

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS
BIOATIVOS**

**BIODEGRADABILIDADE DE ISÔMEROS DE XILENO POR BACTÉRIAS
ISOLADAS DO TERMINAL PORTUÁRIO DE SUAPE-PE**

Laurení Alves de Lima

Recife - 2005

Laureni Alves de Lima

**BIODEGRADABILIDADE DE ISÔMEROS DE XILENO POR
BACTÉRIAS ISOLADAS DO TERMINAL PORTUÁRIO DE
SUAPE-PE**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE.

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada.
Orientadora: Profª Maria de Fátima Vieira de Queiroz
Sousa, *D.Sc.*

Recife – 2005

Lima, Laurení Alves de

Biodegradabilidade de isômeros de xileno por
bactérias isoladas do terminal portuário de SUAPE-
PE / Laurení Alves de Lima. – Recife : O Autor, 2005.
xviii, 98 folhas : il., fig., tab., gráf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos
Bioativos, 2005.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Microbiologia aplicada – Biotecnologia. 2.
Hidrocarboneto monoaromático xileno – Bactérias. 3.
Bacillus megaterium – Biodegradação de isômeros
de xileno. I. Título.

579.61
579.17

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
BC2005-103

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *LAURENI ALVES DE LIMA* AO **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

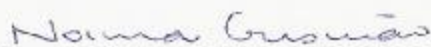
DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 18 DE FEVEREIRO DE 2005 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:



Dra. MARIA DE LOS ANGELES PEREZ FERNANDEZ PALHA
Departamento de Engenharia Química – UFPE



Dr. CARLOS EDISON LOPES
Departamento de Antibióticos – UFPE



Dra. NORMA BUARQUE DE GUSMÃO
Departamento de Antibióticos – UFPE

“De absoluto, só a relatividade”.

Albert Einstein

**Ao companheiro Wolney: meu porto
seguro em todos os momentos,**

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades concedidas;

À Grande Família Lima, pela força transmitida nos momentos mais difíceis;

Ao companheiro Wolney Gomes, pela compreensão e pelo carinho dedicado;

À Professora Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa, pela oportunidade, orientação e ensinamentos;

À Coordenação do Pós-Biotec, pela atenção e compreensão constantes;

Aos Professores Carlos Edison Lopes e José Otamar Falcão de Moraes, pelos esclarecimentos de dúvidas e sugestões;

Ao Professor Nei Pereira Jr., pelas valiosas sugestões apresentadas;

A todos os Professores do Pós-Biotec, pelos ensinamentos transmitidos;

Aos bolsistas do projeto BAPPD, Rita Miranda, Edelvio Gomes, Roberta Lovaglio, Cynthia Souza, Adriana Vilaça e Pollianna Isabel, pelo apoio, pelas orientações dadas nos momentos mais difíceis, pelo compartilhamento das atividades inerentes à dissertação e pela amizade construída durante esses dois anos;

Aos amigos Danilo Mamede e Gilvanda Ribeiro, pela amizade e pelo interesse em auxiliar sempre;

Às estagiárias Paula Luna e Marcela Araújo, pelos favores “laboratoriais” sempre realizados de bom grado;

Ao amigo Fábio Sérgio Barbosa, doutorando do Departamento de Micologia da UFPE, pelo tratamento estatístico apresentado neste trabalho;

Ao pesquisador Irapuan Pinheiro, pela constante disposição em ajudar e pelas sugestões apresentadas;

A todos os colegas do mestrado, especialmente Cláudia Crasto, Denise Azevedo, Manuela Lins e Ulrich Vasconcelos, pela amizade, pelos desabafos e pelos momentos de descontração;

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos, em especial Orlando, Luís, Fátima Regina, Suzete, Josa e Salatiel pela ajuda incondicional em todas as necessidades;

À CAPES, pelo auxílio dado durante a execução deste trabalho;

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram de alguma forma na execução deste trabalho, meu muito OBRIGADA!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvi
RESUMO	xvii
<i>ABSTRACT</i>	xviii
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Petróleo e seus Derivados	5
2.2 Hidrocarbonetos Monoaromáticos	6
2.2.1 BTEX – Aspectos Gerais	6
A) Benzeno	6
B) Tolueno	8
C) Etilbenzeno	10
D) Xileno	11
2.2.2 Destino dos BTEX em Ambientes	12
2.2.3 Toxicidade	17
2.3 Processos de Descontaminação	22
2.3.1 Abióticos	22
2.3.2 Biótico: Biorremediação	22
2.4 Biodegradação de Hidrocarbonetos Aromáticos	24
2.4.1 Metodologia Analítica	29
2.5 Fatores que Influenciam a Biodegradação	31
2.5.1 Fatores Abióticos	31
A) Temperatura	31
B) pH	32
C) Nutrientes	32
D) Umidade	32
E) Estrutura e Concentração do Poluente	33

2.5.2 Fatores Bióticos	33
A) Predação por Protozoários	33
B) Troca Genética	33
C) Adaptação	34
D) Consórcios Microbianos	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Fonte de carbono	36
3.2 Microrganismos Utilizados	36
3.2.1 Manutenção das Linhagens Bacterianas	38
3.3 Seleção de Linhagens Degradadoras, Isoladas e em Consórcios	38
3.4 Identificação da Linhagem Bacteriana Seleccionada	39
3.5 Ensaios de Aclimação da Linhagem Seleccionada	39
3.5.1 Determinação do pH	41
3.5.2 Determinação da Tensão Superficial do Meio	41
3.5.3 Quantificação Bacteriana	41
3.6 Ensaios para a Verificação das Perdas Abióticas de Xileno	41
3.6.1 Aparato Experimental “A”	42
3.6.2 Aparato Experimental “B”	44
3.6.3 Aparato Experimental “C”	45
3.7 Ensaios de Biodegradação	45
3.7.1 Quantificação Bacteriana	46
3.7.2 Análises Cromatográficas	46
3.7.3 Tratamento Estatístico	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Seleção de Linhagens Degradadoras, Isoladas e em Consórcios	49
4.2 Identificação da Linhagem Bacteriana Seleccionada	54
4.3 Ensaios de Aclimação	56
4.3.1 Determinação do pH	56
4.3.2 Determinação da Tensão Superficial do Meio	58
4.3.3 Quantificação Bacteriana	60
4.4 Ensaios para a Verificação das Perdas Abióticas de Xileno	65
4.4.1 Aparato Experimental “A”	65

4.4.2 Aparato Experimental “B”	65
4.4.3 Aparato Experimental “C”	66
4.5 Ensaaios de Biodegradação	67
4.5.1 Quantificação Bacteriana	67
4.5.2 Análises Cromatográficas	69
5. CONCLUSÕES	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
7. ANEXOS	90
7.1 Cromatogramas	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Estrutura química do benzeno.	7
Figura 2.2 -	Estrutura química do tolueno.	9
Figura 2.3 -	Estrutura química do etilbenzeno.	10
Figura 2.4 -	Estrutura química dos isômeros de xileno. A: <i>orto</i> -xileno; B: <i>meta</i> -xileno; C: <i>para</i> -xileno.	12
Figura 2.5 -	Destino de BTEX liberado no ambiente (EPA, 2003).	15
Figura 2.6 -	Esquema ilustrativo da localização de água subterrânea (TROY, 1994).	16
Figura 2.7 -	Rotas de oxidação de hidrocarbonetos aromáticos por microrganismos procariotos e eucariotos.	25
Figura 2.8 -	Mecanismos de biodegradação do tolueno.	26
Figura 2.9 -	Sistema enzimático da biodegradação do tolueno pelo ataque no grupo metila.	27
Figura 2.10 -	Desenho esquemático representando o método de extração líquido-líquido.	31
Figura 3.1 -	Vista da Lagoa da Barra, situada no Complexo Industrial Portuário de Suape-PE, local de coleta das amostras utilizadas no isolamento dos microrganismos.	37
Figura 3.2 -	Esquema ilustrativo dos ensaios de aclimação.	41
Figura 3.3 -	Esquema do aparato experimental “A” para verificação de perdas abióticas de xileno. a: banho refrigerante de água destilada; b: tubulação para entrada do banho refrigerante; c: tubulação para saída do banho refrigerante; d: condensador de tubo reto; e: coletor de amostras; f: tubo de látex; g: pinça de Hoffman; h: rolha de silicone; i: coluna de vidro (500 mL) dotada de uma placa sinterizada; j: tubulação para entrada de ar; l: filtro absoluto; m: bomba de aquário; n: capela exaustora.	43

Figura 3.4 -	Aparato experimental “B” para verificação de perdas abióticas de xileno.	44
Figura 3.5 -	Aparato experimental “C” para verificação de perdas abióticas de xileno.	45
Figura 4.1 -	Viragem do indicador redox (DCPIP) pela linhagem UFPEDA-816, em <i>orto</i> -xileno, após 12h de incubação a 30±1°C. T: poço teste; CN: poço controle negativo; CP: poço controle positivo.	49
Figura 4.2 -	Viragem do indicador redox (DCPIP) pela linhagem UFPEDA-816, em <i>meta</i> -xileno, após 12h de incubação a 30±1°C. T: poço teste; CN: poço controle negativo; CP: poço controle positivo.	50
Figura 4.3 -	Viragem do indicador redox (DCPIP) pela linhagem UFPEDA-816, em <i>para</i> -xileno, após 12h de incubação a 30±1°C. T: poço teste; CN: poço controle negativo; CP: poço controle positivo.	50
Figura 4.4 -	Viragem do indicador redox (DCPIP) pela linhagem UFPEDA-816, na mistura dos isômeros (~33% de cada), após 12h de incubação a 30±1°C. T: poço teste; CN: poço controle negativo; CP: poço controle positivo.	51
Figura 4.5 -	Viragem do indicador redox (DCPIP) pela linhagem UFPEDA-837, em <i>orto</i> -xileno, após 24h de incubação a 30±1°C. T: poço teste; CN: poço controle negativo; CP: poço controle positivo.	52
Figura 4.6 -	Viragem do indicador redox (DCPIP) pela linhagem UFPEDA-837, em <i>meta</i> -xileno, após 24h de incubação a 30±1°C. T: poço teste; CN: poço controle negativo; CP: poço controle positivo.	52
Figura 4.7 -	Aspecto microscópico da linhagem UFPEDA-816 submetida à coloração de Gram (aumento 1000X).	55
Figura 4.8 -	Crescimento celular de <i>B. megaterium</i> em 1% da fonte de carbono.	61
Figura 4.9 -	Crescimento celular de <i>B. megaterium</i> em 3% da fonte de carbono.	61
Figura 4.10 -	Crescimento celular de <i>B. megaterium</i> em 5% da fonte de carbono.	62
Figura 4.11 -	Aclimação de <i>B. megaterium</i> em 5% da mistura dos isômeros de xileno após 24h de incubação a 30±1°C. A: frasco teste; B: frasco controle.	63

Figura 7.1 - Perfil cromatográfico de <i>orto</i> -xileno (pico 8.277) na amostra controle após 24h de bioprocessamento.	91
Figura 7.2 - Perfil cromatográfico de <i>orto</i> -xileno (pico 8.307) na amostra teste após 24h de bioprocessamento.	91
Figura 7.3 - Perfil cromatográfico de <i>meta</i> -xileno (pico 7.726) na amostra controle após 24h de bioprocessamento.	92
Figura 7.4 - Perfil cromatográfico de <i>meta</i> -xileno (pico 7.707) na amostra teste após 24h de bioprocessamento.	92
Figura 7.5 - Perfil cromatográfico de <i>para</i> -xileno (pico 7.754) na amostra controle após 24h de bioprocessamento.	93
Figura 7.6 - Perfil cromatográfico de <i>para</i> -xileno (pico 7.738) na amostra teste após 24h de bioprocessamento.	93
Figura 7.7 - Perfil cromatográfico da mistura dos isômeros: <i>orto</i> -xileno (pico 8.265); <i>meta</i> - e <i>para</i> -xileno (pico 7.730) na amostra controle após 24h de bioprocessamento.	94
Figura 7.8 - Perfil cromatográfico da mistura dos isômeros: <i>orto</i> -xileno (pico 8.242); <i>meta</i> - e <i>para</i> -xileno (pico 7.703) na amostra teste após 24h de bioprocessamento.	94
Figura 7.9 - Perfil cromatográfico de <i>orto</i> -xileno (pico 8.314) na amostra controle após 72h de bioprocessamento.	95
Figura 7.10 - Perfil cromatográfico de <i>orto</i> -xileno (pico 8.303) na amostra teste após 72h de bioprocessamento.	95
Figura 7.11 - Perfil cromatográfico de <i>meta</i> -xileno (pico 7.721) na amostra controle após 72h de bioprocessamento.	96
Figura 7.12 - Perfil cromatográfico de <i>meta</i> -xileno (pico 7.704) na amostra teste após 72h de bioprocessamento.	96
Figura 7.13 - Perfil cromatográfico de <i>para</i> -xileno (pico 7.763) na amostra controle após 72h de bioprocessamento.	97
Figura 7.14 - Perfil cromatográfico de <i>para</i> -xileno (pico 7.730) na amostra teste após 72h de bioprocessamento.	97

Figura 7.15 - Perfil cromatográfico da mistura dos isômeros: *orto*-xileno (pico 8.265); *meta*- e *para*-xileno (pico 7.730) na amostra controle após 72h de bioprocessamento. 98

Figura 7.16 - Perfil cromatográfico da mistura dos isômeros: *orto*-xileno (pico 8.256); *meta*- e *para*-xileno (pico 7.715) na amostra teste após 72h de bioprocessamento. 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 -	Características físico-químicas do benzeno (EPA, 2002).	7
Tabela 2.2 -	Características físico-químicas do tolueno (WHO, 1985).	9
Tabela 2.3 -	Características físico-químicas do etilbenzeno (WHO, 1985).	11
Tabela 2.4 -	Características físico-químicas de xilenos (EPA, 2003).	13
Tabela 2.5 -	Propriedades físico-químicas de poluentes e seu efeito sobre a migração na água subterrânea.	17
Tabela 2.6 -	Características toxicológicas dos principais hidrocarbonetos aromáticos.	19
Tabela 2.7 -	Efeitos provocados pela inalação de diferentes concentrações de etilbenzeno, isômeros de xileno e xileno técnico, em ratas gestantes e seus descendentes.	21
Tabela 3.1 -	Características dos isômeros de xileno utilizados como fonte de carbono.	36
Tabela 3.2 -	Composição do meio mineral de Büshnell-Haas (ATLAS, 1995c).	37
Tabela 3.3 -	Composição do meio <i>Tryptic Soy Agar</i> (ATLAS, 1995c).	38
Tabela 3.4 -	Composição do meio <i>Tryptic Soy Broth</i> (ATLAS, 1995c).	40
Tabela 3.5 -	Condições operacionais do sistema GC-MS.	46
Tabela 4.1 -	Características da linhagem UFPEDA-816.	55
Tabela 4.2 -	Valores de pH nos ensaios de aclimação de <i>B. megaterium</i> em 1% da fonte de carbono.	57
Tabela 4.3 -	Valores de pH nos ensaios de aclimação de <i>B. megaterium</i> em 3% da fonte de carbono.	57
Tabela 4.4 -	Valores de pH nos ensaios de aclimação de <i>B. megaterium</i> em 5% da fonte de carbono.	58
Tabela 4.5 -	Valores da Tensão Superficial (TS), inicial e final, do meio isento de células, na aclimação de <i>B. megaterium</i> em 1% da fonte de carbono.	59
Tabela 4.6 -	Valores da Tensão Superficial (TS), inicial e final, do meio isento de células, na aclimação de <i>B. megaterium</i> em 3% da fonte de carbono.	59

Tabela 4.7 - Valores da Tensão Superficial (TS), inicial e final, do meio isento de células, na aclimação de <i>B. megaterium</i> em 5% da fonte de carbono.	60
Tabela 4.8 - Percentual de perdas abióticas do aparato experimental “A”.	65
Tabela 4.9 - Percentual de perdas abióticas do aparato experimental “B”.	65
Tabela 4.10 - Percentual de perdas abióticas do aparato experimental “C”.	66
Tabela 4.11 - Concentração celular de <i>B. megaterium</i> nos tempos, inicial, 24h e 72h, nos ensaios de biodegradação.	68
Tabela 4.12 - Percentual de recuperação de orto-xileno, dissolvido em meio BH, após 3h de resfriamento em gelo e análise imediata pelo sistema GC-MS.	69
Tabela 4.13 - Percentual de biodegradação dos isômeros de xileno por <i>B. megaterium</i> com 24h e 72h de bioprocessamento.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH	Meio mineral de Büshnell-Haas
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos
C:N	Carbono:Nitrogênio
C:N:P	Carbono:Nitrogênio:Fósforo
DCPIP	Indicador redox 2,6 diclorofenol-indofenol
DNAPLs	Fase orgânica líquida não-aquosa densa
ECD	Detecção por captura de elétrons
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FID	Detecção por ionização em chama
GC	Cromatografia gasosa
HSM	Microextração do <i>headspace</i> por solvente
HS-SPME	Microextração do <i>headspace</i> em fase sólida
K _H	Constante de Henry
LLE	Extração líquido-líquido
LNAPLs	Fase orgânica líquida não-aquosa leve
MS	Espectrometria de massa
NAPLs	Fase orgânica líquida não-aquosa
PT	<i>Purge-and-trape</i>
SPE	Extração em fase sólida
ST	<i>Spray-and-trape</i>
TS	Tensão Superficial
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFPEA	Universidade Federal de Pernambuco – Departamento de Antibióticos
VOCs	Compostos orgânicos voláteis
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

O xileno, também chamado de dimetilbenzeno, é um hidrocarboneto monoaromático existente sob as três formas isoméricas: *orto*, *meta* e *para*. Tem ampla utilização em tintas, colas, tintas de impressão, na formulação de pesticidas, nas indústrias do couro e da borracha, em laboratórios histológicos e como componente da gasolina. A constante introdução desse composto no ambiente pode ocasionar problemas ambientais e a saúde humana devido à sua toxicidade. Uma alternativa para eliminar ou minimizar esses problemas é a biorremediação, tecnologia que utiliza microrganismos para degradarem poluentes. Este trabalho objetiva estudar a biodegradabilidade de isômeros de xileno por bactérias isoladas do Terminal Portuário de Suape-PE. A partir de quarenta culturas bacterianas, previamente isoladas de ambiente poluído por petroderivado, foi realizada a seleção de linhagens degradadoras, isoladas e em consórcios, aplicando-se a técnica do indicador redox 2,6 diclorofenol indofenol, utilizando os isômeros de xileno isolados e a mistura deles. A linhagem selecionada foi identificada e aclimatada, variando-se a concentração da fonte oleosa (1%, 3% e 5% v/v) em meio mineral de Bushnell-Haas (BH). Os ensaios de biodegradação foram efetuados em frascos Erlenmeyer (500 mL), vedados com rolha de borracha, contendo 75% do meio BH, 20% de inóculo aclimatado e 5% da fonte de carbono, sob agitação de 200 rpm, temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h e 72h, sendo feitas as medidas da quantificação celular e do percentual de biodegradação nos referidos tempos. Das 40 linhagens testadas, a UFPEDA-816 apresentou potencial degradador para os três isômeros de xileno, enquanto que a UFPEDA-837 foi capaz de oxidar apenas os isômeros *orto*- e *meta*-xileno e o consórcio formado por essas duas linhagens não apresentou potencialidade para degradar os referidos isômeros. A linhagem UFPEDA-816 foi identificada como *Bacillus megaterium*. Na aclimação, os valores de pH ficaram próximos da neutralidade; a cultura apresentou melhor crescimento na presença de *orto*-xileno e na mistura dos isômeros; houve uma maior redução na tensão superficial do meio quando *para*-xileno era a fonte oleosa. Nos ensaios de biodegradação, verificou-se, após 24h, um crescimento significativo do *B. megaterium* com *orto*-xileno e com a mistura dos isômeros; após 72h, houve uma redução do crescimento celular na presença de todas as fontes de carbono. O maior percentual de biodegradação ocorreu nas primeiras 24h, sendo significativo apenas para *orto*-xileno.

ABSTRACT

Xylene, also known as dimethylbenzene is a monoaromatic hydrocarbon existing in three isometric forms: *ortho*, *meta* and *para*. It is widely used in paints, glues, printer ink, pesticides, in the leather and rubber industries, in histology labs and is a component of gasoline. The constant use of this compound may cause damage in the environment and to human health, owing to its toxicity. An alternative way of eliminating or minimizing these problems, is bioremediation, a technique that uses microorganisms to degrade pollutants. This study aims to investigate the biodegradability of xylene isomers by bacteria isolated from the Port Terminal at Suape in the Brazilian State of Pernambuco. Forty bacterial strains, previously isolated from an environment polluted by petroleum derivatives, were submitted to selection test of cultures, isolated or consortia, which have the potential to degrade xylene isomers or a mixture of them, using the technique involving the redox indicator 2,6 dichlorophenol indophenol. The selected strain was identified and acclimated by varying the concentration of the oily source (1%, 3% and 5% v/v) in a Bushnell-Haas (BH) mineral medium. The biodegradation assays were carried out in Erlenmeyer flasks (500 mL), sealed with rubber corks, containing 75% of BH medium, 20% of inoculum acclimated and 5% of the carbon source. These flasks were incubated at temperature of $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ and shaken at 200 rpm for 24 and 72 hours; the cellular concentration and the percentage of biodegradation were measured at these times. Of the forty strains tested, UFPEDA-816 showed the potential to degrade all three xylene isomers, while UFPEDA-837 was capable of oxidizing only the *ortho*- and *meta*-xylene isomers; and the consortium comprising these two strains did not show potential to degrade these isomers. The UFPEDA-816 strain was identified as *Bacillus megaterium*. On the acclimation assays, the pH values remained near to neutrality; the selected bacteria showed the greatest growth in the presence of *ortho*-xylene and in the mixture of isomers; and there was a greater reduction in the surface tension of the medium when *para*-xylene was used as the oily source. On the biodegradation assays were observed that, after 24h, there was significant growth of *B. megaterium* with *ortho*-xylene and the mixture of isomers; after 72h, there was a reduction in cellular growth in the presence of all carbon sources. The highest percentage of biodegradation occurred in the first 24h, being significant only to *ortho*-xylene.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O petróleo e seus derivados impulsionam a economia mundial, através da produção de energia e da sua utilização na indústria petroquímica, contudo, o seu processamento, incluindo extração, refinamento, estocagem e transporte, representa um risco ambiental devido à ocorrência de vazamentos e derramamentos acidentais ou intencionais.

