 1999. v. 65, p. 549 – 552.
- Colleran, E. Uses of bacteria in bioremediation. In: Sheehan, D. (Ed), **Methods in Biotechnology**. Vol. 2, Bioremediation Protocols. Humana Press, New Jersey. 1997. p. 322.

- Cooper, D., Goldenberg, B. G. **Applied Environment Microbiology**. 1987. v. 53, p. 224-229.
- England, P. A.; Cross-H., C. F.; Stevenson, J. A.; Rouch, D. A.; Wong, L. L. The oxidation of naphthalene and pyrene by cytochromo P450 (cam). **FEBS Letter**. 1998. v. 424, p. 271-274.
- Fluoreno. **Citações e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em: <http://chrom.tutms.tut.ac.jp/JINNO/DATABASE/08fluorene.html> Acesso em: 13 agosto 1999.
- Gauger, W. K.; Kilbane, J. J.; Kelly, R. L., Srivasta, V. J. Enhancement of microbial degradation of hydrocarbons in soil and water. In: **Gas, Oil, Coal and Environmental Biotechnology**. C. Akin J., Smith (Eds). Intitute of Gas Technology, Chicago, Illinois. 1990. p. 171 - 203.
- Head, I. M. Bioremediation: towards a credible technology. **Microbiology**. 1998. v. 144, p. 599-608.
- Johnson, V.; Singh, M.; Saini, V. S.; Adhikardi, D. K.; Sista, V. & Yadav, N. K. Transformation of vegetable-oils by an oleaginous yeast - rhodotorula-glutinis iip-30. **Biotechnology Letter**. 1992. v. 6, p. 487-490.
- Karegoudar, T. B.; Kim, C. K. Microbial degradation of monohydroxybenzoic acids. **Journal Microbiology**. 2000. v. 38, p. 53 - 61.
- Kiyohara, H.; Nagao, K., Yana, K. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates **Applied Environment Microbiology**. 1982. v. 43, p. 454-457.
- Mcnally, D. L.; Mihelcic, J. R., Lueking, D. R. Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions. **Chemosphere**. 1999. v. 38, p. 1313-1321.
- Moorman, T. B. Adaptation of microorganisms in subsurface environmental: significance to pesticide degradation. In: Racke, K. D.; Coats, J. R. Eds. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environmental**. Washiington: ACS. 1990. p. 167 - 180.
- O naftaleno. **Citações e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em: <http://www.eq.uc.pt/~mena 3/naftaleno.html> Acesso em: 22 abril 2002.
- Os xilenos. **Citações e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em: <http://www.eq.uc.pt/~mena 3/xilenos. Html> Acesso em: 22 abril 2002.

- Pyrene. **Citações e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em:
<<http://chrom.tutms.tut.ac.jp/JINNO/DATABASE/12pyrene.html>> Acesso em: 17 agosto 1999.
- Química.ufpr. **Citações e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em:
<<http://www.quimica.ufpr.br/~ssta/tolueno.html>> Acesso em: 22 abril 2002.
- Reardon, K. F.; Mosteller, D. C.; Rogers, J. D. B. Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. **Biotechnology Bioengineering**. 2000. v. 69, p. 385 – 400.
- Rehmann, K.; Noll, H. P.; Steinberg, C. E. W.; Kettrup, A. A. Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KR2. **Chemosphere**. 1997. v. 36, p. 2977 – 2992.
- Richter, H.; Howard, J. B. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbon and their growth to soot – a review of chemical reaction pathways. **Progress Energy. Combustion Science**. 2000, v. 26, p. 565-608.
- Rodrigues, J. M.; Pellizar, V. H. Biodegradação de PCBs. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. (Eds). **Microbiologia Ambiental**. Embrapa – CNPMA. 1997, Cap. 4., p. 107 – 124.
- Spectrum(a). **Citações e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em:
<<http://www.speclab.com/compound/c108883.htm>> Acesso em: 17 agosto 1999.
- Spectrum(b). **Citações e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em:
<<http://www.speclab.com/compound/c1330207.html>> Acesso em: 17 agosto 1999.
- Spectrum(c). **Citações e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em:
<<http://www.speclab.com/compound/c191203.htm>> Acesso em: 17 agosto 1999.
- Spectrum(d). **Citações e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em:
<<http://www.speclab.com/compound/c120127htm>> Acesso em: 17 agosto 1999.
- Spectrum(e). **Citações e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em:
<<http://www.speclab.com/compound/c86737.htm>> Acesso em: 17 agosto 1999.
- Spectrum(f). **Citações e referências a documentos eletrônicos**. Disponível em:
<<http://www.speclab.com/compound/c129000.htm>> Acesso em: 17 agosto 1999.
- Tiehm, A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactant. **Applied Environment Microbiology**. 1994. v. 60, p. 258 – 263.

Verschueren, K. **Handbook of environment data on organic chemicals**. 3^a ed. Van Nostrand Reinhold. 1996. pp. 2064.

Walton, B. T., Anderson, T. A. Structural properties of organic chemicals as predictors of biodegradation and microbial toxicity in soils. **Chemosphere**. 1988. v. 17, p. 1501 – 1507.

*“O mundo não deve ter fronteiras
mas horizontes.”*

CAPÍTULO III

IDENTIFICAÇÃO DAS
LINHAGENS E DEGRADAÇÃO
DE HAPs, SOLUBILIZADOS
EM ACETONA

1. RESUMO

Quatro linhagens bacterianas, (*Bacillus badius*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter agglomerans* e *Bacillus sphaericus*); foram estudadas quanto a capacidade de degradar os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno), quando cultivadas como culturas puras em meio contendo estes compostos solubilizados em acetona ou em cristais.

Através dos resultados pôde-se observar que as linhagens bacterianas utilizaram HAPs, solubilizados ou em cristais, como fonte de carbono e energia, no entanto, para cada HAP a maior porcentagem de degradação se deu no sexto dia para os solubilizados e a partir do nono dia para os cristais.

1.1. ABSTRACT

Four bacterial strains: *Bacillus badius*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus sphaericus*, were used in studies to determine their capacity in to degrade the polycyclic aromatic hydrocarbons (naphthalene, anthracene, fluorene and pyrene), added to the culture medium in a solubilized form or as crystal. Degradation was determined by reverse-phase HPLC using a C₁₈ column. The solubilized PAH highest levels of acetone-solubilized PAH was obtained on the 6th day of growth, regardless of the strain or of the PAH, whereas it was necessary 9 days of incubation to obtain the highest degradation of the crystals of the PAHs.

2. INTRODUÇÃO

Nos últimos 200 anos têm ocorrido um rápido crescimento da população, resultando na necessidade de se utilizar grandes quantidades de combustível, produtos químicos, fertilizantes, pesticidas e fármacos para manter e melhorar a qualidade de vida (Chakrabarty *et al.*, 1988).

Embora muitos desses químicos sejam utilizados ou destruídos, altas porcentagens dos mesmos são liberadas no ar; água e solos, representando um risco em potencial para o meio ambiente e saúde humana (Alexander, 1995). Como resultado, temos como herança locais contaminados que requerem atenção. Infelizmente, não é possível substituir todos os processos industriais que geram poluentes como alternativa de “limpeza” do meio ambiente. No entanto, tratamentos dos produtos liberados, acidentalmente ou não, é uma das alternativas na prevenção, recuperação e manutenção dos ecossistemas (Colleran, 1997; Field *et al.*, 1995; Betts, 1991;).

As possíveis soluções para os rejeitos lançados no meio ambiente podem abrigar diferentes processos biológicos, cujo objetivo é a biodegradação de compostos poluentes em compostos mais simples, em outras palavras, a mineralização completa de moléculas orgânicas. Alguns processos podem gerar ainda, produtos finais de valor energético, como é o caso do metano, ou de valor para a indústria de química fina, como é o caso do catecol, originado a partir da transformação biológica de compostos aromáticos (Griffiths, 1992).

3. OBJETIVOS

Este capítulo teve como objetivo identificar as bactérias *Bacillus* sp. e linhagem L28 quanto a espécie e gênero, respectivamente, e comparar a degradação dos HAPs quando adicionados, em meio de cultivo, solubilizados ou em cristais, contendo as linhagens bacterianas selecionadas.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O impacto dos processos microbiológicos no dia-a-dia da existência humana é difícil de ser quantificado, dada a ampla variedade de produtos cuja elaboração envolveu direta ou indiretamente a ação de microrganismos. A aplicação de microrganismos nas formulações de inoculantes microbiológicos para uso industrial e agropecuário, tais como inoculantes para a biodegradação de compostos tóxicos em tratamentos de efluentes e para a biorremediação ambiental, têm sido bastante pesquisados (Manfio & Lemos, 2002).

4.1. Microrganismos

Os microrganismos estão largamente distribuídos em nosso planeta. Representantes desses seres vivos são muitas vezes encontrados em ambientes de características extremas e presumivelmente adversas. Características interessantes dos microrganismos em geral é o papel que têm exercido e continuam exercendo, desde o aparecimento da vida no planeta, em inúmeros processos geológicos fundamentais. A atividade metabólica desenvolvida pelos microrganismos exerce comprovada influência na degradação de combustíveis fósseis (Garcia-J, 1997; Ehrlich, 1981).

A adaptação de microrganismos a muitos compostos orgânicos exerce um importante fator nas taxas de degradação. Respostas adaptativas tem sido observadas em culturas puras, ambientes aquáticos, solos e aquíferos (Moorman, 1990). A capacidade de certos microrganismos de utilizarem hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia foi apresentada por Zobell em 1946. Ele verificou que esses microrganismos eram amplamente distribuídos na natureza, e a utilização de

hidrocarbonetos era altamente dependente da natureza química dos compostos em condições ambientais.

As maiores responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos aromáticos (HAPs) no ambiente são as bactérias. Como a degradação desses compostos a CO₂ envolve uma reação de oxidação, os organismos que os degradam em sua maioria são aeróbios. O destino dos hidrocarbonetos, além da produção de CO₂ na sua degradação total, podem também ser armazenados como glóbulos e alguns alcanos podem ser incorporados na biomassa (Dumenil *et al.*, 1988).

4.1.1. Bactérias

Bactérias são microrganismos procariotos, caracterizados por apresentar uma única molécula de DNA, e que são desprovidos de membrana nuclear. São visualizadas em microscópio com a utilização de corantes. A coloração mais importante e mais amplamente utilizada é o método diferencial de Gram. Esta técnica foi descrita por Christian Gram em 1884, na Dinamarca, e possibilitou a divisão das bactérias em dois grandes grupos: Gram positivas e Gram negativas.

Entre os diversos gêneros estudados na degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, neste trabalho, destacam-se dois *Bacillus* e *Enterobacter*, os quais foram selecionados, por apresentarem altos índices de degradação dos HAPs (Capítulo II).

4.1.1. 1. *Bacillus*

Bacillus, representa o gênero de bactérias Gram positivas que estão na natureza (solo, água e partículas). Algumas espécies estão presentes na flora natural do intestino humano. Quando cultivadas em agar-sangue, produzem colônias branco-acinzentadas com margens irregulares.

Uma característica única dessas bactérias é a capacidade de produzir endosporo em condições de estresse. Muitas espécies são saprófitas inofensivas, no entanto duas espécies são consideradas significantes – *Bacillus anthracis* e *Bacillus cereus*.

Características de identificação:

- Aeróbia estrita ou anaerobia facultativa;
- Tamanho 0,3 – 2,2 μm x 1,2 – 7,0 μm ;
- Endosporo resistente ao calor, podendo ser central ou terminal;
- Maioria das linhagens são Gram positivas;
- Quase todas as espécies são móveis; e
- Quimiorganotróficas.

Seu metabolismo pode ser estritamente respiratório, fermentativo ou ambos. O oxigênio é o aceptor de elétrons no caso do metabolismo respiratório, em algumas espécies podem usar nitrato como uma alternativa de aceptor de elétrons. Existem 48 espécies do gênero *Bacillus* descrita, sendo que a maioria não são patogênicas (Bacillus, 2002; Corbin, 2002).

4.1.2. *Enterobacter*

Enterobacter, são bactérias Gram negativas, presentes em água, solo, plantas, esgoto e fezes animais; pertencem a família *Enterobacteriaceae* e são espécies bioquimicamente similares a *Klebsiella*.

Características de identificação:

- Gram negativas;
- Anaeróbia facultativa;
- Temperatura ótima de crescimento entre 30-37°C;
- Mobilidade via flagelo; e
- Quimiorganotróficas.

Possuem ambas vias metabólicas, respiratória e fermentativa. Glicose e outros carboidratos são catabolizados com produção de ácidos e gás. Este gênero também é conhecido por fixar nitrogênio no solo (Gardner, 2002).

5. METODOLOGIA

5.1. Identificação das Linhagens Bacterianas

Duas, entre as quatro linhagens selecionadas, *Bacillus* sp. e L28, não foram identificadas quanto espécie e gênero/espécie, respectivamente. Ambas, através do processo de coloração de Gram, são bastonetes esporulados Gram positivos. Por este motivo utilizou-se o Kit Api 50 CHB e CH no processo de identificação dessas linhagens.

5.1.1. Coloração de Gram

Neste processo, um esfregaço, da massa bacteriana, fixado recebeu o seguinte tratamento:

- A) Solução de cristal de violeta (ou violeta-de-genciana) – 1 minuto;
- B) Solução de lugol, atua como fixador do corante – 1 minuto;
- C) Solução de etanol – é o passo crítico da diferenciação, já que um grupo de bactérias sofre descoloração pelo álcool e outro, não;
- D) Solução de safranina (ou fucsina) – 30 segundos.

No final da coloração, as bactérias apresentam-se roxas ou vermelhas. As primeiras apresentam a cor roxa porque retiveram o complexo violeta-lugol e não se descoloriram pelo etanol. São as bactérias Gram-positivas. As segundas devem sua cor vermelha ao corante de fundo, a safranina, já que não conservam a coloração do complexo violeta-lugol. Constituem as bactérias Gram-negativas.

5.1.2. Kit Api 50 CHB – *Bacillus*

Para a utilização do Kit Api 50 CHB, seguiu-se as etapas descritas abaixo:

- A) As linhagens bacterianas, foram crescidas em meio NA, durante 18 horas;
- B) Foi transferido uma alçada da massa bacteriana para tubo de ensaio contendo 10 mL de uma solução de NaCl 0,85% - Solução S1;
- C) Em uma ampola contendo 5 mL de soro, suspendeu a solução S1 até atingir o ponto 2 da escala de McFarland (anotando o número de gotas utilizadas da solução S1, para atingir a escala 2);
- D) Em uma ampola Api 50 CHB, inoculou duas vezes o número de gotas da solução S1, homogeneizou a solução;
- E) Aplicou-se a solução em uma cartela Api 50 CH; incubar a 30 °C; e foram efetuadas leituras após 24 e 48 horas de crescimento.

5.1.3. Kit Api 50 CH – Carboidratos

Este Kit baseia-se nas diferentes vias de metabolização dos carboidratos:

- Assimilação – os microrganismos crescem utilizando o substrato como única fonte de carbono.
- Oxidação – a mudança de coloração ocorrida na cartela–teste, este permite observar a produção de ácido em aerobiose que são revelados por indicador de pH do meio.
- Fermentação – mudança de coloração devido a produção de ácidos em anaerobiose e revelados por indicador de pH do meio.

O meio Api 50 CHB permite realizar o estudo da fermentação de 49 açúcares da galeria Api 50 CH. As duas linhagens bacterianas foram diluídas em um meio de

suspensão e inoculadas em cada tubo da galeria (cada tubo contém um açúcar). Durante a incubação, o catabolismo dos glicídeos produz ácidos orgânicos que provocam a viragem do indicador de pH.

Em cada tubo se estuda a acidificação produzida que se traduz por uma viragem do indicador vermelho fenol para amarelo, presente no meio de cultivo (Api CH). Para o teste esculina (número 25), observa-se uma viragem do indicador vermelho para negro.

5.2. Microrganismos

As linhagens bacterianas, selecionadas no Capítulo II e mostradas na Tabela III.1., foram utilizadas nos experimentos descritos a seguir a fim de se estabelecer uma comparação entre a % degradação dos HAPs solubilizados em acetona com relação aos cristais de HAPs;

Tabela III.1. Linhagens bacterianas

Linhagens	Origem	Gram
<i>Bacillus badius</i>	Borra oleosa	Gram +
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Borra oleosa	Gram -
<i>B. sphaericus</i>	Borra oleosa	Gram +
<i>B. cereus</i>	Borra oleosa	Gram +

5.3. Meio de Crescimento Bacteriano

As linhagens bacterianas foram cultivadas em placas de Petri ou tubos de ensaio, contendo meio NA (agar nutriente – Merk), ou meio NB (caldo nutriente – Becton Dickinson) e HAP. Este foi utilizado para manter os genes responsáveis pela sua degradação. A incubação se deu em estufa (Eletrolab - DBO) a 30°C até atingir fase exponencial de crescimento (24 horas).

5.4. Degradação dos HAPs

5.4.1. Meio de Cultivo

As linhagens foram cultivadas em meio Bushenell-Hass - BH - (Tabela III.2.) adicionando-se os diferentes HAPs, solubilizados em acetona ou em cristais (concentração final 0,3% - m/v), como fonte de carbono. A incubação foi realizada na ausência de luz a 30°C, sem agitação.

Tabela III.2. Meio Bushenell-Haas (pH 7,0)

Quantidade (g/L)	Componentes
0,2	Sulfato de magnésio
0,002	Cloreto de cálcio
1,0	Fosfato de potássio monobásico
1,0	Fosfato de potássio dibásico
1,0	Nitrato de amônio
0,005	Cloreto férrico

5.4.2. Coleta do Sobrenadante

A princípio, o cultivo das linhagens foi realizado durante quinze dias, retirando amostras no sexto, nono, décimo segundo e décimo quinto dias de crescimentos. As amostras coletadas nestes dias foram analisadas quanto ao pH e a degradação dos HAPs, cuja análise foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência. Após essas análises foi possível estabelecer o melhor período pelo qual as bactérias utilizaram os HAPs como fonte de carbono e energia.

5.4.3. Análise da Degradação dos HAPs por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para que não houvesse a possibilidade dos HAPs adsorverem-se no pellet bacteriano ou possíveis impurezas no meio de cultivo, estes foram extraídos das amostras, conforme descrita no item 5.4.3.1.

5.4.3.1. Extração de HAPs

Para a extração foi necessário seguir as etapas descritas abaixo:

- A) As amostras foram acidificadas com ácido clorídrico 10 M a pH 2,0;
- B) Foi adicionado 10 mL de acetato de etila;
- C) Foi deixado em repouso durante 24 horas;
- D) Após 24 horas, foi descartado a fase aquosa, recolhendo o solvente;

- E) Foi adicionado, novamente, 10 mL de acetato de etila, a solução foi agitada e após a separação de fases (aquosa / solvente), foi descartada a fase aquosa, recolhendo o solvente. Esta operação foi repetida mais uma vez;
- F) As três frações extraídas, foram evaporadas em rotar vaporador (Eyla);
- G) Em seguida, o “pó” foi ressuspensionado com 10 mL de acetonitrila (o mesmo solvente utilizado na composição da fase móvel) e utilizado em análises de cromatografia líquida de alta eficiência.

5.4.3.2. Condições Cromatográficas

Após a extração, 20 μ L de amostra foi injetada no cromatógrafo. As condições cromatográficas foram as mesmas descritas no item 5.5.2 (Capítulo II).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Identificação das Linhagens Bacterianas

Os resultados obtidos através da leitura das galerias do Kit Api 50 CH, estão demonstrados na Tabela III.3 e constituem o perfil bioquímico da cepa, servindo para sua identificação ou tipagem.

Tabela III.3. Leitura do Kit Api 50 CHB – Identificação de Linhagens *Bacillus*.

Açúcares	Leitura (mudança de coloração)			
	<i>Bacillus</i> sp.		Linhagem L28	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0 – Controle				
1 – Glicerol	-	+	-	-
2 – Eritrol	-	-	-	-
3 – D – arabinose	-	-	-	-
4 – L – arabinose	-	-	-	-
5 – Ribose	+	+	-	-
6 – D – xilose	-	-	-	-
7 – L – xilose	-	-	-	-
8 – Adonito	-	-	-	-
9 – 8 Metil-D-xilosidase	-	-	-	-
10 – Galactose	-	-	-	-
11 – Glicose	+	+	-	-
12 – Frutose	+	+	-	-
13 – Manose	-	-	-	-
14 – Sorbose	-	-	-	-
15 – Ramnose	-	-	-	-
16 – Dulcitol	-	-	-	-
17 – Inositol	-	-	-	-
18 – Manitol	-	-	-	-

Tabela III.3. Continuação

19 – Sorbitol	-	-	-	-
20 - α -Metil-D-manosidase	-	-	-	-
21- α -Metil-D-glicosidase	-	-	-	-
22 – N Acetil glucosamida	+	+	-	-
23 – Amygdalin	-	-	-	-
24 – Arbutin	+	+	-	-
25 – Esculim	+	+	-	±
26 – Salicin	+	+	-	-
27 – Celobiose	±	±	-	-
28 – Maltose	+	+	-	-
29 – Lactose	-	-	-	-
30 – Melobiose	-	-	-	-
31 – Sacarose	+	+	-	-
32 – Trealose	+	+	-	-
33 – Inulim	-	-	-	-
34 – Melezitose	-	-	-	-
35 – Rafnose	-	-	-	-
36 – Amido	+	+	-	-
37 – Glicogen	+	+	-	-
38 – Xilitol	-	-	-	-
39 – Gentiobiose	-	-	-	-
40 – D Turanose	-	-	-	-
41 – D Lixose	-	-	-	-
42 – D Tagatose	-	-	-	-
43 – D Fucose	-	-	-	-
44 – L Fucose	-	-	-	-
45 – D Arabitol	-	-	-	-
46 – L Rabitol	-	-	-	-
47 – Cluconate	-	-	-	-
48 – 2 Ceto Gluconato	-	-	-	-
49 – 5 Ceto Gluconato	-	-	-	-

Consultando tabela de identificação que acompanha o Kit Api 50 CHB, a qual lista 24 espécies de *Bacillus* (Sneath *et al.*, 1986), pôde-se identificar as linhagens estudadas:

- *Bacillus* sp. => *Bacillus cereus*.
- Linhagem L28 => *Bacillus sphaericus*.

6.2. Estudo da Degradação dos HAPs

Todos os resultados descritos a seguir são médias aritméticas das amostras analisadas, nos diferentes experimentos, em triplicata e descontados dos controles.

6.2.1. HAPs solubilizados em acetona

As linhagens cultivadas em meio contendo HAPs (0,3% - v/v), foram analisadas quanto ao pH e porcentagem de degradação por CLAE, Figuras III.1. e III.2, respectivamente.

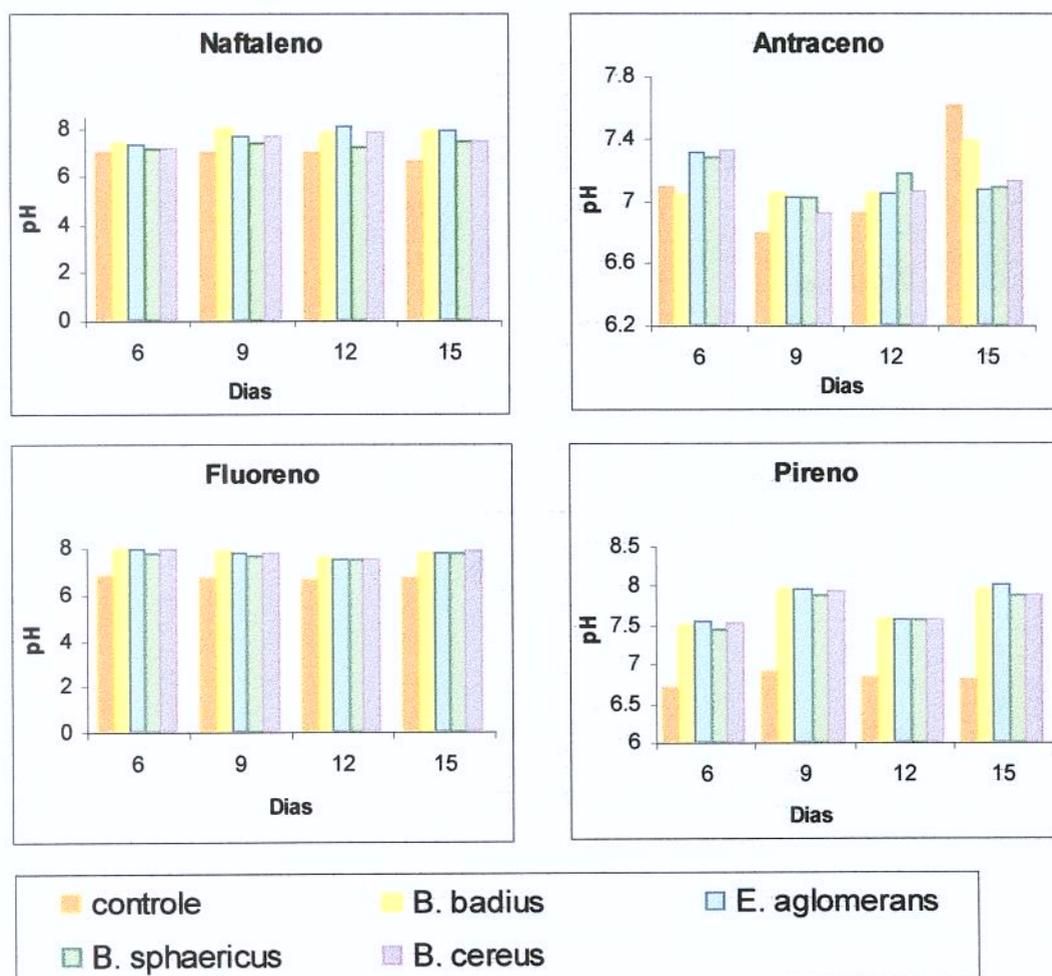


Figura III.1. pH de meio BH, contendo HAPs (solubilizado, concentração final 0,3% - v/v) como fonte de carbono, fermentado pelas linhagens bacterianas.