Os hidrocarbonetos presentes no petróleo e em seus derivados, ao entrarem no meio ambiente, podem gerar um grande desequilíbrio ecológico, tendo em vista a sua toxicidade e atividade carcinogênica (MOREIRA, 1999). O acúmulo desses compostos no ambiente requer o desenvolvimento de métodos eficazes para mitigação dos impactos ambientais. Dentre estes métodos, a biorremediação desponta como uma alternativa promissora, uma vez que utiliza microrganismos para degradarem ou mineralizarem os poluentes a produtos inorgânicos (MAIER, 2000; ALEXANDER, 1999a).

Uma das dificuldades encontradas no emprego das tecnologias de biorremediação em ambientes impactados por petróleo e seus derivados é a sua complexa composição química (HILL, 1984), especialmente pela presença de hidrocarbonetos aromáticos e compostos asfálticos que são mais resistentes à biodegradação (PRINCE *et. al.*, 2003; ATLAS, 1995b; HEITKAMP & CERNIGLIA, 1988).

Uma categoria de hidrocarbonetos aromáticos são os hidrocarbonetos voláteis, coletivamente conhecidos como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos). Dentre estes, os isômeros de xileno (*orto*-, *meta*- e *para*-xileno) se destacam pela sua ampla utilização como solventes e por serem componentes da gasolina. A evaporação durante o refino de petróleo, a queima da gasolina e vazamentos ou derrames durante o transporte e estoque de gasolina são as principais fontes liberadoras de xileno (EPA, 2003) que contribuem para a poluição ambiental.

A gasolina é um dos combustíveis movimentado pelo Terminal Portuário de Suape-PE que abriga importantes distribuidoras de combustíveis de petróleo. O transporte e o armazenamento de gasolina são atividades que oferecem riscos de contaminação ambiental, quer seja no solo, no ar ou na água, tanto para a própria região portuária quanto para as praias adjacentes.

Dessa forma, estudos visando à seleção de microrganismos com capacidade de degradar isômeros de xileno é de fundamental importância para otimizar os processos de biorremediação para a área em estudo ou similar.

Este trabalho visa estudar a biodegradabilidade de isômeros de xileno por bactérias isoladas do Terminal Portuário de Suape-PE e, especificamente, objetiva: selecionar bactérias

com potencialidade para degradar isômeros de xileno; identificar a(s) linhagem(ns) bacteriana(s) selecionada(s); realizar ensaios de aclimação, variando a concentração da fonte de carbono e realizar ensaios de biodegradabilidade.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Petróleo e seus Derivados

O petróleo é conhecido desde os primórdios da civilização, mas passou a ser empregado, comercialmente, a partir do século XVIII, na indústria farmacêutica e na iluminação. Isto promoveu sua utilização, em larga escala, como fonte de energia. Com o advento da indústria petroquímica, os derivados de petróleo e centenas de novos produtos surgiram para a utilização diária e comodidade da vida humana (PETROBRÁS, 2003).

Quimicamente, o petróleo é considerado uma mistura complexa de milhares de hidrocarbonetos diferentes e substâncias relacionadas que contêm átomos de oxigênio, nitrogênio, enxofre e traços de metais pesados, formando os materiais asfálticos (IRWIN *et. al.*, 1997). A proporção de cada um desses compostos varia de acordo com a região de origem do petróleo.

No grupo dos hidrocarbonetos estão as parafinas, as ciclo-parafinas e os compostos aromáticos; entre estes, encontram-se o benzeno (0,15%), o tolueno (0,5%), os xilenos (1%), alguns alquilbenzenos, o naftaleno e outros alquilnaftalenos que são originários diretamente do fracionamento do petróleo e têm diversas aplicações industriais (SHREVE & BRINK, 1977 *apud* MOREIRA, 1999). Misturas destes hidrocarbonetos formam os óleos combustíveis, tais como: querosene, gasolina, Diesel e *bunker*.

Os fenóis, os ácidos naftênicos e os ácidos graxos estão compreendidos entre os materiais asfálticos que contêm oxigênio em sua composição molecular. Os compostos sulfurados podem apresentar uma fração de até 7% devido à ação das bactérias redutoras de sulfato na formação do petróleo. As piridinas, as quinolinas e os indóis compõem as substâncias nitrogenadas. Níquel, cobre, ferro, chumbo e vanádio são os metais pesados geralmente encontrados no petróleo (MOREIRA, 1999).

O aumento da população humana e o desenvolvimento tecnológico contribuem para a demanda crescente da utilização de petróleo como fonte de energia, tanto na forma bruta quanto na forma refinada, através dos combustíveis fósseis. Isto representa um grande significado para a economia mundial, no entanto, ocasiona também um problema ambiental devido à freqüente introdução dessas substâncias no meio ambiente.

2.2 Hidrocarbonetos Monoaromáticos

Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (*orto*-, *meta*- e *para*-), coletivamente conhecidos como BTEX, são os hidrocarbonetos derivados da fração monoaromática do petróleo, encontrados principalmente na gasolina. Também são produzidos, numa escala de toneladas por ano, para serem matéria-prima para as indústrias de solventes, pesticidas, plásticos, fibras sintéticas (SHIM & YANG, 1999). Constituem uma das maiores causas de poluição ambiental, devido à ocorrência de vazamentos de tanques subterrâneos de gasolina e derrames em poços de prospecção de petróleo, refinarias, oleodutos e terminais de distribuição (FRIES *et. al.*, 1994).

2.2.1 BTEX – Aspectos Gerais

A) Benzeno

Também conhecido como benzol, o benzeno é amplamente usado como solvente industrial, como um intermediário em sínteses químicas e como um componente da gasolina; portanto, a introdução no ambiente é grande.

É facilmente absorvido por animais e por seres humanos, sendo distribuído em várias partes do corpo. A exposição crônica ao benzeno resulta em deterioração progressiva da função hematopoiética; também provoca efeitos neurotóxicos em animais e humanos depois de um curto período de exposição, mas em concentrações relativamente altas (EPA, 2002).

O benzeno ocupa a 16ª posição de compostos químicos produzidos nos Estados Unidos, com uma produção anual estimada em $4,39 \times 10^5$ toneladas em 1991 (WHO, 1993).

A volatilidade e a solubilidade são as propriedades mais importantes que influenciam o seu transporte no ambiente. Entra na atmosfera de emissões diretas e volatilização de solo e de águas superficiais. A degradação do benzeno no ar ocorre principalmente por reações com radicais hidróxi, alcoxi e peroxi, átomos de oxigênio e ozônio. Em águas superficiais e subterrâneas é biodegradado por vários microrganismos, sob condições aeróbicas e anaeróbicas (WHO, 1993).

Algumas características físico-químicas estão apresentadas na Tabela 2.1 (EPA, 2002) e sua estrutura química encontra-se na Figura 2.1.

Tabela 2.1 - Características físico-químicas do benzeno (EPA, 2002).

Fórmula Química	C ₆ H ₆
Peso Molecular	78,11
Pressão de vapor a 20°C	75 mmHg
Estado físico a 25°C	Líquido
Solubilidade na água a 25°C	1750 mg/L
Fatores de conversão no ar	1 ppm = 3,24 mg/m ³ 1 mg/m ³ = 0,31 ppm 1 mg/L = 313 ppm
Ponto de fusão	5,5 °C
Ponto de ebulição	80,1°C
Limite de exposição permitido	1 ppm
Limites de odor no ar	0,84 – 53 ppm
Nome sinônimo	Benzol

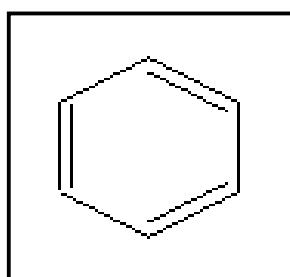


Figura 2.1 - Estrutura química do benzeno.

B) Tolueno

É o nome comum para metilbenzeno. É produzido na forma isolada e como componente de misturas, especialmente na gasolina. Isoladamente, é usado na produção de outros compostos, como solvente em tintas, adesivos e produtos farmacêuticos, bem como, aditivo em produtos cosméticos (WHO, 1985).

As fontes primárias de liberação de tolueno no ambiente são: fontes inadvertidas (65%) – emissão de motor de veículos e exaustão de aeronaves, perdas durante as atividades de comercialização da gasolina, derrames e fumaça de cigarro; processos em que o tolueno é utilizado (33%) e produção de tolueno (2%) (WHO, 1985).

É facilmente absorvido pelo trato respiratório, pela pele e pelo trato gastrointestinal. Após a absorção, se distribui rapidamente atingindo altos níveis no tecido adiposo, na medula óssea, nas glândulas adrenais, nos rins, no fígado, no cérebro e no sangue (EPA, 2002).

O tolueno liberado no ambiente entra principalmente na atmosfera e nas águas superficiais. É removido da atmosfera por reações com radicais hidroxil. Em altas latitudes, durante o verão o tempo de vida no ambiente é de aproximadamente 4 dias; no inverno, pode ficar durante meses. Os fatores que afetam os níveis de tolueno na água superficial e subterrânea incluem: volatilização, solubilidade, degradação e adsorção durante a percolação através do solo. É biodegradado por microrganismos do solo e por bactérias em ambientes estuarinos e marinhos (EPA, 2002).

Algumas características físico-químicas estão apresentadas na Tabela 2.2 (WHO, 1985) e sua estrutura química encontra-se na Figura 2.2.

Tabela 2.2 - Características físico-químicas do tolueno (WHO, 1985).

Fórmula Química	C ₇ H ₈
Peso Molecular	92,13
Pressão de vapor a 25°C	28,7 mmHg
Estado físico a 25°C	Líquido
Solubilidade na água (25°C)	Água doce: 535 mg/L Água do mar: 380 mg/L
Densidade (20°C)	0,8669 g/mL
Fatores de conversão no ar	1 ppm = 3,75 mg/m ³ 1 mg/m ³ = 0,266 ppm
Ponto de fusão	-95 °C
Ponto de ebulição	110,6°C
Nomes sinônimos	Metilbenzeno, metacida, metilbenzol, toluol

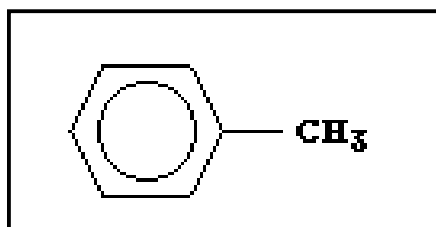


Figura 2.2 - Estrutura química do tolueno.

C) Etilbenzeno

Produzido pela alquilação do benzeno e do etileno. O etilbenzeno é empregado na produção de estireno e também do xileno técnico como solvente em tintas, fixadores, borracha e indústrias químicas. É encontrado no óleo cru, em produtos de petróleo refinado e em produtos de combustão (WHO, 1996).

É degradado primariamente por foto-oxidação e biodegradação; sua volatilização é rápida. Tem um potencial para bioacumular em organismos aquáticos, sendo sua toxicidade moderada para algas, peixes e invertebrados aquáticos (EPA, 2003).

A exposição humana ocorre principalmente pela inalação; cerca de 40 a 60% do etilbenzeno inalado fica retido nos pulmões. Além da absorção pulmonar, é absorvido pela pele e pelo trato gastrointestinal. Em humanos, é tóxico ao sistema nervoso central, sendo um irritante de membranas mucosas e dos olhos (WHO, 1996).

Sua estrutura química encontra-se na Figura 2.3 e algumas características físico-químicas estão apresentadas na Tabela 2.3 (WHO, 1985).

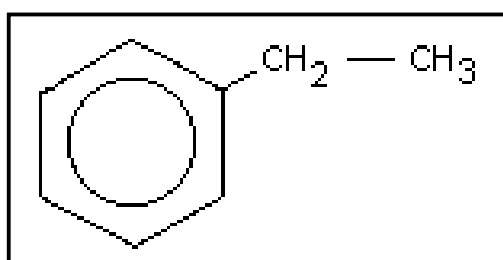


Figura 2.3 - Estrutura química do etilbenzeno.

Tabela 2.3 - Características físico-químicas do etilbenzeno (WHO, 1985).

Fórmula Química	C ₈ H ₁₀
Peso Molecular	106,16
Pressão de vapor a 20°C	1,24 Kpa
Estado físico a 25°C	Líquido
Solubilidade na água (20°C)	152 mg/L
Limites de odor no ar	2 mg/m ³
Limites de odor na água	0,1 mg/L
Densidade (25°C)	0,866 g/cm ³
Fatores de conversão no ar	1 ppm = 4,3 mg/m ³ 1 mg/m ³ = 0,23 ppm
Ponto de fusão	-94,95 °C
Ponto de ebulição	136,2 °C

D) Xileno

Também conhecido como dimetilbenzeno. Apresenta três isômeros: *orto*-, *meta*- e *para*-xileno (Figura 2.4). Existe ainda o xileno técnico, que é uma mistura dos isômeros com cerca de 35% de etilbenzeno (HASS *et. al.*, 1995).

O xileno é um solvente orgânico amplamente utilizado em tintas, colas, tintas de impressão, na formulação de pesticidas, indústrias do couro e da borracha e em laboratórios histológicos, sendo também encontrado na gasolina (SAILLENFAIT *et. al.*, 2003).

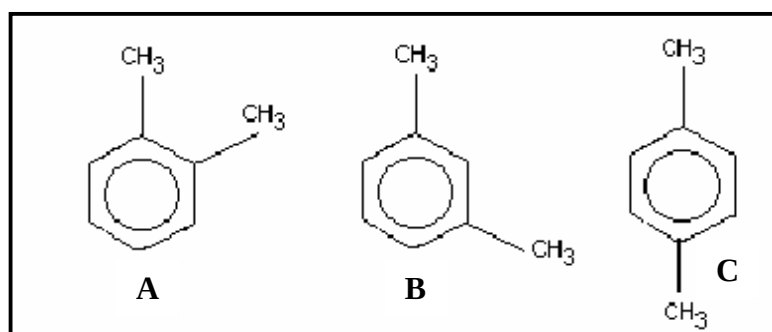


Figura 2.4 - Estrutura química dos isômeros de xileno. A: *orto*-xileno; B: *meta*-xileno; C: *para*-xileno.

A maior liberação ambiental de xileno é a evaporação durante o refino de petróleo; queima da gasolina; vazamentos ou derrames durante o transporte e o estoque de gasolina e de outros combustíveis. Os isômeros de xileno são produtos naturais de plantas e são componentes do petróleo e do alcatrão do carvão (EPA, 2003).

Algumas características físico-químicas estão apresentadas na Tabela 2.4 (EPA, 2003).

Tabela 2.4 - Características físico-químicas de xilenos (EPA, 2003).

Características	<i>o</i> -xileno	<i>m</i> -xileno	<i>p</i> -xileno	xileno técnico
Fórmula Química	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀	—
Peso molecular	106,17	106,17	106,17	—
Estado físico a 25°C	Líquido	Líquido	Líquido	Líquido
Pressão de vapor a 20°C	5,0 - 6,5 mmHg	5,0 – 6,5 mmHg	5,0 - 6,5 mmHg	6 - 16 mmHg
Densidade	0,8801 g/cm ³	0,8642 g/cm ³	0,8611 g/cm ³	0,864 g/cm ³
Ponto de fusão	- 25°C	- 47,4°C	13 – 14°C	—
Ponto de ebulição	144,4°C	139°C	138,37°C	137-140°C
Solubilidade na água	178 - 213 mg/L	134 - 146 mg/L	185 - 198 mg/L	130 mg/L
Fatores de conversão no ar	1 ppm = 4,34 mg/m ³ ; 1 mg/m ³ = 0,23 ppm	1 ppm = 4,34 mg/m ³ ; 1 mg/m ³ = 0,23 ppm	1 ppm = 4,34 mg/m ³ ; 1 mg/m ³ = 0,23 ppm	—
Limites de odor no ar	0,08 - 0,17 ppm	3,7 ppm	0,47 ppm	1,0 ppm
Nível máximo de contaminação	10 ppm	10 ppm	10 ppm	—
Nomes sinônimos	1,2-dimetil-benzeno <i>o</i> -metiltolueno 1,2-xileno <i>o</i> -xilol	1,3-dimetil-benzeno <i>m</i> -metiltolueno 1,3-xileno <i>m</i> -xilol	1,4-dimetil-benzeno <i>p</i> -metiltolueno 1,4-xileno <i>p</i> -xilol	—

Estima-se que no período compreendido entre 1987 a 1993, houve a liberação de cerca de 500 litros de xileno na água e 2.210.000 litros em terra. Essas liberações provêm principalmente das indústrias de refinaria (EPA, 2003).

A maior parte do xileno liberada no ambiente entra diretamente na atmosfera; uma pequena proporção entra na água e no solo. Uma vez introduzido no ambiente, vários processos afetam sua permanência: uma grande parte sofre volatilização; uma pequena proporção pode sofrer precipitação, devido à sua solubilidade em água; adsorção a sedimentos aquáticos e ao solo; biodegradação na água e no solo; foto-oxidação; oxidação atmosférica (reação com outros componentes encontrados na atmosfera, como: radicais peróxidos, ozônio e óxidos de nitrogênio) e leve bioacumulação (WHO, 1997).

2.2.2 Destino dos BTEX em Ambientes

Uma vez liberado no ambiente, os hidrocarbonetos monoaromáticos podem volatilizar, dissolver e se aderir a partículas de solo ou ser biologicamente degradado (EPA, 2003), como pode ser visualizado na Figura 2.5.

A persistência destes compostos no ambiente dependerá tanto de suas características quanto das do ecossistema atingido. Fernandes *et. al.* (2002) comprovou a influência das condições climáticas sobre as concentrações atmosféricas de hidrocarbonetos aromáticos e BTX no Rio de Janeiro; eles verificaram que durante o verão há menores concentrações do que no inverno, pois no verão há um aumento dos mecanismos de deposição/dispersão e remoção química desses poluentes.

Em termos práticos, uma das principais preocupações da liberação de BTEX no ambiente é a contaminação de aquíferos usados para o consumo humano, pois estes hidrocarbonetos são os constituintes da gasolina que apresentam maior solubilidade em água, sendo, portanto os primeiros contaminantes que atingem a água subterrânea (CORSEUIL & MARINS, 1998).

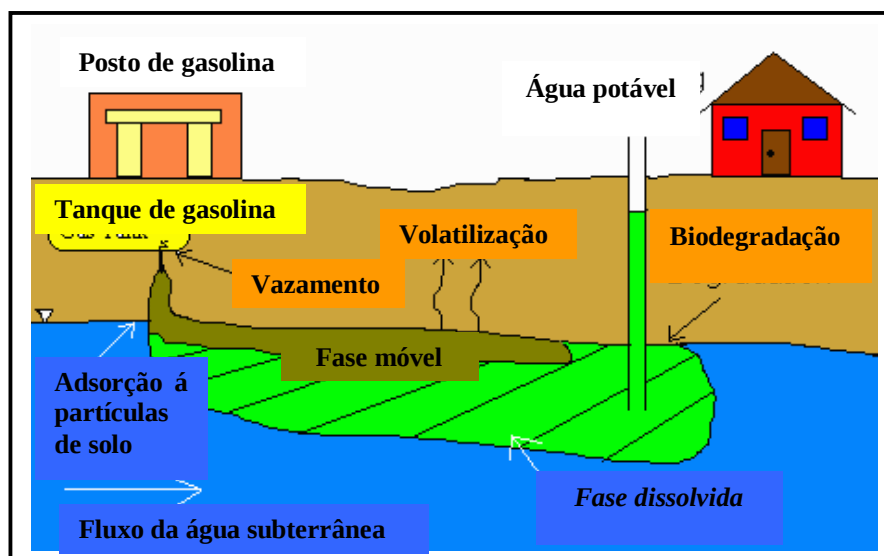


Figura 2.5 – Destino de BTEX liberado no ambiente (EPA, 2003).

Água subterrânea é toda aquela localizada abaixo da superfície do solo e pode ser encontrada em duas zonas: a não saturada e a saturada (Figura 2.6, TROY, 1994). A zona não saturada situa-se desde a superfície do solo até o topo da franja capilar e contém ar e água. A zona saturada localiza-se imediatamente abaixo da zona não saturada, apresenta poros (espaços entre as partículas do terreno) preenchidos com água que se move livremente e com maior rapidez. A subzona localizada entre as zonas não saturada e saturada é chamada de franja capilar; nela, a água é retida por tensão superficial.

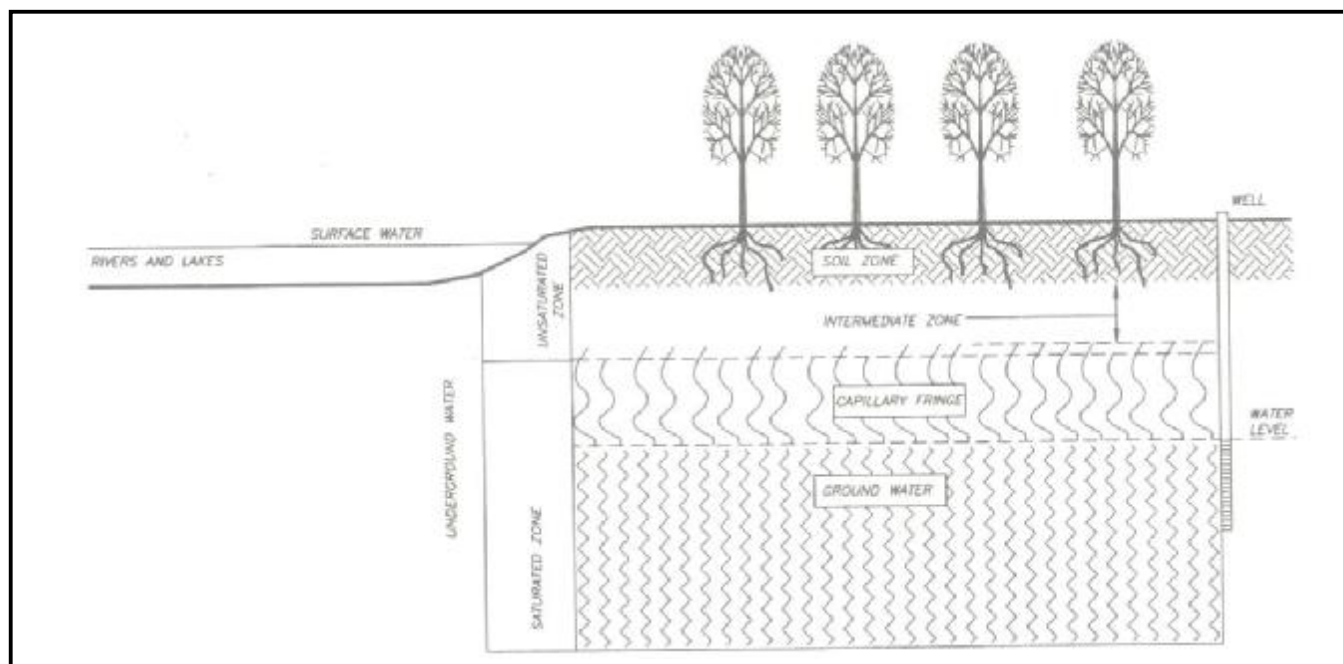


Figura 2.6 – Esquema ilustrativo da localização de água subterrânea (TROY, 1994).