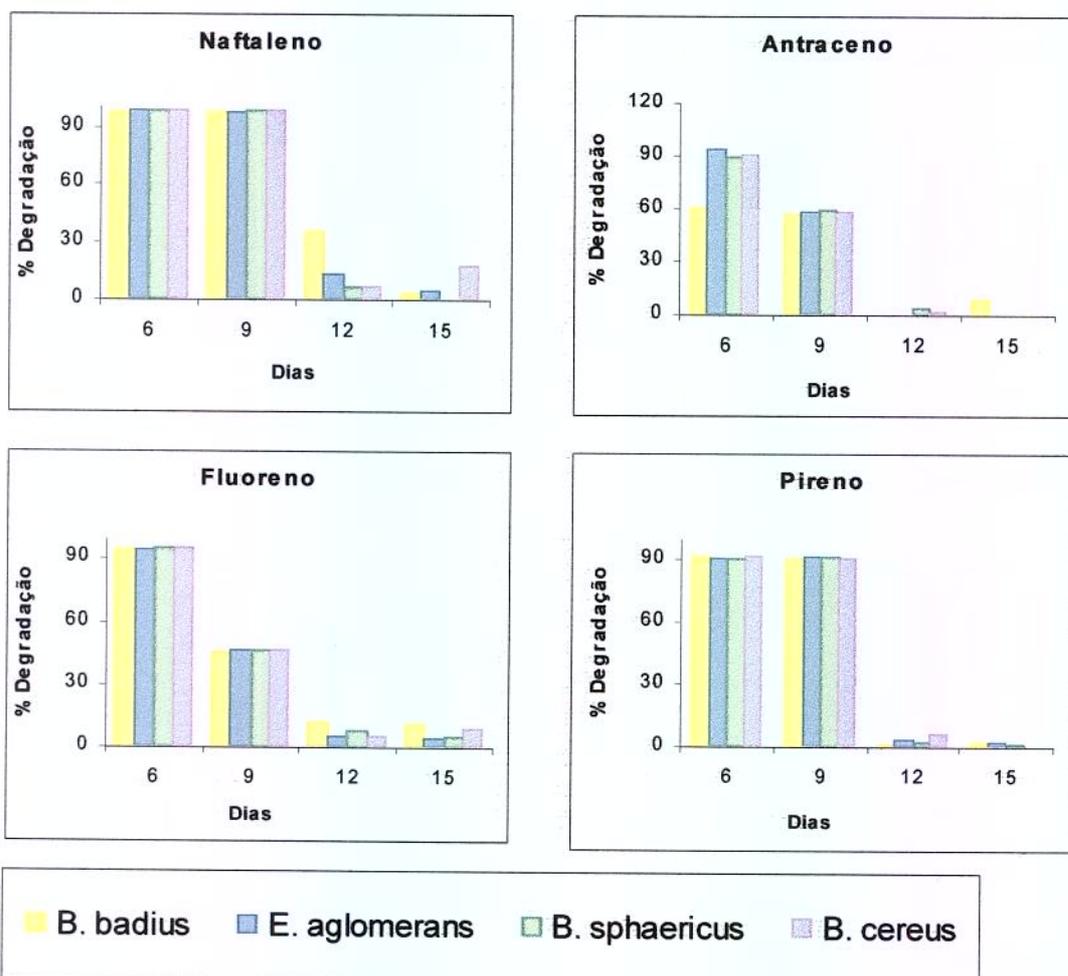


Figura III.2. Porcentagem de degradação dos HAPs, solubilizados em acetona, presentes em meio BH e fermentado por linhagens bacterianas.

Pôde-se observar nas Figuras III.1. e III.2., que para cada fonte de carbono obteve-se:

➤ Naftaleno

Todas as linhagens apresentaram um leve aumento de pH a partir do sexto dia de cultivo, quando comparadas com o controle. Com relação a porcentagem de degradação, observou-se que no sexto e nono dias de cultivo houve maior porcentagem de degradação, ou seja, cerca de 97% do composto foi degradado.

➤ Antraceno

Quando as linhagens foram cultivadas nesta fonte de carbono, pouco ou nenhum aumento no valor de pH ocorreu, quando comparado com o controle. Em relação a porcentagem de degradação do mesmo, o melhor dia observado foi o sexto, com degradação superior a 85%, excetuando *Bacillus badius* que apresentou 60% de degradação. No nono dia, mais de 50% do composto foi degradado. Para os demais dias, pouco ou nada foi degradado.

Apesar do sexto e nono dias de cultivo mostrarem serem os melhores na degradação do antraceno, o valor de pH manteve-se inalterado, o que sugere que o composto ou mesmo os produtos de degradação do mesmo não interferem no valor deste, uma vez que o meio continuou básico ou neutro.

➤ Fluoreno

Todas as linhagens apresentaram um aumento de pH quando cultivados em meio com este composto, sendo que no sexto dia registrou-se o maior valor de pH. Este dia também foi o que se destacou em relação a porcentagem de degradação – superior a 90%, para todas as linhagens. Sendo assim, os produtos formados através da degradação do fluoreno podem ter elevado o pH do meio.

➤ Pireno

Independente do dia em que coletou-se as amostras para detecção de pH, todas as linhagens apresentaram aumento de seu valor, quando comparadas com o controle. Cerca de 90% do composto foi degradado até sexto dia por todas as linhagens.

Essa diferença de pH pode ser atribuída aos produtos formados pela degradação do pireno.

Com base nos dados relatados acima, pôde-se estabelecer que os melhores dias de cultivo foram o sexto e nono. Talvez devido a rapidez de crescimento bacteriano, uma vez que mudando-se a fonte de carbono de HAP por glicose, por exemplo, as mesmas conseguem se reproduzir em menos de 24 horas.

Com relação ao pH, não foi possível estabelecer o aumento do mesmo com um dia em específico. A variação de valores detectados de um dia para o outro, pode estar relacionado com a atividade enzimática. O que ficou evidente é que a alteração se dá de básico para neutro, o que pode estar correlacionado com a ação de enzimas, as quais atuam na faixa de pH 7,0 – 8,0 (Hegman, 1966; Fujisawa & Hayaishi, 1968; Dorn & Knackmuss, 1978; Baggi *et al.*, 1987).

Comparando estes resultados com os obtidos no Capítulo II, têm-se a confirmação que o sexto dia é o melhor para medir a degradação dos compostos aromáticos.

De acordo com os resultados obtidos desta etapa, pôde concluir que: ocorreu um aumento de pH no meio BH quando as bactérias foram inoculadas; o sexto e nono dias de cultivo mostraram-se os melhores na detecção da degradação dos HAPs e comparando-se as linhagens entre si, pôde-se observar que todas conseguiram utilizar os HAPs como fonte de carbono com seis dias de crescimento, o que pode ser observado na Figura III. 3.

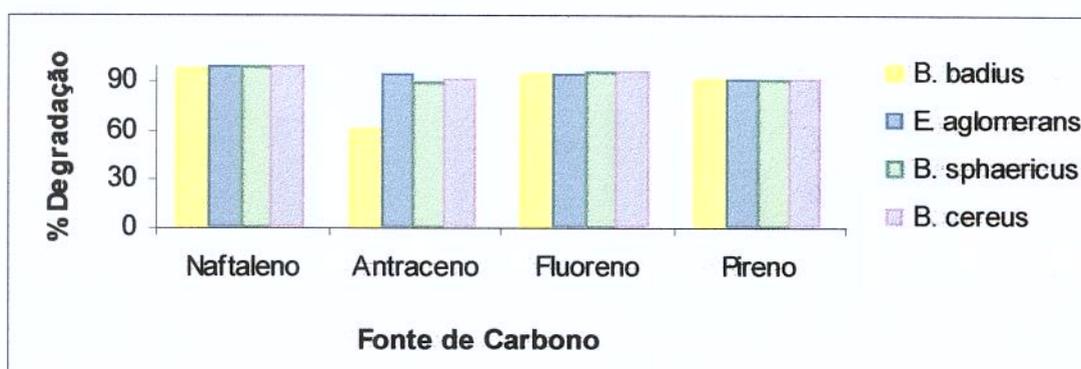


Figura III.3. Porcentagem de degradação de HAPs entre as linhagens após seis dias de cultivo.

6.2.2. HAPs em cristais

Nesta etapa também verificou-se a degradação dos HAPs quando as linhagens foram cultivadas em meio BH contendo cristais. Os resultados obtidos estão demonstrados no Figura III.4.

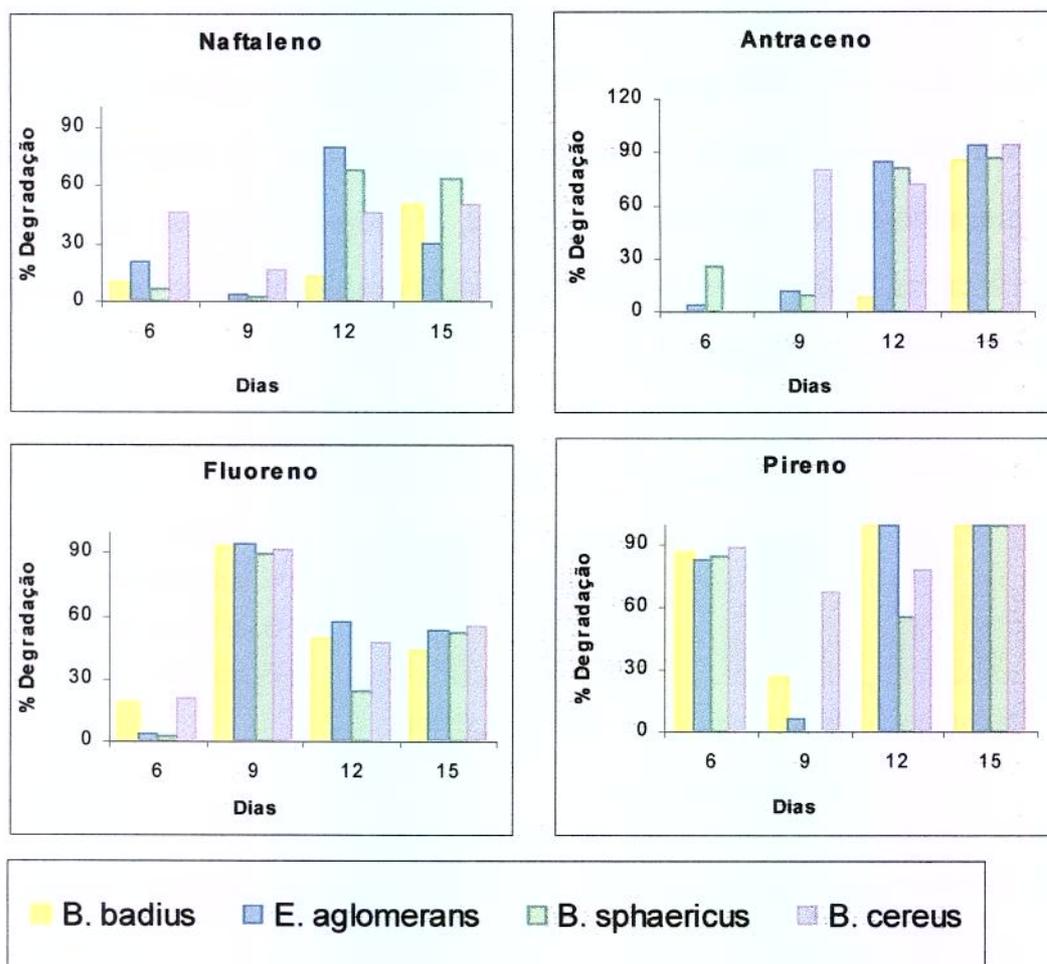


Figura III.4. Porcentagem de degradação dos HAPs pelas linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo cristais.

Analisando a Figura III.4, para cada fonte de carbono observou-se:

➤ Naftaleno

Todas as linhagens apresentaram maior taxa de degradação a partir do décimo segundo dia de crescimento, exceto *B. badius* que degradou 50% dos cristais de naftaleno até o décimo quinto dia. Comparando-se este experimento com a porcentagem de degradação dos HAPs solubilizados, observou-se os seguintes resultados, mostrados na Tabela III.4.

Tabela III.4. Porcentagem de degradação de linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo naftaleno solubilizado ou em cristal

Linhagens	% Degradação Naftaleno							
	6 dia		9 dia		12 dia		15 dia	
	S	C	S	C	S	C	S	C
<i>B. badius</i>	97	10	97	0	35	13	3	50
<i>E. aglomerans</i>	98	20	97	3	13	79	4	29
<i>B. sphaericus</i>	98	6	98	2	6	67	0,04	63
<i>B. cereus</i>	98	45	98	16	6	45	17	49

S = naftaleno solubilizado em acetona; C = cristais de naftaleno

Quando o composto foi solubilizado em acetona, este tornou-se mais acessível aos microrganismos estudados, sendo quase todo degradado (98 %), até o sexto dia de cultivo. Entretanto, quando as linhagens foram cultivadas em cristais de naftaleno, foi necessário mais tempo para que o composto fosse utilizado como fonte de carbono e energia, sendo necessário no mínimo doze dias para obter degradação superior a 40%.

A porcentagem de degradação em meio contendo cristais de naftaleno foi baixa para a maioria dos microrganismos avaliados no sexto e nono dias. A partir do nono dia de cultivo, a porcentagem de degradação aumentou.

➤ Antraceno

Assim como ocorrido com o naftaleno, as linhagens também necessitaram de mais tempo de cultivo para utilizar antraceno como fonte de carbono. Essa relação

tempo/degradação está diretamente associada com a forma como o composto é “oferecido” aos microrganismos, ou seja solubilizados ou em cristais (Tabela III.5).

Tabela III.5. Porcentagem de degradação das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo antraceno solubilizado ou em cristal

Linhagens	% Degradação Antraceno							
	6 dia		9 dia		12 dia		15 dia	
	S	C	S	C	S	C	S	C
<i>B.adius</i>	60	0	56	0	0	8	0	85
<i>E. aglomerans</i>	94	3	58	12	0	84	0	94
<i>B. sphaericus</i>	89	25	59	9	3	81	0	87
<i>B. cereus</i>	90	0	58	80	1	72	0	93

S = antraceno solubilizado em acetona; C = cristais de antraceno.

➤ Fluoreno

Como pode ser observado na Tabela III.6, as linhagens conseguiram utilizar fluoreno como fonte de carbono, até o nono dia de cultivo. Comparando as linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo solução de fluoreno ou em cristais, pode-se observar que assim como os demais compostos descritos, o fluoreno foi quase todo degradado até o sexto dia de cultivo quando solubilizado em acetona (+ 90%). No entanto, este valor só foi obtido no nono dia quando as linhagens foram cultivadas em cristais.

Tabela III.6. Porcentagem de degradação das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo fluoreno solubilizado ou em cristal

Linhagens	% Degradação Fluoreno							
	6 dia		9 dia		12 dia		15 dia	
	S	C	S	C	S	C	S	C
<i>B. badius</i>	94	18	45	93	12	49	11	43
<i>E. aglomerans</i>	94	3	46	94	5	57	4	53
<i>B. sphearicus</i>	95	2	46	89	8	24	5	52
<i>B. cereus</i>	95	20	46	91	5	47	9	55

S = fluoreno solubilizado em acetona; C = cristais de fluoreno

➤ Pireno

Na Tabela III.7, estão demonstradas as porcentagens de degradação do pireno pelas bactérias quando utilizado solubilizado ou em cristais.

Diferentemente dos outros compostos (naftaleno, antraceno e fluoreno); as linhagens conseguiram utilizar o pireno como fonte de carbono e energia até o sexto dia de cultivo ocorreu mais de 80% de degradação do composto. No décimo quinto dia obteve-se cerca de 99% de degradação para todos os microrganismos avaliados.

Tabela III.7. Porcentagem de degradação das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo pireno solubilizado ou em cristal

Linhagens	% Degradação Pireno							
	6 dia		9 dia		12 dia		15 dia	
	S	C	S	C	S	C	S	C
<i>B. badius</i>	91	86	90	26	1	99	2	99
<i>E. aglomerans</i>	90	83	91	6	3	99	2	99
<i>B. sphaericus</i>	90	84	91	0	2	55	0,7	99
<i>B. cereus</i>	91	88	90	67	6	78	0	99

S = pireno solubilizado em acetona; C = cristais de pireno

Com este experimento, observou-se que a solubilização do pireno não apresentou diferença de resultados em relação a sua degradação, visto que, os cristais de pireno também foram utilizados até o sexto dia de crescimento bacteriano, uma vez que esse composto foi a única fonte de carbono para as linhagens.

De acordo com os resultados obtidos nesta fase (crescimento das linhagens em cristais de HAPs), pôde-se concluir que as maiores porcentagens de degradação foram obtidas no décimo quinto dia para naftaleno (exceto *E. aglomerans*, com o décimo segundo dia de cultivo) e antraceno; no nono dia para fluoreno e no sexto para pireno. Comparando-se as linhagens bacterianas cultivadas em cristais de HAPs em relação aos mesmos solubilizados em acetona, constatou-se que foram necessários maior tempo de incubação para que o cristal fosse utilizado como fonte de carbono.

A utilização do HAP é altamente dependente da natureza química dos compostos (Lee *et al.* 1992) . As condições dadas as bactérias foram diferentes em relação a fonte de carbono. Primeiro os mesmos foram apresentados solúveis em acetona e posteriormente em forma de cristais; estes apresentam baixa solubilidade quando adicionados em meio líquido.

Segundo Sims & Overcash (1983), quanto maior o número de anéis benzênicos, menor sua solubilidade em água a 25 °C. Um exemplo disso está entre a solubilidade do naftaleno, com dois anéis aromáticos, de 32 mg/L e do pireno, com quatro anéis aromáticos e solubilidade de 0,16 mg/L.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste Capítulo; pôde-se concluir que:

- Utilizando o Kit Api 50 CHB e 50 CH, a linhagem L 28 foi identificada como *Bacillus sphaericus* e a Linhagem *Bacillus* sp., como *Bacillus cereus*;
- Ocorreu aumento de pH em alguns meios cultivados pelas linhagens e HAPs como fonte de carbono;
- Quando os HAPs foram solubilizados em acetona, as linhagens bacterianas os utilizaram como fonte de carbono em seis dias de cultivo; e
- Comparando as linhagens bacterianas cultivadas em cristais de HAPs em relação as cultivadas em HAPs solubilizados, foram necessários maiores tempos de incubação (15 dias), para que os cristais fossem utilizados como fonte de carbono pelas bactérias.

8. REFERÊNCIAS

- Alexander, M. How toxic are toxic chemicals in soil? **Sci. Technol.** 1995. v. 11, p. 2713 – 1717.
- Bacillus. **Citações e referências a documentos eletrônicos.** Disponível em: <<http://medic.med.uth.tmc.edu/path/00001437.htm>> Acesso em 28 jan. 2002.
- Baggi, G.; Barbieri, P.; Galli, E., Tollari, S. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades o-xylene. **Applied Environment Microbiology.** 1987. v. 53, p. 2129 – 2132.
- Betts, W. D. (Ed). **Biodegradation: Natural and Synthetic Materials.** Springer-Verlag, German. 1991.
- Chakrabarty, T., Subrahmanyam, P. V. R., Sundaresan, B. B. Biodegradation of recalcitrant industrial wastes. In Wise, D., **Biotreatment Systems.** 1988. v. 2. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 172 – 234.
- Colleran, E. Uses of bacteria in bioremediation. In: Sheehan, D. (Ed), **Methods in Biotechnology.** Vol. 2, Bioremediation Protocols. Humana Press, New Jersey. 1997. p. 322.
- Corbin, K. In **Bacillus – Soil Microbiol.** Disponível em: <http://www.bsi.vt.edu/biol_4684/Microbes/bacillus.html> Acesso em 28 jan. 2002.
- Dorn, E., Knackmuss, H-J. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. **Biochemistry Journal.** 1978. v. 174, p. 73 – 84.
- Dumenil, G.; Mattei, G.; Sergent, M.; Bertrand, J. C.; Laget, M., Phan-Tan-Luu. Application of a doehlert experimental-design to the optimization of microbial-degradation of crude-oil in sea-water by continuous culture **Applied Microbiology Biotechnology.** 1988. v. 27, p. 405 – 409.
- Ehrlich, H. L. **Geomicrobiology.** New York: Marcel Dekker. 1981. 392p.
- Field, J. A., Stams, A. J. M., Kato, M., Schraa, G. **Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in cocultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia.** *Antonie van Leeuwenhoek.* 1995. v. 67, p. 47-77.
- Fujisawa, H., Hayaishi, O. Protochatechuate 3,4 – Dioxygenase. **Journal of Biology Chemistry.** 1968. v. 243, p. 2673 – 2681.

- Garcia-J, O. Microorganismos e metais In: *Microbiologia Ambiental*. Melo, I. S., Azevedo, J. L. Eds. **Embrapa – CNPMA**. 1997. p. 11-42.
- Gardner, B. In: **Enterobacter – Soil Microbiology**. Disponível em:
<http://www.bsi.vt.edu/biol_4684/Microbes/Enterobacter.html> Acesso em 28 jan. 2002.
- Griffiths, M. **Biotechnology for a clean environment**. Mike Griffiths Associates, The Pantilles, Ivy Lane, Woking, Inglaterra. 1992. Pp. 19.
- Hegman, G. D. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**. 1966. v. 91, p. 1140 – 1154.
- Lee, L. S.; Rao, P. S. C., Okuda, I. Equilibrium partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal tar to water. **Environment Science Technology**. 1992 v. 26, p. 2110 – 2115.
- Manfio, G. P.; Lemos, M. F. Microorganismos e Aplicações industriais. In: **Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas**.
<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap_9/4/gilson.html> Acesso em: 23 abril 2002.
- Moorman, T. B. Adaptation of microorganisms in subsurface environmental: significance to pesticide degradation. In: RACKE, K. D.; COATS, J. R. ed. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environmental**. Washington: ACS. 1990. p. 167 – 180.
- Sims, R. C.; Overcash, M. R. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. **Residues Review** 1983. v. 88, p. 1 – 68.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, E., Holt, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins. 1986. v 2.
- Zobell, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Bacteriology Review**. 1946. v. 10, p. 1- 49.

*“Nada mais poderoso do que uma
idéia que chegou no tempo certo.”*

CAPÍTULO IV

DEGRADAÇÃO DE CRISTAIS

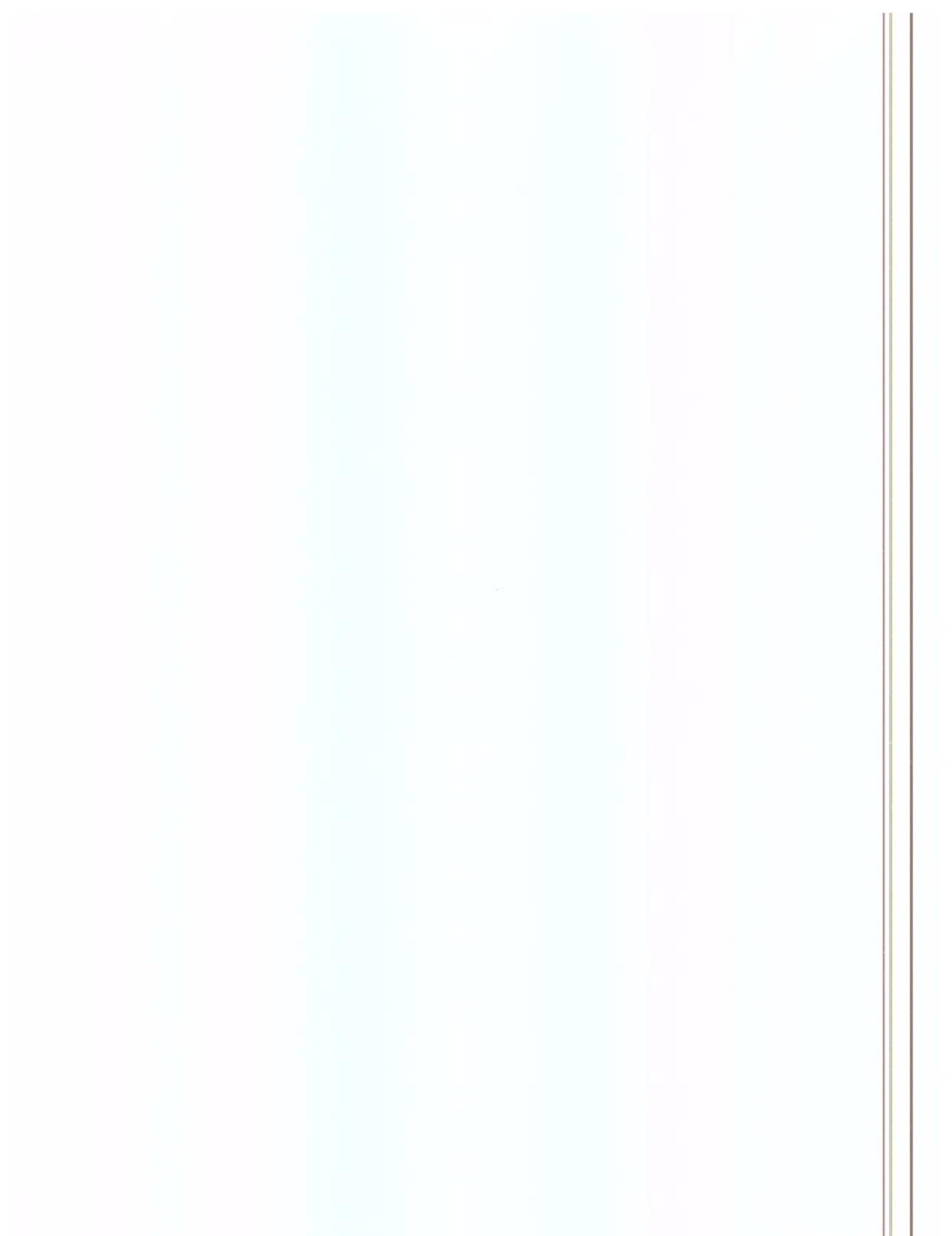
DE HAPs POR:

Bacillus badius

Enterobacter agglomerans

Bacillus sphaericus

Bacillus cereus



1. RESUMO

Quatro linhagens bacterianas (*Bacillus badius*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter agglomerans* e *Bacillus sphaericus*), foram estudadas quanto a produção enzimática, atividade de biosurfactante e capacidade de degradar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno), por cromatografia líquida de alta eficiência, quando foram utilizadas como fonte de carbono em culturas puras ou em consórcio de bactérias.

Através dos resultados pôde-se observar que as linhagens bacterianas utilizaram os cristais de HAPs como fonte de carbono e energia, no entanto, para cada HAP a maior porcentagem de degradação se deu em diferentes dias de cultivo. Quando as mesmas foram usadas em consórcio bacteriano foi possível obter maior degradação dos compostos em menor tempo de cultivo. Com a adição de surfactantes pôde-se observar aumento na degradação em menos tempo, embora o Triton X-100 tenha apresentado efeitos tóxicos para as bactérias. Além dos HAPs, as linhagens bacterianas também utilizaram os surfatantes (Tween 20 e 80) como fonte de carbono. Com as análises realizadas por cromatografia gasosa foi possível identificar a formação de catecol como subproduto no processo de degradação de antraceno, fluoreno e pireno.

1.1. ABSTRACT

Bacillus badius, *Bacillus cereus*, *Enterobacter agglomerans* and *Bacillus sphaericus* were cultivated as pure culture or in a consortium, in a medium containing crystals of naphthalene, anthracene, fluorene and pyrene for 9 days. The supernatants of the culture were collected and the degradation of the PAHs, the activity of some enzymes and also the production of biosurfactant activity was estimated.

For pure cultures the time of cultivation to produce the highest levels of degradation was dependent on the strain. When the consortia was used a decrease in the time of cultivation for highest degradation of the PAHs was observed, regardless of the PAH. The presence of surfactantes such as Tween 20, Tween 80 or Triton X-100, in the growth medium an increase in the degradation in a shorter incubation time when compared to growth in media without surfactants was observed. However, the bacteria used Tween 20 and Tween 80 preferentially to the PAHs.

Gas chromatography analysis of the supernatant's cultures showed that catechol was one of degradation product formed during growth of these four bacteria in PAHs.

2. INTRODUÇÃO

A cada ano novos compostos são produzidos pelo homem, levando à introdução de novos resíduos na natureza. Estes nem sempre podem ser aproveitados e/ou degradados na forma em que se encontram, desta maneira persistem no ambiente prejudicando a biota local e conseqüentemente o homem. Os compostos aromáticos policíclicos (HAPs), enquadram-se principalmente, nos resíduos resultantes da atividade antrópica, sendo encontrados no solo e na água, e normalmente são originados na indústria química e petroquímica (Tuhácková *et al.*, 2001; Conceição *et al.*, 2001).

Alguns microrganismos possuem capacidade de se adaptar a ambientes poluídos iniciando o processo de biodegradação de diversos componentes considerados tóxicos (Filonov *et al.* 2000, Li *et al.*, 2000; Romantchuck *et al.*, 2000; Balashova *et al.*, 1999).

3. OBJETIVOS

Este capítulo teve como objetivos estudar as linhagens bacterianas *Bacillus badius*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus cereus*, quando cultivadas em meio contendo cristais de HAPs, sob diferentes aspectos como:

- O sistema enzimático envolvido na degradação dos HAPs, como o estudo das dioxigenases;
- O efeito dos surfactantes no processo de degradação;
- As bactérias em consórcio, para verificar a relação dessa interação com a degradação dos HAP; e
- Comprovação da degradação dos HAPs por análises por cromatografia gasosa.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Muitas substâncias são produzidas e introduzidas nos ecossistemas terrestre e aquáticos, podendo atuar na disponibilidade de oxigênio dissolvido, desequilibrando a comunidade aeróbica ou agir diretamente pela toxicidade destes compostos. A toxicidade pode ser percebida como ocorrência de efeitos deletérios, que advêm do contato entre os seres vivos e uma substância química. Os efeitos da toxicidade podem ser distinguidos em efeitos agudos ou crônicos (Balan, 2001). Desde muito tempo os microrganismos são estudados com a finalidade de remover estas substâncias tóxicas do meio ambiente (Karegoudar & Kim, 2000; Bidaud & Minh-T, 1998; Rehmann *et al.*, 1997)

As enzimas microbianas são utilizadas na degradação dos poluentes (Mars *et al.*, 1999; Meyer *et al.*, 1999; Milo *et al.*, 1999). Muitas delas estão envolvidas neste mecanismo a milhões de anos, protegendo as células das substâncias que lhes seriam tóxicas e/ou permitindo a utilização de carbono como fonte de energia. A destoxificação pode resultar na completa mineralização do poluente ou em decomposição parcial associada com a perda da atividade biológica. Várias enzimas não são completamente específicas aos substratos, e agem sobre compostos recém sintetizados e liberados pelas atividades humanas na biosfera (Balan, 2001).

4.1. Mecanismo de Degradação dos HAPs pelas Bactérias

Tipicamente, a degradação dos HAPs por bactérias envolve a ação de uma dioxigenase que gera a formação de um diol, com conseqüente clivagem e formação de um diácido como *cis-cis*-ácido mucônico (Edward, 1993; Robert, 1992).

As dioxigenases, envolvidas na hidroxilação do anel aromático, requerem cofatores NADH ou NADPH, os quais recebem os elétrons provenientes de uma flavoproteína ferro-enxofre e os transferem para uma ferredoxina 2Fe.S (Haigler & Gibson, 1990). Esta por sua vez, reduz uma proteína ferro-enxofre terminal (Ensley & Gibson, 1983), que irá catalisar a oxidação do composto aromático (Figura IV.1.).

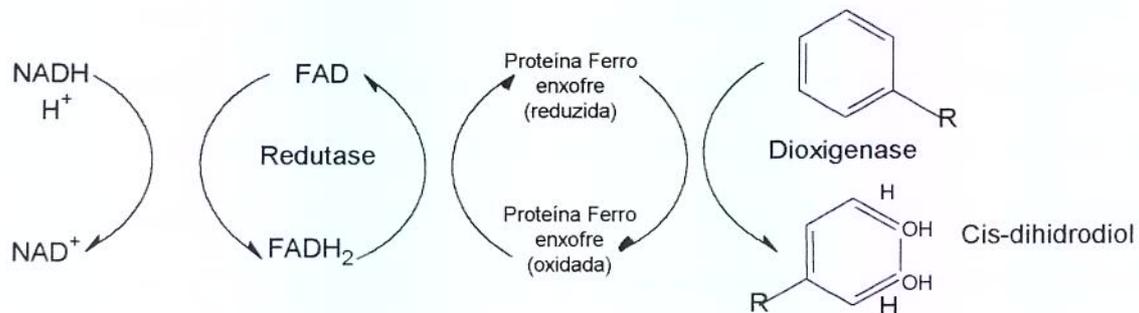


Figura IV.1. Mecanismo de oxidação dos compostos aromáticos pelos componentes enzimáticos da dioxigenase.

Neste primeiro estágio do metabolismo, os compostos aromáticos formam um intermediário, denominado *cis*-dihidrodiol. No segundo estágio do metabolismo de HAPs por bactérias, têm-se a rearomatização do *cis*-dihidrodiol por uma desidrogenase, para formar um derivado dihidroxilado (Patel & Gibson, 1974). Embora os passos iniciais da conversão sejam semelhantes para muitos HAPs, o número de intermediários formados após a rearomatização do anel benzênico é limitado (Reineke & Knackmuss, 1988; Chaudhry & Chapalamadugu, 1991). Esses intermediários hidroxilados (catecol, protocatecol ou ácido gentísico), servem de substratos para outros tipos de dioxigenases, que promoverão a abertura do anel benzênico. Tais dioxigenases não requerem cofatores e podem clivar compostos, através de duas vias metabólicas principais, *meta* ou *orto*.

A rota da biodegradação do naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno estão demonstradas nas Figuras IV.2. a IV.5., respectivamente.

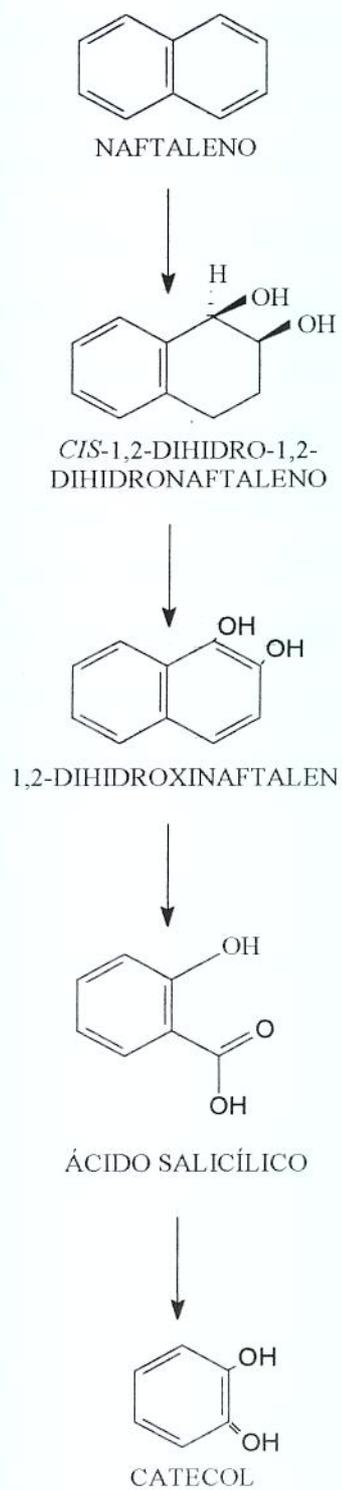


Figura IV.2. Biodegradação aeróbica do naftaleno (Wilson & Bouwer, 1997).

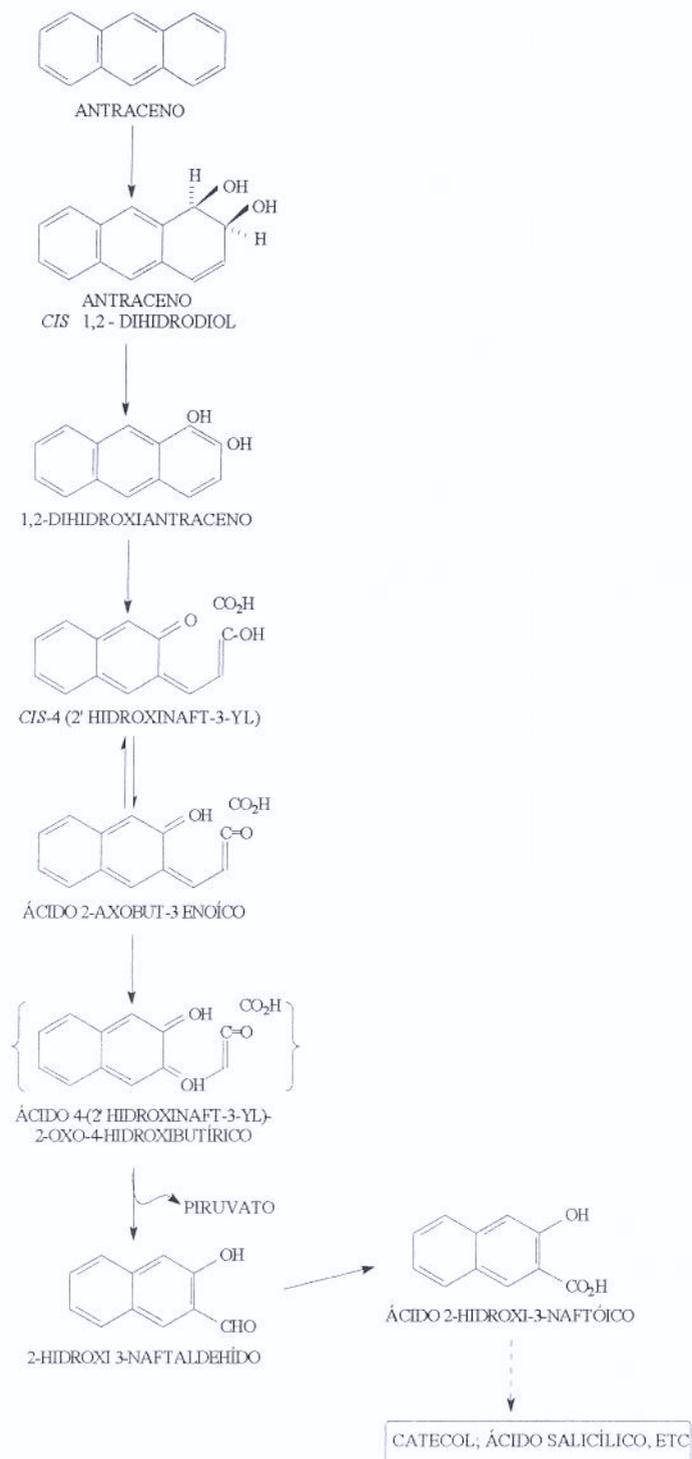


Figura IV.3. Biodegradação aeróbica do antraceno (Smith, 1990).

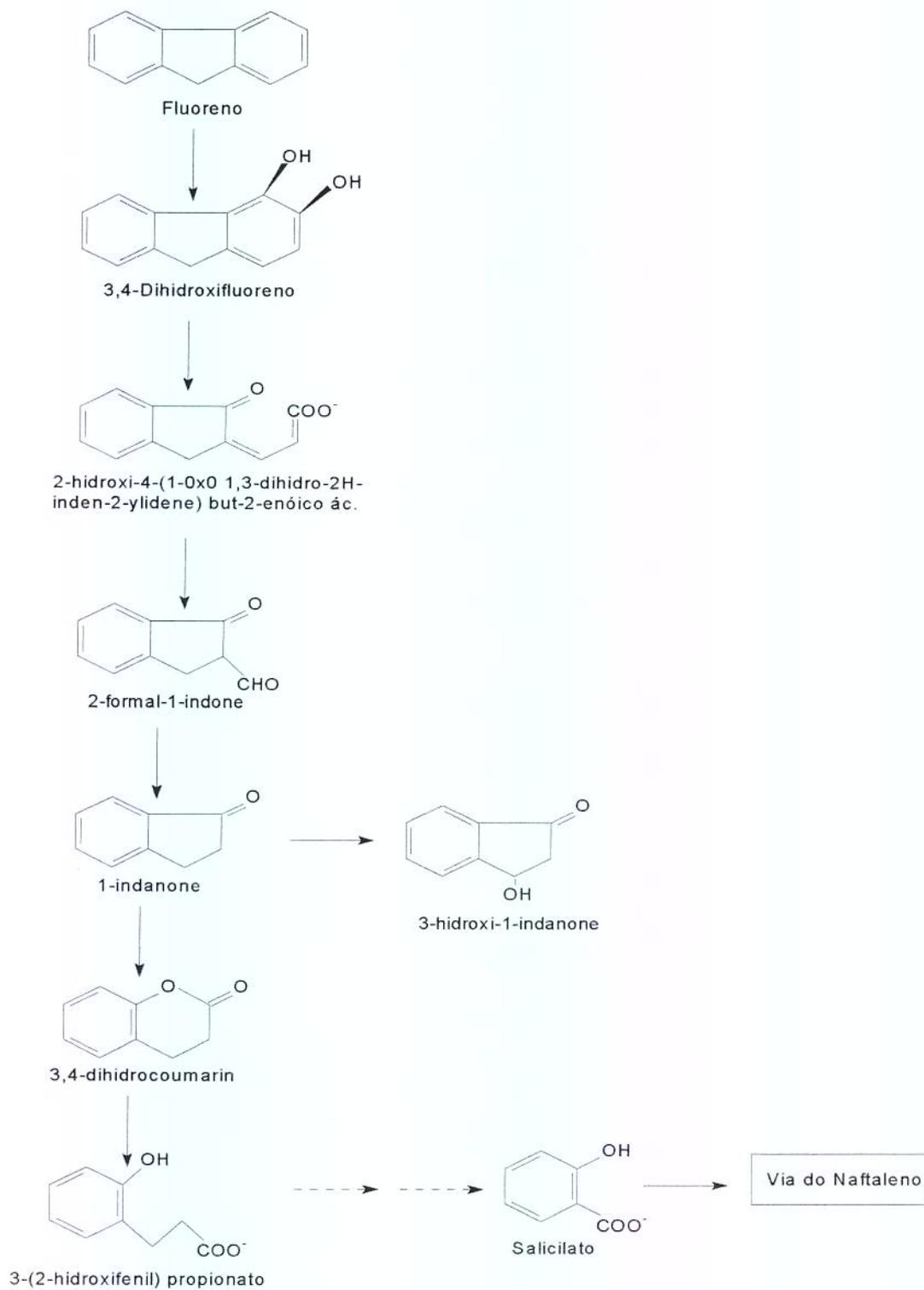


Figura IV.4. Biodegradação aeróbica do fluoreno (Solanas & Feng, 1999)

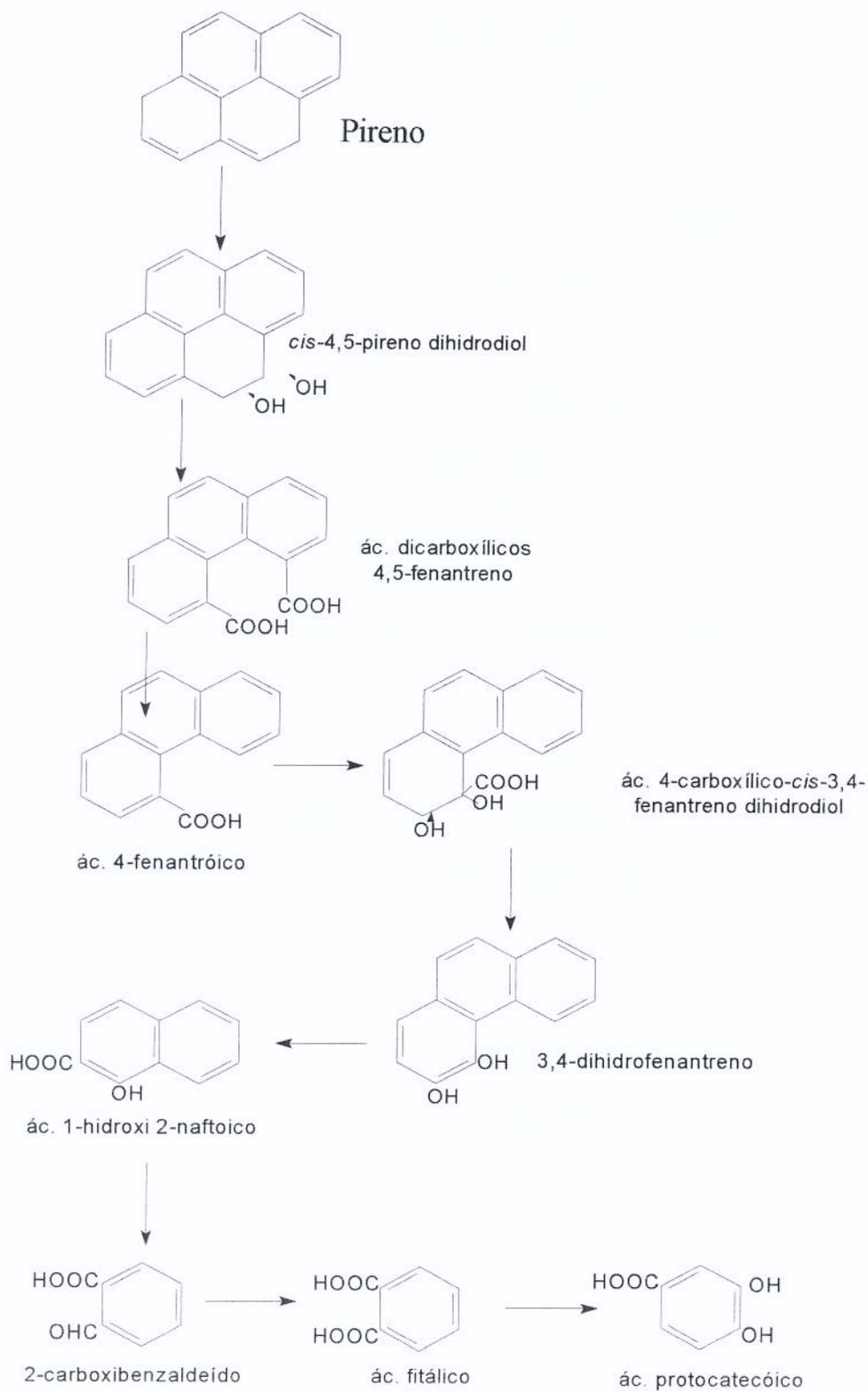


Figura IV.5. Biodegradação aeróbica do pireno (Rehmann *et al.* 1997).

Existem várias vias responsáveis pela quebra de compostos aromáticos, muitas delas apresentam o catecol como intermediário central. Uma vez formado, o próximo passo é a fissão do anel do catecol, que pode ocorrer por dois mecanismos distintos, clivagem *meta* ou *orto*.

Na via *meta*, a quebra da ligação ocorre entre o átomo do carbono adjacente ao grupo hidroxila do catecol, formando o 2-hidroxi-mucônico semialdeído como intermediário da via metabólica e, posteriormente, piruvato e acetaldeído. A dioxigenase responsável por essa catálise, também chamada de extradiol, é a catecol 2,3-dioxigenase (Dagley, 1975).

A via *orto* envolve a quebra de ligação entre átomos de carbono ligados aos dois grupos hidroxila do catecol para dar lugar a formação do ácido *cis-cis* mucônico e daí succinato e acetil-coenzima A (Chapman, 1979). A abertura do anel aromático, acrescido dos passos metabólicos seguintes da clivagem intradiol é denominada via metabólica *orto* ou do β -cetoadipato. A catecol 1,2-dioxigenase é a enzima que quebra a ligação entre os átomos de carbono. Se o dihidrodiol formado é o protocatecol, a enzima atuante sobre esse metabólito será a protocatecol 3,4-dioxigenase (Figura IV.6.).

Todas essas vias levam a intermediários da rota metabólica central da célula, o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Figura IV.7.).

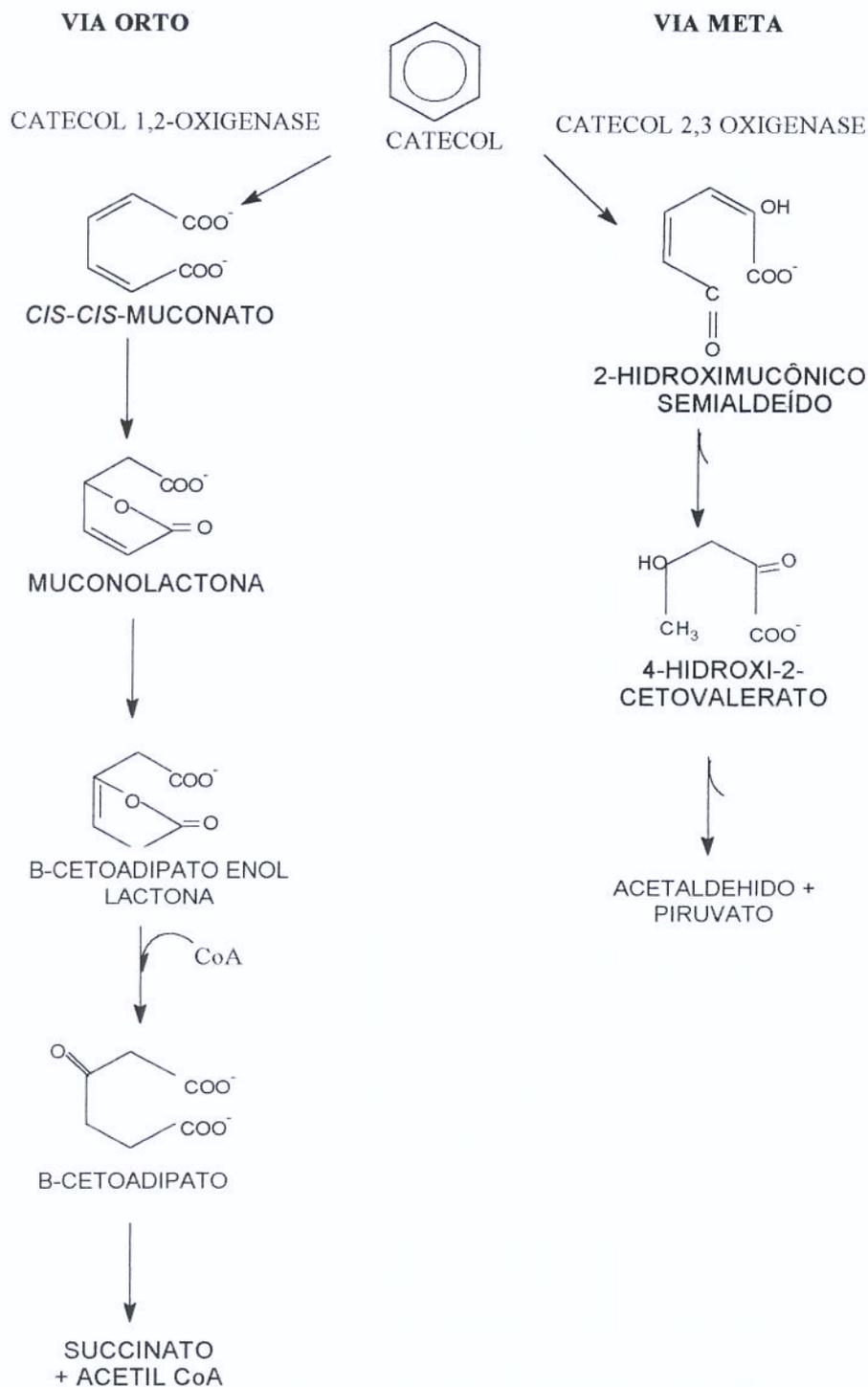


Figura IV.6. Via de degradação do catecol – clivagem *orto* e *meta* (Burlage *et al.*, 1989)

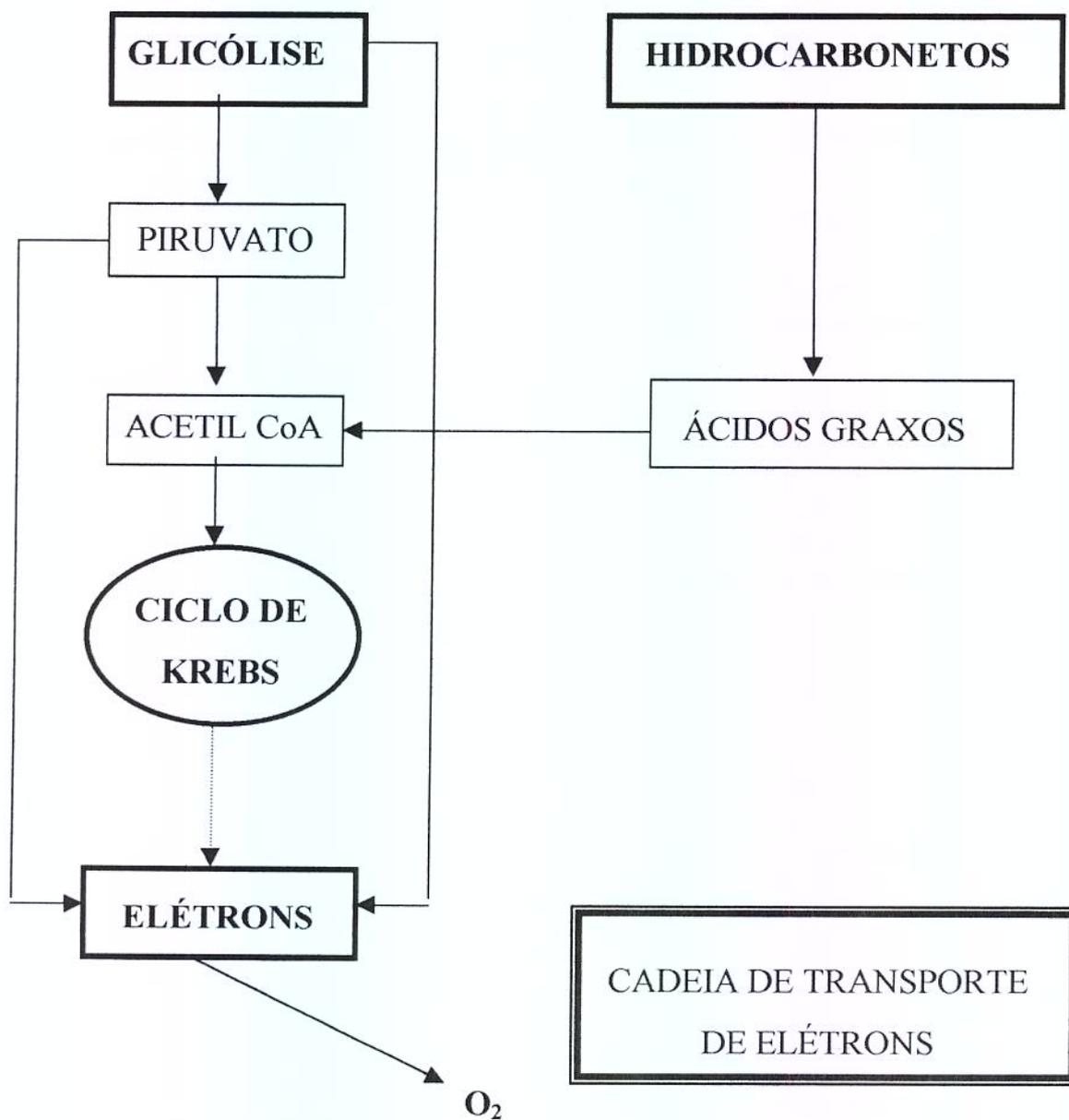


Figura IV.7. Esquema geral da degradação de hidrocarbonetos, mostrando a convergência para produtos comuns como a degradação de carboidratos (Barbosa & Torres, 1998).