Segundo Langwaldt & Puhakka (2000), a migração dos contaminantes na subsuperfície é controlada pelas características do poluente (Tabela 2.5) e do local contaminado. A zona não saturada pode ser contaminada por compostos orgânicos, voláteis e dissolvidos, e pela fase orgânica líquida não-aquosa (NAPLs). Já a zona saturada pode ser atingida pelos contaminantes orgânicos solúveis em água e NAPLs; a fase orgânica líquida não-aquosa leve (LNAPLs) e a fase orgânica líquida não-aquosa densa (DNAPLs) migram seguindo ou não a direção do fluxo de água subterrânea. DNAPLs também podem contaminar o sistema capilar abaixo do aquífero, caso encontre alguma fratura na matriz rochosa.

Tabela 2.5 – Propriedades físico-químicas de poluentes e seu efeito sobre a migração na água subterrânea.

Propriedades físico-químicas	Variação	Comportamento na subsuperfície
Densidade (Kg dm^{-3})	< 1.0	Flutua na superfície de água
	> 1.0	Migra para o fundo do aquífero
Solubilidade (mg l^{-1})	Imiscível (NAPL) ^a	Produto livre, migra contra ou a favor do fluxo de água subterrânea
	Miscível	Migra com o fluxo de água subterrânea
Pressão de vapor - constante de Henry (atm)	< 50	Partição na fase aquosa
	>50	Volatilização através da zona não saturada
Coefficiente de partição etanol/água ($\lg_{10}K_{ow}$)	<10	Hidrofílico, alta solubilidade em água
	>10.000	Hidrofóbico, adsorção à matriz do solo

^a NAPL, fase orgânica líquida não-aquosa.

Modificado por Langwaldt & Puhakka (2000).

Song (2003) demonstrou que metabólitos provenientes da biodegradação de tolueno e o-xileno se aderem à matéria orgânica do solo, apresentando baixas taxas de mineralização; podendo dessa forma, permanecer por muitos anos no ambiente.

2.2.3 Toxicidade

Desde o século XVIII, a toxicidade, incluindo atividade carcinogênica, de substâncias químicas já era conhecida, mas não se tinha identificado os compostos responsáveis pelo aparecimento de doenças. Algumas observações em pacientes com câncer levaram a correlações entre o surgimento da doença com hábitos diários, como o consumo de tabaco e rapé, e atividades profissionais, tais como: exposição constante à fuligem do carvão, a determinados alcatrões e a óleos parafínicos. Em todos esses casos, os hidrocarbonetos aromáticos estão presentes (MOREIRA, 1999).

Lewis (1970) *apud* Moreira (1999) relaciona as características toxicológicas dos principais hidrocarbonetos aromáticos (Tabela 2.6). Os compostos com um maior número de anéis, exceto o benzeno, apresentam atividade carcinogênica marcante. As características venenosas e irritantes são equivalentes para quase todas essas substâncias.

No entanto, a preocupação com a toxicidade de BTEX não está restrita apenas a saúde humana; vários estudos foram desenvolvidos para avaliar esta questão usando como material de estudo microrganismos, plantas e animais, uma vez que o ambiente é um conjunto macro, e como tal, quando uma de suas partes é afetada todo o ecossistema de algum modo sofrerá alterações.

Segundo Herman *et. al.* (1991) há uma correlação linear entre a bioconcentração e a toxicidade de BTEX. Esses pesquisadores verificaram, utilizando a alga *Selenastrum capricornutum*, que benzeno e tolueno foram os menos tóxicos ($EC_{50} = 41$ mg/L) e mostraram menor potencial de bioconcentração, enquanto que o etilbenzeno e os isômeros de xileno apresentaram toxicidade similares (EC_{50} entre 4 e 5 mg/L) e grande potencial de bioconcentração.

Tabela 2.6 - Características toxicológicas dos principais hidrocarbonetos aromáticos (Lewis, 1970 *apud* Moreira, 1999).

Substância	Atividade Carcinogênica	Características Venenosas	Características Irritantes
BENZENO	Confirmada	+	+
TOLUENO	Teratogênico e mutagênico em testes de laboratório	+	+
ETILBENZENO	Teratogênico e mutagênico em testes de laboratório	+	+
ESTIRENO	Suspeito	+	+
XILENOS	Teratogênico e mutagênico em testes de laboratório	+	+
FENOL	Carcinogênicos em testes de laboratório	+	Severo
NAFTALENO	Sem consenso nos dados experimentais	+	+
FENANTRENO	Sem consenso nos dados experimentais	+	+
ANTRACENO	Sem consenso nos dados experimentais	+	+
BENZ[A]ANTRACENO	Confirmada	+	
CRISENO	Confirmada	+	
PIRENO	Questionada	+	
BENZO[A]PIRENO	Questionada	+	+

Hass *et. al.* (1995) avaliaram os efeitos pós-natal de xileno técnico (19% *o*-, 40% *m*-, 20% *p*-xileno e 15% etilbenzeno) em ratos, expondo-os a inalação de uma concentração de 499 ± 13 ppm. Os autores não observaram sinais de toxicidade materna e verificaram apenas uma leve redução no peso corporal da prole que não perdurou por muito tempo.

Gersberg *et. al.* (1995) avaliaram a toxicidade de BTEX sobre crustáceos da espécie *Ceriodaphnia dubia* após a biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina. Com a biorremediação, os níveis de BTEX reduziram cerca de 99% em um dos poços mais contaminados, contudo a toxicidade permaneceu semelhante ao período anterior à biorremediação.

Henner *et. al.* (1999) relataram que os hidrocarbonetos poliaromáticos de alto peso molecular não inibiram a germinação e o crescimento de plantas; por outro lado, os hidrocarbonetos voláteis (benzeno, tolueno e xilenos), estireno, naftaleno e outros foram a principal causa da toxicidade em plantas.

Junoven *et. al.* (2000) observaram, após a biorremediação de solo impactado com óleo, a redução de hidrocarbonetos totais seguida de um decréscimo na toxicidade microbiana, utilizando bactérias bioluminescentes.

Gil *et. al.* (2002) desenvolveram um biosensor, com uma linhagem bacteriana bioluminescente engenheirada geneticamente (GC-2), para testar a toxicidade de BTEX. A redução no nível de bioluminescência está diretamente relacionada à toxicidade do composto; esses autores verificaram que o benzeno foi a substância mais tóxica devido à sua alta solubilidade.

Saillenfait *et. al.* (2003) expuseram ratas gestantes a inalação de concentrações variadas (100, 500, 1000 e 2000 ppm) de etilbenzeno, isômeros de xileno e xileno técnico. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.7.

Tabela 2.7 - Efeitos provocados pela inalação de diferentes concentrações de etilbenzeno, isômeros de xileno e xileno técnico, em ratas gestantes e seus descendentes.

Substâncias	Efeitos Maternos	Efeitos Fetais
ETILBENZENO	Não causou morte. Ataxia, atividade motora reduzida (2000 ppm); redução significativa do peso corporal e do consumo alimentar (1000 e 2000 ppm).	Redução do peso corporal (significativa a partir de 1000 ppm); má formações viscerais; maior número de fetos, por ninhada, com variações esqueléticas.
O-XILENO	Não causou morte. Hipotonia e sonolência; redução significativa do peso corporal e do consumo alimentar (1000 e 2000 ppm).	Redução do peso corporal (500 e 2000 ppm); má formações viscerais (500 e 1000 ppm); maior número de fetos, por ninhada, com variações esqueléticas.
M-XILENO	Não causou morte. Redução significativa do peso corporal (2000 ppm) e do consumo alimentar (1000 e 2000 ppm).	Redução significativa do peso corporal (1000 e 2000 ppm); leve aumento na incidência de ossificação torácica incompleta (2000 ppm).
P-XILENO	Não causou morte. Redução do peso corporal (2000 ppm) e do consumo alimentar (1000 e 2000 ppm).	Redução significativa do peso corporal (1000 e 2000 ppm); má formação (hérnia diafragmática a 2000 ppm); maior número de fetos, por ninhada, com variações esqueléticas.
XILENO TÉCNICO	Não causou morte. Redução do peso corporal (1000 e 2000 ppm) e do consumo alimentar.	Redução significativa do peso corporal em todas as concentrações; má formação esporádica.

2.3 Processos de Descontaminação

2.3.1 Abióticos

Os processos abióticos incluem os métodos físicos e químicos para a remoção de poluentes.

Dentre os métodos físicos, destaca-se o *pump-and-treat* que é um método convencional em que a amostra aquosa poluída é bombeada para a superfície onde é tratada e posteriormente devolvida para o local. Os tratamentos incluem; adsorção, ultrafiltração, uso de biorreatores ou tratamento químico (TRAVIS & DOTY, 1990).

Os tratamentos químicos mais comuns são: a adição de surfactantes, neutralização com agentes químicos, precipitação, oxidação e extração por solventes (KOWALICK JR., 1991).

Além destes métodos, existem processos naturais responsáveis pela remoção ou transformação do contaminante, como: volatilização, foto-oxidação e oxidação atmosférica (FLOODGATE, 1984).

2.3.2 Biótico: Biorremediação

Devido aos diversos problemas ambientais e de saúde causados pelos componentes aromáticos, há um interesse crescente de se entender o destino e as formas de desaparecimento desses compostos para que haja o desenvolvimento de métodos mais eficientes para a remoção dos mesmos do ambiente (BARBIERI, 1998).

Uma das estratégias ecologicamente viável para atingir tal objetivo é a biorremediação, tecnologia que utiliza microrganismos vivos para degradar contaminantes ambientais e pode ser definida como a reação, catalisada biologicamente, que transforma compostos quimicamente complexos em compostos mais simples. No caso dos compostos orgânicos, geralmente há a conversão dos elementos do composto original em produtos inorgânicos, processo esse denominado de mineralização (ALEXANDER, 1999b).

A biorremediação pode ser efetuada *in situ* ou *ex situ*. As tecnologias *ex situ* removem fisicamente o material contaminado para outra área, onde é realizado o tratamento. As técnicas *in situ* envolvem o tratamento do material contaminado no próprio local.

Segundo Baker & Herson (1994a), alguns exemplos das tecnologias de biorremediação são:

- Bioaumento: adição de microrganismos a um meio poluído;
- Bioestimulação: ativação de populações microbianas em solos e/ou águas subterrâneas através da adição de nutrientes;
- Biofiltros: uso de colunas com microrganismos imobilizados para o tratamento de emissões gasosas;
- Biorreatores: biodegradação em um *container* ou reator para o tratamento de líquidos contaminados;
- Bioventilação: usada para o tratamento de solo contaminado através da introdução de oxigênio no solo para estimular o crescimento e a atividade microbiana;
- Compostagem: tratamento mesofílico/termofílico, aeróbico e anaeróbico em que o material contaminado é misturado em pilhas volumosas;
- “Landfarming”: sistema de tratamento para solos poluídos.

Em 1989, o petroleiro *Exxon Valdez* derramou cerca de 35.000 toneladas de petróleo, o que afetou 6.500 Km da linha costeira do estado do Alasca, que se espalharam por 2.331 Km² (PRITCHARD & COSTA, 1991). Este acidente formou a base para um estudo mais amplo sobre a técnica de bioestimulação, pois segundo Atlas (1995a) a degradação do petróleo, neste caso, foi limitada por nutrientes, constatando-se que a aplicação de fertilizantes foi uma estratégia que se obteve êxito. Entretanto, a adição de nutrientes ao meio ambiente pode trazer outros problemas como a eutrofização, reduzindo conseqüentemente a biodiversidade ambiental.

Para avaliar os efeitos da adição de nutrientes em sedimentos impactados com óleo, sobre a meio-fauna e a macro-fauna, Schratzberger *et. al.* (2003) desenvolveram um experimento onde os grupos naturais foram expostos a diferentes tratamentos (sedimentos sem óleo, com óleo e com óleo tratado com fertilizantes) por 45 semanas. Concluíram que a degradação do óleo foi maior nas áreas tratadas com fertilizantes, contudo não houve diferença significativa na taxa de recolonização da meio-fauna e da macro-fauna entre as áreas estudadas. Entretanto, há evidência experimental de que a adição de nutrientes a sedimento impactado com óleo pode ocasionar mudanças na ecologia microbiana em áreas tratadas (RÖHLING *et. al.*, 2002).

O processo de biofiltração vem sendo muito utilizado para tratar ar poluído pelos hidrocarbonetos monoaromáticos. Elmrini *et. al.* (2004) desenvolveram um biofiltro para analisar a remoção de vapores de xileno do ar e constataram que a eficiência de remoção foi cerca de 96%.

Nos Estados Unidos, produtos de biorremediação estão sendo comercializados. Aldrett *et. al.* (1997) testaram 13 desses produtos (12 agentes de bioaumento e 1 agente de bioestimulação) para verificar a eficiência destes na degradação de hidrocarbonetos do petróleo e observaram que os agentes avaliados aceleraram o processo de biodegradação.

Baker & Herson (1994a) destacam as vantagens e as desvantagens da biorremediação. Entre as vantagens encontram-se:

- As técnicas podem ser feitas no local contaminado;
- Causam pouco desequilíbrio ecológico;
- O custo é relativamente baixo;
- Elimina permanentemente os resíduos;
- Pode ser acoplada a outras técnicas de tratamento.

As principais desvantagens são:

- Alguns compostos químicos, como os clorados e metais, não são facilmente biodegradados;
- A degradação microbiana de determinados compostos pode levar à produção de substâncias mais tóxicas do que o composto original;
- A biorremediação é um procedimento cientificamente extensivo que deve ser realizado de acordo com as condições específicas do local, o que pode elevar os custos em relação às tecnologias convencionais;
- Há necessidade de monitoramento intensivo;
- Existem limitações legais para a implementação da biorremediação, as quais estão relacionadas com as condições do local e com o poluente a ser degradado.

2.4 Biodegradação de Hidrocarbonetos Aromáticos

Biodegradação é a quebra de compostos orgânicos que ocorre devido à atividade microbiana; tais compostos podem ser considerados como fontes de nutrientes ou substratos para os microrganismos.

Para atingir a biodegradação completa ou mineralização, ocorre uma série de reações, sendo cada uma catalisada por uma enzima específica que é sintetizada pela célula microbiana. A falta de enzimas biodegradadoras apropriadas é uma das razões que ocasiona a persistência dos contaminantes orgânicos, principalmente àqueles com estruturas químicas incomuns que não são reconhecidos pelas enzimas existentes (MAIER, 2000). Dessa forma, contaminantes orgânicos que apresentam estruturas similares àquelas de substratos naturais são degradados com maior facilidade.

A taxa de biodegradação depende das interações entre: o ambiente, o número e o tipo de microrganismos presentes e a estrutura química do contaminante a ser degradado. Geralmente, a biodegradação de poluentes orgânicos ocorre mais rápido em condições aeróbicas. Contudo, alguns microrganismos utilizam nitrato, sulfato, ferro ou manganês como aceptor final de elétrons degradando poluentes orgânicos anaerobicamente (WALTER & CRAWFORD, 1997).

Os hidrocarbonetos aromáticos geralmente são hidroxilados para formar dióis; os anéis são então clivados com a formação de catecóis que são posteriormente degradados em intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Fungos e bactérias formam intermediários diferentes; os fungos produzem trans-diidrodióis enquanto que as bactérias formam os cis-diidrodióis (Figura 2.7). Esta reação é catalisada pelas enzimas oxigenases que podem ser monooxigenases, as que incorporam um dos átomos de oxigênio na molécula do substrato, e dioxigenases, as que adicionam dois átomos de oxigênio no composto aromático (BARBIERI, 1998; ATLAS, 1995b;).

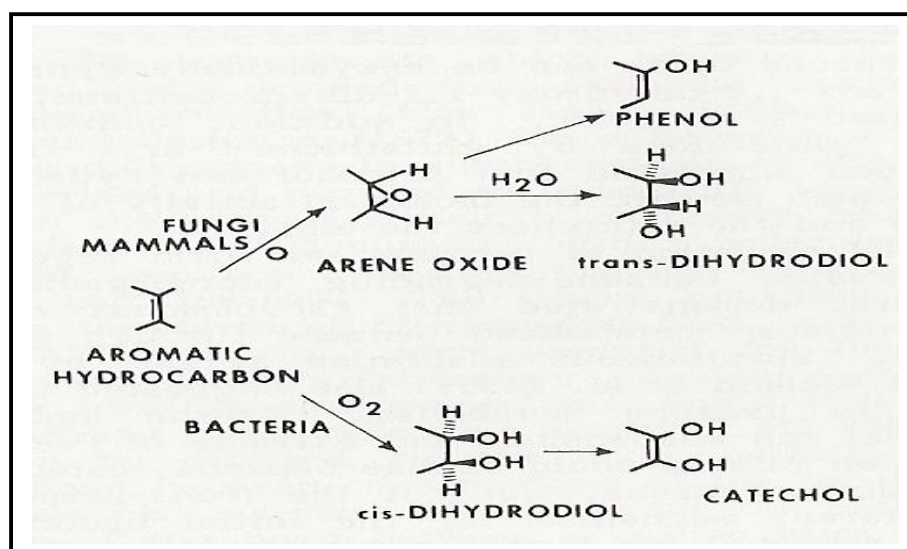


Figura 2.7 - Rotas de oxidação de hidrocarbonetos aromáticos por microrganismos procariotos e eucariotos.

O benzeno é considerado o hidrocarboneto aromático mais simples; sua degradação microbiana produz dois intermediários que têm aplicações industriais. Um deles é o *cis*-benzenoglicol que pode ser usado em polímeros e na indústria farmacêutica; o outro é o catecol e seus derivados que podem ser empregados na elaboração de aromas sintéticos como a vanilina (SMITH, 1990).

A introdução de grupos substituintes no anel benzênico permite outros mecanismos de biodegradação, podendo os microrganismos atuar na cadeia lateral, no anel ou em ambos.

O tolueno, o mais simples dos hidrocarbonetos substituídos é degradado tanto por ataques no anel como por hidroxilação do grupamento metila. Quando o anel é atacado, há a formação de 3-metilcatecol; o ataque no grupo metila forma o catecol (Figura 2.8). O sistema enzimático envolvido na biodegradação do tolueno pode ser comum para a biodegradação do *meta* e do *para*-xileno (Figura 2.9) (SMITH, 1990).

Vários microrganismos, incluindo bactérias, fungos e algas, são capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos, sendo a degradação bacteriana a mais conhecida.

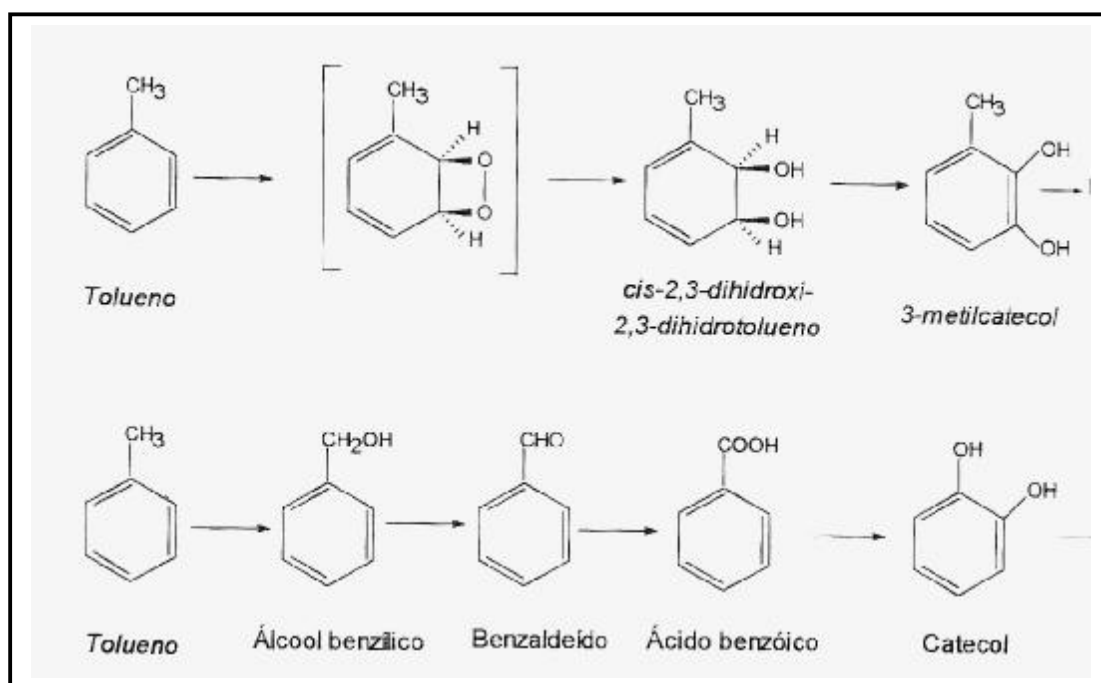


Figura 2.8 – Mecanismos de biodegradação do tolueno.

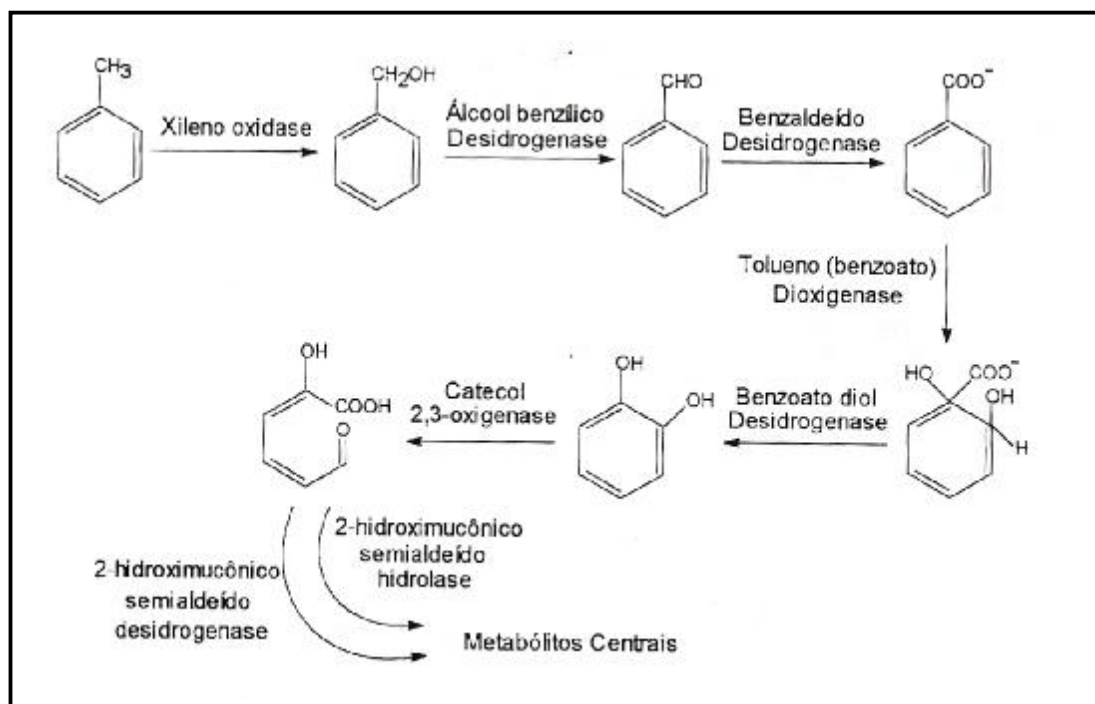


Figura 2.9 - Sistema enzimático da biodegradação do tolueno pelo ataque no grupo metila.