4.2. Enzimas

4.2.1. Catecol 2,3-dioxigenase (EC 1.13.11.2; catechol:oxygen 2,3-oxidoreductase)

Catecol 2,3-dioxigenase faz parte das enzimas de clivagem extradiol (Figura IV.8.). Consiste de quatro subunidades idênticas de 32 KDa e contém um íon ferro [Fe(II)] catalítico por subunidade. O produto de reação é um semialdeído 2-hidroxi-3-oxopropionato, o qual possui coloração amarela (Hahn *et al.* 1991).

A reação enzimática procede por um mecanismo bi-uni ordenado: primeiro ocorre a ligação do catecol à enzima, seguindo o dioxigênio para formar um complexo ternário, então, o anel aromático é clivado para produzir o semialdeído hidroximucônico.



Figura IV.8. Clivagem extradiol – via meta

4.2.2. Protocatecol 3,4-dioxigenase (EC 1.13.11.3; protocatechuate-oxygen 3,4-oxidoreductase)

Protocatecol 3,4-dioxigenase pertence as enzimas que realizam clivagem intradiol (Figura IV.9.). Contêm Fe (III) como grupo prostético e números iguais de subunidades α e β que formam diferentes estruturas quaternárias de $(\alpha\beta)_n$, onde n varia de 3 a 12 (Harayama *et al*, 1992).



Figura IV.9. Clivagem intradiol – via orto

4.2.3. Catecol 1,2-dioxigenase (EC 1.13.11.1; pyrocatechase)

Catecol 1,2-dioxigenase contém Fe (III) como grupo prostético e pertence as enzimas que fazem clivagem intradiol (Figura IV.9.). Muitas espécies bacterianas apresentam subunidades α e β não idênticas $(\alpha\beta\text{-Fe}^{3+})_n$ já outras, possuem polipeptídeo simples $(\alpha\alpha\text{-Fe}^{3+})_n$. Possui pouca ou nenhuma atividade aos clorocatecóis.

4.3. Surfactantes

O principal problema da degradação dos HAPs pelos microrganismos está na sua insolubilidade em água. Para solucionar este problema, muitos pesquisadores têm estudado a ação dos surfactantes. Estes desempenham papel importante para a remediação *in situ* e também como medida auxiliar para estimular a biodegradação dos hidrocarbonetos (Rosato, 1997; Iqbal, 1995).

Diversos microrganismos são produtores de agentes surfactantes (Iqbal *et al.*, 1995) e alguns têm sido utilizados para limpeza de tanques reservatórios de petróleo (Gutnick & Rosenberg, 1977). O papel de surfactantes pode ser observado em mutantes de *Pseudomonas*. *P. aeruginosa* irradiado por raios gama apresentou aumento de 3-4 vezes na produção de surfactante com aumento concomitante na degradação de heptadecano (Iqbal *et al.*, 1995).

A eficiência dos biosurfactantes levou à análise de surfactantes químicos mais baratos, como por exemplo Triton X e Tween (Bury & Miller, 1993).

4.3.1. Tween 20

Tween 20, também denominado de poli(oxietileno)-sorbitol-monolaurato (Figura IV.10.), é um detergente não iônico, com massa molar de $1227,72 \text{ g mol}^{-1}$, estabilidade entre 2 a 8 °C; absorvância (254nm) de 0,025 e concentração micelial crítica aproximadamente $0,06 \times 10^3 \text{ M}$; é utilizado para solubilizar membranas protéicas durante o isolamento de complexos membrana-proteína (Sullivan, 2001).

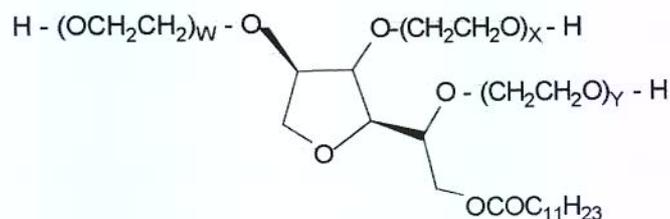


Figura IV.10. Estrutura química do Tween 20

4.3.2. Tween 80

Tween 80, também denominado de poli(etileno)-sorbitol-éster (Figura IV.11.), é um detergente não iônico que apresenta massa molar de 1310 g mol^{-1} , estabilidade entre 2 a 8°C ; concentração micelial crítica de 13-15 $\text{mg/L}^{4,5}$. Tem sido amplamente utilizado em aplicações bioquímicas incluindo, solubilização de proteínas, isolamento de núcleos a partir de culturas celulares e emulsificações e dispersão de substâncias em produtos alimentares e medicinais (Sigma, 2001).

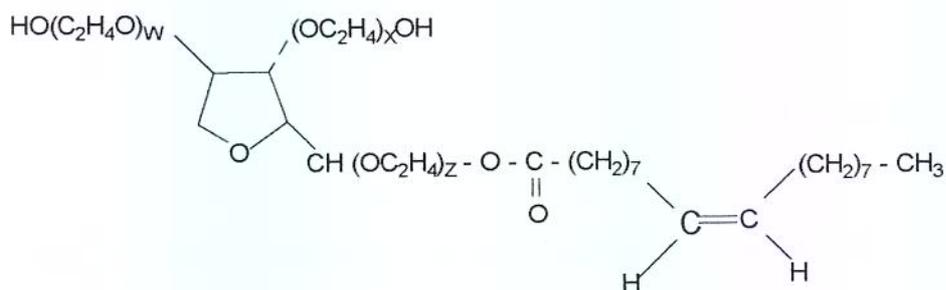


Figura IV.11. Estrutura química do Tween 80.

4.3.3. Triton X-100

Triton X-100, também conhecido como octilfenol (etilenoglicoeter)_x, (Figura IV.12.), é um detergente não iônico, com massa molar de 647 g mol⁻¹, estabilidade entre 2 a 8°C e concentração micelial critica de 0,2 x 10⁻³ M (Roche).

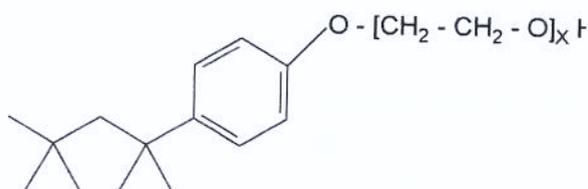


Figura IV.12. Estrutura química do Triton X-100

4.4. Consórcio Bacteriano

Os HAPs se encontram em ecossistemas aquáticos e terrestres misturados com culturas de microrganismos. Alguns destes são mineralizados por um único microrganismo, no entanto, um consórcio pode ser mais efetivo neste processo. O consórcio pode ser construído com base nas relações de comensalismo e sinergismo. No caso de comensalismo, alguns microrganismos se beneficiam sem que outros sejam afetados. A interação comensalística mais vista é a produção e liberação de substâncias ao meio. Estas substâncias podem ser utilizadas por outros microrganismos que estão crescendo no mesmo substrato. Associações sinérgicas são capazes de uma biodegradação mais efetiva, uma vez que todos os microrganismos se beneficiam no processo (Mueller *et al.*, 1990; Walter, 1991; Wiesel *et al.*, 1993; Ginkel, 1996).

5. METODOLOGIA

5.1. Microrganismos

As linhagens bacterianas (*Bacillus badius*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus cereus*) foram utilizadas nos experimentos descritos a seguir a fim de se entender a relação entre o metabolismo das mesmas, com a degradação do hidrocarbonetos aromáticos, estando divididos em etapas.

5.2. Meio de Crescimento Bacteriano

As linhagens bacterianas foram cultivadas em placas de Petri ou tubos de ensaio, contendo meio NA (agar nutriente – Merk), ou meio NB (caldo nutriente – Becton Dickinson) e HAP. Este foi utilizado para manter os genes responsáveis pela sua degradação. A incubação se deu em estufa (Eletrolab) a 30°C até atingir fase exponencial de crescimento (24 horas).

Etapa I: Estudo das Atividades Enzimáticas

5.1.1 Meio de Cultivo

As linhagens bacterianas foram cultivadas e mantidas em meio NB e após atingirem densidade óptica (DO_{590nm}) igual a 1,0, 500 µL foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio BH e cristais de hidrocarbonetos aromáticos (naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno), numa concentração final de 0,3% (m/v).

O meio contendo os cristais foi autoclavado à 121 °C, durante 15 min. Após esterilização, a cultura bacteriana, foi inoculada e incubada a 30 °C, no escuro e sem agitação durante quinze dias. As amostras foram coletadas no sexto, nono, décimo segundo e décimo quinto dias de crescimento. Uma vez que as enzimas analisadas, neste trabalho, são intracelulares, foi necessário realizar extração celular para liberá-las.

5.1.2. Extração

Para extração seguiu-se o método de Balajee & Mahadevean (1991), descrito abaixo.

- A) Os caldos das amostras foram centrifugados a 1000 g, durante 15 minutos;
- B) O sobrenadante foi descartado e o extrato lavado duas vezes, com tampão fosfato 0,025 M, pH 7,0, a 15000 g durante 10 min.;
- C) Posteriormente a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o extrato celular ressuspenso no mesmo tampão e homogeneizado com bastão de vidro (macerando o extrato com o tampão);
- D) Em seguida, o mesmo foi sonicado em Sonifer 250 Branson, durante 5 minutos;
- E) Após, a amostra foi centrifugada a 17000 g durante 60 min. a 5°C;
- F) O sobrenadante resultante foi utilizado em análises enzimáticas.

5.1.3. Catecol 2,3-dioxigenase

A atividade de catecol 2,3-dioxigenase foi determinada de acordo com o método de Baggi *et al.* (1987) modificado. Consiste na leitura a 375 nm do produto formado a partir da fissão do anel aromático do catecol. A mistura de reação continha:

Quantidade (mL)	Composto
1,0	0,3 mM Catecol
1,0	50 mM Tampão fosfato (pH 7,0)
1,0	Extrato celular

A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1 mmol do substrato por minuto.

5.1.4. Protocatecol 3,4-dioxigenase

A atividade de protocatecol foi determinada de acordo com o método de Fujisawa & Hayaishi (1968) modificado, sendo determinado espectrofotometricamente a 290 nm. A mistura de reação continha:

Quantidade (mL)	Composto
1,0	0,12 mM Ácido protocatecólico
1,0	15 mM Tampão tris-acetato (pH 7,5)
1,0	Extrato celular

A atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1 mmol do substrato por minuto.

5.1.5. Catecol 1,2-dioxigenase I

A atividade de catecol 1,2-dioxigenase I foi determinada de acordo com o método de Hegman (1966) modificado. A atividade enzimática foi determinada a 260 nm. A mistura de reação continha:

Quantidade (mL)	Composto
1,0	0,3 mM Catecol
0,8	50 mM Tampão fosfato (pH 7,5)
0,2	0,4 mM EDTA
1,0	Extrato celular

Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade requerida para transformar 1 mmol do substrato em produto, por minuto. A conversão de 1 mmol do substrato corresponde a aumento de 5,63 unidades de absorvância, sob estas condições.

5.1.6. Catecol 1,2-dioxigenase II

A atividade de catecol 1,2-dioxigenase I foi determinada de acordo com o método de Dorn & Knackmuss (1978) modificado. A atividade enzimática foi determinada a 260 nm. A mistura de reação continha:

Quantidade (mL)	Composto
1,0	0,1 mM Catecol
0,8	10 mM Tampão tris-HCl (pH 8,0)
0,2	0,1 mM 2-Mercaptoetanol
1,0	Extrato celular

Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade requerida para transformar 1 mmol do substrato em produto, por minuto. A conversão de 1 mmol do substrato corresponde a aumento de 5,63 unidades de absorvância, sob estas condições.

5.1.7. Determinação Protéica

A proteína presente na amostra foi determinada através do Kit “Protein Assay – Bio Rad”, baseado no método de Bradford.

As amostras cultivadas em meio BH durante 15 dias, foram centrifugadas a 15000 g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o extrato foi utilizado na determinação protéica. A esse extrato adicionou-se 1,5 mL de hidróxido de sódio 10 M; misturou-se vigorosamente o extrato com bastonete de vidro; em seguida a solução foi centrifugada à 10000 g durante 15 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi utilizado na seguinte mistura de reação:

- 800 µL de sobrenadante;
- 200 µL do reagente concentrado;
- A solução foi agitada e incubada por 5 min. até 1 hora em temperatura ambiente;
- Em seguida, efetuada a leitura em espectrofotômetro a 595 nm.

Através da equação obtida por uma curva padrão, foi possível determinar a quantidade de proteína presente na amostra, sendo expressa em mg/mL.

Etapa II: Estudo das Atividades de Biosurfactantes

5.II.1. Determinação da Produção de Biosurfactantes

As linhagens bacterianas foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio BH e cristais de HAPs (naftaleno, antraceno, fluoreno ou pireno), numa concentração final de 0,3 % (m/v), como fonte de carbono, durante nove dias de cultivo a 30°C, no escuro e sem agitação. As amostras foram coletadas no sexto e nono dias de crescimento; centrifugadas a 15000 g durante 15 min. e o sobrenadante, resultante, analisado quanto a:

- Produção de biosurfactantes através da tensão superficial, efetuado por um tensiômetro – Digital Tensiometer K10ST – Kruss; e
- Atividades de emulsificação óleo em água determinada a 610 nm (Johnson *et al.*, 1992) e água em óleo, medindo a altura do halo formado após 24 horas e expresso em centímetros (Cooper & Goldenberg, 1987).

5.II.2. Efeito dos Surfactantes na Degradação dos HAPs

As linhagens bacterianas foram cultivadas em meio NB a 30°C, sem agitação. Após 24 horas de incubação, 500 µL dessa cultura foi transferida para frascos de Elenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio BH e cristais de HAPs, numa concentração final de 0,3% (m/v), como fonte de carbono e 10 µL/mL de surfactantes (Tween 20, Tween 80 ou Triton X-100). Os frascos foram incubados a 30°C, no escuro, durante nove dias e sem agitação.

As amostras coletadas no sexto e nono dias foram centrifugadas durante 10 min. a 15000 g e o sobrenadante resultante, analisado quanto a atividade de emulsificação (óleo/água e água/óleo) e degradação dos HAPs por CLAE.

Etapa III: Estudo da Degradação dos HAPs por Consórcio das Linhagens Bacterianas

Não somente culturas puras, mas também uma mistura delas, apresentam capacidade de degradar grande número de compostos orgânicos, como os HAPs (Wiesel *et al.* 1993; Walter, 1991; Mueller *et al.* 1990).

Como nas etapas anteriores, as linhagens bacterianas estudadas separadamente – *Bacillus badius*, *Enterobacter agglomerans*, *B. cereus*. e *B. esphaericus* mostraram-se capazes de utilizar cristais de HAPs (naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno), como fonte de carbono e energia num período de quinze dias, esta etapa teve como objetivo estudar a capacidade das mesmas linhagens em degradar os cristais de HAPs, porém, em consórcio e com menor tempo de cultivo (nove dias)

5.III.1. Cultivo

As linhagens bacterianas, em consórcio (Tabela IV.1.) foram cultivadas em frascos de Erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio BH e os diferentes HAPs, numa concentração final de 0,3% (m/v). Após nove dias de incubação a 30°C, e sem agitação, as amostras, coletadas no sexto e nono dias, foram centrifugadas e tratadas como descrito no item 5.I.2. Os sobrenadantes resultantes

da extração foram analisados quanto a atividades enzimáticas, proteínas e porcentagens de degradação de HAPs.

Tabela IV.1. Consórcio das linhagens bacterianas

Consórcios	Linhagens Bacterianas			
	<i>B.adius</i>	<i>E. aglomerans</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. sphaericus</i>
01	+	+	+	+
02	-	+	+	+
03	+	-	+	+
04	+	+	-	+
05	+	+	+	-

Onde, + bactérias inoculadas no meio HB; - bactérias não inoculadas

Etapa IV.: Determinação da Degradação de HAPs por Cromatografia Gasosa (CG)

5.IV.1. Meio de Cultivo

As linhagens bacterianas foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio BH e cristais de HAPs, numa concentração final de 0,3%. Após nove dias de incubação a 30°C, no escuro e sem agitação, as amostras foram tratadas e analisadas por cromatógrafo gasoso.

5.IV.2. Extração

A extração foi realizada de acordo com o método de Shimura *et al.* (1999), estando descritos a seguir as etapas realizadas neste processo.

- A) Colocou-se os tubos em banho de gelo por 10 min.;
- B) Adicionou-se 50 μ L de HCl concentrado na suspensão;
- C) Adicionou-se 10 mL de acetato de etila;
- D) Misturou-se a suspensão vigorosamente com um agitador Vortex durante 10 min.;
- E) Centrifugou-se 5000 g por 10 min; e
- F) Transferiu-se 1,0 mL da fase de acetato de etila para tubo de Ependorff.

5.IV.2. Condições Cromatográficas

Um microlitro do volume extraído foi injetado em cromatógrafo gasoso (CG – 14 A, Shimadzu, Japan), conectado ao integrador CR6A. A unidade é equipada com injetor Split / Splitless e detector de ionização em chama (FID).

Foi utilizado coluna Supelcowax – 10 (Supelco), 30 m x 0,53 mm d.i e 1 μ m de espessura de filme, detector a 280 °C, injetor a 250 °C, razão de split 25:1 e hélio como gás de arraste num fluxo de 1 mL/min. A coluna foi mantida a 100 °C por 2 minutos, depois a 280 °C por 5 minutos, através de rampa de temperatura a 5 °C por minuto até 280 °C.

Os compostos foram identificados através do tempo de retenção, comparando-os com substâncias padrões de HAPs e catecol e protocatecol, determinado a porcentagem de degradação através da área (Mlynaz-T, *et al.*, 1995 – modificado).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nas diferentes etapas são resultantes da média aritmética das amostras analisadas em triplicata e descontados dos controles abióticos.

Etapa I. Estudo das Atividades Enzimáticas

As linhagens bacterianas cultivadas em meio BH e cristais de hidrocarbonetos aromáticos (naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno), numa concentração final de 0,3%, durante quinze dias, sem agitação; foram analisadas quanto a produção de quatro enzimas – catecol 2,3-dioxigenase; protocatecol 3,4-dioxigenase, catecol 1,2-dioxigenases I e II. Os resultados estão apresentados nas Figuras IV.13 a IV.17, de acordo com a fonte de carbono utilizada.

➤ Naftaleno

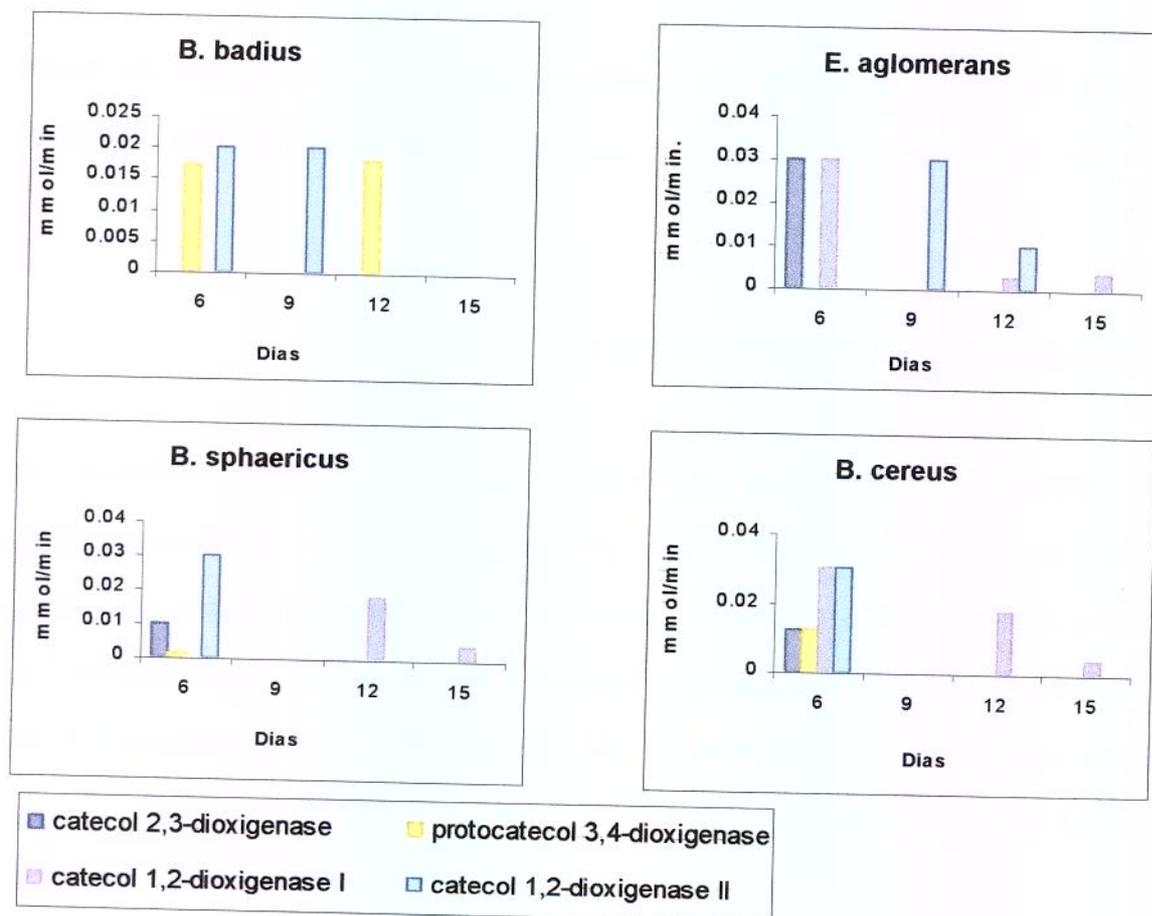


Figura IV.13. Atividades enzimáticas das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo cristais de naftaleno.

As enzimas catecol 2,3-dioxigenase e protocatecol 3,4-dioxigenase não foram detectadas em nenhuma das linhagens no nono e décimo quinto dias de cultivo. Observou-se maior produção enzimática no sexto dia de cultivo das bactérias. Após quinze dias de cultivo nenhuma enzima foi produzida pelas linhagens estudadas

➤ Antraceno

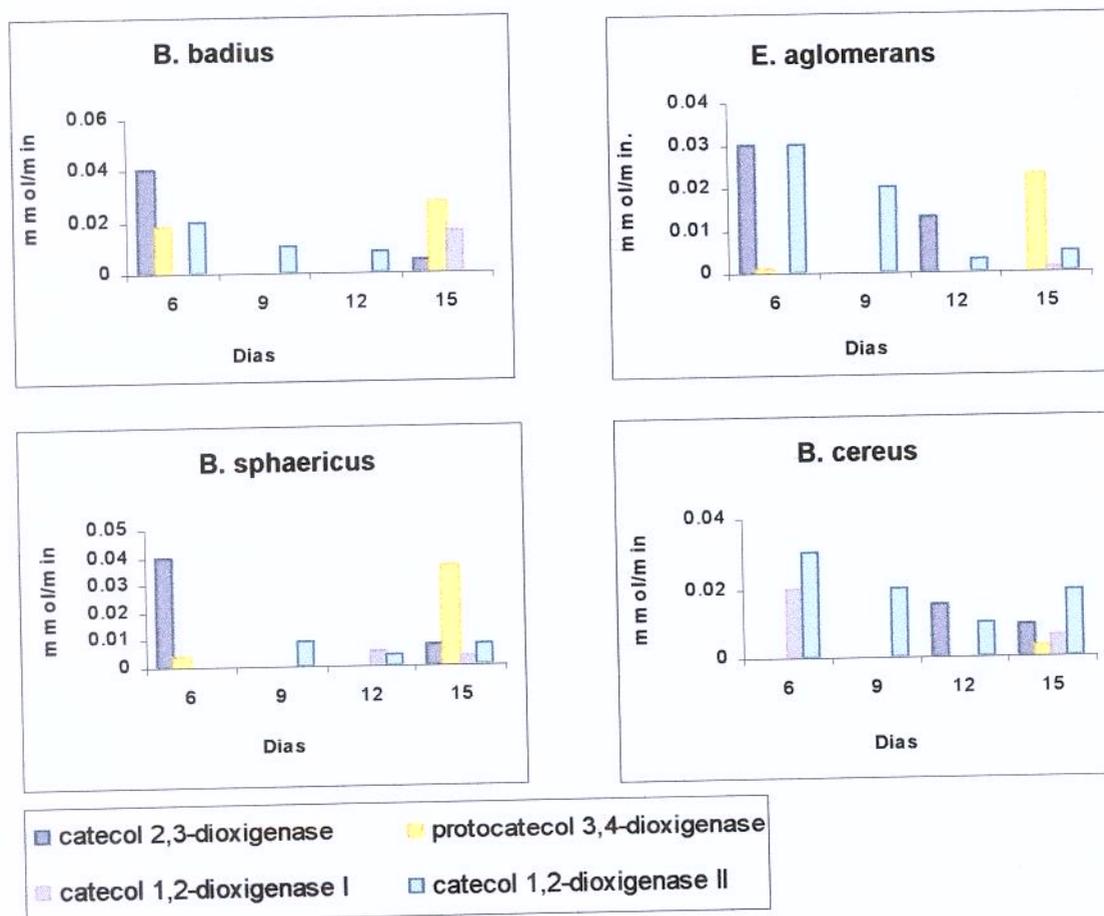


Figura IV.14. Atividades enzimáticas das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo cristais de antraceno.

Quase todas as enzimas foram produzidas pelas linhagens estudadas, principalmente no sexto e no décimo quinto dias. O nono dia destacou-se pela produção de uma única enzima – catecol 1,2-dioxigenase II. A linhagem *B. badius* produziu dioxigenases em todos os dias avaliados. A maior atividade foi detectada no sexto dia de cultivo, com a produção de catecol 2,3-dioxigenase. Para a linhagem *E. agglomerans*, foi no sexto dia onde se observou as maiores atividades de catecol 2,3-dioxigenase e catecol 1,2-dioxigenase II. Quando a linhagem *B.*

sphaericus foi cultivada em meio contendo cristais de antraceno, observou-se maiores produções enzimáticas no sexto dia, com destaque para a enzima catecol 2,3-dioxigenase e no décimo quinto dia com produção de todas as enzimas estudadas. O *B. cereus* produziu a enzima catecol 1,2-dioxigenase II em todos os dias avaliados.