Os gêneros de bactérias e fungos mais comuns são: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Anthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Candida*, *Rhodothorula* e *Sporobolomyces* (LEAHY & COLWELL, 1990).

Entre os gêneros de algas, Cerniglia (1984) destaca: *Oscillatoria*, *Microcoleus*, *Nostoc*, *Anabaena*, *Agmenellum*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Chlamydomonas*.

Sorkhoh *et. al.* (1990) realizaram experimentos com bactérias e fungos isolados de amostras marinhas e de solo para avaliar a capacidade de degradação de óleo cru por esses microrganismos. Os isolados fúngicos foram *Aspergillus terreus*, *A. sulphureus*, *Mucor globosus*, *Fusarium* sp. e *Penicillium citrinum*, sendo a espécie *Mucor globosus* a mais ativa na degradação do óleo cru. Os isolados bacterianos compreenderam *Bacillus* sp., *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Nocardia* spp., *Streptomyces* spp. e *Rhodococcus* spp.; entre essas, as linhagens de *Rhodococcus* foram as mais eficientes na degradação do óleo cru.

Morgan *et. al.* (1993) estudaram a taxa e a extensão da biodegradação de BTEX por microrganismos naturais de água subterrânea contaminada com gasolina. Todos os compostos foram degradados sob condições aeróbicas e não houve aumento na degradação quando a

temperatura de incubação foi elevada de 10°C ou quando suplementos nutricionais orgânicos ou inorgânicos foram adicionados; no entanto, o oxigênio foi o fator limitante. Sob condições anaeróbicas denitrificantes houve biodegradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno, *m*-xileno e *p*-xileno, mas não de *o*-xileno.

Holliger & Zehnder (1996) afirmaram que a oxidação dos três isômeros de xileno ocorre, tanto em culturas enriquecidas como em culturas puras, sob condições anaeróbicas. O isômero *meta*-xileno é um substrato para bactérias denitrificantes, e estudos experimentais indicaram que as etapas iniciais são as mesmas que ocorrem na degradação do tolueno. Os isômeros *orto*- e *para*-xileno são oxidados por enriquecimento de culturas. Além disso, algumas bactérias denitrificantes e redutoras de sulfato podem transformar os xilenos em metilbenzoatos, cujo processo de degradação ainda não é conhecido.

Kao & Wang (2000) relataram que em zonas redutoras de ferro (aquéfero subterrâneo contaminado com gasolina), tolueno e *o*-xileno são removidos mais rapidamente do que *m*- e *p*-xileno, benzeno e etilbenzeno. Entretanto, em zonas denitrificantes, a ordem da degradação foi a seguinte: tolueno, *m*- e *p*-xileno, etilbenzeno, *o*-xileno e benzeno.

Juhasz & Naidu (2000) listaram várias bactérias e fungos capazes de degradar naftaleno, acenafteno, antraceno, fluoranteno, pireno e criseno.

Yang *et. al.* (2000) demonstraram, através de um experimento com biofiltro aeróbico, que um biofilme formado por consórcios bacterianos, proveniente de amostras de sedimento de um estuário contaminado com petroderivados, degradaram o óleo Diesel sob condições de alta salinidade (> 40‰).

Bento & Gaylarde (2001) relataram 18 espécies de microrganismos encontrados em tanques de óleo Diesel no Brasil; entre estas, os fungos *Hormoconis resinae*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Candida silvicola* e as bactérias *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. cresceram em meio mineral com óleo Diesel como única fonte de carbono.

Segundo Venosa & Zhu (2003), hidrocarbonetos monoaromáticos são tóxicos a alguns microrganismos devido à sua ação como solvente das membranas celulares, mas em baixas concentrações eles são facilmente degradados sob condições aeróbicas.

2.4.1 Metodologia Analítica

A análise quantitativa e/ou qualitativa de hidrocarbonetos aromáticos presentes em matrizes complexas (amostras aquosas ou de solo) é de fundamental importância para as pesquisas ambientais.

Como vários contaminantes, inclusive BTEX, apresentam natureza mutagênica e/ou carcinogênica é necessário o seu monitoramento em ambientes naturais antes e depois de serem submetidos a processos de descontaminação. Tal monitoramento é feito por várias metodologias analíticas que tendem a se aperfeiçoar para obter resultados fidedignos no menor tempo possível e preferencialmente com baixo custo.

Diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas para analisar compostos orgânicos em amostras aquosas. Entre estas, destacam-se: extrações em fase sólida - SPE (EZQUERRO *et. al.*, 2004; MATISOVÁ *et. al.*, 2002) ou sistema *purge-and-trap* - PT (JOOS *et. al.*, 2003; ROSELL *et. al.*, 2003) e extração líquido-líquido - LLE (SABATÉ *et. al.*, 2004; LACOTTE *et. al.*, 1995) combinada com a cromatografia gasosa - GC através da detecção por ionização em chama - FID acoplada à espectrometria de massa - MS.

O sistema PT pode ser estático ou dinâmico. O método PT estático ou SPE envolve o equilíbrio termodinâmico de substâncias voláteis entre as fases, aquosa e gasosa, de uma amostra contida em um recipiente termooestável fechado. A fase gasosa é absorvida em um suporte sólido, posteriormente desorvida, injetada na coluna do GC e analisada sem a influência da matriz aquosa (SAKATA *et. al.*, 2004).

Alkalde *et. al.* (2004) utilizaram a técnica de microextração em fase sólida do *headspace* (HS-SPME) seguida por GC-MS como um método alternativo para avaliar a contaminação ocupacional por BTX, analisando a urina de trabalhadores de uma área industrial.

O método PT dinâmico ou convencional extrai compostos orgânicos voláteis passando um fluxo de gás inerte por uma agulha de pequena abertura para gerar diversas bolhas gasosas na amostra aquosa, mantida dentro de um tubo de vidro completamente selado. Dessa forma, cria-se uma grande área interfacial entre as fases líquida e gasosa, acelerando a distribuição dos compostos voláteis entre essas fases. Os compostos dissolvidos voláteis são quase totalmente removidos da amostra aquosa através da injeção do gás inerte; são imobilizados em matriz criogênica e/ou sorvente para concentrar os analitos extraídos. Geralmente, essa matriz é rapidamente aquecida para liberar os compostos voláteis, retidos num sistema GC

através de injeção, para separação e detecção dos compostos (SWINNERTON *et. al.*, 1962 *apud* YANG *et. al.*, 2004).

Uma variação do sistema PT dinâmico é o sistema *spray-and-trape* - ST que utiliza um bico de *spray* para gerar várias gotas pequenas da amostra dentro de uma câmara de extração. Isto acelera a partição dos compostos voláteis devido ao contato de grande volume de gás com um pequeno volume de líquido, o oposto do que ocorre no sistema PT (BAYKUT & VOIGT, 1992 *apud* YANG *et. al.*, 2004).

Yang *et. al.* (2004) construíram um sistema ST acoplado ao GC, utilizando a detecção por captura de elétrons - GC-ECD e GC-FID, a fim de monitorar compostos orgânicos voláteis - VOCs dissolvidos em corpos de água que já tinham sido analisados pelo método PT convencional. Quando compararam os dois métodos para análise de BTEX, verificaram que o ST mostrou baixas taxas de recuperação e que em pequenas concentrações de BTEX (10-20 µg/L), essas taxas estavam relacionadas com a constante de Henry - K_H ; essa constante determina a distribuição de um composto entre a solução e o *headspace*, ou seja, compostos com baixos valores de K_H são mais solúveis em água e apresentam menor pressão de vapor no *headspace*, sendo mais difíceis de serem extraídos.

Uma alternativa do sistema PT estático é a microextração por solvente do *headspace* - HSM; nesta técnica, uma microgota de um solvente orgânico é expulsa de uma microseringa cromatográfica, sendo exposta no *headspace* acima da amostra aquosa. Os compostos voláteis são extraídos e concentrados na microgota por difusão. A microgota é então retraída na microseringa e injetada diretamente no sistema cromatográfico (PRZYJAZNY *et. al.*, 2000 *apud* PRZYJAZNY & KOKOSA, 2002).

A extração líquido-líquido - LLE é um método que permite a separação de um composto em um sistema de duas fases, uma de solvente orgânico e outra aquosa, usando um funil de separação. Com a agitação do funil de separação o composto passa para a fase onde está o solvente de maior afinidade (Figura 2.10). Posteriormente, a separação é feita, coletando-se o extrato e submetendo-o à análise cromatográfica (COLLINS *et. al.*, 1997).

Segundo Gioseffi (1998), esta técnica produz bons resultados, embora ofereça algumas desvantagens, como: maior tempo de manipulação; grande volume de amostras e solventes; possibilidade de ocorrer emulsificação; geração de grandes volumes de resíduos de solventes orgânicos, etc. Apesar das desvantagens citadas, a metodologia de extração líquido-líquido foi a escolhida neste trabalho por ser uma técnica relativamente simples, em comparação

com as descritas nos parágrafos anteriores, por não requerer altos custos nem aparelhagem especial.

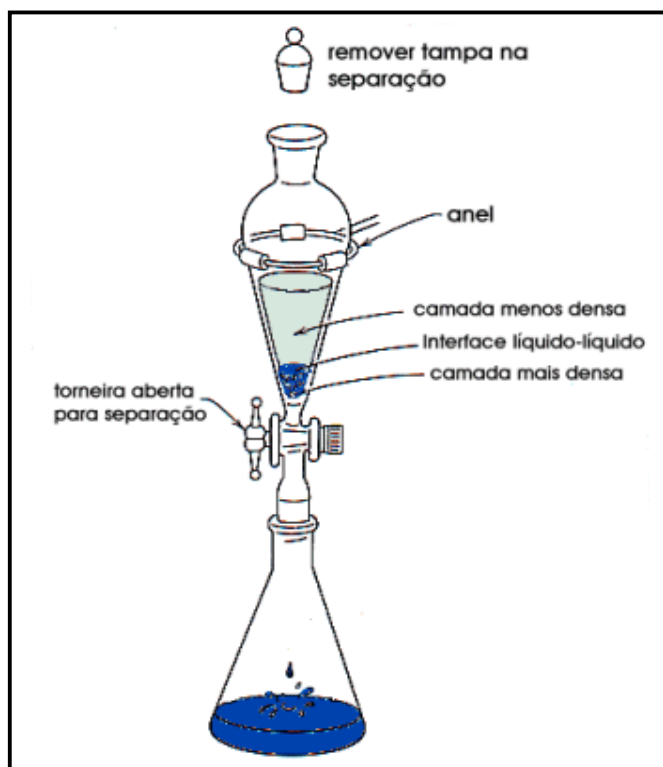


Figura 2.10 - Desenho esquemático representando o método de extração líquido-líquido.

2.5 Fatores que Influenciam a Biodegradação

As taxas de biodegradação de poluentes ambientais são influenciadas por fatores abióticos e bióticos.

2.5.1 Fatores Abióticos

A) Temperatura

De maneira geral, temperaturas baixas estão associadas à pouca ou nenhuma biodegradação de muitos substratos orgânicos. No caso do petróleo, baixas temperaturas promovem um aumento na viscosidade, uma redução na volatilidade de alcanos tóxicos de cadeias curtas, elevando conseqüentemente sua solubilidade o que poderá acarretar num

decréscimo da atividade enzimática (ATLAS, 1995b). Em temperaturas elevadas, a atividade microbiana aumenta em resposta a condições mais favoráveis, atingindo um máximo entre 30 e 40°C. Acima de 40°C, ocorre uma redução ou, até mesmo, uma interrupção da biodegradação causada pela elevação da toxicidade dos hidrocarbonetos à membrana celular e pela desnaturação de enzimas (LEAHY & COLWELL, 1990)

B) pH

A taxa de biodegradação tende a declinar em acidez ou alcalinidades extremas (ALEXANDER, 1999b). Em solos, a taxa de degradação de hidrocarbonetos é maior em condições alcalinas do que em condições ácidas. Em solos ácidos, os fungos são mais competitivos do que as bactérias, que preferem condições neutras (MAIER, 2000). Estudos têm mostrado que a degradação de óleo aumenta com o aumento de pH e que a degradação ótima ocorre sob condições levemente alcalinas (VENOSA & ZHU, 2003).

C) Nutrientes

O crescimento dos microrganismos depende do suprimento de nutrientes. O nitrogênio e o fósforo são os nutrientes mais utilizados na bioestimulação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos (BAKER & HERSON, 1994b). Teoricamente, aproximadamente 150 mg de nitrogênio e 30 mg de fósforo são utilizados na conversão de 10g de hidrocarbonetos em material celular (VENOSA & ZHU, 2003). Normalmente, os microrganismos têm uma proporção média de C:N, dentro da sua biomassa, de cerca de 5:1 a 10:1, dependendo do tipo de microrganismo. Em áreas contaminadas com petróleo, uma proporção de aproximadamente 100:10:1 (C:N:P) é freqüentemente usada (MAIER, 2000).

O oxigênio é um nutriente muito importante na biodegradação, pois geralmente a biodegradação aeróbica é mais rápida do que a anaeróbica.

D) Umidade

Os microrganismos necessitam de um suprimento adequado de água para a degradação ótima do poluente. Geralmente, em solos contaminados com óleo cru, obtêm-se taxas ótimas de biodegradação quando o teor da umidade do solo está entre 30% e 90% da capacidade de absorção de água do mesmo. Contudo, o melhor valor de umidade depende: das propriedades

do solo, do poluente e do agente despoluidor, que são os microrganismos. (ALEXANDER, 1999b).

E) Estrutura e Concentração do Poluente

Segundo Del'arco & França (2001), a ordem decrescente de susceptibilidade ao ataque microbiano dos hidrocarbonetos é a seguinte: alifáticos, ramificados, aromáticos de baixo peso molecular, cíclicos e poliaromáticos. Os compostos polares ou asfálticos apresentam uma taxa extremamente baixa de biodegradação, podendo ser considerados como recalcitrantes ao ataque microbiano.

A biodegradação de hidrocarbonetos poliaromáticos também é afetada por efeitos estéricos e eletrônicos dos grupos substituintes que bloqueiam o contato entre o poluente e a enzima (MAIER, 2000).

A baixa concentração do poluente à ação microbiana, ou seja, a baixa biodisponibilidade é um fator limitante à biodegradação. Um poluente em grande quantidade no ambiente pode não estar necessariamente disponível aos agentes degradadores, devido à sorção do mesmo ao material particulado que se encontra no local (MAIER, 2000).

2.5.2. Fatores Bióticos

A) Predação por Protozoários

Protozoários que se alimentam de bactérias no ambiente podem reduzir a população de degradadores a níveis onde a biodegradação é afetada negativamente (RADAMAN *et. al.*, 1990).

B) Troca Genética

Muitos genes que carregam os códigos para a síntese das enzimas degradativas são encontrados nos plasmídeos. A transferência de plasmídeos pode ocorrer na natureza, dependendo da interação biológica e de fatores físico-químicos, os quais afetam o crescimento, a sobrevivência e a atividade microbiana (CHAUDHRY & CHAPALAMADUGU, 1991).

C) Adaptação

A biodegradação é facilitada quando os microrganismos são previamente expostos aos poluentes devido à ocorrência de um aumento do potencial de oxidação dos hidrocarbonetos, tendo em vista que os microrganismos já estão adaptados (BAUER & CAPONE, 1988). Esse mecanismo de adaptação ainda não está bem compreendido (WIGGINS *et. al.*, 1987).

De acordo com Atlas (1995b), em ambientes não poluídos, geralmente a percentagem de bactérias que degradam hidrocarbonetos é menor do que 1% da população bacteriana total. Quando um ambiente está poluído com petróleo, a proporção de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos frequentemente excede 10% da população bacteriana total.

D) Consórcios Microbianos

Uma única espécie de microrganismo dificilmente será capaz de mineralizar misturas complexas de hidrocarbonetos; portanto, consórcios microbianos permitem a atuação de enzimas distintas, degradando completamente o poluente (HILL, 1984).

Segundo Alexander (1999b), esses consórcios microbianos representam tipos de sinergismo que envolvem vários mecanismos: a) Uma ou mais espécies fornecem vitaminas do complexo B, aminoácidos ou outros fatores de crescimento para um ou mais microrganismos consorciados; b) Uma espécie cresce sobre o poluente e realiza uma degradação incompleta para produzir um ou vários produtos orgânicos, e a segunda espécie mineraliza tais produtos; c) A primeira espécie converte o substrato em um metabólito tóxico que pode reduzir a transformação, mas a reação procede rapidamente se o segundo membro da associação destrói o inibidor, ou seja, é capaz de usá-lo como uma fonte de carbono para crescimento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fonte de Carbono

A fonte de carbono, utilizada nesse trabalho, refere-se aos isômeros de xileno, isolados e a mistura deles (~33% de cada), cujas características estão expressas na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Características dos isômeros de xileno utilizados como fonte de carbono.

CARACTERÍSTICAS	ISÔMEROS DE XILENO		
	<i>orto-xileno</i>	<i>meta-xileno</i>	<i>para-xileno</i>
Fabricante	VETEC	VETEC	VETEC
Percentual de pureza	98%	99%	99%
Faixa de ebulição	143-145°C	139,3°C	137-139°C
Densidade	0,8801	0,863-0,864	0,861-0,862
Peso Molecular	106,17	106,17	106,17
Massa	1L ≈ 0,89Kg	1L ≈ 0,86Kg	1L ≈ 0,86Kg

3.2 Microrganismos Utilizados

Foram utilizadas quarenta linhagens bacterianas, previamente isoladas de amostras, poluídas por petroderivado, coletadas na Lagoa da Barra (Figura 3.1), situada no Complexo Industrial Portuário de Suape-PE. O isolamento foi realizado, empregando-se as técnicas por incorporação e por nebulização, após o enriquecimento seletivo em meio mineral de Büshnell-Haas - BH (Tabela 3.2), contendo os petroderivados: óleo Diesel, ou gasolina, ou *bunker* ou querosene, como única fonte de carbono e energia.



Figura 3.1 – Vista da Lagoa da Barra, situada no Complexo Industrial Portuário de Suape-PE, local de coleta das amostras utilizadas no isolamento dos microrganismos.

Tabela 3.2 - Composição do meio mineral de Büshnell-Haas (ATLAS, 1995c).

COMPONENTES	
K ₂ HPO ₄	1,00g
KH ₂ PO ₄	1,00g
NH ₄ NO ₃	1,00g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,20g
FeCl ₃ .2H ₂ O	0,05g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02g
Água destilada	1L
Quando sólido	
Agar	15,00g
pH 7,0 ± 0,2	

3.2.1 Manutenção das Linhagens Bacterianas

Os isolados bacterianos foram repicados mensalmente em tubos inclinados, contendo o meio *Tryptic Soy Agar* - TSA (Tabela 3.3), os quais eram mantidos sob refrigeração (4 a 8°C) para a realização dos ensaios subsequentes.

Tabela 3.3 – Composição do meio *Tryptic Soy Agar* (ATLAS, 1995c).

COMPONENTES	
Tripticase	15,00g
Peptona de soja	5,00g
Agar	15,00g
Cloreto de sódio	5,00g
Água destilada	1L
pH 7,3 ± 0,2	

3.3 Seleção de Linhagens Degradoras, Isoladas e em Consórcios

As quarenta linhagens bacterianas foram submetidas à seleção, empregando-se a técnica de Hanson *et. al.* (1993), a qual utiliza o indicador redox 2,6 diclorofenol indofenol - DCPIP que atua como aceptor final de elétrons no processo de oxidação biológica. Se o isolado bacteriano a ser testado for capaz de oxidar os isômeros de xileno ou a mistura deles, será observada a mudança de coloração do meio de cultura de azul para incolor.

O teste de seleção foi realizado em placas multipoços, onde, para cada cultura, tinha-se o poço teste, o poço controle negativo e o poço controle positivo, todos em triplicata. O poço teste continha 270 µL de inóculo em meio BH, 1% da fonte de carbono e 5 µL do indicador redox; o poço controle negativo tinha apenas 270 µL de meio BH com 1% da fonte oleosa e 5 µL do indicador e o poço controle positivo incluía 270 µL de inóculo em meio BH, 1% de uma solução de glicose a 10% e 5 µL do indicador DCPIP.

O inóculo para cada poço teste foi preparado em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio BH, cuja suspensão bacteriana foi padronizada por comparação com o tubo nº 5 da escala de MacFarland, o que corresponde a uma concentração celular da ordem de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Cada inóculo foi exposto a 1% da fonte oleosa de hidrocarboneto, sendo incubados a $30 \pm 1^\circ\text{C}$,

sob agitação de 200 rpm, por 12h, para uma prévia adaptação à fonte de carbono, e, após esse período, foram retiradas alíquotas e transferidas para as placas multipoços, conforme descrição citada no parágrafo anterior.

O inóculo para o poço controle positivo também foi preparado da mesma forma que o inóculo para o poço teste, sendo que a fonte de carbono empregada foi a glicose, não havendo o período de 12h de adaptação, tendo em vista que esta é a fonte de carbono e energia preferencial para quase todas as bactérias.

Após o preenchimento das placas multipoços, estas foram incubadas a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ e o tempo de viragem do indicador redox, ocasionado pelas bactérias testadas, foi acompanhado durante 72 horas.

A seleção dos consórcios microbianos foi realizada, utilizando-se a mesma técnica. O inóculo consorciado foi preparado em tubos de ensaio, contendo 5 mL do meio BH, e suspensão de cada cultura selecionada padronizada por comparação com o tubo nº 5 da escala de MacFarland, totalizando um volume final de 10 mL, além de 1% da fonte oleosa. Os consórcios foram incubados a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação de 200 rpm, por 12h, para se adaptarem à fonte de carbono.

3.4 Identificação da Linhagem Bacteriana Selecionada

Realizou-se uma caracterização preliminar do isolado bacteriano selecionado através de observações macroscópicas e microscópicas, bem como, pela efetivação de alguns testes bioquímicos (SMIBERT & KRIEG, 1994).

A cultura selecionada foi identificada a nível de espécie pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, sob a responsabilidade do Prof. Marcos Rogério Totola, empregando-se a determinação do perfil de ácidos graxos em cromatografia gasosa usando um GC 5890 (Hewlett-Packard, série II, serial 3223^a42710) equipado com um detector de ionização em chama (FID), através do Sistema de Identificação Microbiana MIDI.

3.5 Ensaios de Aclimação da Linhagem Selecionada

A aclimação da linhagem bacteriana promissora foi realizada em frascos Erlenmeyer (500 mL), vedados com rolhas de borracha, contendo o meio mineral BH, inóculo e

concentrações crescentes da fonte de carbono, totalizando um volume final de 100 mL. Os frascos, em duplicata, foram submetidos à agitação de 200 rpm, a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 120 horas.

O inóculo inicial foi obtido através do crescimento em caldo nutritivo *Tryptic Soy Broth* – TSB (Tabela 3.4) a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, sob agitação de 200 rpm, por 24h. Ao término desse tempo, as células foram centrifugadas, ressuspensas em meio BH e quantificadas pelo método de plaqueamento *pour plate*.

Tabela 3.4 – Composição do meio *Tryptic Soy Broth* (ATLAS, 1995c).

COMPONENTES	
Tripticase	17,00g
Peptona de soja	3,00g
Cloreto de sódio	5,00g
Fosfato de potássio	2,50g
Dextrose	2,50g
Água destilada	1L
pH $7,3\pm 0,2$	

Após o período de cultivo (120h), foram retirados 20% do material bioprocessado, para inocular o meio fresco de BH do experimento seguinte, contendo concentrações crescentes da fonte oleosa (1%, 3% e 5%), conforme Figura 3.2. Em cada uma dessas concentrações foram coletadas amostras, a intervalos de 24h, para efetuar a quantificação bacteriana e a determinação do pH. A tensão superficial do meio foi medida no início e no final dos experimentos.

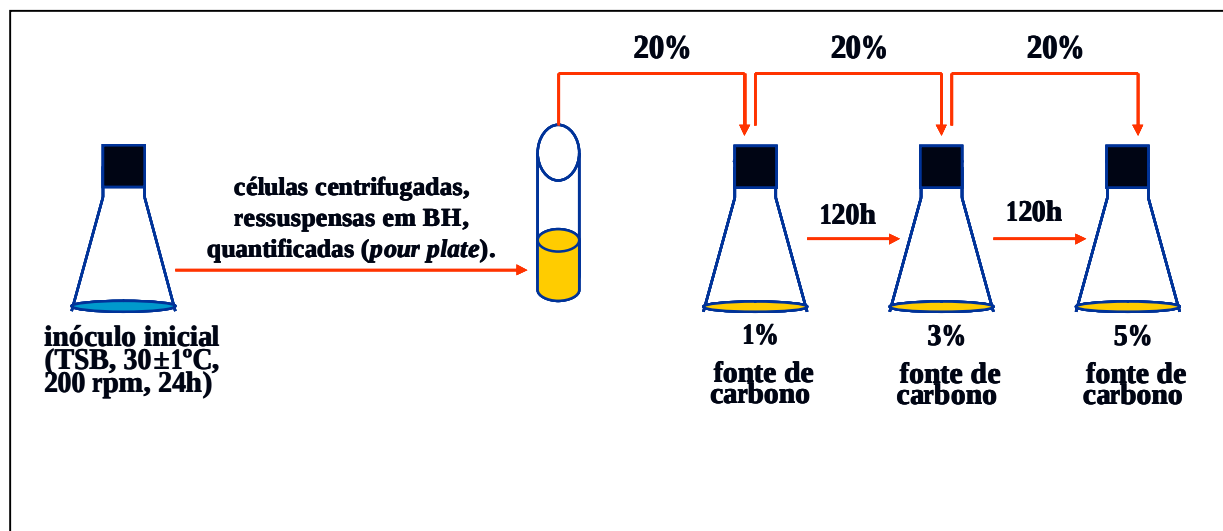


Figura 3.2 – Esquema ilustrativo dos ensaios de aclimação.

3.5.1 Determinação do pH

As medições de pH foram realizadas em potenciômetro digital DIGIMED[®] modelo DM-21.

3.5.2 Determinação da Tensão Superficial do Meio

A determinação da tensão superficial foi realizada pelo método da leitura através da submersão do anel de platina no meio líquido, isento de células, em tensiômetro manual CSC-DUNOY 70.545. Para obtenção do meio líquido isento de células, as amostras foram submetidas à filtração a vácuo, usando-se membranas filtrantes, com porosidade de 0,22 μm .

3.5.3 Quantificação Bacteriana

A contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) foi efetuada, empregando-se o método *pour plate* em placas de Petri, contendo o meio TSA (Tabela 3.3) para o crescimento microbiano, após 48h de incubação a $30\pm 1^\circ\text{C}$.

3.6 Ensaios para a Verificação das Perdas Abióticas de Xileno

Devido à volatilidade do xileno e à necessidade da linhagem bacteriana selecionada crescer em condições aeróbicas, os ensaios que antecederam aos de biodegradação tiveram o objetivo de determinar o aparato experimental que oferecesse uma menor perda abiótica. Nesse sentido, foram testados três aparatos experimentais:

3.6.1 Aparato experimental “A”

Constou de uma coluna de vidro (500 mL) dotada de uma placa sinterizada, para promover a formação de pequenas bolhas de ar, ligada a uma bomba de aquário. A coluna era vedada com rolha de silicone, onde se havia acoplado um condensador de tubo reto e um coletor de amostras, cuja extremidade estava ligada a um tubo de látex vedado com pinça de Hoffman. O ar, antes de entrar na coluna, era passado por um filtro absoluto para fins de esterilização. O condensador era resfriado por um banho refrigerante de água destilada numa temperatura entre 10-15°C, faixa de temperatura adequada para liquefazer o xileno. Todo o sistema foi montado no interior de uma capela exaustora cuja temperatura variava entre 30°C e 35°C (Figura 3.2).

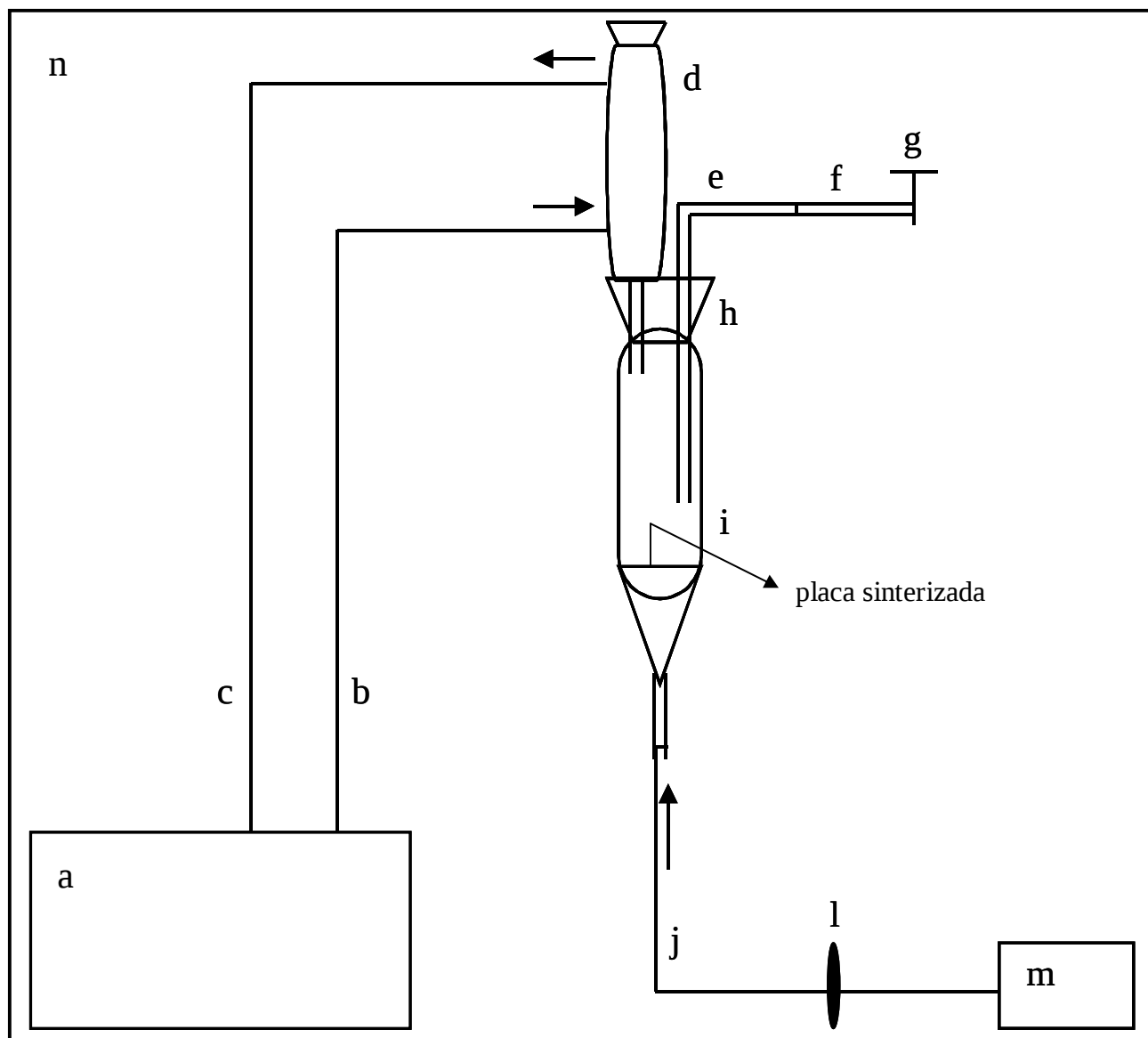


Figura 3.3– Esquema do aparato experimental “A” para verificação de perdas abióticas de xileno. a: banho refrigerante de água destilada; **b:** tubulação para entrada do banho refrigerante; **c:** tubulação para saída do banho refrigerante; **d:** condensador de tubo reto; **e:** coletor de amostras; **f:** tubo de látex; **g:** pinça de Hoffman; **h:** rolha de silicone; **i:** coluna de vidro (500 mL) dotada de uma placa sinterizada; **j:** tubulação para entrada de ar; **l:** filtro absoluto; **m:** bomba de aquário; **n:** capela exaustora.

A coluna de vidro foi preenchida com um volume final de 300 mL, sendo que 95% era de meio BH e 5% (0,013 g/L) do isômero *orto*-xileno. Essa mistura foi aerada durante 72h e a intervalos de 12h eram coletadas alíquotas, através do acoplamento de uma seringa descartável ao tubo látex do coletor de amostras, para plaqueamento em meio TSA, com vistas a detectar possível contaminação bacteriana. Terminado esse período, todo o líquido contido na coluna foi transferido para frasco âmbar, submetido a resfriamento em gelo por cerca de 3h e processado para análise cromatográfica.

Esse procedimento foi repetido duas vezes e como se constatou uma elevada perda abiótica reduziu-se o tempo experimental para 24h e posteriormente para 12h. No experimento com duração de 24h, as amostras para plaqueamento foram coletadas a cada 4h e no experimento de 12h, a coleta foi efetuada a cada 2h.

3.6.2 Aparato experimental “B”

Frascos Erlenmeyer (500 mL), vedados com rolha de borracha (Figura 3.3), contendo 95% de meio BH e 5% (0,004 g/L) do isômero *orto*-xileno, totalizando um volume final de 100 mL, foram utilizados.

Os frascos foram submetidos à agitação de 200 rpm, à temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ por dois períodos: 24h e 72h. Para cada período, foram usados frascos em triplicata. Alíquotas de 0,5 mL foram coletadas nos tempos, inicial e final, para verificar possível contaminação bacteriana. Ao término desses tempos, os frascos foram resfriados em gelo por cerca de 3h e todo o volume foi submetido à análise cromatográfica.



Figura 3.4– Aparato experimental “B” para verificação de perdas abióticas de xileno.

3.6.3 Aparato experimental “C”

Frascos âmbar (100 mL), vedados com tampa plástica rosqueada (Figura 3.4), contendo 95% de meio BH e 5% (0,004 g/L) do isômero *orto*-xileno, totalizando um volume final de 100 mL, foram empregados.

Os frascos, em triplicata, foram submetidos à agitação de 200 rpm, à temperatura de $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h e 72h. Alíquotas de 0,5 mL foram coletadas nos tempos, inicial e final, para verificar possível contaminação bacteriana. Ao final desses tempos, os frascos foram resfriados em gelo por cerca de 3h e todo o volume foi submetido à análise cromatográfica.



Figura 3.5– Aparato experimental “C” para verificação de perdas abióticas de xileno.

3.7 Ensaio de Biodegradação

Os ensaios de biodegradação foram realizados apenas com o aparato experimental “B” por este ter apresentado menores perdas abióticas. Os experimentos foram efetuados em triplicatas, contendo em cada frasco Erlenmeyer: 75% do meio BH, 20% de inóculo aclimatado e 5% da fonte de carbono (cerca de 0,004g/L dos isômeros isolados e da mistura deles), totalizando um volume final de 100 mL. Os frascos foram submetidos à agitação de 200 rpm, a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante os períodos de 24h e 72h. Os inóculos foram obtidos a partir da suspensão bacteriana aclimatada com 5% da fonte oleosa. Frascos contendo 95% de meio BH e 5% da fonte de carbono foram usados como controle.

Durante esses ensaios foram realizadas determinações do crescimento microbiano e da concentração residual de xilenos por análise cromatográfica.

3.7.1 Quantificação Bacteriana

Tanto nos frascos controle quanto nos frascos teste, foram coletadas alíquotas nos tempos, inicial e final, para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL) pelo método *pour plate* em placas de Petri contendo o meio TSA (Tabela 3.3).

3.7.2 Análises Cromatográficas

Após o resfriamento em gelo por 3h, todo o volume contido nos frascos foi submetido à extração da fase apolar com acetato de etila (1:1) e os extratos foram submetidos às análises cromatográficas. As condições operacionais de tais análises estão discriminadas na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Condições operacionais do sistema GC-MS.

Parâmetros do sistema GC-MS	Valores
Temperatura inicial de injeção	25,0°C
Temperatura da interface	230,0°C
Modo de controle	<i>Split</i>
Pressão de entrada	48,9 Kpa
Fluxo da coluna	1,0 mL/min
Velocidade linear	36,1 cm/seg
Fluxo total	52,2 mL/min
Tempo de equilíbrio	1,0 min
Parâmetros da coluna	Descrição/Valores
Nome	DB-5 MS
Número de série	US 2278875H
Espessura	0,25 µm
Comprimento	30,0 m
Diâmetro interno	0,25 mm

Para verificar a eficiência do método de extração, foram preparados, em triplicatas, frascos teste contendo *orto*-xileno como fonte de carbono, e imediatamente foram submetidos a resfriamento por 3h; a seguir procederam-se as etapas de extração e análise cromatográfica.

As análises cromatográficas foram realizadas com o objetivo de determinar a concentração residual de xileno dissolvido no meio líquido, e não o que volatilizou ou o que foi biotransformado. Essa avaliação foi efetuada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), comparando-se a concentração residual do composto no meio líquido dos frascos controle (sem microrganismos) com a concentração residual dos frascos teste (com microrganismos); através do decaimento dos picos do composto em função do tempo de retenção, obtendo-se portanto o percentual de biodegradação da fonte de carbono testada.

3.7.3 Tratamento Estatístico

Os valores referentes à quantificação bacteriana e ao percentual de biodegradação de xilenos foram submetidos a tratamento estatístico.

Os dados de biodegradação foram transformados por arcoseno $\sqrt{x}/100$ antes de serem submetidos à análise de variância. Após esta análise, as médias foram comparadas pelo teste de Newman-Keuls ($p \leq 0,05$), utilizando-se o programa Statistica (1997).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de Linhagens Degradadoras, Isoladas e em Consórcios

Dentre as quarenta bactérias testadas, apenas uma, especificada na Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE como UFPEDA-816, foi capaz de oxidar os três isômeros de xileno, isolados ou a mistura deles (~33% de cada isômero), promovendo a descoloração do meio de cultura após 12h de incubação a $30\pm 1^\circ\text{C}$ (Figuras 4.1 a 4.4).

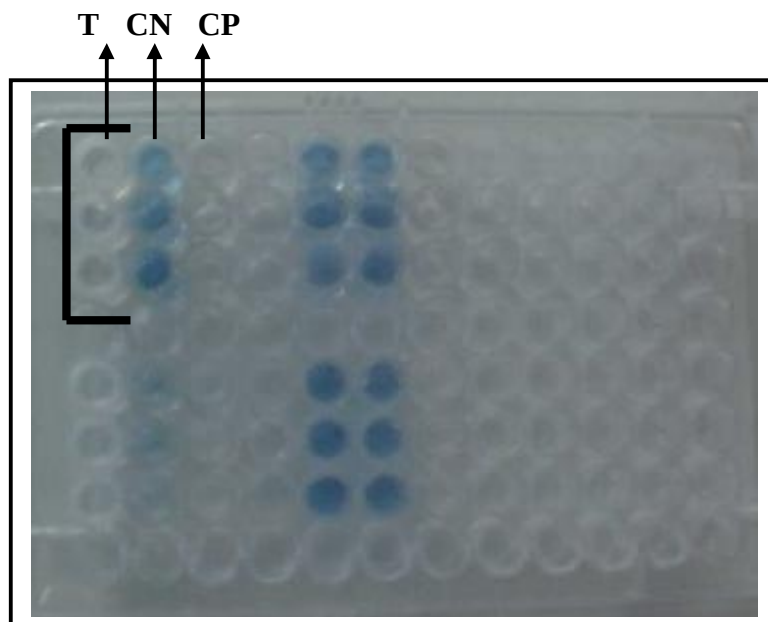


Figura 4.1 - Viragem do indicador redox (DCPIP) pela linhagem UFPEDA-816, em *orto*-xileno, após 12h de incubação a $30\pm 1^\circ\text{C}$. T: poço teste; CN: poço controle negativo; CP: poço controle positivo.

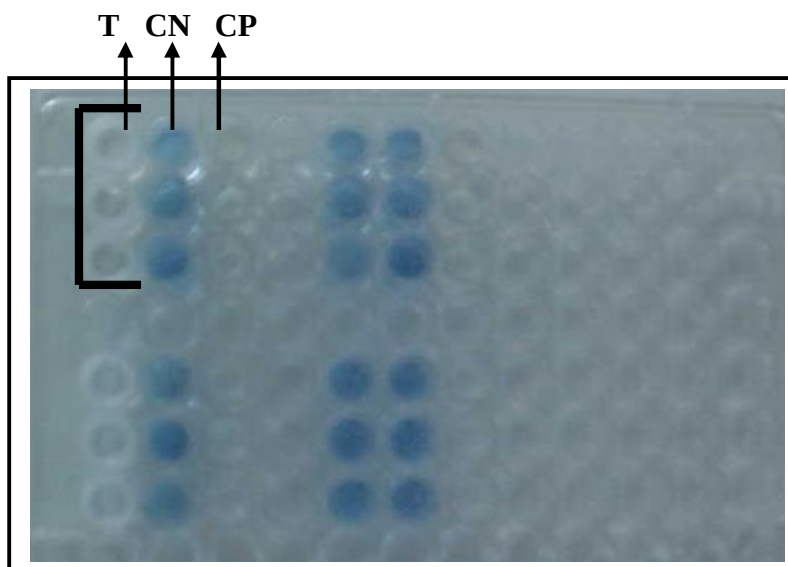


Figura 4.2 - Viragem do indicador redox (DCPIP) pela linhagem UFPEDA-816 em *meta*-xileno, após 12h de incubação a $30\pm 1^\circ\text{C}$. T: poço teste; CN: poço controle negativo; CP: poço controle positivo.

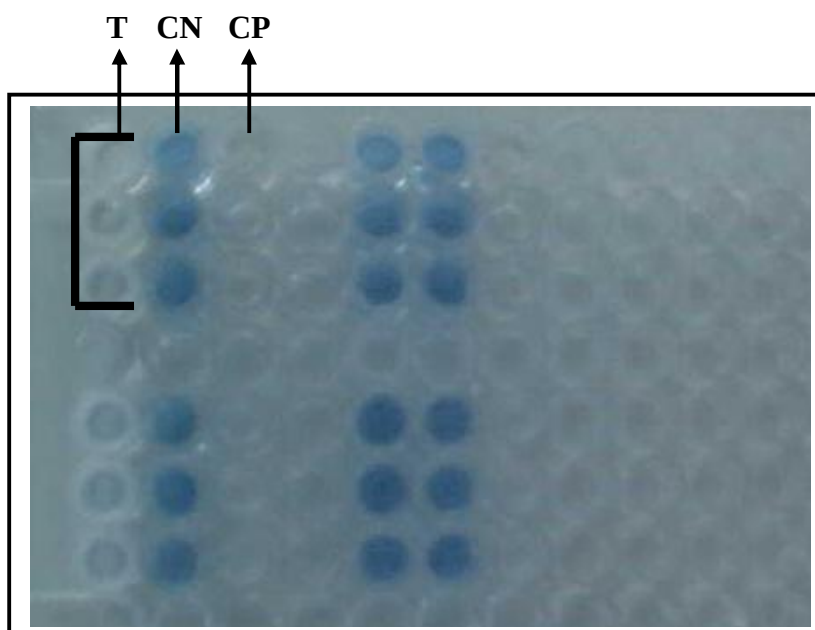


Figura 4.3 - Viragem do indicador redox (DCPIP) pela linhagem UFPEDA-816, em *para*-xileno, após 12h de incubação a $30\pm 1^\circ\text{C}$. T: poço teste; CN: poço controle negativo; CP: poço controle positivo.