➤ Fluoreno

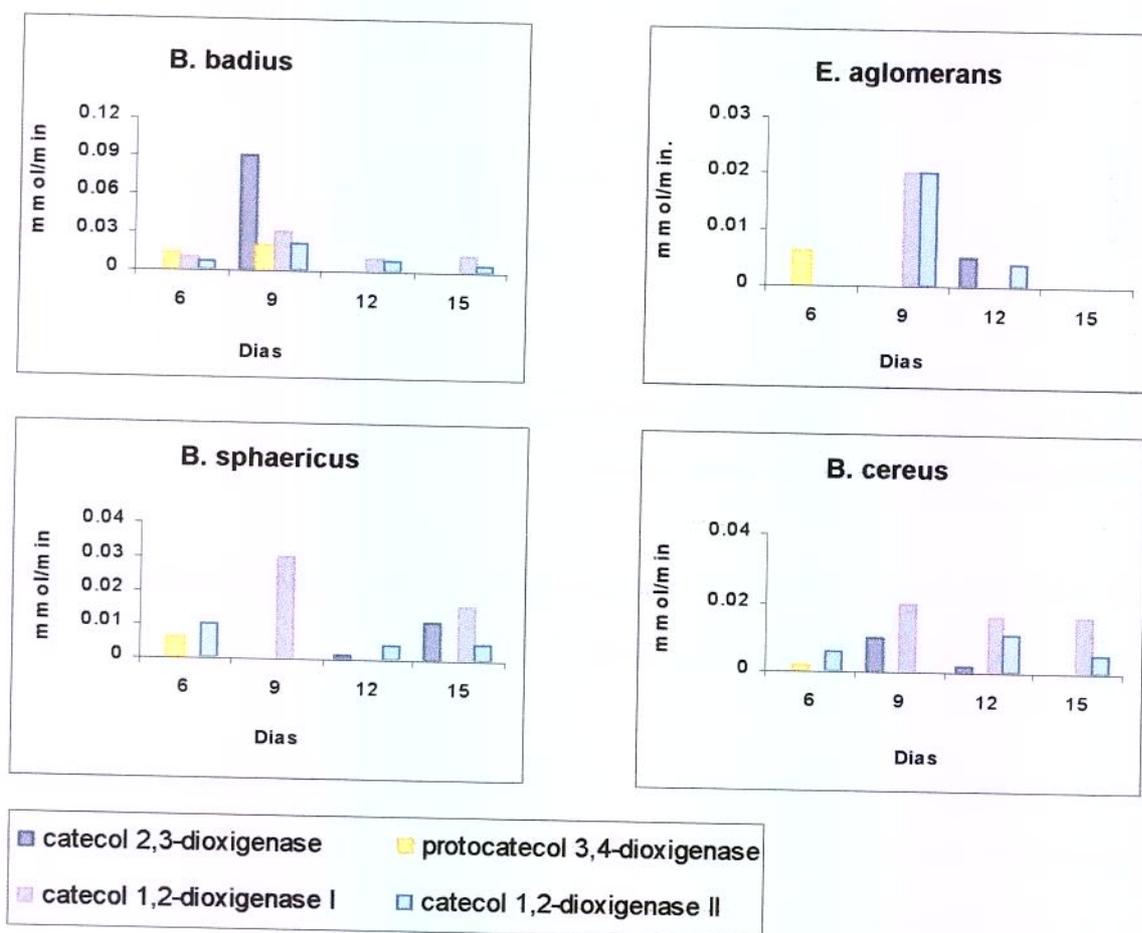


Figura IV.15. Atividades enzimáticas das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo cristais de fluoreno.

A bactéria *B. badius* quando cultivado em fluoreno como única fonte de carbono, produziu enzimas dioxigenases principalmente no nono dia. Ao contrário do observado na Figura IV.14, as maiores atividades foram detectadas após nove dias de cultivo, além de todas as enzimas serem produzidas. Observa-se produção das enzimas catecol 1,2 dioxigenase I e II no nono dia de cultivo pela linhagem *E. aglomerans*. A bactéria *B. sphaericus* produziu maior atividade de catecol 1,2-dioxigenase I no nono dia de cultivo. Quando *B. cereus* foi cultivado em fluoreno como fonte de carbono, observa-se uma maior produção da enzima catecol 1,2-dioxigenase a partir do nono dia de cultivo.

➤ Pireno

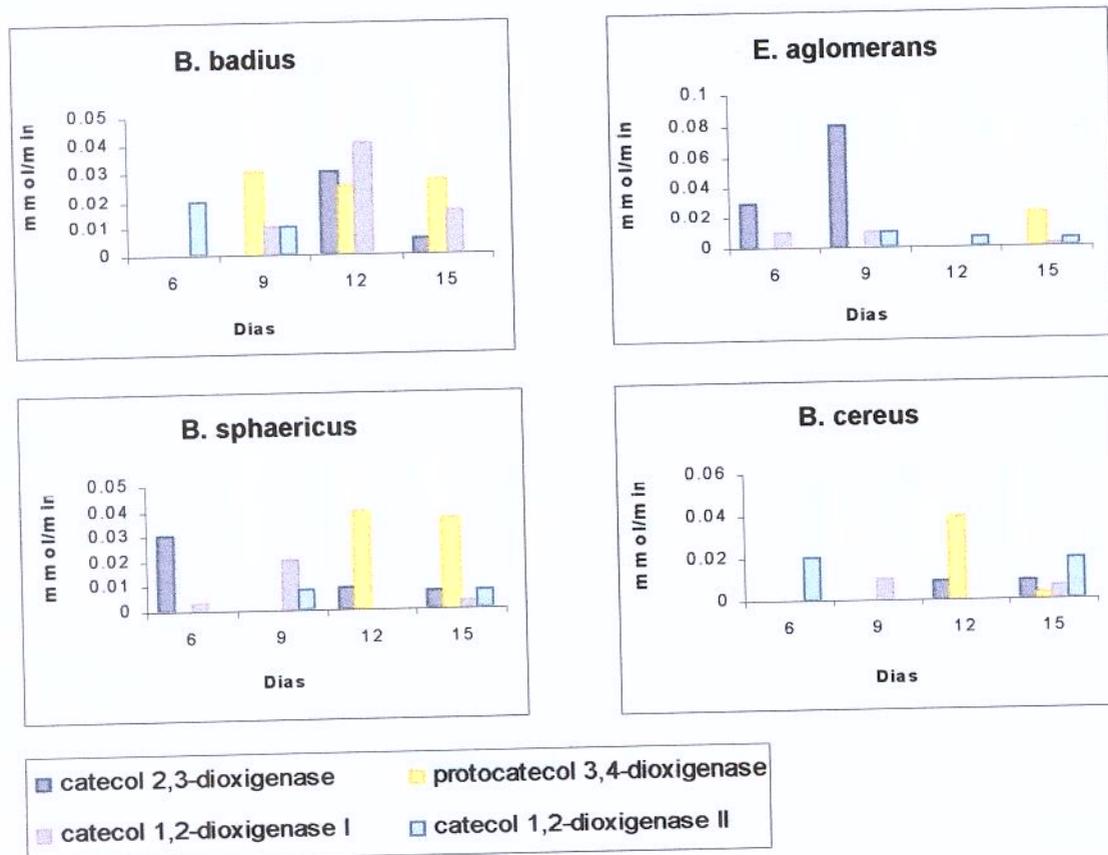


Figura IV.16. Atividades enzimáticas das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo cristais de pireno.

Todas as linhagens bacterianas produziram algum tipo de enzima nos diferentes dias de cultivo, estudados. O décimo quinto dia se destacou-se, pois todas as bactérias produziram as enzimas, exceto *B. badius* e *E. agglomerans* que não produziram as enzimas catecol 1,2-dioxigenase II e catecol 2,3-dioxigenase, respectivamente. O fato das linhagens produzirem maior quantidade de enzimas neste período está relacionado com a utilização do composto como fonte de carbono, visto que a degradação do mesmo foi de 99%.

A quantidade de proteína medida neste experimento está apresentada na Figura IV.17.

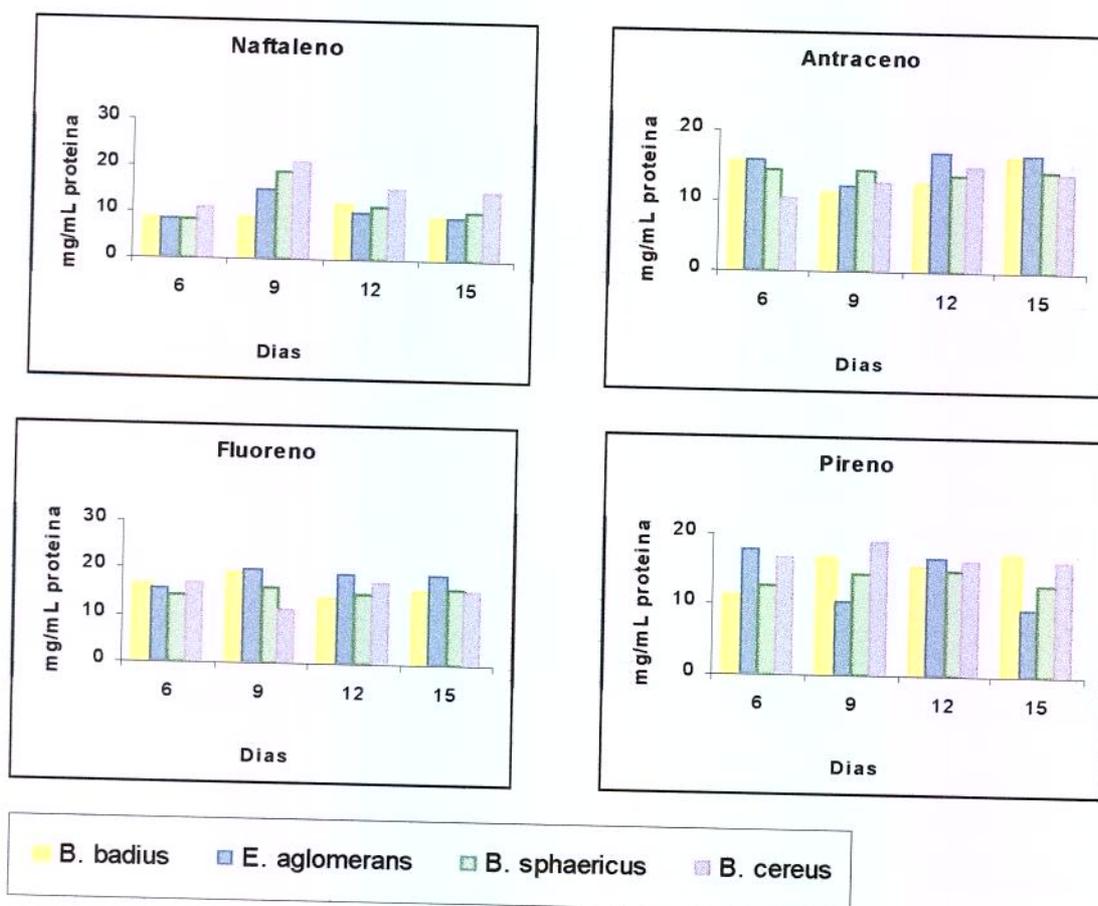


Figura IV.17. Concentração de proteína produzida pelas linhagens bacterianas cultivadas em meios contendo cristais de HAPs.

De acordo com os resultados descritos acima observa-se diferença de produção enzimática entre as linhagens estudadas. Neste caso é importante levar em consideração que a degradação microbiana dos HAPs pode ser influenciada por uma variedade de fatores abióticos, como: temperatura, pH, tipo de aeração, concentração do nutrientes e compostos, umidade, intensidade luminosa, entre outros; e fatores bióticos como: tipo e distribuição dos microrganismos; adaptação microbiana ao composto e biodisponibilidade do composto (Robert, 1992; Edward, 1993; Stapleton *et al.*, 1998).

O fato de se ter uma enzima produzida em um dia, uma outra detectada em outro dia, ou mesmo as atividades enzimáticas serem observadas em dias de cultivos diferentes, pode estar relacionado a necessidade da bactéria em ter acesso a fonte de carbono. Ao entrar em contato com o composto o microrganismo produz as enzimas necessárias para torná-lo acessível e a partir do momento em que o composto se torna fonte de carbono, as linhagens param de produzir as enzimas. A medida que a fonte de carbono torna-se de difícil acesso, as mesmas voltam a ser produzidas. Sendo assim, é importante levar em conta o sistema regulatório para entender quando o mesmo pode operar, quando muito ou nada do substrato esteja disponível e assim reconhecer situações em que os HAPs são degradados (Neilson, 1995).

Um outro fator importante é o metabolismo microbiano no processo de degradação dos HAPs, que opera em dois estágios. No primeiro ocorre oxidação inicial do anel benzênico, para formar os *cis*-dihidrodióis; no segundo estágio ocorre rearomatização para formar um derivado hidroxilado (Patel & Gibson, 1974). Embora os passos iniciais de conversão sejam semelhantes para muitos compostos aromáticos, o número de intermediários formados após a rearomatização é limitada (Reineke & Knackmuss, 1988; Chaudhry & Chapalamadugu, 1991).

Nesta rearomatização, pode haver a formação de outros compostos intermediários que não seja catecol ou protocatecol. Estes foram os substratos essenciais para as enzimas aqui estudadas. Portanto, a ausência de uma dessas enzimas, não significa necessariamente, que o compostos não serão degradados. Outras enzimas podem estar participando do processo degradativo (Enseley *et al.*, 1983; Trenz *et al.*, 1994); visto que, quando as amostras foram analisadas por CLAE, obteve-se degradação dos HAPs.

Etapa II. Estudo das Atividade de Biosurfactantes

Esta etapa do trabalho foi dividida em três fases, a) análise da produção de biosurfactantes e atividades de emulsificação das bactérias cultivadas em cristais de HAPs (0,3%); b) estudo do efeito dos surfactantes na degradação de HAPs e c) utilização de surfactantes como fonte de carbono pelas linhagens bacterianas. Todos os resultados mostrados, a seguir, foram obtidos após média aritmética das análises em triplicata e descontados os controle abióticos.

A) Primeira Fase

As atividades de emulsificação óleo/água (ABS) e água/óleo (formação de halo – cm), assim como a produção de biosurfactantes (tensão superficial – mN/m) estão mostrados de acordo com a fonte de carbono utilizada.

➤ Naftaleno

Ao analisar a Tabela IV.2, constatou-se que a linhagens *B.cereus* apresentou os dois tipos de emulsão. Para a linhagem *E. aglomerans* observa-se atividade de emulsificação óleo/água, no sexto dia de cultivo. Já no nono dia de cultivo, a bactéria *B. badius*, também apresentou este tipo de emulsificação. Em relação a tensão superficial, os dados obtidos foram ligeiramente inferiores ao do respectivo controle, concluindo-se, portanto, que houve pequena produção de biosurfactante.

Tabela IV.2. Atividades de emulsificação e de biosurfactantes, das linhagens bacterianas cultivadas durante nove dias em meio contendo cristais de naftaleno.

Linhagens	6 Dias de Cultivo			9 Dias de Cultivo		
	O/A	A/O (cm)	T.S. (mN/m)	O/A	A/O (cm)	T.S. (mN/m)
Controle	0	0	64,7	0	0	64,4
<i>B. badius</i>	0	0	63,2	0,116	0	61,8
<i>E. aglomerans</i>	0,051	0	62,4	0,036	0	62,9
<i>B. sphaericus</i>	0	0	61,0	0	0	63,1
<i>B. cereus</i>	0,077	0,5	62,6	0,235	2,5	60,5

O/A emulsão óleo em água; A/O emulsão água em óleo; T.S tensão superficial

➤ Antraceno

Comparando os dias de cultivo em relação as atividades de emulsificação (Tabela IV.13), observou-se que a linhagem *B. sphaericus* não apresentou nenhuma das atividades, tanto no sexto como no nono dias de cultivo. *B. badius* apresentou somente emulsão O/A nos dois dias de cultivo. *E. aglomerans* apresentou atividade de emulsificação O/A no sexto e nono dia de crescimento e emulsão A/O, somente no nono dia de crescimento. *B. cereus* apresentou um tipo de emulsão no sexto dia (O/A) e outro (A/O) no nono. Para esta bactéria, a tensão superficial também foi inferior, quando comparada com o controle. Nestas condições de cultivo, destacou-se a linhagem *B. cereus*, com a menor tensão superficial, portanto, maior produção de biosurfactante, quando comparada com as demais linhagens.

Tabela IV.3. Atividades de emulsificação e de biosurfactantes, das linhagens bacterianas cultivadas durante nove dias em meio contendo cristais de antraceno.

Linhagens	6 Dias de Cultivo			9 Dias de Cultivo		
	O/A	A/O (cm)	T.S. (mN/m)	O/A	A/O (cm)	T.S. (mN/m)
Controle	0	0	64,3	0	0	64,1
<i>B. badius</i>	0,005	0	63,5	0,124	0	63,4
<i>E. aglomerans</i>	0,01	0	63,7	0,089	1,0	63,5
<i>B. sphearicus</i>	0	0	60,1	0	0	59,2
<i>B. cereus</i>	0,005	0	61,0	0	2,3	56,9

O/A = emulsão óleo em água; A/O = emulsão água em óleo; T.S = tensão superficial

➤ Fluoreno

Com exceção da linhagem *B. sphearicus* que não formou nenhum tipo de emulsificação, as demais apresentaram algum tipo de emulsão (O/A e A/O). A linhagens *B. cereus*, destaca-se por apresentar maior atividade de emulsificação e menor tensão superficial, quando cultivada por nove dias (Tabela IV.4).

Tabela IV.4. Atividades de emulsificação e de biosurfactantes, das linhagens bacterianas cultivadas durante nove dias em meio contendo cristais de fluoreno.

Linhagens	6 Dias de Cultivo			9 Dias de Cultivo		
	O/A	A/O (cm)	T.S. (mN/m)	O/A	A/O (cm)	T.S. (mN/m)
Controle	0	0	69,0	0	0	68,6
<i>B. badius</i>	0,12	0	65,7	0,17	0	65,5
<i>E. aglomerans</i>	0,08	0,3	63,4	0,13	1,5	61,3
<i>B. sphaericus</i>	0,14	0	61,3	0	0	59,0
<i>B. cereus</i>	0,08	1,5	58,1	1,49	2,3	57,2

O/A = emulsão óleo em água; A/O = emulsão água em óleo; T.S = tensão superficial

➤ Pireno

No sexto dia de cultivo, todas as linhagens formaram emulsão óleo em água. No nono dia apenas *E. aglomerans* e *B. cereus* apresentaram este tipo de emulsão. Assim como demonstrado com fluoreno, a linhagem *B. cereus* apresentou os dois tipos de emulsão, nos dois dias de cultivo, destacando-se o nono com atividade de emulsificação de 1,30 de O/A e 2,3 de A/O, além de apresentar a menor tensão superficial, quando comparada com o controle (Tabela IV.5).

Tabela IV.5. Atividades de emulsificação e de biosurfactantes, das linhagens bacterianas cultivadas durante nove dias em meio contendo cristais de pireno.

Linhagens	6 Dias de Cultivo			9 Dias de Cultivo		
	O/A	A/O (cm)	T.S. (mN/m)	O/A	A/O (cm)	T.S. (mN/m)
Controle	0	0	64,8	0	0	64,8
<i>B. badius</i>	0,03	0	64,8	0	0	65,3
<i>E. aglomerans</i>	0,07	0	62,3	0,25	0	61,3
<i>B. sphaericus</i>	0,04	0	60,7	0	0	59,0
<i>B. cereus</i>	0,79	1,5	58,1	1,30	2,3	57,2

O/A = emulsão óleo em água; A/O = emulsão água em óleo; T.S = tensão superficial

A produção de agentes emulsificantes, assim como de biosurfactantes faz com que estes se interajam com as moléculas de HAPs, tornando-os mais solúveis, ou seja, aumentam a área superficial e concentração na fase aquosa e, conseqüentemente, aumentam sua acessibilidade aos microrganismos (Rouse *et al.*, 1994; Yeom *et al.*, 1996).

Comparando as linhagens entre si em relação a produção de biosurfactantes e emulsificantes, com porcentagem de degradação de HAPs, a linhagem *B. cereus* destaca-se com produção destes agentes, quando cultivada por seis e nove dias em naftaleno, fluoreno e pireno, apresentando maiores taxas de degradação que as demais. Quando esta linhagem foi cultivada em antraceno, observou-se maior porcentagem de degradação em nove dias de cultivo com produção de emulsão água em óleo e diminuição da tensão superficial. Os dados completos de

degradação dos HAPs obtidos pelas linhagens bacterianas, quando cultivadas em compostos poliaromáticos está mostrado na Figura IV.18.

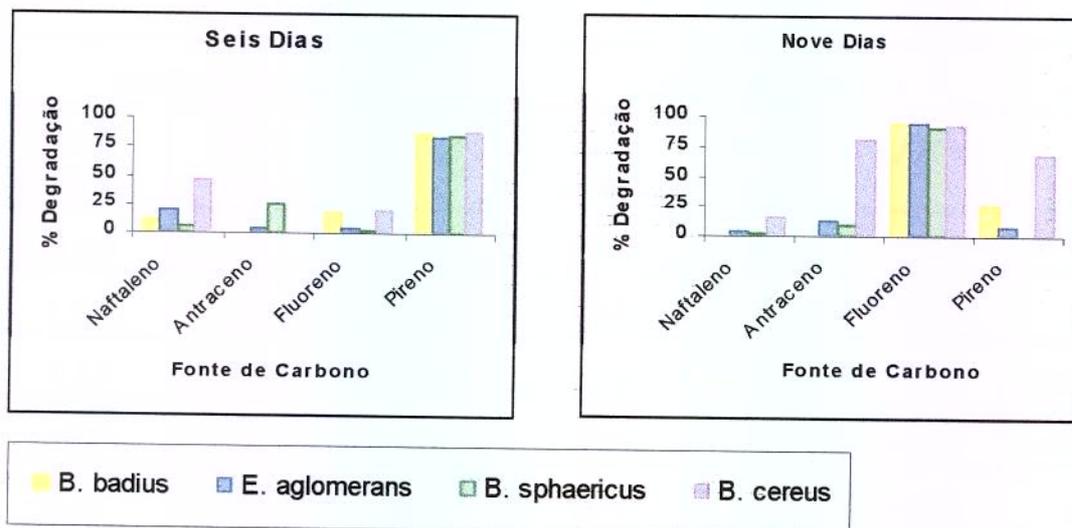


Figura IV. 18. Porcentagem de degradação dos cristais de HAPs por linhagens bacterianas, cultivadas durante nove dias.

Com seis dias de cultivo, todas as linhagens avaliadas apresentaram cerca de 75% de degradação do pireno. Para os demais compostos a porcentagem de degradação foi baixa. Após nove dias de cultivo, o fluoreno foi degradado em altas taxas (90%) para todos os microrganismos estudados. As linhagens quando cultivadas em naftaleno, apresentaram baixa degradação do mesmo. Com nove dias de cultivo a bactéria *B. cereus* degradou 75% do composto antraceno.

B) Segunda Fase

Nesta fase as linhagens foram cultivadas em cristais de HAPs e meio de cultivo BH com surfactantes (Tween 20, 80 e Triton X-100) durante nove dias. Os surfactantes foram adicionados com o objetivo de verificar sua ação nas moléculas de HAPs, ou seja, se os microrganismos conseguiram utilizar os compostos aromáticos como fonte de carbono em menos dias de cultivo. Para demonstrar esta ação, foram medidas atividades de emulsificação (A/O (halo - cm) e O/A- ABS) e porcentagem de degradação por CLAE. Os resultados estão apresentados a seguir, de acordo com a fonte de carbono empregada.

➤ Naftaleno

Tabela IV.6. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação das linhagens bacterianas cultivadas por seis dias em meio contendo cristais de naftaleno e com adição de surfactantes.

Linhagens	Surfactantes								
	Tween 20			Tween 80			Triton X-100		
	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)
<i>B.adius</i>	0	1.0	87	0,56	0	0	0	0	0
<i>E. aglomerans</i>	0,27	0	0,09	1,57	0	14	0,005	1,3	22
<i>B. sphaericus</i>	0,25	0	39	1,61	1,5	0	0,005	0	13
<i>B. cereus</i>	0,29	0	59	1,62	0,5	0	0,005	0,5	44

O/A = emulsão óleo em água; A/O = emulsão água em óleo; % D. = % degradação naftaleno

Tabela IV.7. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação das linhagens bacterianas cultivadas por nove dias em meio contendo cristais de naftaleno e com adição de surfactantes.

Linhagens	Surfactantes								
	Tween 20			Tween 80			Triton X-100		
	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)
<i>B. badius</i>	1,09	0	60	0	0	53	0,04	0	66
<i>E. aglomerans</i>	0,61	0	42	0	0	10	0	0	52
<i>B. sphaericus</i>	0,18	0	38	0	0	13	0	0	72
<i>B. cereus</i>	0,79	0	46	0,35	0	98	0	0	46

O/A = emulsão óleo em água; A/O = emulsão água em óleo; % D. = % degradação naftaleno

Apesar das linhagens bacterianas terem formado emulsão óleo em água no sexto dia com a adição dos surfactantes, a degradação do naftaleno foi baixa; exceto a linhagem *B. badius* com 87% do composto degradado. Com nove dias de cultivo, pouco ou nenhuma atividade de emulsificação foi produzida, nos meios com os três surfactantes adicionados. No entanto ocorreu uma degradação do naftaleno, fato este pode estar relacionado com a disponibilidade do naftaleno aos microrganismos, ou seja, com a produção de emulsificante o composto tornou-se mais solúvel em água, aumentando, portanto, a concentração do HAP que causou toxidez ao microrganismo.

➤ Antraceno

Tabela IV.8. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação das linhagens bacterianas cultivadas por seis dias em meio contendo cristais de antraceno e com adição de surfactantes.

Linhagens	Surfactantes								
	Tween 20			Tween 80			Triton X-100		
	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)
<i>B. badius</i>	0	1,5	99	0	0	88	0	0	16
<i>E. aglomerans</i>	0,31	0	59	0,40	0,1	21	0	0	0
<i>B. sphaericus</i>	0,18	0	90	0,45	0	64	0,015	0	0
<i>B. cereus</i>	0,29	0	0	0,69	0	42	0,015	0	0

O/A = emulsão óleo em água; A/O = emulsão água em óleo; % D. = % degradação antraceno.

Tabela IV.9. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação das linhagens bacterianas cultivadas por nove dias em meio contendo cristais de antraceno e com adição de surfactantes.

Linhagens	Surfactantes								
	Tween 20			Tween 80			Triton X-100		
	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)
<i>B. badius</i>	0	0	0	0	0	38	0,056	0	16
<i>E. aglomerans</i>	0	0	0	0	0	10	0	0	0
<i>B. sphaericus</i>	0	0	65	0	0	49	0	0	0
<i>B. cereus</i>	0	0	0	0,47	0	46	0,023	0	0

O/A = emulsão óleo em água; A/O = emulsão água em óleo; % D. = % degradação antraceno.

Com nove dias de cultivo (Tabela IV.9.), a adição dos surfactantes parece ter inibido a atividade de emulsificação, uma vez que a maioria das linhagens não formaram nenhum tipo de emulsão.

No entanto, quando adicionou-se Tween 20 obteve-se alta taxa de degradação do antraceno, exceto linhagem *Bacillus* sp (Tabela IV.8.). Com adição de Tween 80, a linhagem *B. badius* apresentou alta degradação do composto (88%). Já com a adição de Triton X-100, pouco ou nada do composto foi degradado – Tabelas IV.8. e IV.9.

A concentração de Triton X-100 utilizada (10 μ L/mL), apresentou efeito tóxico para as linhagens bacterianas, visto que as mesmas não conseguiram utilizar o antraceno como fonte de carbono, pois pouco do composto foi degradado.