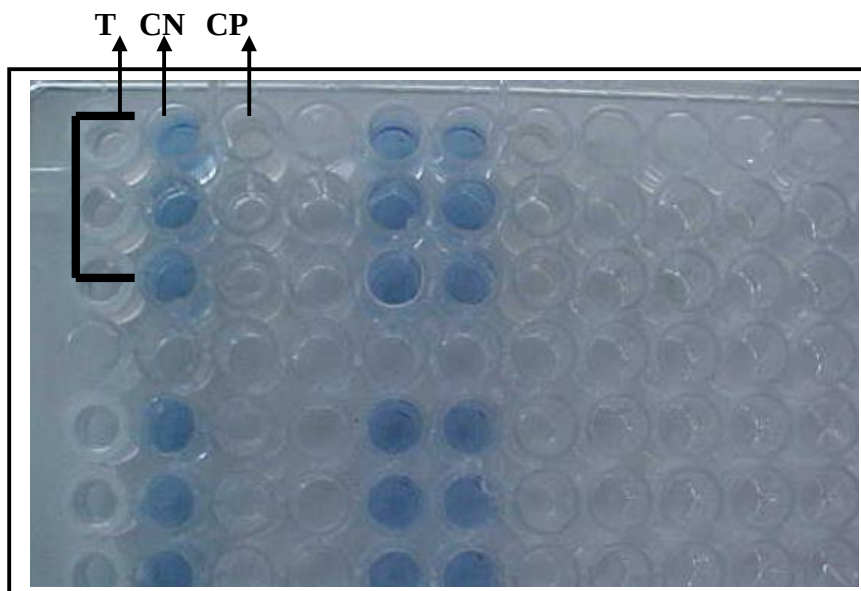


Figura 4.4 - Viragem do indicador redox (DCPIP) pela linhagem UFPEDA-816, na mistura dos isômeros de xileno (~33% de cada), após 12h de incubação a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. T: poço teste; CN: poço controle negativo; CP: poço controle positivo.

Verificou-se também a viragem do indicador DCPIP, com a linhagem UFPEDA-837 em presença apenas dos isômeros *orto*- e *meta*-xileno, após 24h de incubação a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$ (Figuras 4.5 e 4.6).

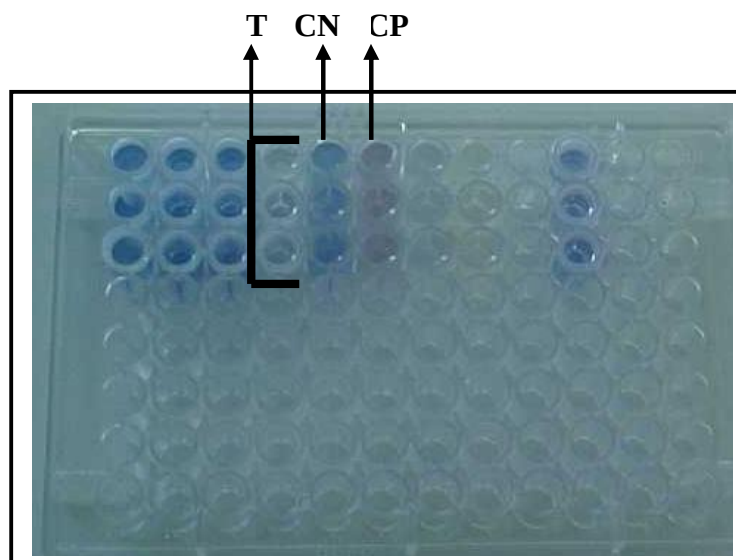


Figura 4.5 - Viragem do indicador redox (DCPIP) pela linhagem UFPEDA-837, em *orto*-xileno, após 24h de incubação a $30\pm 1^\circ\text{C}$. T: poço teste; CN: poço controle negativo; CP: poço controle positivo.

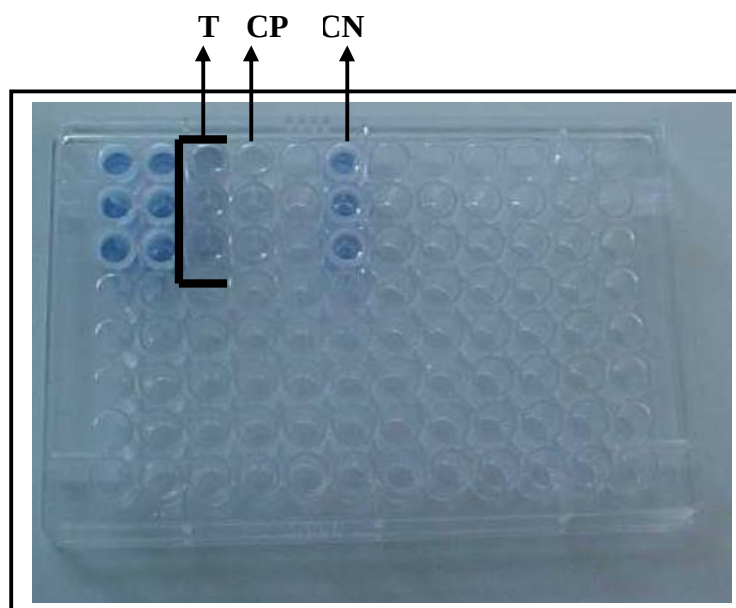


Figura 4.6 - Viragem do indicador redox (DCPIP) pela linhagem UFPEDA-837, em *meta*-xileno, após 24h de incubação a $30\pm 1^\circ\text{C}$. T: poço teste; CN: poço controle negativo; CP: poço controle positivo.

A oxidação de hidrocarbonetos por microrganismos envolve reações que são catalisadas por enzimas específicas produzidas pela célula microbiana. O sítio ativo dessas enzimas pode ser bloqueado por efeitos estéricos e eletrônicos resultantes da localização dos substituintes químicos no composto orgânico, interferindo dessa forma, no contanto entre a enzima e o substrato (MAIER, 2000).

Teoricamente, como *orto*-xileno apresenta efeito estérico maior do que *para*- e *meta*-xileno, devido à localização dos grupos metila, era de se esperar que a linhagem UFPEDA-837 oxidasse os isômeros *meta*- e *para*- e não *orto*- e *meta*-, como foi observado.

Esses resultados contrastam com trabalhos anteriores: Baggi *et. al.* (1987) observaram que nenhuma das bactérias capazes de degradar *para*- e *meta*-xileno foram capazes de utilizar *orto*-xileno e vice-versa. Num estudo realizado por Su & Kafkewitz (1994) foi verificado que quando os isômeros de xileno eram submetidos individualmente à degradação por *Pseudomonas maltophilia*, apenas *meta*- e *para*-xileno foram assimilados; quando os isômeros eram misturados, as três formas isoméricas foram utilizadas.

A posição do grupo metila no anel aromático desempenha uma importante função na seleção dos microrganismos que têm potencialidade para oxidarem isômeros de xileno. Estudos mais aprofundados sobre as vias metabólicas de utilização de xilenos pela linhagem UFPEDA-837 serão necessários para a compreensão do resultado obtido.

A utilização dos três isômeros de xileno por uma única linhagem bacteriana, UFPEDA-816, indica a sua versatilidade enzimática, o que confere um maior potencial de degradação em relação à linhagem UFPEDA-837.

Um fato que merece atenção é que dentre as 40 linhagens testadas, apenas uma foi capaz de oxidar os três isômeros, ressaltando a toxicidade do xileno, como já citado na revisão da literatura (HERMAN *et. al.*, 1991; UNGVARY *et. al.*, 1980).

O consórcio microbiano composto pelas linhagens UFPEDA-816 e UFPEDA-837 foi colocado em presença dos isômeros *orto*- e *meta*-xileno isolados, uma vez que a última linhagem apresentou capacidade para degradar apenas esses dois isômeros. Decorrido o período de 72h de incubação a 30±1°C não foi observada a viragem do indicador, o que nos indica que o referido consórcio não apresentou potencial degradador de xileno superior às linhagens isoladas.

A composição de consórcios tem a finalidade de assimilar mais rapidamente o hidrocarboneto testado, tendo em vista que num processo de biorremediação quanto menor o tempo de degradação dessas substâncias, mais rápida será a recuperação ambiental. Dessa forma, era desejável encontrar consórcios que virassem o indicador (DCPIP) num tempo inferior a 12h, que foi o período gasto pela linhagem UFPEDA-816 isolada para oxidar os isômeros de xileno, e o consórcio formado não mostrou esse perfil.

Embora alguns autores empreguem culturas mistas para a biodegradação de hidrocarbonetos (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 2000; SHIM & YANG, 1999; MORGAN *et. al.*, 1993), deve-se levar em consideração que microrganismos quando estão em associação podem competir por nutrientes, causando um efeito repressor entre eles (BAKER & HERSON, 1994b). Segundo Maier (2000), tal efeito envolve o bloqueio do sítio ativo das enzimas e, dessa forma a degradação ocorre mais lentamente ou pode ser interrompida. Para Fredrickson (1977) *apud* Davison *et. al.* (1994), a competição por nutrientes resulta na remoção de substratos necessários para a reprodução de outras populações, acarretando taxas reduzidas de crescimento.

Diante do exposto, a linhagem UFPEDA-816 foi a mais promissora e, portanto a selecionada para a realização dos ensaios posteriores.

4.2 Identificação da Linhagem Bacteriana Promissora

Na tabela 4.1 estão apresentadas as características da linhagem bacteriana UFPEDA-816 e seu aspecto microscópico pode ser observado na Figura 4.7. De acordo com Sneath (1996), as características observadas possivelmente se referem a bactérias do gênero *Bacillus*.

Os resultados de identificação a nível de espécie, considerando o perfil de ácidos graxos, indicaram que se trata da cultura bacteriana *Bacillus megaterium* subgrupo A (índice de similaridade – IS = 0,788).

Tabela 4.1 - Características da linhagem UFPEDA-816.

Coloração de Gram	Positiva
Morfologia	Bastonete irregular e móvel
Aspecto da colônia	Lisa de coloração amarela
Produtora de esporos	Sim
Morfologia dos esporos	Ovóides, mais espessos que os bastonetes
Crescimento	Aeróbico
Temperatura máxima de crescimento	51°C
Catalase	Positiva
Oxidase	Negativa
Hidrólise de caseína	Positiva
Hidrólise de amido	Positiva

**Figura 4.7 - Aspecto microscópico da linhagem UFPEDA-816 submetida à coloração de Gram (aumento 1000X).**

Alguns trabalhos citam o gênero *Bacillus* como eficiente na utilização de hidrocarbonetos do petróleo.

Hun *et. al.* (2003) identificaram uma linhagem bacteriana - *Bacillus sphaericus* 205y - capaz de crescer na presença de benzeno, tolueno, etilbenzeno e *para*-xileno, numa concentração de até 75%.

Rahman *et. al.* (2002) isolaram 130 culturas puras com capacidade para utilizar óleo cru como única fonte de carbono e energia. Dentre estas culturas, o gênero *Bacillus* foi um dos dominantes.

Shimura *et. al.* (1999) isolaram uma linhagem de *Bacillus* sp. JF8 capaz de degradar naftaleno e bifenil a uma temperatura de 60°C.

Antai (1990) relatou que *Bacillus* sp. degradou cerca de 45% de óleo cru durante 14 dias a 28°C, quando o meio foi suplementado com 4g/L de nitrogênio e 3g/L de fósforo.

4.3 Ensaios de Aclimação

Os ensaios de aclimação foram realizados, submetendo a cultura de *Bacillus megaterium* a concentrações crescentes da fonte oleosa (1%, 3% e 5%).

Os valores de pH, da tensão superficial do meio e da quantificação bacteriana determinados durante os ensaios de aclimação, em cada concentração da fonte de carbono, estão mostrados nos itens seguintes.

4.3.1 Determinação do pH

Nas Tabelas 4.2, 4.3 e 4.4 estão discriminados os valores de pH ao longo dos ensaios de aclimação de *Bacillus megaterium* (UFPEDA-816) em presença de 1%, 3% e 5% da fonte oleosa, respectivamente.

Observa-se que em todas as concentrações ensaiadas da fonte de carbono, os valores de pH não se distanciaram da faixa de neutralidade, apresentando variação máxima compreendida entre 6,7 e 7,2.

Tabela 4.2 - Valores de pH nos ensaios de aclimação de *B. megaterium* em 1% da fonte de carbono.

Tempo (h)	Valores de pH			
	Orto-xileno	Meta-xileno	Para-xileno	Mistura dos isômeros
0	7,0	7,2	7,2	7,0
24	7,0	7,2	7,2	6,8
48	7,0	7,2	7,2	6,8
72	7,0	7,1	7,2	6,8
96	7,0	7,1	7,2	6,8
120	7,0	7,1	7,2	6,8

Tabela 4.3 - Valores de pH nos ensaios de aclimação de *B. megaterium* em 3% da fonte de carbono.

Tempo (h)	Valores de pH			
	Orto-xileno	Meta-xileno	Para-xileno	Mistura dos isômeros
0	7,0	6,9	6,9	7,0
24	6,8	6,9	6,9	6,9
48	6,8	6,8	6,9	6,9
72	6,8	6,8	6,9	6,8
96	6,8	6,7	6,9	6,8
120	6,8	6,7	6,9	6,8

Tabela 4.4 - Valores de pH nos ensaios de aclimação de *B. megaterium* em 5% da fonte de carbono.

Tempo (h)	Valores de pH			
	Orto-xileno	Meta-xileno	Para-xileno	Mistura dos isômeros
0	6,9	7,1	7,1	6,9
24	6,8	6,8	6,8	6,8
48	6,7	6,8	6,8	6,8
72	6,7	6,8	6,8	6,8
96	6,7	6,8	6,8	6,7
120	6,7	6,8	6,8	6,7

Essa constância dos valores de pH durante a degradação de hidrocarbonetos é confirmada por Leahy & Colwell (1990), os quais relataram que a maioria das bactérias degrada hidrocarbonetos em pH próximo à neutralidade, sendo os fungos mais tolerantes às condições ácidas.

Outros trabalhos também confirmam esses resultados. Antai (1990) relatou que as maiores taxas de biodegradação de óleo cru ocorreram em pH 7,0 para *Bacillus* sp. e pH 7,4 para *Pseudomonas* sp. Jung & Park (2004) estudaram a biodegradação de BTX por *Rhodococcus pyridinovorans* e constataram que em pH 7,0 ocorreu as maiores reduções nas concentrações desses compostos.

4.3.2 Determinação da Tensão Superficial do Meio

A tensão superficial do meio, isento de células, está relacionada à produção de substâncias tensoativas ou biossurfactantes. Tais substâncias permitem a emulsificação de compostos que apresentam baixa solubilidade em meio aquoso, como os hidrocarbonetos do petróleo, promovendo sua assimilação por microrganismos (REDDY *et. al.*, 1982).

Nas Tabelas 4.5, 4.6 e 4.7 estão mostrados os valores de tensão superficial, inicial e final, nos ensaios de aclimação de *Bacillus megaterium* em 1%, 3% e 5% de hidrocarbonetos, respectivamente.

Comparando os valores de tensão superficial, verifica-se que houve uma maior redução dos referidos valores, em todas as concentrações testadas da fonte oleosa, na presença do isômero *para*-xileno; o que, provavelmente indica, que a assimilação deste isômero de xileno poderá estar sendo mediada pela produção de biossurfactante.

Nota-se ainda na Tabela 4.7 que para a maior concentração de *para*-xileno (5%), ocorreu uma redução máxima da tensão superficial (43%). Este fato é explicável porque quando há uma elevação na concentração da fonte oleosa há uma tendência em reduzir a solubilidade do composto (HOMEL, 1990), aumentando dessa forma a produção de substâncias tensoativas, para que se efetue o ataque microbiano.

Tabela 4.5. Valores da Tensão Superficial (TS), inicial e final, do meio isento de células, na aclimação de *B. megaterium* em 1% da fonte de carbono.

Fonte de carbono	TS inicial	TS final	Redução (%)
<i>Orto</i> -xileno	70,0	58,5	16,5
<i>Meta</i> -xileno	70,0	53,0	24,0
<i>Para</i> -xileno	70,0	51,5	26,5
Mistura dos isômeros	70,0	62,0	11,5

Tabela 4.6 - Valores da Tensão Superficial (TS), inicial e final, do meio isento de células, na aclimação de *B. megaterium* em 3% da fonte de carbono.

Fonte de carbono	TS inicial	TS final	Redução (%)
<i>Orto</i> -xileno	69,0	61,7	10,5
<i>Meta</i> -xileno	69,0	56,5	18,0
<i>Para</i> -xileno	69,0	52,0	25,0
Mistura dos isômeros	69,0	61,0	11,5

Tabela 4.7 - Valores da Tensão Superficial (TS), inicial e final, do meio isento de células , na aclimação de *B. megaterium* em 5% da fonte de carbono.

Fonte de carbono	TS inicial	TS final	Redução (%)
<i>Orto</i> -xileno	69,0	55,9	19,0
<i>Meta</i> -xileno	69,0	47,9	30,5
<i>Para</i> -xileno	69,0	39,4	43,0
Mistura dos isômeros	69,0	45,8	34,0

Diversos trabalhos citam linhagens pertencentes ao gênero *Pseudomonas* como as maiores produtoras de biossurfactantes durante a biodegradação de hidrocarbonetos (CYBULSKI *et. al.*, 2003; KOCH *et. al.*, 1991; GARDNER & WILLIAMS, 1982). Um trabalho desenvolvido por Bento & Gaylarde (1996) demonstrou que isolados bacterianos dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* produziram ativamente substâncias tensoativas na presença de óleo Diesel.

4.3.3 Quantificação bacteriana

As figuras 4.8, 4.9 e 4.10 mostram os perfis de crescimento celular de *Bacillus megaterium* em 1%, 3% e 5% da fonte oleosa, respectivamente, a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 120 horas.

Verifica-se na Figura 4.8 que na presença de 1% da fonte de carbono houve, em todos os casos, uma redução na concentração celular com 24h provavelmente, devido à toxicidade do composto e também pelo fato de ser o primeiro contato das células microbianas com a fonte oleosa. Com 48h, ocorreu uma retomada do crescimento na presença de *orto*-xileno e da mistura dos isômeros, mas, em seguida, decresce acentuadamente e ao final das 120h todas as quantificações se situaram em torno de 10^6 UFC/mL, para todas as fontes de carbono testadas. Na presença de *meta*- e *para*-xileno, houve uma redução gradual do crescimento ao longo das 120h, sendo esta queda mais acentuada para o isômero *meta*-.

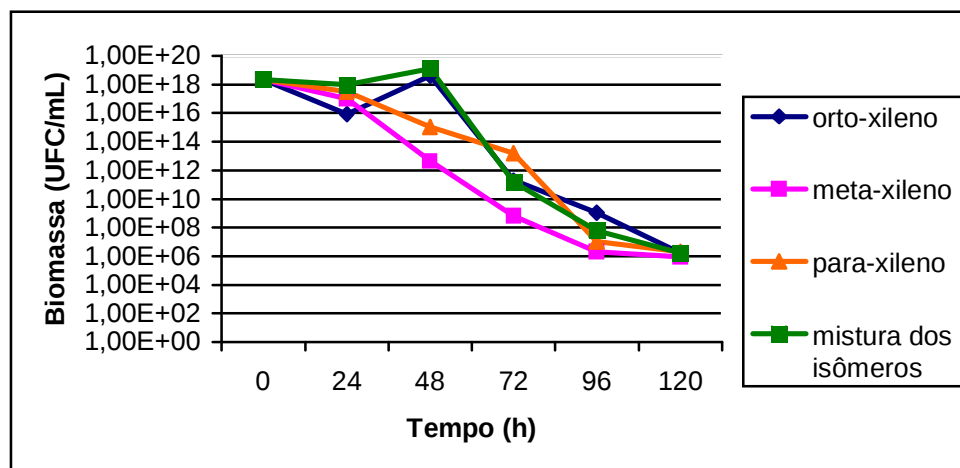


Figura 4.8 - Crescimento celular de *B. megaterium* em 1% da fonte de carbono.

Comparando-se a Figura 4.8 com a Figura 4.9 observa-se que, na concentração de 3% da fonte oleosa, a linhagem bacteriana apresenta melhor adaptação na presença da mistura dos isômeros e do *orto*-xileno, já que nas primeiras 24h, verifica-se um considerável crescimento microbiano (de 10^6 a 10^{10} UFC/mL e de 10^6 a 10^8 UFC/mL, respectivamente). Após 24h, ocorre um declínio em ambas as curvas de crescimento, sendo a queda mais vertiginosa para a mistura dos isômeros. Em presença dos isômeros *meta*- e *para*-xileno nota-se apenas o decaimento nas quantificações celulares, demonstrando o efeito tóxico desses isômeros para a linhagem selecionada.

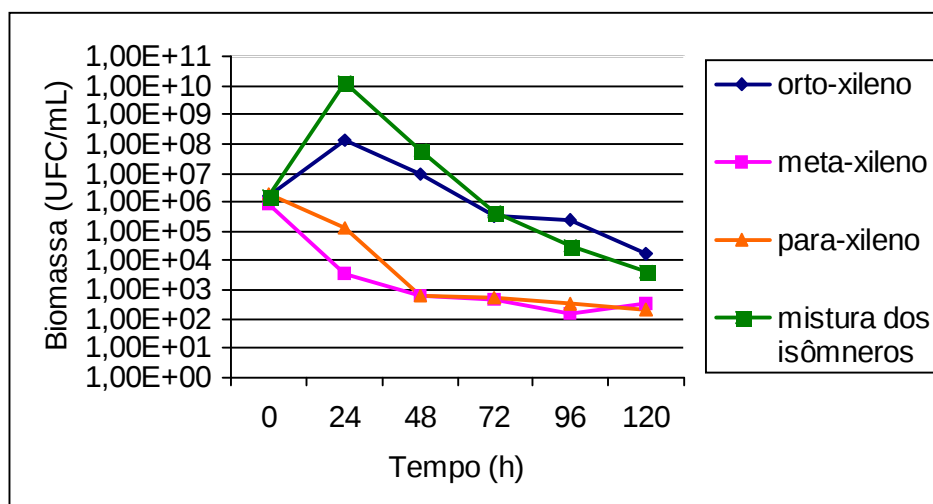


Figura 4.9 - Crescimento celular de *B. megaterium* em 3% da fonte de carbono.

Na figura 4.10, nota-se que na presença de 5% dos isômeros isolados e mistos o *Bacillus megaterium* não apresentou a fase de adaptação inicial (fase *lag*), sendo observada nas primeiras 24h, a fase *log* de crescimento, fato este que demonstra uma boa adaptação da cultura aos hidrocarbonetos monoaromáticos. A partir das 24h de bioprocessamento, ocorre o decaimento das curvas de crescimento em todas as fontes de carbono testadas, já que se trata de uma condição altamente adversa. Um lento decréscimo nas quantificações microbianas foi observado na presença de *orto*-xileno e da mistura dos isômeros, resultando nas maiores concentrações celulares ao final de 120 horas. Como já foi verificado nas concentrações anteriores, o crescimento celular na presença de *meta*- e *para*-xileno é muito semelhante, ocorrendo um declínio acentuado nas quantificações celulares.