➤ Fluoreno

Tabela IV.10. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação das linhagens bacterianas cultivadas por seis dias em meio contendo cristais de fluoreno e com adição de surfactantes.

Linhagens	Surfactantes								
	Tween 20			Tween 80			Triton X-100		
	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)
<i>B. badius</i>	0	1,0	90	0	0	98	0	0	0
<i>E. aglomerans</i>	0	0,8	93	0,06	0,2	56	0	0	0
<i>B. sphaericus</i>	0,28	0	0	0,03	0,2	0	0	0	1,8
<i>B. cereus</i>	0,48	0	0	0	0,2	91	0,009	0	14

O/A = emulsão óleo em água; A/O = emulsão água em óleo; % D. = % degradação fluoreno.

Tabela IV.11. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação das linhagens bacterianas cultivadas por nove dias em meio contendo cristais de fluoreno e com adição de surfactantes.

Linhagens	Surfactantes								
	Tween 20			Tween 80			Triton X-100		
	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)
<i>B. badius</i>	1,71	0	16	0	0	79	0,068	0	0
<i>E. aglomerans</i>	0,43	0	58	0,28	0	60	0,072	0	0
<i>B. sphaericus</i>	0,22	0	42	0	0	43	0	0	0
<i>B. cereus</i>	0,57	0	31	0,28	0	63	0,04	0	0

O/A = emulsão óleo em água; A/O = emulsão água em óleo; % D. = % degradação fluoreno.

Assim como com antraceno, a linhagem *B. badius* conseguiu utilizar fluoreno como fonte de carbono, quando cultivada em meio contendo Tween 20 e 80, no sexto e nono dias de cultivo, respectivamente. A linhagem *E. aglomerans*, também degradou o composto quando cultivada em meio contendo Tween 20, no sexto dia (93%) e nono dia (58%) de cultivo e Tween 80 com degradação superior a 50 % no sexto e nono dias.

Observou-se, também que nada do composto foi degradado quando adicionou-se Triton X-100.

➤ Pireno

Tabela IV.12. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação das linhagens bacterianas cultivadas por seis dias em meio contendo cristais de pireno e com adição de surfactantes.

Linhagens	Surfactantes								
	Tween 20			Tween 80			Triton X-100		
	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)
<i>B. badius</i>	0	1,5	98	0	0	82	0	0	0
<i>E. aglomerans</i>	0	0	70	0,29	0	0	0	0	0
<i>B. sphaericus</i>	0,11	0	14	0,26	0	0	0	0	0
<i>B. cereus</i>	0,48	0	0	0,49	0	0	0	0	0

O/A = emulsão óleo em água; A/O = emulsão água em óleo; % D. = % degradação pireno.

Tabela IV.13. Atividades de emulsificação e porcentagem de degradação das linhagens bacterianas cultivadas por nove dias em meio contendo cristais de pireno e com adição de surfactantes.

Linhagens	Surfactantes								
	Tween 20			Tween 80			Triton X-100		
	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)
<i>B. badius</i>	0,58	0	44	0,30	0	68	0	0	0
<i>E. aglomerans</i>	0	0	15	0	0	45	0,017	0	0
<i>B. sphaericus</i>	0	0	95	0,29	0	38	0,019	0	0
<i>B. cereus</i>	0	0	42	0,25	0	46	0,011	0	0

O/A = emulsão óleo em água; A/O = emulsão água em óleo; % D. = % degradação pireno.

Com adição dos surfactantes Tween 20 e 80, as linhagens produziram principalmente emulsão óleo em água (sexto dia). Como observado com as demais fontes de carbono, a bactéria *B. badius* degradou pireno, quando cultivada em Tween 20 ou 80, sendo a taxa de degradação maior no sexto dia de cultivo.

A bactéria *E. agglomerans* utilizou pireno como fonte de carbono quando adicionou-se Tween 20 no meio de cultura (sexto dia) e a linhagem *B. sphaericus* apresentou 95% de degradação do composto quando cultivada em meio com Tween 20 durante nove dias.

A comparação das porcentagens de degradação dos HAPs em relação a adição ou não dos surfactantes estão mostrados nas Figuras IV.19 a IV.22.

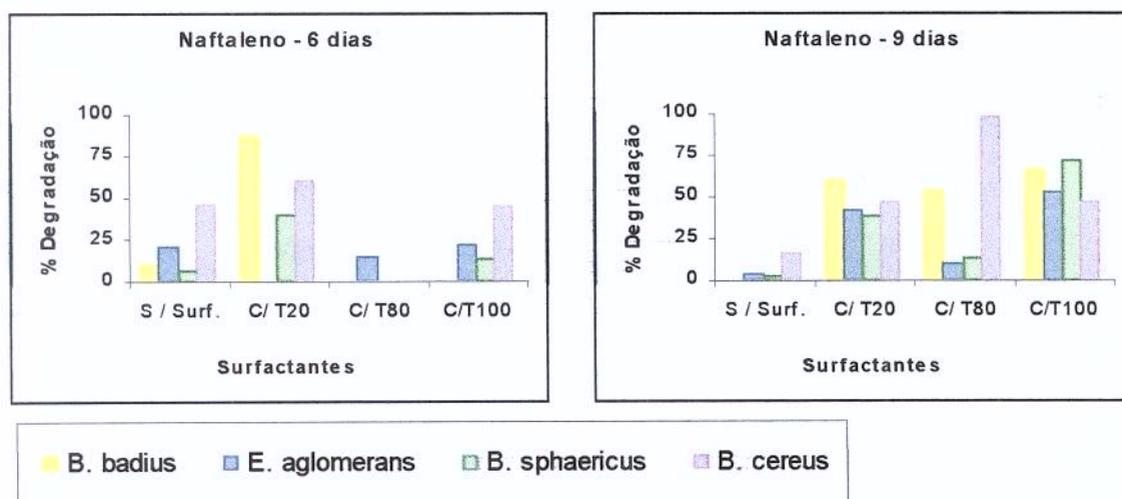


Figura IV.19. Porcentagem de degradação de naftaleno pelas linhagens bacterianas, quando cultivadas durante nove dias com ou sem adição de surfactantes no meio de cultura. S/Surf (sem surfactante); C/T20 (adição de Tween 20); C/T80 (adição de Tween 80); C/T100 (adição de Triton X-100).

Observa-se na Figura IV.19 que em todas as condições de cultivo e dias avaliados, a adição dos surfactantes favoreceram a degradação do naftaleno, exceto o sexto dia com adição de Tween 80, onde não ocorreu um aumento de degradação desse composto.

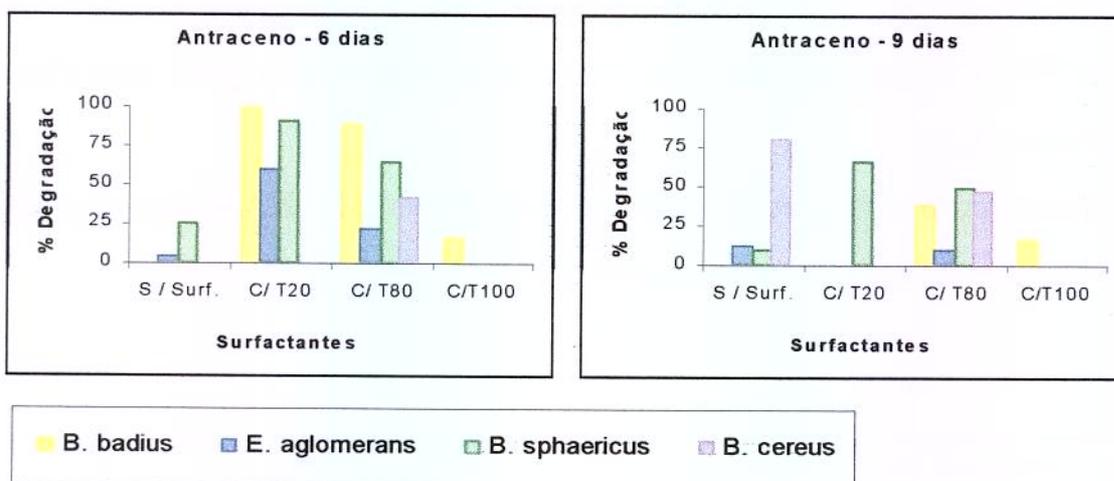


Figura IV.20. Porcentagem de degradação de antraceno pelas linhagens bacterianas, quando cultivadas durante nove dias com ou sem adição de surfactantes no meio de cultura. S/Surf (sem surfactante); C/T20 (adição de Tween 20); C/T80 (adição de Tween 80); C/T100 (adição de Triton X-100).

Observando a Tabela IV.20., a adição dos surfactantes Tween 20 e 80 favoreceram a degradação do antraceno, quando comparado com a degradação do composto sem adição dos mesmos, com seis dias de cultivo. Com nove dias, esta relação de adição do surfactante com aumento de degradação está bem evidenciado na linhagem *B. sphaericus*, onde observa-se uma aumento em torno de 70% de degradação com a adição de Tween 20.

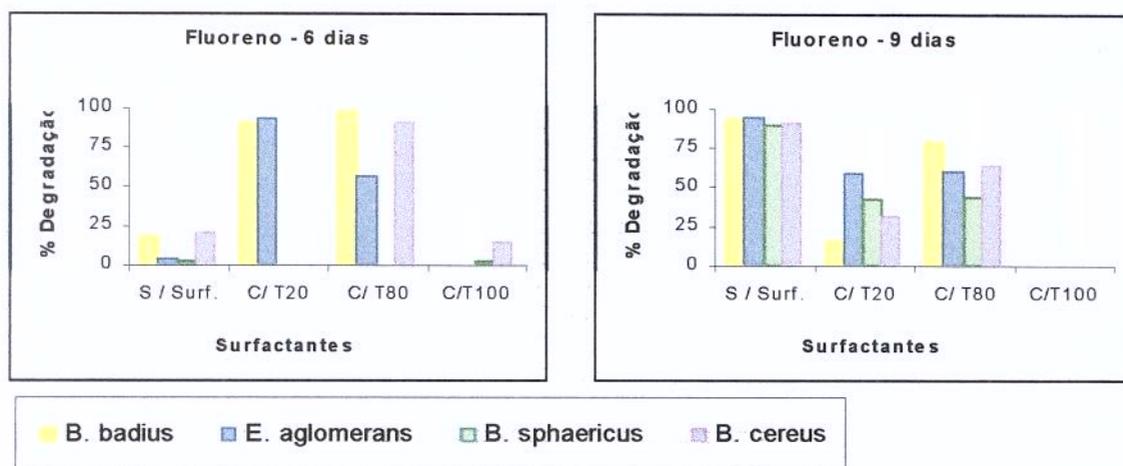


Figura IV.21. Porcentagem de degradação de fluoreno pelas linhagens bacterianas, quando cultivadas durante nove dias com ou sem adição de surfactantes no meio de cultura. S/Surf (sem surfactante); C/T20 (adição de Tween 20); C/T80 (adição de Tween 80); C/T100 (adição de Triton X-100).

Quando as linhagens bacterianas foram cultivadas em fluoreno, observa-se que com seis dias de cultivo, a adição de Tween 20 e 80 ao meio, favoreceu um aumento na degradação de fluoreno. No entanto, com nove dias de cultivo, a adição desses mesmos surfactantes, não interferiram na degradação do composto.

Em ambos os dias de cultivo, a adição de Triton X-100 não aumentou a degradação do fluoreno.

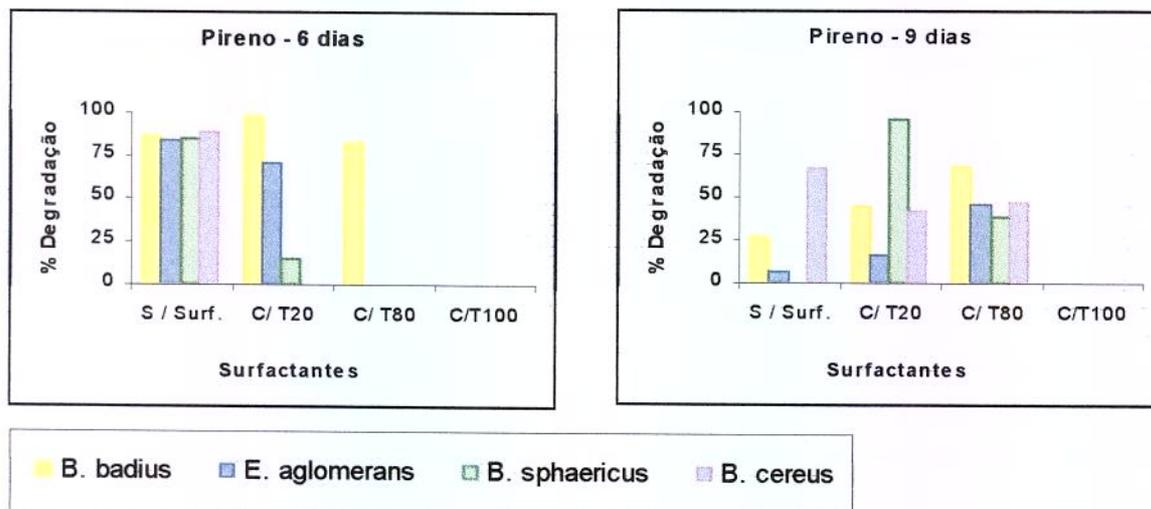


Figura IV.22. Porcentagem de degradação de pireno pelas linhagens bacterianas, quando cultivadas durante nove dias com ou sem adição de surfactantes no meio de cultura. S/Surf (sem surfactante); C/T20 (adição de Tween 20); C/T80 (adição de Tween 80); C/T100 (adição de Triton X-100).

Observando a Figura IV.22, com seis dias de cultivo a adição dos surfactantes parece não ter influenciado na degradação de pireno, visto que somente com a bactéria *B. badius*, com adição de Tween 20 resultou em uma maior degradação do composto. Já com nove dias, a adição de Tween 20 e 80 parece ter ajudado na degradação do pireno, para a maioria das bactérias estudadas. Neste caso, também, o Triton X-100, não influenciou na degradação desse composto, visto que quando as linhagens foram cultivados na presença do mesmo, o pireno não foi utilizado como fonte de carbono.

Essa diferença de resultados observados com as três fontes de surfactantes em relação a degradação dos HAPs, pode estar relacionada a variação da composição e concentração dos mesmos, podendo solubilizar diferentemente os compostos (Sobish *et al.*, 2000). Igualmente, grupos de microrganismos similares podem responder diferentemente ao mesmo surfactante. Este fator dificulta a determinação de mecanismos biológicos ou físico-químicos que são responsáveis pelo aumento da biotransformação em sistemas líquido/líquido ou líquido/sólido pelos surfactantes (Yeh *et al.*, 1998).

A biodisponibilidade dos hidrocarbonetos e conseqüentemente a velocidade e grau de sua degradação é “melhorada” pelos surfactantes, no entanto, efeitos negativos podem ocorrer devido a toxicidade ou inclusão de hidrocarbonetos em micelas estáveis (Roch & Alexander, 1995; Deschenes *et al.*, 1996; Willunsen *et al.*, 1998).

C) Terceira Fase

Como existia a possibilidade das linhagens bacterianas utilizarem os surfactantes como fonte de carbono ao invés dos HAPs, as mesmas foram avaliadas quanto a capacidade de degradar Tween 20, Tween 80 e Triton X-100, concentração final 10 μ L / mL (v/v) durante nove dia de cultivo. Os resultados estão demonstrados nas Tabelas IV. 14 e IV.15.

Tabela IV.14. Porcentagem de degradação e atividades de emulsificação (O/A e A/O) das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo surfactantes por seis dias.

Linhagens	Surfactantes								
	Tween 20			Tween 80			Triton X-100		
	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)
<i>B. badius</i>	0	0	95	0	0	95	0,04	1	9
<i>E. aglomerans</i>	0,04	1,4	86	0	0	85	0,18	0,5	0
<i>B. sphaericus</i>	0,05	1,3	97	0,06	0	94	0,12	0,3	14
<i>B. cereus</i>	0,66	1,4	96	0,10	0	94	0,01	0,6	3

O/A = emulsão óleo em água; A/O = emulsão água em óleo; % D. = % degradação surfactantes.

Tabela IV.15. Porcentagem de degradação e atividades de emulsificação (O/A e A/O) das linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo surfactantes por nove dias.

Linhagens	Surfactantes								
	Tween 20			Tween 80			Triton X-100		
	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)	O/A	A/O (cm)	D. (%)
<i>B. badius</i>	0	0	98	0	0	98	0	0	3
<i>E. aglomerans</i>	0	0	98	0	0	96	0,012	0	0
<i>B. sphaericus</i>	0	0	98	0	0	90	0,06	0	0
<i>B. cereus</i>	0,30	0	0	0,03	0	98	0,016	0	0

O/A = emulsão óleo em água; A/O = emulsão água em óleo; % D. = % degradação surfactantes.

Os resultados listados nas Tabelas IV.14. e IV.15. demonstram que as linhagens bacterianas utilizaram o Tween 20 e 80 como fonte de carbono, uma vez que a degradação desses compostos foram em torno de 90%, tanto no sexto como no nono dias de cultivo. Apesar das bactérias formarem emulsão óleo em água quando cultivadas em Triton X-100, o mesmo não foi degradado, o que leva a crer que quando ocorre emulsificação, o composto torna-se mais acessível as bactérias e portanto mais tóxico, para as mesmas, inibindo seu crescimento.

Nesta etapa do trabalho, conclui-se portanto, que os surfactantes auxiliam os compostos aromáticos a tornarem-se mais disponíveis às linhagens bacterianas, no entanto, esse aumento de solubilização dos HAPs pode torná-los mais tóxicos e portanto, menos utilizados como fonte de carbono. A mesma capacidade das bactérias utilizarem HAPs foi observada com os surfactantes, quando ambos foram utilizados como fonte de carbono.

Etapa III. Estudo das Linhagens Bacterianas Estabelecidas em Consórcio e Cultivadas em Meio Contendo Cristais de HAPs

As linhagens bacterianas cultivadas em meio contendo cristais de naftaleno, antraceno, fluoreno ou pireno, foram capazes de sintetizar enzimas envolvidas no processo degradativo destes compostos. Esta etapa teve como objetivo, cultivar estas mesmas linhagens em meio contendo estes compostos, só que estabelecidas em consórcio, para verificar se existe interações entre as linhagens em relação ao aumento da taxa de degradação dos HAPs em menor tempo de cultivo. Os resultados estão representados nas Figuras descritas abaixo, de acordo com a fonte de carbono utilizada. Todos os resultados apresentados, a seguir, foram obtidos após média aritmética das análises em triplicata e descontados os controles abióticos.

➤ Naftaleno

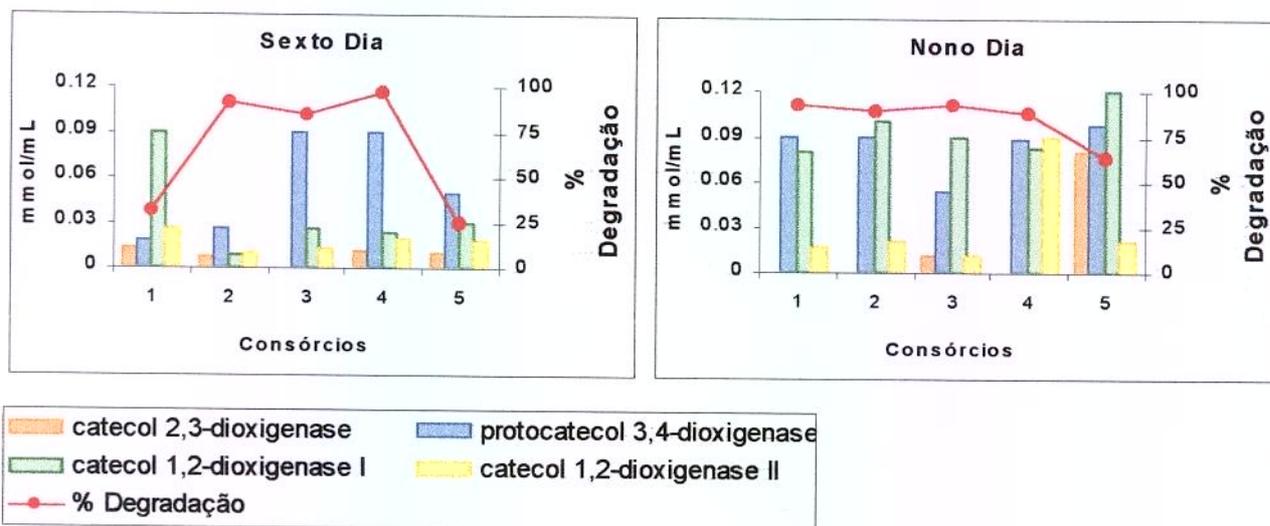


Figura IV.23. Atividades enzimáticas e porcentagem de degradação das linhagens bacterianas em consórcio e cultivadas durante nove dias em meio contendo cristais de naftaleno.

Com seis dias de cultivo, observou-se que em todos os consórcios houve produção enzimática, exceto o consórcio 3 que não produziu a enzima catecol 2,3-dioxigenase. Com nove dias de cultivo, os consórcios 1, 2 e 3 não produziram a enzima catecol 2,3-dioxigenase.

Com relação a degradação do naftaleno, observou-se que apenas nos consórcios 1 e 5 no sexto dia de cultivo, pouco do composto foi degradado.

➤ Antraceno

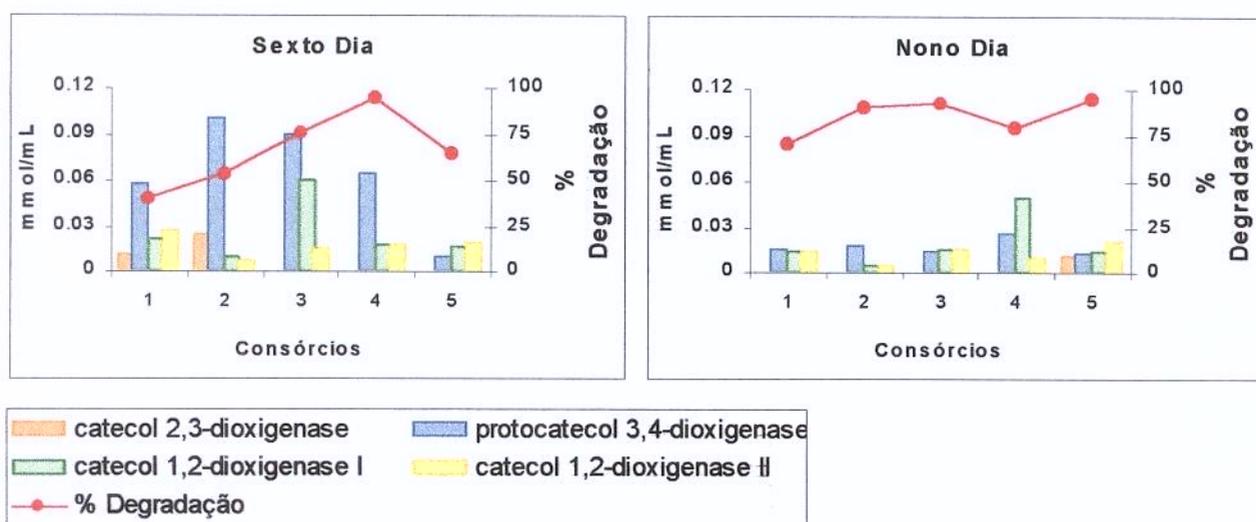


Figura IV.24. Atividades enzimáticas e porcentagem de degradação das linhagens bacterianas em consórcio e cultivadas durante nove dias em meio contendo cristais de antraceno.

Apenas a enzima catecol 2,3-dioxigenase não foi produzida nos consórcios 3, 4 e 5, no sexto dia. Já para o nono dia de cultivo, esta enzima só foi produzida no consórcio 5.

As linhagens submetidas em consórcio (consórcios 1 a 5), apresentaram maiores taxas de degradação com nove dias de cultivo.

➤ Fluoreno

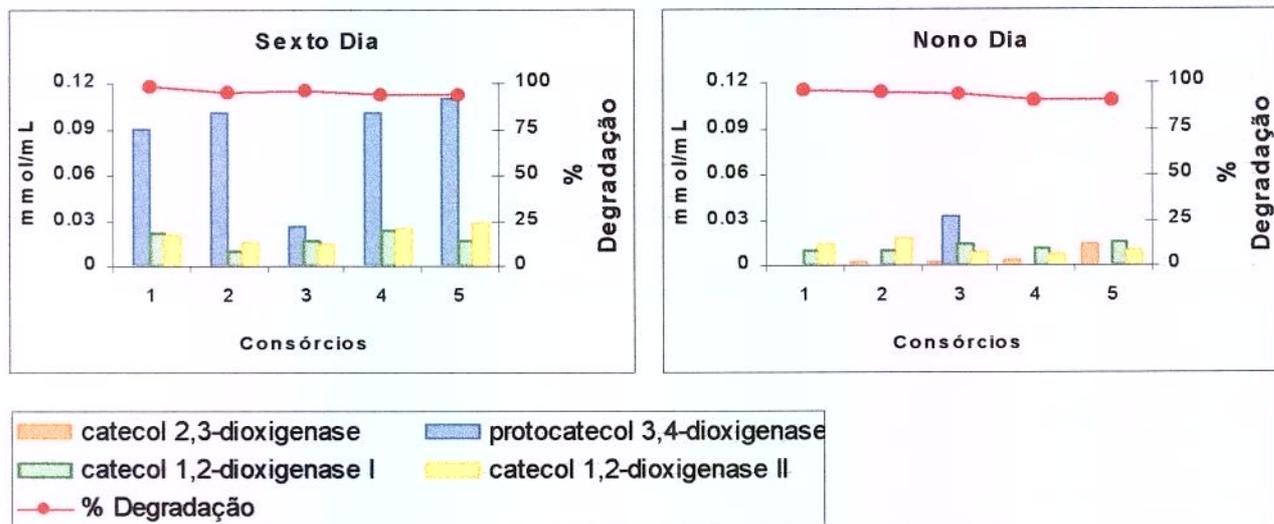


Figura IV. 25. Atividades enzimáticas e porcentagem de degradação das linhagens bacterianas em consórcio e cultivadas durante nove dias em meio contendo cristais de fluoreno.

Apenas a enzima catecol 2,3-dioxigenase não foi produzida em nenhum consórcio. Com nove dias de cultivo a enzima protocatecol 3,4 dioxigenase só foi produzida no consórcio 3.

Quando as linhagens foram submetidas em consórcio, altos índices de degradação do fluoreno foram obtidos (mais de 90%), no sexto e nono dias de cultivo. O fato das linhagens inoculadas, separadamente, em meio contendo cristais de fluoreno, não apresentarem esta taxa de degradação pode estar relacionado a fatores de inibição, uma vez que a toxicidade ou antagonismo ao composto pode causar inibição (Bouchez *et al.*, 1995).