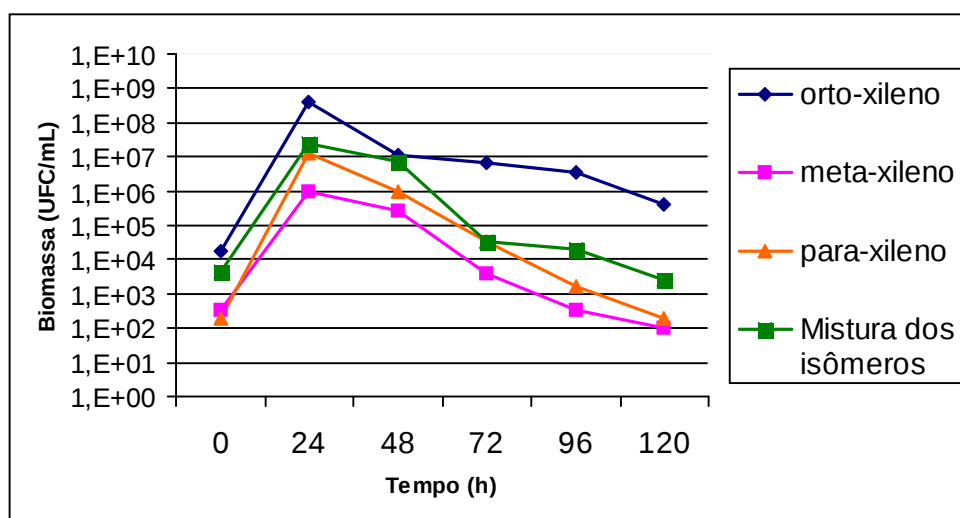


Figura 4.10 - Crescimento celular de *B. megaterium* em 5% da fonte de carbono.

A aparência do meio aclimatado com 5% da mistura dos isômeros, após 24h de incubação a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$, pode ser visualizada na Figura 4.11 a qual mostra uma diferença significativa na turbidez do meio aclimatado comparado ao meio do frasco controle, demonstrando um denso crescimento microbiano.

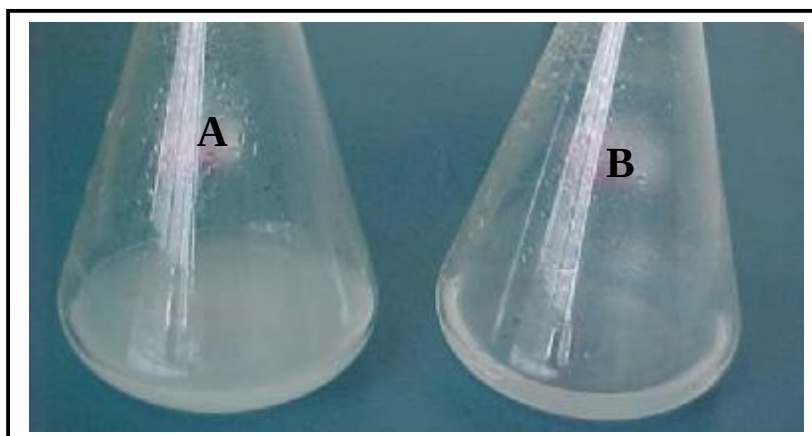


Figura 4.11 - Aclimação de *B. megaterium* em 5% da mistura dos isômeros de xileno, após 24h de incubação a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. A: frasco teste; B: frasco controle.

A realização dos ensaios de aclimação durante o período de apenas 120h, deve-se principalmente a dois motivos: a toxicidade e a volatilidade do composto em estudo.

A seleção da concentração máxima de 5% de xilenos para a realização dos ensaios de biodegradação se prende ao fato de que *Bacillus megaterium* apresentou crescimento significativo em todas as formas isoméricas, nas primeiras 24h, e, além disso, ensaios preliminares, na presença de concentrações acima deste valor, demonstraram que o crescimento bacteriano foi inibido, provavelmente devido à toxicidade dos hidrocarbonetos monoaromáticos.

A adaptação ou aclimação resulta no aumento do potencial oxidativo de hidrocarbonetos ocasionado pela ação microbiana. Segundo Spain & Van Veld (1983), no ambiente, a adaptação pode ocorrer pela interrelação de três mecanismos: indução e/ou repressão de enzimas específicas, mudanças genéticas que resultam em novas capacidades metabólicas, e enriquecimento seletivo de organismos com habilidade para transformar o composto de interesse.

Maliyekkal *et. al.* (2004) destacaram a importância da aclimação, revelando que inóculos pré-cultivados em compostos comparativamente mais tóxicos (benzeno e xileno) podem degradar mais facilmente um composto relativamente menos tóxico (tolueno).

Atlas (1981) tem mostrado que o número de microrganismos hidrocarbonoclasticos tende a aumentar com a exposição prévia a hidrocarbonetos e que os níveis de tais microrganismos geralmente refletem o grau de poluição do ecossistema.

No desenvolvimento deste trabalho, pode-se verificar que a exposição gradual a níveis crescentes da fonte de carbono promoveu o rápido crescimento da cultura bacteriana nas primeiras 24h de cultivo, com 5% do composto orgânico; fato este que não foi observado durante o primeiro contato entre a linhagem bacteriana e a fonte de carbono na concentração de 1%.

Outros estudos relataram a eficiência do contato prévio entre o agente biológico e o composto químico de interesse. Um deles é o realizado por Wiggins *et. al.* (1987) que observaram um crescimento máximo de *Flavobacterium* sp. capaz de mineralizar concentrações variadas (20 ng/mL a 2µg/mL) de *para*-nitrofenol em 7h, somente após um período prévio de adaptação de 25h na presença de 2 ng/mL do citado composto.

Em todas as concentrações ensaiadas da fonte oleosa, notou-se uma maior tolerância da linhagem selecionada ao isômero *orto*-xileno, quer na forma individual ou na forma de mistura com os demais isômeros. Na literatura, é comum os autores relatarem que microrganismos que assimilam *orto*-xileno não são capazes de utilizar *meta*- e *para*-xileno e vice-versa (DEEB & ALVAREZ-COHEN, 2000; SU & KAFKEWITZ, 1994; BAGGI *et. al.*, 1987). Apesar de *Bacillus megaterium* crescer na presença de todos os isômeros, parece haver uma preferência pela forma isomérica *orto*- em relação às formas *meta*- e *para*-. Talvez, o isômero *orto*-xileno possa ser um indutor enzimático mais eficiente do que os outros isômeros; como foi evidenciado por Baggi *et. al.* (1987), os quais notaram que a enzima catecol 2,3-oxigenase produzida pela bactéria *Pseudomonas stutzeri* foi induzida com mais eficiência pelo isômero *orto*-xileno.

Geralmente, solventes orgânicos têm efeitos maléficos sobre microrganismos e suas enzimas, muitas das quais perdem suas funções, cessando o crescimento microbiano (OGINO *et. al.*, 1994).

A grande vantagem de selecionar microrganismos que crescem em solventes orgânicos é que estes provavelmente produzem enzimas tolerantes a tais solventes, o que deve ser muito útil na área industrial. Hun *et. al.* (2003) isolaram uma linhagem bacteriana de *Bacillus sphaericus* 205y que cresce na presença de benzeno, tolueno, etilbenzeno e *para*-xileno, numa concentração de até 75%, apresentando melhor crescimento e maior produção de lipase numa concentração de 5% (v/v).

4.4 Ensaios para a Verificação das Perdas Abióticas de Xileno

4.4.1 Aparato Experimental “A”

O percentual de perdas abióticas por volatilização, aferido pelo sistema GC-MS, encontra-se expresso na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Percentual de perdas abióticas do aparato experimental “A”.

Tempo Experimental (h)	Concentração inicial de orto-xileno (%)	Concentração final de orto-xileno (%)	Perda abiótica (%)
12	5	0,00132	99,98
24	5	0,00081	99,99
72	5	0,00058	99,99

Mesmo reduzindo o tempo experimental para 12 horas, a perda abiótica foi próxima de 100%, provavelmente devido à aeração direta do líquido no interior da coluna e a ineficiência do banho refrigerante no condensador de tubo reto em permitir que o xileno volátil fosse condensado e retornasse ao estado líquido para o interior da coluna.

4.4.2 Aparato Experimental “B”

O percentual de perdas abióticas por volatilização, aferido pelo sistema GC-MS, está mostrado na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 - Percentual de perdas abióticas do aparato experimental “B”.

Tempo Experimental (h)	Concentração inicial de orto-xileno (%)	Concentração final de orto-xileno (%)	Perda abiótica (%)
24	5	0,64907	87,0
72	5	0,26194	94,8

O xileno é um solvente altamente corrosivo, sendo capaz de danificar materiais plásticos; já borracha e silicone são materiais mais resistentes a esse composto (IRWIN *et. al.*, 1997).

Como a rolha que vedava os frascos Erlenmeyer era de borracha e estava bem ajustada à abertura dos frascos e também como não houve uma aeração direta do meio, o percentual de perdas abióticas neste aparato foi menor do que o observado no aparato experimental “A”.

4.4.3 Aparato Experimental “C”

O percentual de perdas abióticas por volatilização, aferido pelo sistema GC-MS, encontra-se discriminado na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Percentual de perdas abióticas do aparato experimental “C”.

Tempo	Concentração inicial	Concentração final	
Experimental (h)	de orto-xileno (%)	de orto-xileno (%)	Perda abiótica (%)
24	5	0,25485	95
72	5	0,099215	98

Os frascos âmbar foram preenchidos totalmente (100 mL) para eliminar o *headspace*, visando minimizar as perdas por volatilização. Dessa forma, esperava-se que este aparato experimental apresentasse menor percentual de perdas abióticas; no entanto, isto não foi verificado. Provavelmente, o xileno presente no meio líquido danificou a tampa plástica, já que esse material é sensível ao xileno, permitindo maior volatilização do que o aparato experimental “B”.

Este fato pode ser reforçado pela seguinte observação: durante os experimentos, quando se aspirava o ar próximo aos frascos vedados com tampa plástica era possível sentir o odor de xileno, o que não foi percebido com os frascos vedados com rolhas de borracha.

Os três aparatos experimentais testados apresentaram valores elevados nas perdas abióticas. O aparato experimental “B” (frascos Erlenmeyer vedados com rolhas de borracha) foi o mais viável por apresentar menores perdas abióticas.

O plaqueamento de todas as amostras coletadas durante os ensaios não apresentou nenhuma contaminação microbiana; o que demonstra que a redução da concentração de *orto*-xileno dissolvido ocorreu realmente devido à perdas abióticas.

Esses ensaios foram realizados apenas com *orto*-xileno devido à maior tolerância do *Bacillus megaterium* a este isômero, fato este observado nas curvas de crescimento celular (Figura 4.10).

4.5 Ensaios de Biodegradação

Os ensaios de biodegradação foram realizados durante os períodos de 24h e 72h, utilizando apenas 5% da fonte de carbono. Nos tempos, inicial e final, foram realizadas determinações da concentração celular e do percentual residual de xilenos, dissolvidos no meio líquido.

Os tempos de duração dos ensaios (24h e 72h) foram escolhidos baseando-se no perfil do crescimento celular do ensaio de aclimação efetuado com 5% dos hidrocarbonetos (Figura 4.10), já que com 24h ocorreu o crescimento praticamente exponencial com todos os xilenos, e com 72h já havia o decaimento celular em todas as quantificações.

4.5.1 Quantificação Bacteriana

Como os frascos tinham de ser manipulados o mínimo possível para minimizar as perdas abióticas, não houve condições de se construir uma curva de crescimento ao longo dos experimentos de biodegradação.

O plaqueamento das amostras controle não apresentou nenhuma contaminação microbiana. A concentração celular das amostras teste, determinada na presença das diferentes fontes de carbono está apresentada na Tabela 4.11. Os referidos valores são provenientes do resultado da média aritmética obtida das triplicatas.

Tabela 4.11 - Concentração celular de *B. megaterium* nos tempos, inicial, 24h e 72h, durante os ensaios de biodegradação.

Fonte de Carbono	Tempo (h)	Biomassa (UFC/mL)
Orto-xileno	0	$1,8 \times 10^5$ c
	24	$2,4 \times 10^9$ a
	72	$3,8 \times 10^6$ c
Meta-xileno	0	$8,6 \times 10^5$ c
	24	$1,5 \times 10^7$ c
	72	$8,7 \times 10^4$ c
Para-xileno	0	$4,4 \times 10^5$ c
	24	$1,5 \times 10^7$ c
	72	$1,4 \times 10^5$ c
Mistura dos isômeros	0	$6,3 \times 10^5$ c
	24	$8,4 \times 10^8$ b
	72	$7,7 \times 10^5$ c

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Newman-Keuls ($p \leq 0,05$).

Com 24h de bioprocessamento, verifica-se que o *Bacillus megaterium* apresenta um crescimento significativo ($p \leq 0,05$) na presença de *orto*-xileno seguido pela mistura dos isômeros (Tabela 4.11). Mais uma vez é confirmada a preferência da referida linhagem pela forma isomérica *orto*-, seja isoladamente ou na presença com os demais isômeros, como já foi discutido anteriormente durante os ensaios de aclimação.

Com 72h de incubação, houve uma redução no crescimento bacteriano, não sendo observado diferença estatística na quantificação celular, em todos os casos estudados (Tabela 4.11). Isto nos leva a crer que mesmo a cultura estando bem aclimatada à fonte orgânica, o tempo de exposição prolongado deve causar um efeito prejudicial à biomassa, reduzindo o seu crescimento.

Na literatura, os autores citam trabalhos com microrganismos, isolados ou em consórcios, que utilizam fontes de carbono complexas (petróleo, querosene, gasolina, óleo Diesel, etc.), as quais oferecem várias alternativas para o crescimento microbiano (GOMES, 2004; LEAHY *et. al.*, 2003; ESPÍRITO-SANTO, 2002; BARATHI & VASUDEVAN, 2001; SOLANO-SERENA *et. al.*, 2000). Nas condições deste estudo, onde se tem uma cultura pura utilizando praticamente uma única fonte de carbono (xilenos), é evidente que há uma certa restrição para o aumento da biomassa, principalmente pela toxicidade do composto que tende a aumentar quando se prolonga o tempo de contato (MALIYEKKAL *et. al.*, 2004), criando dessa forma, condições adversas ao crescimento microbiano, como por exemplo, solubilizando membranas celulares (VENOSA & ZHU, 2003).

Além da toxicidade, um outro fator que pode explicar a redução do crescimento microbiano é a volatilização do xileno. Com 72h, as perdas abióticas podem resultar numa concentração do hidrocarboneto que não seja suficiente para permitir um aumento na biomassa, mas apenas a sua manutenção, ou seja, o crescimento seria limitado porque as necessidades de carbono do microrganismo não poderiam ser satisfeitas (LEAHY & COLWELL, 1990).

O período de 24h parece ser ideal para obter uma maior quantificação celular de *Bacillus megaterium* na presença de isômeros de xileno.

4.5.2 Análises Cromatográficas

O método de extração líquido-líquido utilizado foi capaz de recuperar cerca de 95% de *orto*-xileno, dissolvido no meio líquido (Tabela 4.12), demonstrando ser um método satisfatório para análise de xileno.

O resfriamento em gelo antes da extração foi baseado no trabalho de Shimura *et. al.* (1999). O tempo usado (3h) para resfriar as amostras foi puramente casual.

Tabela 4.12 - Percentual de recuperação de *orto*-xileno, dissolvido em meio BH, após 3h de resfriamento em gelo e análise imediata pelo sistema GC-MS.

Concentração Inicial (%)	Concentração Final (%)	Percentual de Recuperação
5	5	100
5	5	100
5	4,5	86
Média aritmética		95

Por comparação entre as áreas dos picos dos isômeros de xileno presentes nas amostras, controle e teste, foi calculado o percentual residual e, conseqüentemente o percentual de biodegradação (Tabela 4.13). Para isso, considerou-se a área do pico controle como tendo a concentração máxima (100%). Os referidos valores são provenientes da média aritmética obtida das triplicatas.

Tabela 4.13 – Percentual de biodegradação dos isômeros de xileno por *B. megaterium* com 24h e 72h de bioprocessamento.

Fonte de Carbono	Tempo (h)	Percentual Residual (%)	Percentual de Biodegradação (%)
Orto-xileno	0	100	0 e
	24	40	60 a
	72	71	29 d
Meta-xileno	0	100	0 e
	24	66	34 b
	72	72	28 d
Para-xileno	0	100	0 e
	24	64	36 b
	72	70	30 d
Mistura dos isômeros	0	100	0 e
	24	64	36 b
	72	72	28 d

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Newman-Keuls ($p \leq 0,05$).

Analisando-se a tabela 4.13, verifica-se que há um menor percentual residual de xilenos nas amostras com 24h do que com 72h, deduzindo-se dessa forma, que a remoção de xilenos por biodegradação ocorre mais rapidamente durante esse período; este resultado pode ser explicado pela ocorrência da fase *log* da cultura *Bacillus megaterium* no intervalo de 24h, como

observado na curva de crescimento construída durante os experimentos de aclimação (Figura 4.10) e nas quantificações microbianas realizadas durante os experimentos de biodegradação (Tabela 4.11).

Com 24h de bioprocessamento, percebe-se que a cultura *Bacillus megaterium* foi capaz de degradar 60% de *orto*-xileno, o que diferiu significativamente dos percentuais de biodegradação dos isômeros *meta*- (34%), *para*- (36%) e da mistura deles (36%). Este resultado é corroborado pelo crescimento significativo da referida cultura na presença de *orto*-xileno (Tabela 4.11). Isto nos leva a hipótese de que possivelmente este isômero possa ser um indutor enzimático mais potente do que os demais, conforme já dito anteriormente.

Como houve também um crescimento bacteriano significativo, com 24h, na presença dos isômeros mistos (Tabela 4.11), era esperado que o percentual de biodegradação neste caso fosse maior do que o dos isômeros isoladamente. No entanto, esse fato não foi confirmado, pois o percentual de biodegradação da mistura (36%) não diferiu estatisticamente dos percentuais dos isômeros *para*- (36%) e *meta*- (34%), diferindo significativamente para o isômero *orto*- (60%), como mostrado na Tabela 4.13.

De acordo com Baker & Herson (1994b) nem sempre uma biomassa elevada necessariamente indica uma alta taxa de biodegradação, principalmente quando se trata de uma mistura de hidrocarbonetos; onde a biodegradação ocorre através de cometabolismo, em que uma espécie de microrganismo utiliza a fonte de carbono disponível produzindo intermediários metabólicos que por sua vez serão utilizados por outras espécies microbianas.

Smith (1990) relatou que durante a biodegradação de xileno, o microrganismo oxida um grupo metila, resultando na formação de intermediários complexos que tornam o anel aromático mais estável, dificultando a sua clivagem.

Uma das suposições que pode ser levada em consideração é que na mistura dos isômeros de xileno pode ter havido uma maior produção desses intermediários, dificultando a sua utilização pela cultura pura de *Bacillus megaterium*, ocasionando conseqüentemente uma redução no percentual de biodegradação.

Uma outra possibilidade para explicar tal resultado é que se o isômero *orto*-xileno for o indutor enzimático preferencial do *Bacillus megaterium*, pode ser que a presença das demais formas isoméricas bloqueie o sítio ativo da enzima, causando uma lenta indução enzimática (MAIER, 2000), o que refletiu na redução dos percentuais de biodegradação.

Com 72h de bioprocessamento, não houve diferença significativa nos percentuais de biodegradação para todas as formas isoméricas, isoladas ou mistas: *orto*-xileno (29%); *meta*-xileno (28%); *para*-xileno (30%) e a mistura dos isômeros (28%). Comparando-se esses percentuais com aqueles obtidos com 24h de bioprocessamento, verifica-se que ocorreu uma redução nos percentuais de biodegradação em todos os ensaios efetuados (Tabela 4.13), o que pode ser justificado pela redução na quantificação celular para esse tempo de bioprocessamento (Tabela 4.11).

A cultura de *Bacillus megaterium* apresenta habilidade para degradar isômeros de xileno, isolados ou misturados, o que favorece a sua utilização em processos de biorremediação de ambientes poluídos por este petroderivado. Outro dado que reforça a importância deste isolado nos tratamentos de biorremediação é a eficiência da remoção biológica de xilenos no período de 24h, uma vez que o composto é volátil, sendo necessário um rápido ataque microbiano.

Estudos posteriores serão necessários para verificar a eficácia desta cultura frente a outros hidrocarbonetos monoaromáticos (benzeno, tolueno, etilbenzeno), tendo em vista que no ambiente não se encontra um único tipo de poluente. No entanto, o estudo da biodegradabilidade de hidrocarbonetos isolados permite a seleção de microrganismos com capacidades metabólicas específicas, o que acelera a velocidade de consumo dos substratos, bem como, pode auxiliar na preparação de um “pool” microbiano, que possa ser aplicado em processos de biorremediação de áreas impactadas por atividades petrolíferas.

5. CONCLUSÕES

- A linhagem bacteriana UFPEDA-816 apresentou potencialidade para degradar os três isômeros de xileno enquanto a UFPEDA-837 foi capaz de oxidar apenas os isômeros *orto*- e *meta*-xileno.
- A linhagem bacteriana UFPEDA-816 utilizou os isômeros de xileno, isolados ou misturados, como única fonte de carbono e energia, sendo a linhagem mais promissora.
- O consórcio microbiano formado pelas duas linhagens, UFPEDA-816 e UFPEDA-837, não apresentou potencialidade para degradar os isômeros *orto*- e *meta*- como as linhagens isoladas.
- A linhagem selecionada foi identificada como *Bacillus megaterium* (UFPEDA-816).
- Durante os ensaios de aclimação de *B. megaterium* nas diferentes concentrações da fonte de carbono (1%, 3% e 5%), os valores de pH não se distanciaram da neutralidade.
- A cultura *B. megaterium* provavelmente produz mais substâncias tensoativas na presença do isômero *para*-xileno do que nos demais isômeros.
- A localização dos substituintes químicos (radicais metila) no anel aromático do xileno influenciou no crescimento de *B. megaterium*, sendo mais tolerante ao isômero *orto*-xileno, seja na forma isolada ou misturada com os demais isômeros, do que às outras formas isoméricas.
- A exposição de *B. megaterium* à concentrações crescentes da fonte de carbono promoveu um crescimento acentuado, nas primeiras 24h, na concentração de 5%, demonstrando uma boa adaptação aos hidrocarbonetos monoaromáticos.
- O método de extração líquido-líquido, a frio para análise cromatográfica, mostrou-se satisfatório para a recuperação de xileno dissolvido.