➤ Pireno

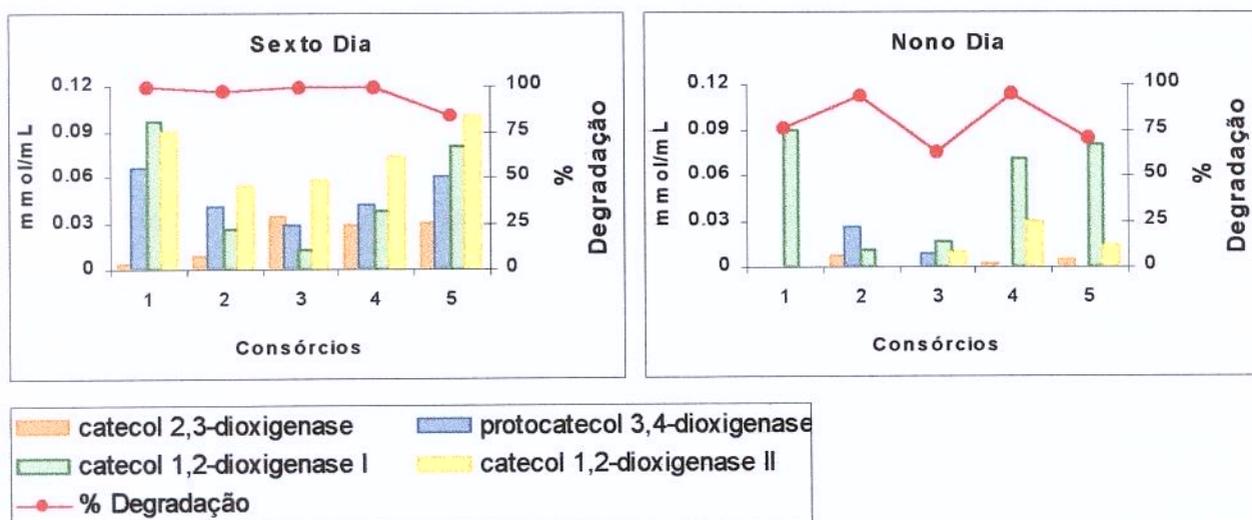


Figura IV. 26. Atividades enzimáticas e porcentagem de degradação das linhagens bacterianas em consórcio e cultivadas durante nove dias em meio contendo cristais de pireno.

Com seis dias de cultivo todas as enzimas foram produzidas, quando as linhagens foram submetidas em consórcio. No nono dia de crescimento, este quadro mudou, ressaltando o consórcio 1 que só apresentou a enzima catecol 1,2-dioxigenase I. Assim como obtido com fluoreno, o pireno também foi utilizado como fonte de carbono, visto que sua taxa de degradação foi alta, principalmente no sexto dia de cultivo.

Nesta etapa do trabalho pôde-se observar que as linhagens submetidas em consórcio conseguiram utilizar os HAPs como fonte de carbono, em menos tempo de cultivo (nove). Uma vez que as linhagens puras necessitaram, em média, de quinze dias de incubação para degradar os compostos aromáticos (naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno).

O metabolismo “coletivo” dos microrganismos pode aumentar a utilização dos HAPs, ou seja, a biotransformação de produtos intermediários de um microrganismo pode servir como substrato para o catabolismo e crescimento de outros (Wiesel *et al.*, 1993).

Linhagens em consórcio, degradaram mais rapidamente compostos de maior massa molar – fluoreno e pireno – em relação aos HAPs de menor massa molar – naftaleno e antraceno. Estes resultados contrariam a literatura (Stapleton *et al.*, 1998; Cerniglia, 1992); que relatam que a biodegradação dos compostos aromáticos é inversamente proporcional ao número de anéis benzênicos. Este fato pode estar relacionado a alguns fatores citados abaixo:

- a) HAPs de menor massa molar são mais “solúveis” em meio de cultivo, quando comparados com os de maior massa molar, por este motivo, naftaleno e antraceno, estariam mais “disponíveis” as linhagens bacterianas. Essa maior disponibilidade poderia ser tóxica aos microrganismos (Lee *et al.*, 1992; Sims & Overcash, 1983);
- b) As linhagens podem produzir enzimas que teriam maior especificidade a compostos de maior massa molar, principalmente o pireno.

Através dos resultados pôde-se concluir que pelo menos uma das enzimas foi produzida nos consórcios e as linhagens submetidas em diferentes consórcios (consórcios 1 a 5), apresentaram alta porcentagem de degradação do fluoreno e pireno, no sexto dia de cultivo.

Etapa IV. Determinação da Degradação de HAPs por Cromatografia Gasosa

Esta etapa do trabalho teve como objetivo estudar a degradação dos HAPs por cromatografia gasosa (CG), visando estabelecer a rota metabólica das bactérias quando cultivadas nestes compostos.

A porcentagem de degradação foi calculada em comparação com a área dos experimentos controle, estando os resultados mostrados conforme a fonte de carbono utilizada (Tabela IV.16.).

Tabela IV.16. Porcentagem de degradação de HAPs pelas bactérias cultivadas durante nove dias e analisadas por CG.

Linhagens	Degradação (%)			
	Naftaleno	Antraceno	Fluoreno	Pireno
<i>B. badius</i>	80	78	79	91
<i>E. aglomerans</i>	56	67	75	85
<i>B. sphaericus</i>	75	92	84	79
<i>B. cereus</i>	65	58	79	88

Assim como demonstrado em CLAE; em CG também detectou-se consumo dos HAPS pelas bactérias, visto que os mesmos foram degradados.

Na oxidação bacteriana dos HAPs, uma dioxigenase introduz oxigênio molecular no anel aromático formando um composto *cis*-dihidrodiol. O dihidrodiol através de vários passos enzimáticos formam o catecol, que posteriormente será convertido em intermediários que entrarão no ciclo de Krebs (Chaudhry & Chapalamadugu, 1991; Reineke & Knackmuss, 1988). Nesta etapa, detectou-se catecol produzido pelas linhagens bacterianas, cultivadas em antraceno, fluoreno e pireno, indicando, assim, que o anel aromático do HAP foi atacado pelas dioxigenases das bactérias. O catecol é um composto fenólico que existe em grandes quantidades em plantas superiores, algumas frutas (Delage *et al.*, 1991), vegetais (Xiong *et al.*, 1993), tabaco e alguns medicamentos tradicionais chineses (Zhang *et al.*, 1996). Este composto apresenta algumas funções, como: antioxidantes (Zhu & Xiao, 1991), antivirais (Zhang *et al.*, 1996) e estimulam o florescimento de algumas plantas (Sun *et al.*, 2000). Por este motivo, existe um interesse comercial em relação a produção de catecol.

As Figuras IV. 27. a IV. 29, demonstram o perfil cromatográfico das linhagens que apresentaram maior taxa de degradação dos compostos estudados (Tabela IV. 16).

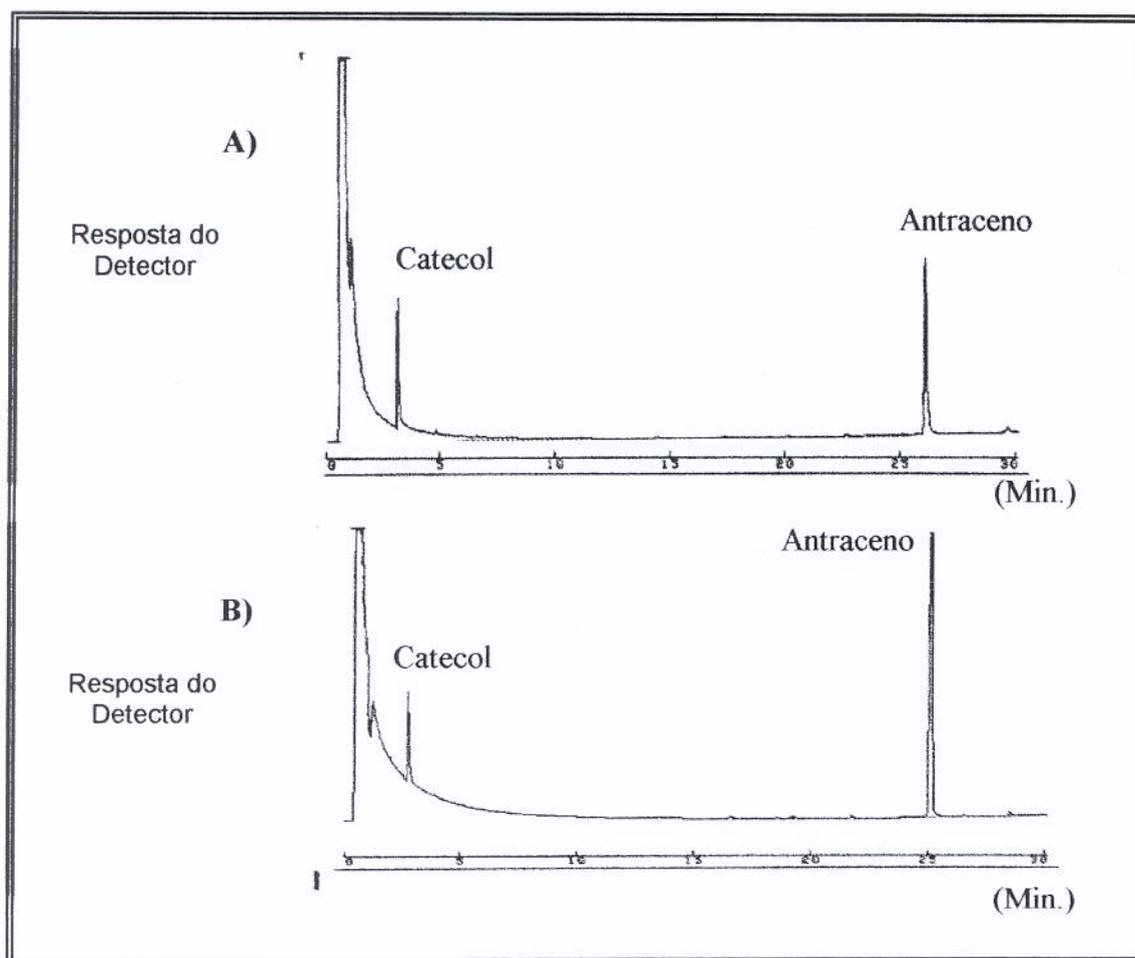


Figura IV.27. Cromatograma do HAP da linhagem *B. sphaericus* cultivado por nove dias em meio contendo cristais de antraceno, sendo (A) amostra mostrando o acúmulo de catecol e antraceno e (B) amostra padrão.

Coluna: capilar, Supelcowx-10, 30m x 0,53 mm d.i, espessura de filme 1 μ m.
Condições cromatográficas: vazão do gás de arraste hélio 1 mL/min, temperatura inicial da coluna: 100°C, tempo inicial: 2 min, taxa de programação: 5°C/min., temperatura final da coluna: 280 °C, tempo final: 5 min., temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 280°C, detector FID, razão de split: 25:1, volume da amostra injetado: 1 μ L.

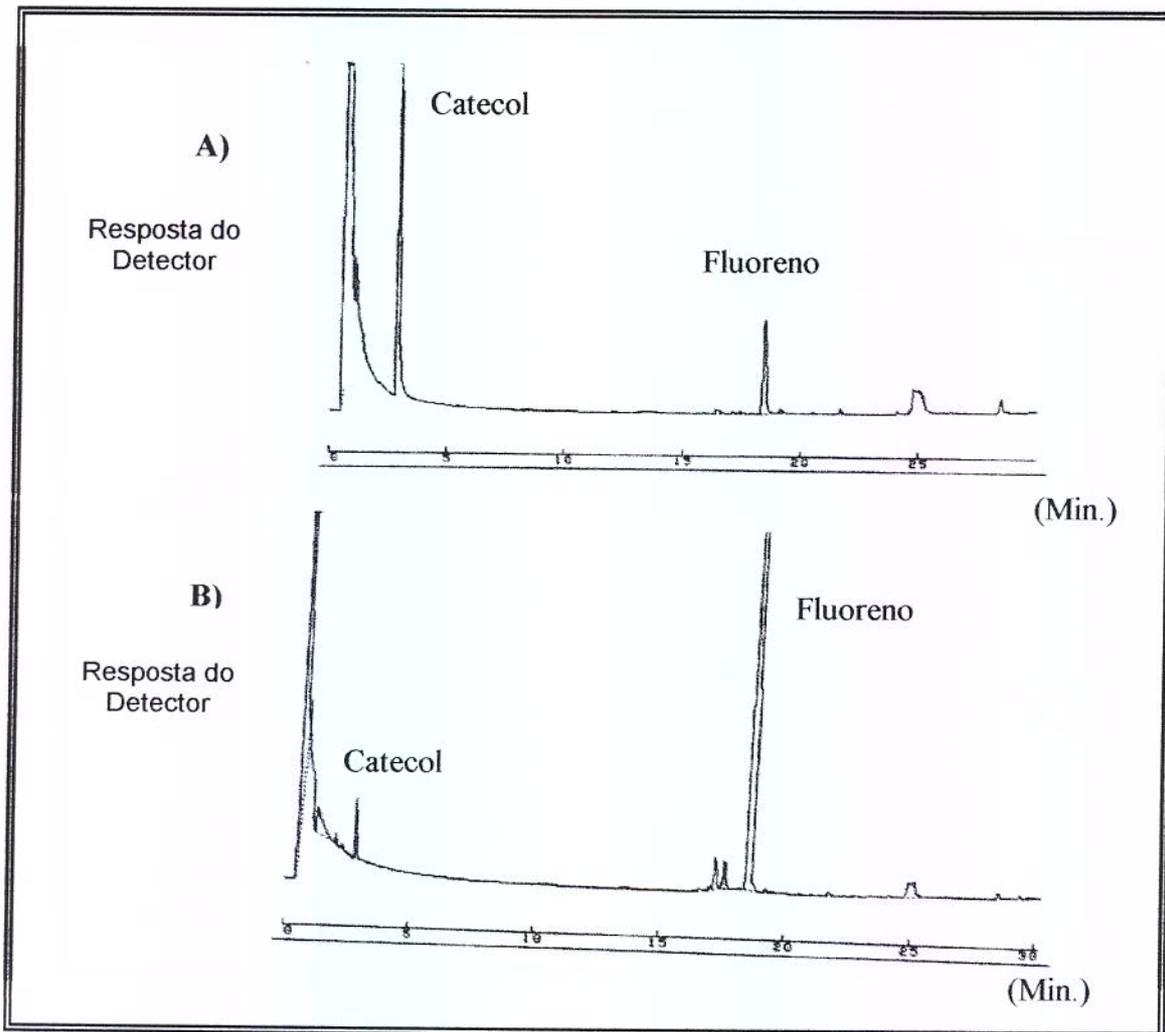


Figura IV.28. Cromatograma do HAP da linhagem *B. sphaericus* cultivado por nove dias em meio contendo cristais de fluoreno, sendo (A) amostra mostrando o acúmulo de catecol e fluoreno e (B) amostra padrão.

Coluna: capilar, Supelcowx-10, 30m x 0,53 mm d.i, espessura de filme 1 μ m. Condições cromatográficas: vazão do gás de arraste hélio 1 mL/min, temperatura inicial da coluna: 100°C, tempo inicial: 2 min, taxa de programação: 5°C/min., temperatura final da coluna: 280 °C, tempo final: 5 min., temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 280°C, detector FID, razão de split: 25:1, volume da amostra injetado: 1 μ L.

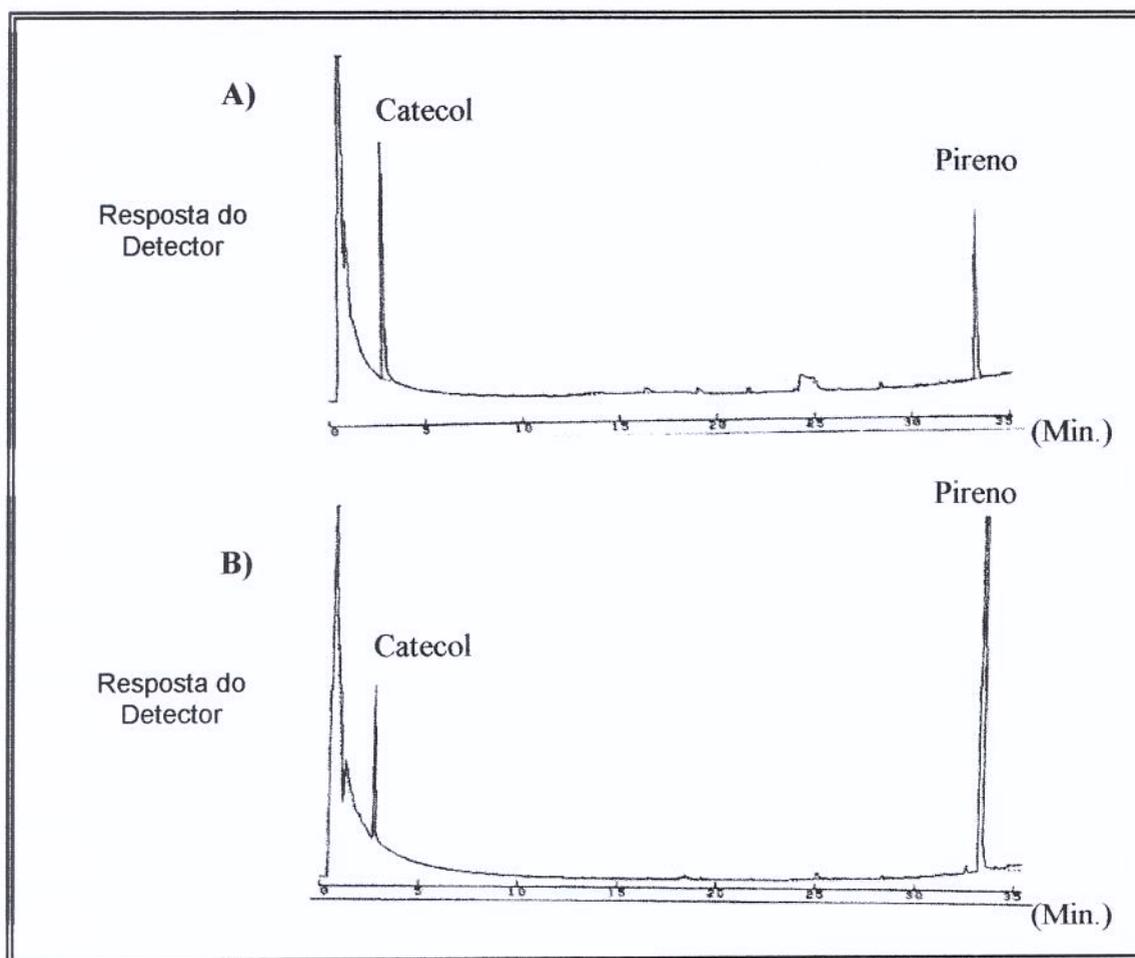


Figura IV.29. Cromatograma do HAP da linhagem *B. badius* cultivado por nove dias em meio contendo cristais de pireno, sendo (A) amostra mostrando o acúmulo de catecol e pireno e (B) amostra padrão.

Coluna: capilar, Supelcowx-10, 30m x 0,53 mm d.i, espessura de filme 1 μ m.
Condições cromatográficas: vazão do gás de arraste hélio 1 mL/min, temperatura inicial da coluna: 100°C, tempo inicial: 2 min, taxa de programação: 5°C/min., temperatura final da coluna: 280 °C, tempo final: 5 min., temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 280°C, detector FID, razão de split: 25:1, volume da amostra injetado: 1 μ L.

Com este trabalho foi possível selecionar e identificar três linhagens Gram positivas (*Bacillus badius*; *Bacillus sphaericus* e *Bacillus cereus*) e uma linhagem Gram negativa (*Enterobacter agglomerans*), de solos contaminados com uma mistura de óleos, com capacidade de degradar naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno. Compostos, estes, que apresentam atividade tóxica quando descartados no meio ambiente (Acaro *et al.*, 1999; Till *et al.*, 1999; Santodonato, 1997).

Devido a dificuldade de algumas células em metabolizar hidrocarbonetos aromáticos, por apresentarem baixa solubilidade em água ou serem instáveis, investigou-se a interação dessas bactérias com os HAPs, através de análises enzimáticas; de produção de biosurfactantes; interação quando estabelecidas em consórcio; degradação por CLAE e caracterização de produtos via cromatografia gasosa.

Para a degradação dos HAPs, utilizando análises de culturas após exposição das linhagens *B. badius*, *E. agglomerans*, *B. sphaericus* e *B. cereus* ao antraceno, fluoreno e pireno, identificou-se o catecol como subproduto do processo de degradação desses compostos. A oxidação de antraceno, fluoreno e pireno à catecol foi demonstrada através das atividades de catecol 2,3-dioxigenase, protococatecol 3,4-dioxigenase e/ou catecol 1,2-dioxigenase I e II.

O metabolismo desses composto foi investigada por vários pesquisadores. Monohar *et al.* (1999) isolaram uma linhagem de *Pseudomonas* sp NGK1, capaz de degradar antraceno, formando intermediários de 1,2-dihidroxi-antraceno, salicilato e catecol.; e produzir enzima catecol 2,3-dioxigenase. Já Milo *et al.* (1999) caracterizaram a enzima catecol 2,3-dioxigenase de um *Bacillus* termofílico. Cenci *et al.* (1999) isolou dez diferentes linhagens de *Pseudomonas* capazes de expressar diferentes enzimas dioxigenases (catecol 1,2-dioxigenase; catecol 2,3-dioxigenase e

protocatecol 2,3-, 3,4- e 4,5-dioxigenases), quando cultivadas em compostos aromáticos.

As linhagens estudadas, demonstraram ampla versatilidade metabólica, visto a capacidade em degradar naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno, além de crescerem em compostos monoaromáticos (tolueno e m-xileno) e utilizarem Tween 20 e 80 como fonte de carbono. Isto indica que as mesmas possam transformar outros hidrocarbonetos aromáticos, através dessas dioxigenases que parecem não apresentar especificidade a um substrato. Características, similares, não tem sido muito descritas em relação a bactérias isoladas de ambientes não contaminados. O fato de um mesmo microrganismo apresentar capacidade em degradar hidrocarbonetos aromáticos como naftaleno e monoaromáticos, como o-xileno é incomum (Gennaro *et al.* 2000). Por outro lado, quando as bactérias são expostas à compostos tóxicos, uma forte pressão aplicada pelos poluentes, induz seleção dos microrganismos presentes (Herrick *et al.*, 1997; Wunsche *et al.*, 1995). Vários pesquisadores relatam este fato com bactérias do gênero *Rhodococcus* (Uz *et al.*, 2000; Bickerdike *et al.*, 1997; Warhurst *et al.* 1994), e do gênero *Pseudomonas* (Leblond *et al.*, 2001; Cenci *et al.* 1999; Balashova *et al.* 1999) com capacidade em utilizar uma variedade de compostos xenobióticos. No entanto, pouco se sabe sobre o metabolismo de bactérias do gênero *Bacillus* (Doddamani & Ninnekar, 2000; Milo *et al.*, 1999; Shimura *et al.*, 1999) e bactérias Gram negativas, do gênero *Klebsiella* (Mansi – El *et al.*, 2000), espécie essa bioquimicamente similar a família *Enterobacteriaceae*.

Portanto, este estudo representa uma tentativa de elucidar a interação entre as bactérias com relação a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, visto que a coexistência de diferentes vias catabólicas num mesmo microrganismo pode ser uma vantagem da linhagem que pode crescer e sobreviver na presença de diferentes

substratos, mesmo sendo poluentes tóxicos (Hedlund *et al.*, 1999; Kaschabek *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 1996; Harms, 1996), com isso um significativo impacto no ambiente contaminado pode ocorrer, uma vez que as enzimas responsáveis pela degradação dos HAPs apresentam amplo espectro de atividades, que podem evoluir para novas rotas degradativas para o catabolismo de compostos recalcitrantes, resultando em maior remoção dos mesmos do meio ambiente.

7. REFERÊNCIAS

- Acaro, K. F., O'Keef, P. W., Yang, Y., Clayton, W., Gierthy, J. F. Antiestrogenicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast cancer cells. **Toxicology**. 1999. v. 133, p. 115-117.
- Baggi, G.; Barbieri, P.; Galli, E., Tollari, S. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades o-xylene. **Applied Environment Microbiology**. 1987. v. 53, p. 2129 – 2132.
- Balajee, S., Mahadevan, A. Influence of temperature on growth, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation and plasmid transfer in *azotobacter chroococcum*. **Biotechnology Technology**. 1991. v 5, p. 55-56.
- Balan, D. S. L. **Descoloração de corantes e efluentes têxteis**. Trabalho apresentado ao II Workshop sobre Biodegradação. Campinas, 2001.
- Balashova, N. V., Kosheleva, I. A., Golovchenko, N. P., Boronin, A. M. Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains. **Process Biochemistry**. 1999 v. 35, 291 – 296.
- Barbosa, H. R.; Torres, B. B. (Eds) **Microbiologia Básica**. 1998. Editora Ateneu, 196p.
- Bickerdike, S. R.; Holt, R. A. Stephens, G. M. Evidence for metabolism of o-xylene by simultaneous ring and methyl group oxidation in a soil isolate. **Microbiology**. 1997. v. 143, p. 2321-2329.
- Bidaud, C.; Minh-T, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons (HAPs) biodegradation in the soil of a former gasworks site: selection and study of PAHs-degrading microorganisms. **Journal Molecular Catalytic B-Enzymatic**. 1998. v. 5, p. 417 – 421.
- Bouchez, M.; Blanchet, D., Vandecasteele, J-P. Degradation of polycyclic aromatic-hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations - inhibition phenomena and cometabolism. **Applied Microbiology Biotechnology**. 1995. v. 43, p. 156 – 164.
- Burlage, R. S.; Hooper, S. W., Sayler, G. S. The tol (pww0) catabolic plasmid. **Applied Environment Microbiology**. 1989. v. 55, p. 1323-1328.
- Bury, S. J., Miller, C. A. Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons. **Environment Science Technology**. 1993. v. 27, p. 104.

- Cenci, G.; Galdini, G.; Boari, L. Dioxygenase activity relative behaviour of *Pseudomonas* strains from soil in the presence of different aromatic compounds. **World Journal Microbiology Biotechnology**. 1999. v. 15, p. 47 – 52.
- Cerniglia, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**. 1992. v. 3, p. 351 – 368.
- Chapman, P. J. Degradation mechanisms. *In*: Bourquian, A. W. & Pritchard P. H. (Eds). **Precedings of the workshop: Microbial Degradation of Pollutants in Marine Enviroments. U. S. Enviroment Protection Agency, Gulf Breeze**. 1979. p. 28-66.
- Chaudhry, G. R., Chapalamadugu, S. Biodegradation of halogenated organic-compounds. **Microbiology Review**. 1991. v. 55, p. 59 – 79.
- Conceição, D. M.; Bidoia, E. D.; Angelis, D. A.; Angelis, D. F. **Detecção de fenol-oxidase em fungos filamentosos isolados do rio Atibaia, visando biodegradação de compostos fenólicos**. Trabalho apresentado ao II Workshop sobre Biodegradação. Campinas, 2001.
- Cooper, D., Goldenberg, B. G.. **Applied Environment Microbiology**. 1987. v. 53, p. 224-229.
- Dagley, S. Biochemical approach to some problems of environmental-pollution. **Essays Biochemistry**. 1975. v. 11, p. 81 – 138.
- Delage, E., Bohuon, G., Baron, A., Drilleau, J. F. **Journal Chromatography**. 1991. v. 555, p. 125.
- Deschenes, L.; Lafrance, P.; Villeneuve, J. P. & Sanson, R. Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil **Applied Microbiology Biotechnology**. 1996. v.46, p. 638 – 646.
- Doddamani, H. P., Ninnekar, H. J. Biodegradation of phenanthrene by a *Bacillus* species. **Current Microbiology**. 2000. v. 41, p. 11 – 14.
- Dorn, E., Knackmuss, H-J. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. **Biochemistry Journal**. 1978. v. 174, p. 73 – 84.
- Edward, J. C. Principles and Pesticides for Petroelum Contaminates Soil. Lewis Publishers, New York. 1993.
- Enseley, B. D., Gibson, D. T. Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase compounds. **Journal Bacteriology**. 1983. v. 155, p. 505-511.

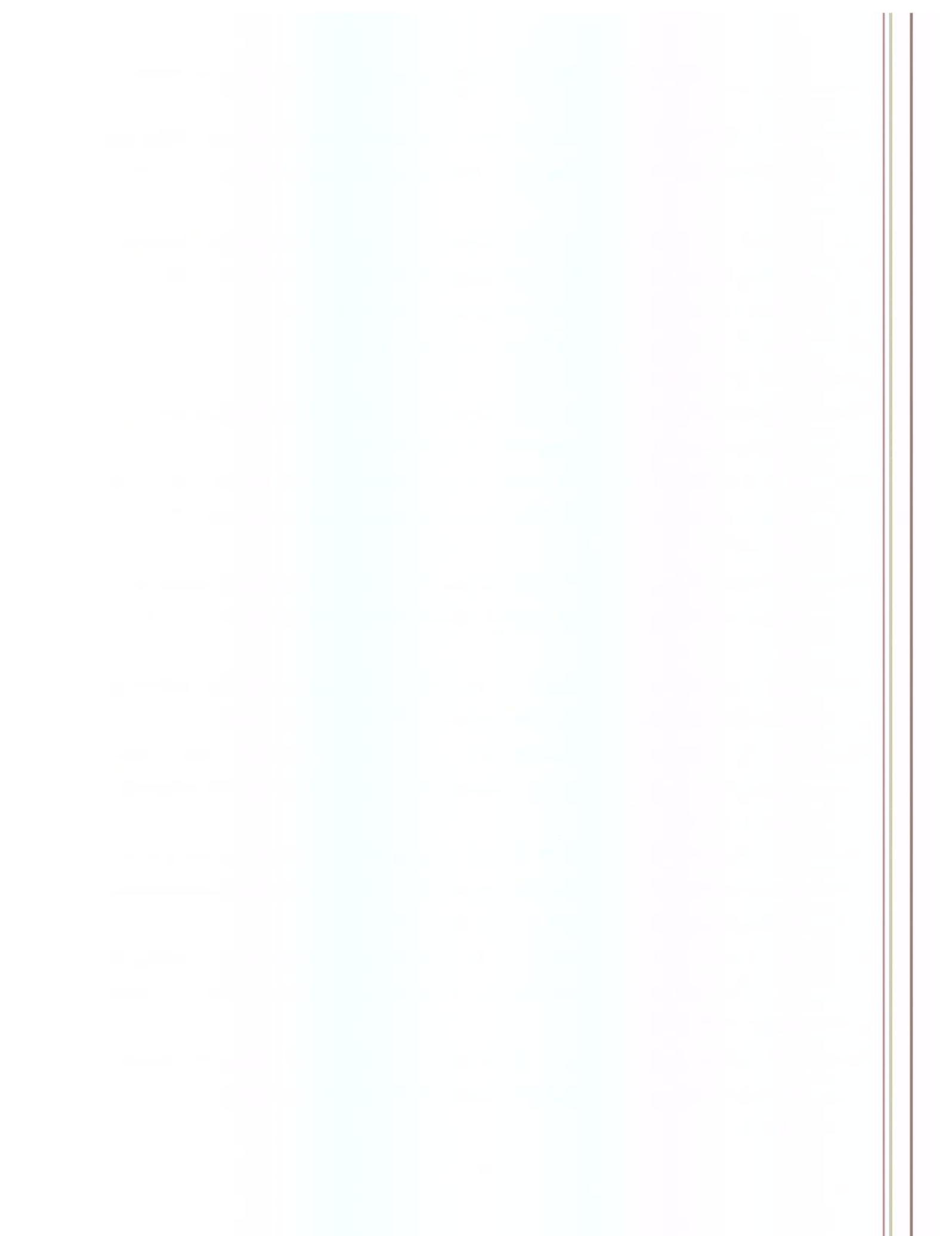
- Filonov, A. E., Karpov, A. V., Kosheleva, I. A., Puntus, I. F., Balashova, N. V., Boronin, A. M. The efficiency of salicylate utilization by *Pseudomonas putida* strains catabolizing naphthalene via different biochemical pathways. **Process Biochemistry**. 2000. v. 35, p. 983 – 987.
- Fujisawa, H., Hayaishi, O. Protochatechuate 3,4 – Dioxygenase. **Journal of Biology Chemical**. 1968. v. 243, p. 2673 – 2681.
- Gennaro, Di F., Galli, E., Orsini, F., Pelizzoni, F., Sello, G., Bestetti, G. Development of biocatalysts carrying naphthalene dioxygenase and dihydrodiol dehydrogenase genes inducible in aerobic and anaerobic conditions. **Research Microbiology**. 2000. v. 151, p. 383 – 391.
- Ginkel, Van G. G. **Biodegradation**. 1996. v.7, p. 151-164.
- Gutnick, D. L., Rosenberg, E. Oil tankers and pollution - microbiological approach. **Ann. Review Microbiology**. 1977. v. 31, p. 379 – 396.
- Hahn, D. R., Solenberg, P. J., Baltz, R. H. Tn5099 a xylE promoter probe transposon for *Streptomyces* spp. **Journal Bacteriology**. 1991. v. 173, p. 5573-5577.
- Haigler, B. E., Gibson, D. T. purification and properties of ferredoxin NAP a component of naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816. **Journal Bacteriology**. 1990. v. 172, p. 465 – 468.
- Harayama, S., Kok, M., Nedleid, A. V. Functional and evolutionary relationship among diverse oxygenases. **Annul Review Microbiology**. 1992. v. 46, p. 565 – 601.
- Harms, H. Bacterial growth on distant naphthalene diffusing through water, air and water-saturated and nonsaturated porous media. **Applied Environment Microbiology**. 1996 v. 62, p. 2286 – 2293,
- Hedlund, B. P.; Geiselbrecht, A. D.; Bair, T. J.; Staley, J. T. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. Nov., sp. nov. **Applied Environment Microbiology**. 1999. v. 65, p. 251 – 259.
- Hegman, G. D. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**. 1966. v. 91, p. 1140 – 1154.
- Herrick, J. B.; Keil-S, K. G.; Ghiorse, W. C.; Madsen, E. L. Natural horizontal transfer of a naphthalene dioxygenase gene between bacteria nativa to a coal tar-contaminated field site. **Applied Environment Microbiology**. 1997 v. 63, p. 2330-2337.

- Iqbal, S.; Khallid, Z. M. & Malik, K. A. Enhanced biodegradation and emulsification of crude-oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma-ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letter Applied Microbiology**. 1995. v. 21, p. 176 – 179.
- Johnson, V.; Singh, M.; Saini, V. S.; Adhikardi, D. K.; Sista, V., Yadav, N. K. Transformation of vegetable-oils by an oleaginous yeast - *Rhodotorula glutinis* iip-30. **Biotechnology Letter**. 1992. v. 6, p. 487-490.
- Karegoudar, T. B.; Kim, C. K. Microbial degradation of monohydroxybenzoic acids. **Journal Microbiology**. 2000. v. 38, p. 53 – 61.
- Kaschabeck, S. R.; Kasberg, T.; Muller, D.; Mars, A. E.; Janssen, D. B.; Reineke, W. Degradation of chloroaromatics: purification and characterization of a novel type of chlorocatechol 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas putida* GJ31. **Journal Bacteriology**. 1998. v. 180, p. 296 – 302.
- Leblond, J. D.; Schultz, T. W.; Sayler, G. S. Observations on the preferential biodegradation of selected components of polyaromatic hydrocarbon mixtures. **Chemosphere**. 2001, v. 42, p. 333 – 343.
- Lee, L. S.; Rao, P. S. C., Okuda, I. Equilibrium partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal tar to water. **Environment Science Technology**. 1992 v. 26, p. 2110 – 2115.
- Li, G.; Huang, W.; Lerner, D. N., Zhang, X. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. **Water Research**. 2000. v. 34, p. 3845 – 3853.
- Mansi – El, M.; Anderson, K. J.; Inche, C. A.; Knowles, L. K.; Platt, D. J. Isolation and curing of the *Klebsiella pneumoniae* large indigenous plasmid using sodium dodecyl sulphate. **Research Microbiology**. 2000 v. 151, p. 201 – 208.
- Mars, A. E.; Kingma, J.; Kaschabeck, S. R.; Reineke, W.; Janssen, D. B. Conversion of 3-chlorocatechol by various catechol 2,3-dioxygenase and sequence analysis of the chlorocatechol dioxygenase region of *Pseudomonas putida* GJ31. **Journal Bacteriology**. 1999. v. 181, p. 1309 – 1318.
- Meyer, S.; Moser, R.; Neef, A.; Stal, U.; Kampfer, P. Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. **Microbiology-UK**. 1999. v. 145, p. 1731 – 1741.

- Milo, R. E; Duffner, F. M., Muller, R. Catechol 2,3-dioxygenase from the thermophilic, phenol-degradating *Bacillus thermoleovorans* strain A2 has unexpected low thermal stability. **Extremophiles**. 1999. v. 3, p. 185 – 190.
- Mlynarz, T., Ward, O. P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures obtained from PAH – contaminated soil. **Canadian Journal Microbiology**. 1995. v. 41, p. 470 – 476.
- Monohar, S., Kim, C. K.; Karegoudar, T. B. Degradation of anthracene by a *Pseudomonas* strain, NGK 1. **Journal Microbiology**. 1999. v. 37, p. 73 – 79.
- Mueller, J. G.; Chapman, P. J.; Blattmann, B. O., Pritchard, P. H. Isolation and characterization of a fluoranthene – utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*. **Applied Environment Microbiology**. 1990. v. 56, p. 1079 – 1086.
- Patel, T. R. and Gibson, D. T. Purification and properties of (+) cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. **Journal Bacteriology**. 1974. v. 119, p. 879 – 888.
- Rehmann, K.; Noll, H. P.; Steinberg, C. E. W.; Kettrup, A. A. Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KR2. **Chemosphere**. 1997. v. 36, p. 2977 – 2992.
- Reineke, W., Knackmuss, H-J. Microbial-degradation of haloaromatics **Annul Review Microbiology**. 1988. v. 42, p. 263 – 287.
- Robert, E. R. Bioremediation of Petroleum Contaminated Sites. CK Smoley Publishers, New York. 1992.
- Roch, F., Alexander, M. Biodegradation of hydrophobic compounds in the presence of surfactants. **Environment Toxicology. Chem.** 1995. v.14, p. 1151 – 1158.
- Romantchuk, M., Sarand, I., Petänen, T., Peltola, R.; Vihanne – J., M.; Koivula, T.; Yrjälä, K.; Haahtela, K. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. **Environment Pollution**. 2000. v. 107, p. 179 – 185.
- Rosato, Y. B. Biodegradação de Petróleo. In: *Microbiologia Ambiental*. Mello, I. S., Azevedo, J. L. Eds. **Embrapa – CNPMA**. 1997. p. 307-334.
- Rouse, J. D; Sabatini, D. A.; Suflita, J. M., Harwell, J. H. Influence of surfactants on microbial-degradation of organic-compounds. **Critical Review Environment Science Technology**. 1994. v. 24, p. 325-370.

- Santodonato, J. Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. **Chemosphere**. 1997. v. 34, p. 835 – 848.
- Schneider, J.; Grosser, R.; Jayasimhulu, K.; Xue, W. Warshawsky, D. Ddegradation of pyrene, benz(a)anthracene, and benzo(a)pyrene by Mycobacterium sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. **Applied Environment Microbiology**. 1996. v. 62, p. 13 – 19.
- Shimura, M., Mukerjee-Dhar, G., Kimbara, K., Nagato, H.; Kiyohara, H., Hatta, T. Isolation and characterization of a thermophilic Bacillus sp. JF8 capable of degradading polychlorinated biphenyls and naphthalene. **FEMS Microbiology Letter**. 1999. v. 178, p. 87 – 93.
- Sigma. **Citações e referências a documentos eletrônicos**.
 <<http://www.sigald.sial.com/sigma/proddata/p1754.html> > Acesso em: 22 agosto 2001.
- Sims, R. C.; Overcash, M. R. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. **Residues Review**. 1983. v. 88, p. 1 – 68.
- Sobisch, T.; Heb, H.; Neibelscheiitz, H., Schmidt, V. Colloid and Surfaces A: Physicochem. **And Engen. Aspects**. 2000. v. 162, p. 1 –14.
- Solanas, A. M.; Feng, J. Fluoreno Degradation Pathway Map. **Citações e referências a documentos eletrônicos**. <http://www.labmed.umn.edu/umbbd/flu/flu_map.html > Acesso em: 13 agosto 1999
- Stapleton R. D.; Savage, D. C.; Sayler, G. S., Stacey, G. Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment. **Applied Environment Microbiology**. 1998. v. 64, p. 4180 – 4184.
- Sullivan, D. **Citações e referências a documentos eletrônicos**. <http://www.bostick-sullivan.com/Technical_papers/tween20.html > Acesso em: 22 agosto 2001.
- Sun, Y-G., Cui, H., Li, Y-H., Lin, X-Q. Determination of some catecol derivates by flow injection electrochemiluminescent inhibition method. **Talanta**. 2000. v. 53, p. 661-666.
- Till, M.; Riebinger, D.; Schimitz, H-J., Schrenck, D. Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures. **Chem. Biol. Interact**. 1999. v. 117, p. 135 – 150.
- Trenz, S. P.; Engesser, K. H.; Fischer, P., Knackmuss, H-J. Degradation of fluorene by brevibacterium sp strain dpo-1361 - a novel c-c bond-cleavage mechanism via 1,10-dihydro-1,10-dihydroxyfluoren-9-one **Journal Bacteriology**. 1994. v.176, p. 789-795.

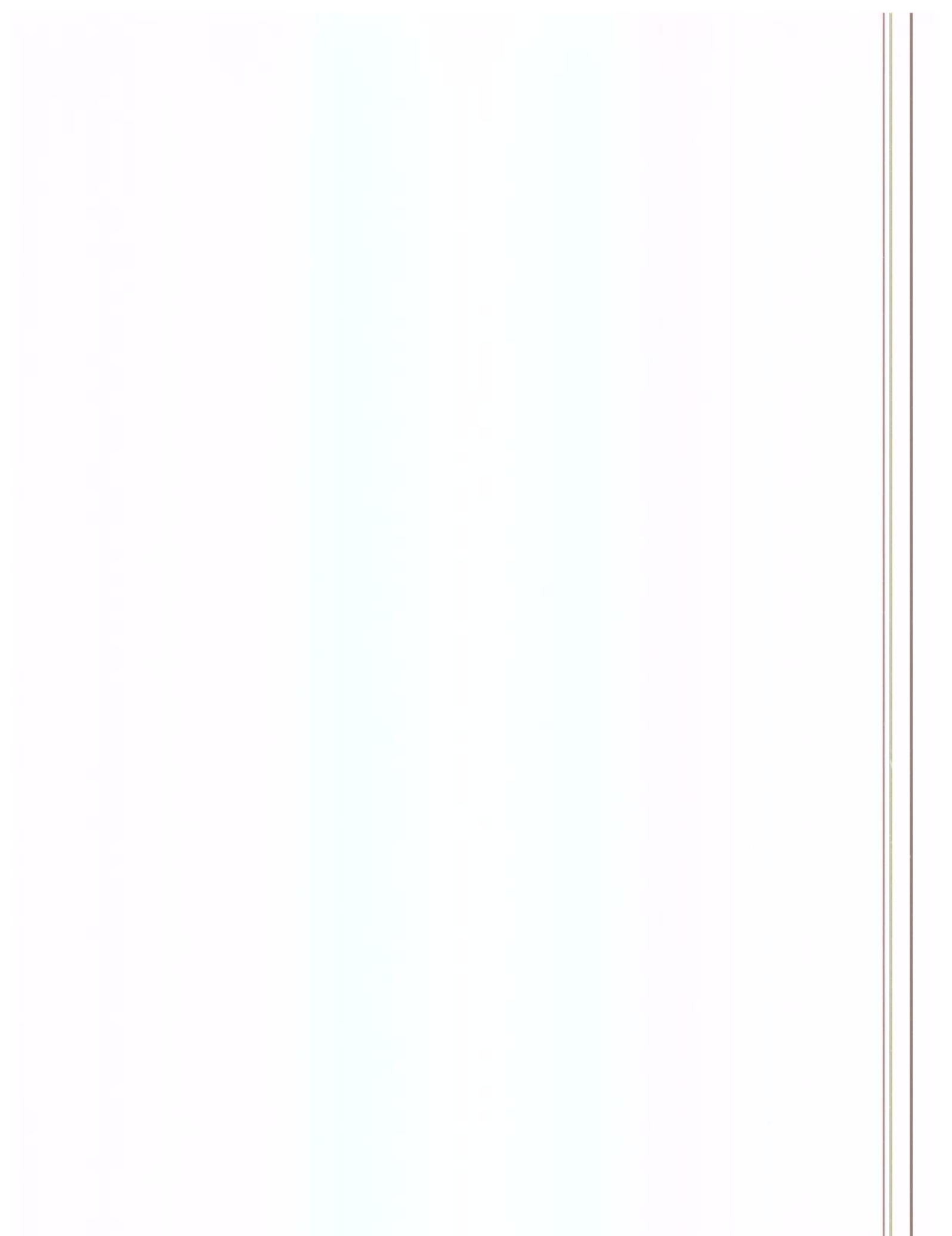
- Tuhácková, J.; Cajthaml, T.; Novák, K., Novotný, C.; Mertelík, J. Hydrocarbon deposition and soil microflora as affected by highway traffic. **Environment Pollution**. 2001. v. 113, p. 255 – 262.
- Uz, I., Duan, Y.P., Orgram, A. Characterization of naphthalene-degrading bacterium, *Rhodococcus opacus* M213. **FEMS Microbiology Letter**. 2000. v. 185, p. 231 – 238.
- Xiong, F., Yuan, L., Lu, C., Chin, J. **Chromatography**. 1993. v. 11, p. 246.
- Zhang, D. Z., Li, Z., Jiamg, Y. **Journal Pharm. Anal.** 1996. v. 16, p. 83.
- Zhu, M., Xiao, P. **Phytother Reserch**. 1991. v. 5, p. 239.
- Walter, V.; Beyer, M.; Klein, J., Rehm, H-J. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp. VW1. **Applied Microbiology Biotechnology**. 1991. v. 34, p. 671 – 676.
- Warhurst, A. M.; Clarke, K. F. Hill, R. A.; Holt, R. A., Fewson, C. A. Metabolism of styrene by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB13259. **Applied Environment Microbiology**. 1994 v. 60, p. 1137 – 1145.
- Wiesel, I.; Wübker, S. M., Rehm, H. J. Degradation of polycyclic aromatic-hydrocarbons by an immobilized mixed bacterial culture **Applied Microbiology Biotechnology**. 1993. v. 39, p. 110-116.
- Willunsen, P. A.; Karlson, U., Pritchard, P. H. Response of fluoranthene-degrading bacteria to surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**. 1998. v. 50, p. 475 – 483.
- Wilson, L. P., Bouwer, E. J. Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: A review. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**. 1997. v.18, p. 116-130.
- Wunsche, L.; Bruggemann, L.; Babel, W. Determination of substrate utilization patterns of soil microbial communities: an approach to assess population changes after hydrocarbons pollution. **FEMS Microbiology Ecology**. 1995. v. 17, p. 295 – 306.
- Yeh, D. H.; Pennell, K. D., Pavlostathis, S. G. Toxicity and biodegradability screening of nonionic surfactants using sediment-derived methanogenic consortia **Water Science Technology**. 1998. v.38, p. 55-62.
- Yeom, I. T.; Ghosh, M. M., Cox, C. D. Micellar solubilization of polynuclear aromatic hydrocarbons in coal tar-contaminated soils. **Environment Science technology**. 1996. v. 30, p. 1589-1595.



... e assim termina”

CAPÍTULO V

CONSIDERAÇÕES
FINAIS E CONCLUSÃO
GERAL



1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Está bem estabelecido que os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), existem na forma de diversos multi-componentes misturados em locais contaminados pela conversão de carvão e creosoto.

Por exemplo, uma análise superficial de extrato de fluido crítico de solos contaminados com carvão, Yu *et al.* (1990) identificou 120 diferentes HAPs que variaram em massa molar de 128 g mol^{-1} (naftaleno) a 302 g mol^{-1} (dibenzo(a,e)pireno). Entre muitos estudos reportando a capacidade de bactérias de biotransformarem ou biodegradarem os HAPs (Leblond *et al.*, 2001; Uz *et al.*, 2000; Shimura *et al.*, 1999), o presente, demonstrou a capacidade de quatro linhagens bacterianas (*Bacillus badius*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus cereus*) em utilizar naftaleno, antraceno, fluoreno e pireno como fonte de carbono. A capacidade de biodegradação dos HAPs que ocorreu nestes microrganismos chama-se adaptação (Spain *et al.*, 1990). Respostas adaptativas tem sido observadas em culturas puras, ambientes aquáticos, solos e aquíferos (Moorman, 1990).

Quando os microrganismos são expostos a um determinado HAP, há geralmente um período inicial de adaptação e nenhuma transformação ocorre. Esta fase finaliza-se quando o início de degradação é detectado. Estratégias genéticas e bioquímicas para adaptação e biodegradação incluem indução enzimática, mutação, transferência e rearranjo do material genético. Estes mecanismos isolados ou em combinação contribuem para mudança nas taxas de biodegradação, observadas depois que os microrganismos são expostos aos substratos (Spain & Vanveld, 1983). Um longo período de adaptação poderia acomodar mudanças genéticas como um mecanismo do microrganismo. Van der Meer *et al.* (1994)

preconizaram duas possibilidades para a adaptação dos microrganismos às moléculas sintéticas: a) existência de enzimas nas células microbianas que reconhecem a estrutura do composto como substrato, conduzindo a uma “adaptação bioquímica” celular; b) alteração do sistema enzimático, pelo estímulo na expressão de novos genes necessários a conversão do composto conduzindo a uma “adaptação genética” celular.

A produção de emulsificantes pode ser considerado como uma forma dessas linhagens em aumentar a área de superfície dos HAPs e, portanto torná-los mais acessíveis (Prince, 1993). Além disso, quando submetidas em consórcio; certas linhagens podem ter agido na remoção de intermediários produzidos por outros membros do consórcio e, conseqüentemente, facilitado a degradação total dos HAPs. A biotransformação dos compostos aromáticos pelas células está no mecanismo de produção de energia celular, uma vez que a variação de energia livre disponível durante a oxidação de certos aromáticos é alta. Alguns trabalhos sugerem que as reações microbianas favorecem a destoxificação do próprio meio pelos microrganismos. É certo contudo, que a disponibilidade energética evidencia “o interesse real das células” na utilização de um aromático poluente (Vazoller, 2002).

Sendo assim, estes microrganismos tornam-se promissores para um emprego futuro, em processos biológicos, atendendo as necessidades inerentes a qualidade ambiental e de saúde pública, além da preservação dos recursos naturais, notadamente os ecossistemas aquáticos.

2. CONCLUSÃO GERAL

De acordo com os resultados conclui-se que:

- As quarenta oito linhagens conseguiram utilizar pelo menos um composto aromático, como fonte de carbono e energia;
- Com análises em CLAE e espectro de absorção, foi possível efetuar uma pré-seleção, escolhendo quinze linhagens dentre as quarenta e oito estudadas;
- Utilizando os compostos aromáticos estabelecidos em cristais ou misturados, selecionou-se quatro linhagens – *Bacillus badius*, *Enterobacter agglomerans*, L 28 e *Bacillus sp.*;

Com estudos mais detalhados das quatro linhagens pode-se concluir que :

- As linhagens conseguiram crescer em meio contendo os HAPs tanto solubilizados em acetona como em forma de cristais;
- Produziram pelo menos uma das enzimas estudadas, assim como atividade de emulsificação óleo em água e/ou água em óleo;
- Quando submetidas em consórcio produziram enzimas e, portanto, degradaram os HAPs;
- Análises em CG, foi possível identificar a formação de catecol, intermediário para as enzimas estudadas;
- Utilizando o Kit Api 50 CHB e 50 CH, a linhagem L28 foi identificada como *Bacillus sphaericus* e a linhagem *Bacillus sp.*, como *Bacillus cereus*; e
- Essas linhagens são promissoras em futuras aplicações em processos de biorremediação.

3. REFERÊNCIAS

- Leblond, J. D.; Schultz, T. W.; Sayler, G. S. Observations on the preferential biodegradation of selected components of polyaromatic hydrocarbon mixtures. **Chemosphere**. 2001, v. 42, p. 333 – 343.
- Moorman, T. B. Adaptation of microorganisms in subsurface environmental: significance to pesticide degradation. In: RACKE, K. D.; COATS, J. R. ed. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environmental**. Washington: ACS. 1990. p. 167 – 180.
- Prince, R. C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. **Critical Review Microbiology**. 1993. v. 19, p. 217 – 242.
- Shimura, M.; Mukerjee-Dhar, G.; Kimbara, K.; Nagato, H.; Kiyohara, H.; Hatta, T. Isolation and characterization of a thermophilic *Bacillus* sp. JF8 capable of degrading polychlorinated biphenyls and naphthalene. **FEMS Microbiology Letter**. 1999, v. 178, p. 87 – 93.
- Spain, J. C.; Pritchard, P. H., Bourquin, A. W. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment-water cores from estuarine and fresh-water environments **Applied Environment Microbiology Science Technology**. 1990. v. 39, p. 123 – 126.
- Sapin, J. C., Vanveld, P. A. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds effects of concentration exposure time inoculum and chemical structure. **Applied Environment Microbiology**. 1983. v. 45, p. 428-438.
- Uz, I.; Duan, Y.P.; Ogram. Characterization of the naphthalene – degrading bacterium *Rhodococcus opacus* M213. **FEMS Microbiology Letter**. 2000, v. 185, p. 231 – 238.
- Van der Meer, J.; Leveau, J.H.; Werlen, C. Genetic adaptations of microorganisms to environmental pollutants. EAWAG News (Swiss Federal Institute Science and Technology). 1994. V. 35E, p. 8 – 15.
- Vazoller, R. F. Microbiologia e Saneamento ambiental In: **Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas**.
<<http://www.bdt.fat.org.br/publicacoes/padct/bio/cap9/3/rosana.html>> Acesso em: 18 abril 2002.
- Yu, X., Wang, X., Bartha, R., Rosen, J. D. Supercritical fluid extraction of coal tar contaminated soil. **Environment Science Technology**. 1990. v. 24, p. 1732-1738.