- O aparato experimental “B” (frascos de Erlenmeyer vedados com rolha de borracha) foi o mais viável por apresentar menores perdas abióticas.
- A maior remoção de xileno em meio líquido ocorreu através do processo de volatilização.
- O isômero *orto*-xileno parece ser um indutor enzimático mais potente para *B. megaterium* do que as demais formas isoméricas.
- Os maiores percentuais de biodegradação de xilenos pelo *B. megaterium* ocorreu durante as primeiras 24h, sendo significativo ($p \leq 0,05$) para o isômero *orto*-xileno.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRETT, S.; BONNER, J. S.; MILLS, M. A.; AUTENRIETH, R. L.; STEPHENS, F. K. Microbial degradation of crude oil in marine environments tested in a flask experiment. *Water Research*. 1997. v. 31, nº 11, p. 2840-2848.

ALEXANDER, M. Effect of chemical structures on biodegradation. In: _____. *Biodegradation and Bioremediation*. 2 ed. New York: Academic Press, 1999a. Cap. 11, p. 177-194.

ALEXANDER, M. Environmental effects. In: _____. *Biodegradation and Bioremediation*. 2 ed. New York: Academic Press, 1999b. Cap. 14, p. 269-298.

ALKALDE, T. K.; PERALBA, M. C. R.; ZINI, C. A.; CAMARÃO, E. B. Quantitative analysis of benzene, toluene, and xylenes in urine by means of headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2004. v. 1027, p. 37-40.

ANTAI, S. P. Biodegradation of bonny light crude oil by *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. *Waste Management*. 1990. v. 10, p. 61-64.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiology Review*. 1981. v. 45, p. 180-209.

ATLAS, R. M. Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1995a, p. 317-327.

ATLAS, R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*. 1995b. v. 31, nº 4-12, p. 178-182.

ATLAS, R. M. *Handbook of media for environmental microbiology*. New York: CRC Press, 1995c. p. 81, 489, 491.

BAGGI, G.; BARBIERI, P.; GALLI, E.; TOLLARI, S. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades *o*-xylene. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987. v. 53, p. 2129-2132.

BAKER, K. H. & HERSON, D. S. Introduction and overview of bioremediation. In: _____. *Bioremediation*. New York: McGraw-Hill, 1994a. Cap. 1, p.1-8.

BAKER, K. H. & HERSON, D. S. Microbiology and biodegradation. In: _____. *Bioremediation*. New York: McGraw-Hill, 1994b. Cap. 2, p.9-60.

BARATHI, S. & VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environment International*. 2001. v. 26, p.413-416.

BARBIERI, S. M. Biodegradação de compostos aromáticos. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1998. Cap. 10, p. 211-242.

BAUER, J. E. & CAPONE, D. G. Effect of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic in marine sediment slurries. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988. v. 54, nº 7, p. 1649-1655.

BAYKUT, G. & VOIGT, A. *Analytical Chemistry*. 1992. v. 64, p.677. *apud* YANG, K-L.; LAI, C-H.; WANG, J-L. Construction and validation of an automated spray-and-trape gas chromatograph for the determination of volatile organic compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*. 2004. v. 1027, p. 41-48.

BENTO, F. M. & GAYLARDE, C. C. The production of interfacial emulsions by bacterial isolates from Diesel fuels. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1996. p. 31-33.

BENTO, F. M. & GAYLARDE, C. C. Biodeterioration of stores Diesel oil: studies in Brazil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2001. v. 47, p. 107-112.

CERNIGLIA, C. E. Microbial transformation of aromatic hydrocarbons. In: ATLAS, R. M. *Petroleum Microbiology*. New York: Macmillan. 1984. Cap. 3, p. 99-128.

CHAUDHRY, G. R. & CHAPALAMADUGU, S. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiological Reviews*. 1991. v. 55, nº 1, p. 59-79.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. 7 ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 1997. p. 9-279.

CORSEUIL, H. X. & MARINS, M. D. M. Efeitos causados pela mistura de gasolina e álcool em contaminações de águas subterrâneas. *Boletim Técnico Petrobrás*, Rio de Janeiro, 1998. v. 41, p. 133-138.

CYBULSKI, Z.; DZIURLA, E.; KACZOREK, E.; OLSZANOWSKI, A. The influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by Pseudomonadacea and Bacillacea strains. *Spill Science & Technology Bulletin*. 2003. v. 8, nº 5-6, p. 503-507.

DEEB, R. A. & ALVAREZ-COHEN, L. Aerobic biotransformation of gasoline aromatics in multicomponent mixtures. *Abstract. Bioremediation Journal*. 2000. v. 4, nº 2, p. 171-179.

DEL'ARCO, J. P. & FRANÇA, F. P. Influence of oil contamination levels on hydrocarbon biodegradation in sandy sediment. *Environmental Pollution*. 2001. v. 110, p. 515-519.

ELMRINI, H.; BREDIN, N.; SHAREEFDEEN, Z.; HEITZ, M. Biofiltration of xylene emissions: bioreactor response to variations in the pollutant inlet concentration and gas flow rate. *Chemical Engineering Journal*. 2004. v. 100, p. 149-158.

EPA. *Toxicological review of benzene*. 2002. Disponível em: <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0276-tr.pdf>. Acessado em: 20 de Setembro de 2003.

EPA. *Toxicological review of xylenes*. 2003. Disponível em: <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0270-tr.pdf>. Acessado em: 20 de Setembro de 2003.

ESPÍRITO-SANTO, L. S. Biodegradabilidade de óleo Diesel por microrganismos nativos da areia da praia de Suape-PE e predição de um modelo relacionado ao derramamento do poluente. 2002. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Pernambuco.

EZQUERRO, O.; ORTIZ, G.; PONS, B.; TENA, M. T. Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in soils by multiple headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography*. 2004. v.1035, nº 1, p. 17-22.

FERNANDES, M. B.; BRICKUS, L. S. R.; MOREIRA, J. C.; CARDOSO, J. N. Atmospheric BTX and polyaromatic hydrocarbons in Rio de Janeiro, Brazil. *Chemosphere*. 2002. v. 47, p. 417-425.

FLOODGATE, G. D. The fate of petroleum in marine ecosystem. In: *Petroleum Microbiology*. New York: Mac Millian Publishing Company, 1984. Cap. 8, p. 355-397.

FREDRICKSON, A. G. *Annal Review Microbiology*. 1977. v.31, p. 63-87 *apud* DAVISON, A. D.; CSELLNER, H.; KARUSO, P.; VEAL, D. A. Synergistic growth of two members from a mixed microbial consortium growing on biphenyl. *FEMS Microbiology Ecology*. 1994. v. 14, p. 133-146.

FRIES, M. R.; ZHOU, J.; CHEE-SANFORD, J.; TIEDJE, J. M. Isolation, characterization and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994. v. 60, nº 8, p. 2802-2810.

GARDNER, A. C. & WILLIAMS, G. R. The growth of *Pseudomonas putida* in fuel samples containing 2-methoxyethanol (2-ME). *International Biodeterioration Bulletins*. 1982. v. 18, p. 93-94.

GERSBERG, R. M.; CARROQUINO, M. J.; FISCHER, D. E.; DAWSEY, J. Biomonitoring of toxicity reduction during *in situ* bioremediation of monoaromatic compounds in groundwater. *Water Research*. 1995. v. 29, nº 2, p. 545-550.

GIL, G. C.; KIM, Y. J.; GU, M. B. Enhancement in the sensitivity of a gas biosensor by using an advanced immobilization of a recombinant bioluminescent bacterium. *Biosensors & Bioelectronics*. 2002. v. 17, p. 427-432.

GIOSEFFI, C. S. Estudo da Biodegradação de hidrocarbonetos monoaromáticos em soluções aquosas e sua determinação por cromatografia gasosa. 1998. 88f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro.

GOMES, E. B. Biodegradabilidade de querosene de aviação movimentado pelo Terminal Portuário de Suape-PE. 2004. 104f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos). Universidade Federal de Pernambuco.

HANSON, K. G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology Techniques*. 1993. v. 7, nº 10, p. 745-748.

HASS, U.; LUND, S. P.; SIMONSEN, L.; FRIES, A. S. Effects of prenatal exposure to xylene on postnatal development and behavior in rats. *Neurotoxicology and Teratology*. 1995. v. 17, nº 3, p. 341-349.

HEITKAMP, M. A. & CERNIGLIA, C. E. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *Applied and Environmental Microbiology*. 1988. v. 54, nº 6, p. 1612-1614.

HENNER, P.; SCHIAVON, M.; DRUELLE, V.; LICHTFOUSE, E. Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Organic Geochemistry*. 1999. v. 30, p. 963-969.

HERMAN, D. C.; MAYFIELD, C. I.; INNIS, W. E. The relationship between toxicity and bioconcentration of volatile aromatic hydrocarbons by the alga *Selenastrum capricornutum*. *Chemosphere*. 1991. v. 22, nº 7, p. 665-676.

HILL, E. C. Biodegradation of petroleum products. In: ATLAS, R. *Petroleum Microbiology*. New York: Macmillan, 1984. Cap. 15, p. 579-617.

HOLLIGER, C. & ZEHNDER, A. J. B. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*. 1996. v. 7, p. 326-330.

HOMEL, R. K. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Biodeterioration*. 1990. v. 1, p. 107-116.

HUN, C. J.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochemical Engineering Journal*. 2003. v. 15, p. 151-174.

IRWIN, R. J.; MOUWERIK, M. V.; STEVENS, L.; SEESE, M. D.; SASHAM, W. *Environmental Contaminants Encyclopedia*. 1997. Disponível em: <http://www.miliarium.com/Paginas/Prontu/Tablas/Quimica/Contaminantes.htm>. Acessado em 07 de Julho de 2003.

JOOS, P. E.; GODOI, A. F. L.; DE JONG, R.; DE ZEEUW, J.; VAN GRIEKEN, R. Trace analysis of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers in environmental samples by low-pressure gas chromatography – ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2003. v. 985, p. 191-196.

JUHASZ, A. L. & NAIDU, R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2000. v. 45, p. 57-88.

JUNG, I-G. & PARK, C-H. Characteristics of *Rhodococcus pyridinovorans* PYJ-1 for the biodegradation of benzene, toluene, *m*-xylene (BTX), and their mixtures. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2004. v. 97, nº 6, p. 429-431.

JUNOVEN, R.; MARTIKAINEN, E.; SCHULTZ, E.; JOUTTI, A.; AHTIAINEN, J.; LEHTOKARI, M. A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2000. v. 47, p. 156-166.

KAO, C. M. & WANG, C. C. Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. *Water Research*. 2000. v. 34, nº 13, p. 3413-3423.

KOCH, K. A.; KÄPPELI, O.; FIECHTER, A.; REISER, J. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Journal of Bacteriology*. 1991. v. 173, p. 4212-4219.

KOWALICK JR., W. W. Removing impediments to the use of bioremediation and other innovative technologies. In: SAYLER, G. S.; FOX, R.; BLACKBURNS, J. W. *Environmental Biotechnology for Waste Treatment*. Nova York: Plenum Press, 1991. p. 53-60.

LACOTTE, D. J.; MILLE, G.; ACQUAVIVA, M.; BERTRAND, J-C. *In vitro* biodegradation of Arabian Light 250 by a marine mixed culture using fertilizers as nitrogen and phosphorous sources. *Chemosphere*. 1995. v. 31, nº 11/12, p. 4351-4358.

LANGWALDT, J. H. & PUHAKKA, J. A. On-site biological remediation of contaminated groundwater: a review. *Environmental Pollution*. 2000. v.107, p. 187-197.

LEAHY, J. G. & COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*. 1990. v. 54, nº 3, p. 305-315.

LEAHY, J. G.; TRACY, K. D.; ELEY, M. H. Degradation of mixtures of aromatic and chloroaliphatic hydrocarbons by aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 2003. v. 43, p. 271-276.

LEWIS, R. J. Sax's dangerous properties of industrial materials. Ed. Van Norstrand Reinhold, vols. I, II, III, 18 ed. 1970 *apud* MOREIRA, V. S. F. D. Biodegradação de Naftaleno.1999.

MAIER, R. M. Microorganisms and organics pollutants. In: MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C.P. *Environmental Microbiology*. New York: Academic Press, 2000. Cap. 16, p. 363-402.

MALIYEKKAL, S. M.; RENE, E. R.; PHILIP, L.; SWAMINATHAN, T. Performance of BTX degraders under substrate versatility conditions. *Journal of Hazardous Materials*. 2004. v. B109, p. 201-211.

MATISOVÁ, E.; MEDVED'OVÁ, M. M.; VRANIAKOVÁ, J.; SIMON, P. Optimisation of solid-phase microextraction of volatiles. *Journal of Chromatography A*. 2002. v. 960, p. 159-164.

MOREIRA, V. S. F. D. Biodegradação de naftaleno. 1999. 163f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MORGAN, P.; LEWIS, S. T. e WATKINSON, R.J. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in gas-condensate-contaminated ground-water. *Environmental Pollution*. 1993. v. 82, p. 181-190.

OGINO, H.; MIYAMOTO, K.; ISHIKAWA, H. Organic solvent-tolerant bacterium which secretes an organic solvent-stable lipolytic enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*. 1994. v. 60, p. 3884-3885.

PETROBRÁS. 2003. Centro de Estudos de Petróleo (CEPETRO). Disponível em www.cepetro.unicamp.br/petroleo. Acessado em: 18 de Setembro de 2003.

PRINCE, R. C.; GARRET, R. M.; BARE, R. E.; GROSSMAN, M. J.; TOWNSEND, T.; SUFLITA, J. M.; LEE, K.; OWENS, E. H.; SERGY, G. A.; BRADDOCK, J. F.; LINDSTROM, J. E.; LESSARD, R. R. The roles of photooxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuels oils. *Spill Science & Technology*. 2003. v. 8, nº 2, p. 145-156.

PRITCHARD, H. P. & COSTA, C. F. EPA's Alaska oil spill bioremediation report. *Environmental Science & Technology*. 1991. v. 25, nº 3, p. 372-379.

PRZYJAZNY, A. AUSTIN, J. F.; ESSENMACHER, A. T. Proceedings of the 6th Polish Conference on Analytical Chemistry, Gliwice, Poland, July 9-14, 2000. v. 2, p. 135-136. *apud* PRZYJAZNY, A. & KOKOSA, J. M. Analytical characteristics of the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in water by headspace solvent microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2002. v. 977, p. 143-153.

RADAMAN, M.A; EL-TAYEB, O. M.; ALEXANDER, M. Inoculum size as a factor limiting success of inoculation for biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990. v. 56, nº 5, p. 1392-1396.

RAHMAN, K. S. M.; THAHIRA-RAHMAN, J.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; BANAT, I. M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology*. 2002. v. 85, p. 257-261.

REDDY, P. G.; SINGH, H. D.; ROY, P. K.; BARVAH, J. N. Predominant role of hydrocarbon solubilization in the microbial uptake of hydrocarbons. *Biotechnology & Bioengineering*. 1982. v. 26, p. 1241-1269.

RÖHLING, W. F. M.; MILNER, M. G.; JONES, D. M.; LEE, K.; DANIEL, F.; SWANNNELL, R. J. P.; HEAD, I. M. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. v. 68, nº 11, p. 5537-5548.

ROSELL, M.; LACORTE, S.; GINEBREDÀ, A. BARCELÓ, D. Simultaneous determination of methyl ter-butyl ether and its degradation products, other gasoline oxygenates and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in Catalanian groundwater by purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2003. v. 995, p. 171-184.

SABATÉ, J.; VIÑAS, M.; SOLANAS, A. M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2004 v. 54, p. 19-25.

SAILLENFAIT, A. M.; GALLISSOT, F.; MOREL, G.; BONNET, P. Developmental toxicities of ethylbenzene, *ortho*-, *meta*-, *para*-xylene and technical xylene in rats following inhalation exposure. *Food and Chemical Toxicology*. 2003. v. 41, p. 415-429.

SAKATA, S. K.; TANIGUCHI, S.; RODRIGUES, D. F.; URANO, M. E.; WANDERMÜREN, M. N.; PELLIZARI, V. H.; COMASSETO, J. V. Development of a static headspace gas chromatographic/mass spectrometric method to analyze the level of volatile contaminants biodegradation. *Journal of Chromatography A*. 2004. v.,p.67-71.

SCHRATZBERGER, M.; DANIEL, F.; WALL, C. M.; KILBRIDE, R.; MACNAUGHTON, S. J.; BOYD, S. E.; REES, H. L.; LEE, K.; SWANNELL, R. P. J. Response of estuarine meio- and macrofauna to in situ bioremediation of oil-contaminated sediment. *Marine Pollution Bulletin*. 2003. v. 46, p. 430-443.

SHIM, H. & YANG, S. Biodegradation of benzene, ethylbenzene, and *o*-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. *Journal of 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 degrading polychlorinated biphenyls and naphthalene. *FEMS Microbiology Letters*. 1999. v. 178, p. 87-93.

SHREVE, R. N. & BRINK Jr., J. A. Produtos Carboquímicos e Refinação do Petróleo. In: *Indústrias de Processos Químicos*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1977, p. 58-71 e 583-614 *apud* MOREIRA, V. S. F. D. Biodegradação de Naftaleno.1999.

SMIBERT, R. M. & KRIEG, N. R. Phenotypic Characterization. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society For Microbiology: Washington, 1994. Cap. 25, p. 607-654.

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

SNEATH, P. H. A. Endospore-forming Gram-positive Rods and Cocci. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G.; EDITORES ASSOCIADOS. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. v. 2. Williams & Wilkins: Baltimore, 1996. Cap. 13, p. 1104-1207.

SOLANO-SERENA, F.; MARCHAL, R.; CASARÉGOLA, S.; VASNIER, C.; LEBEAULT, J-M.; VANDECASTEELE, J-P. A *Mycobacterium* strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. v. 66, nº 6, p. 2392-2399.

SONG, H. Degradation of humus-bound metabolites generated from toluene and o-xylene in soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2003. v. 51, p. 129-132.

SORKHOH, N. A.; GHANNOUM, M. A.; IBRAHIM, A. S.; STRETTON, R. J.; RADWAN, S. S. Crude oil and hydrocarbon-degradating strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environments in Kuwait. *Environmental Pollution*. 1990. v. 65, p. 1-17.

SPAIN, J. C. & VAN VELD, P. A. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983. v. 45, p. 428-435.

STATISTICA, 1997. Statsoft. Tulsa, USA.

SU, J. & KAFKEWITZ, D. Utilization of toluene and xylenes by a nitrate-reducing strain of *Pseudomonas maltophilia* under low oxygen and anoxic conditions. *FEMS Microbiology Ecology*. 1994. v. 15, p. 249-258.

SWINNERTON, J. W.; LINNARBOM, V. J.; CHEEK, C. H. *Analytical. Chemistry*. 1962. v. 34, p.483. *apud* YANG, K-L.; LAI, C-H.; WANG, J-L. Construction and validation of an automated spray-and-trap gas chromatograph for the determination of volatile organic compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*. 2004. v. 1027, p. 41-48.

TRAVIS, C. C. & DOTY, C. B. Can contaminated aquifers be remediated? *Environmental Science Technology*. 1990. v. 24, nº 10, p. 1464-1466.

TROY, M. A. Bioengineering of soils and ground waters. *In*: BAKER, K. H. & HERSON, D. S. *Bioremediation*. New York: McGraw-Hill, 1994. Cap. 5, p.173-201.

UNGVARY, G.; TATRAI, E.; HUDAK, A.; BARCZA, G.; LORINCZ, M. Studies on the embryotoxic effects of *ortho*-, *meta*-, and *para*-xylene. *Abstract. Toxicology*. 1980. v. 18, p. 61-74.

VENOSA, A. D. & ZHU, X. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Science & Technology Bulletin*. 2003. v.8, nº 2, p. 163-178.

WALTER, M. V. & CRAWFORD, R. L. Overview: Biotransformation and Biodegradation. *In*: HURST, C. J. *et. al. Manual of Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology, 1997. Cap. 76, p.707-708.

WHO. World Health Organization. *International programme on chemical safety. Environmental Health Criteria* 52. 1985. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc52.htm>. Acessado em 20 de Setembro de 2003.

WHO. World Health Organization. *International programme on chemical safety. Environmental Health Criteria* 150. 1993. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc150.htm>. Acessado em 20 de Setembro de 2003.

WHO. Word Health Organization. *International programe on chemical safety. Environmental Health Criteria* 186. 1996. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc186.htm>. Acessado em 20 de Setembro de 2003.

WHO. Word Health Organization. *International programe on chemical safety. Environmental Health Criteria* 190. 1997. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc190.htm#SectionNumber:2.1>. Acessado em 20 de Setembro de 2003.

WIGGINS, B. A.; JONES, S. H. e ALEXANDER, M. Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987. v. 53, nº4, p. 791-796.

YANG, K-L.; LAI, C-H.; WANG, J-L. Construction and validation of an automated spray-and-trape gas chromatograph for the determination of volatile organic compounds in aqueous samples. *Journal of Cromatography A*. 2004. v. 1027, p. 41-48.

YANG, L.; LAI, C. e SHIEH, W. K. Biodegradation of dispersed fuel under high salinity conditions. *Water Research*. 2000. v. 34, nº 13, p. 3303-3314.

7. ANEXOS

7.1 Cromatogramas

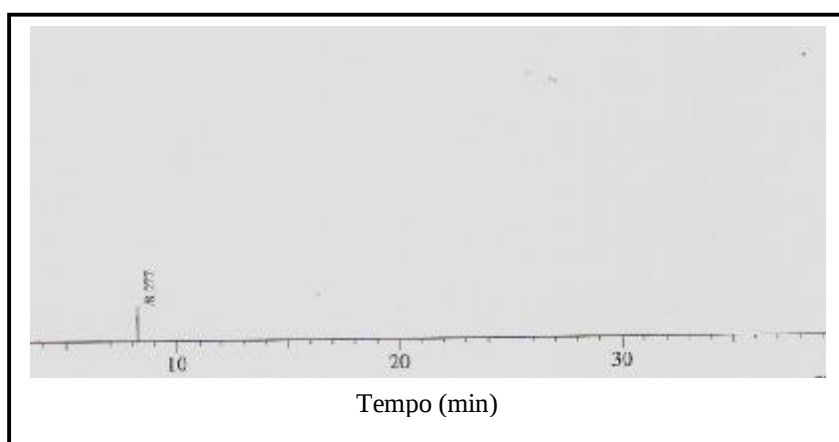


Figura 7.1 – Perfil cromatográfico de *orto*-xileno (pico 8.277) na amostra controle após 24h de bioprocessamento.

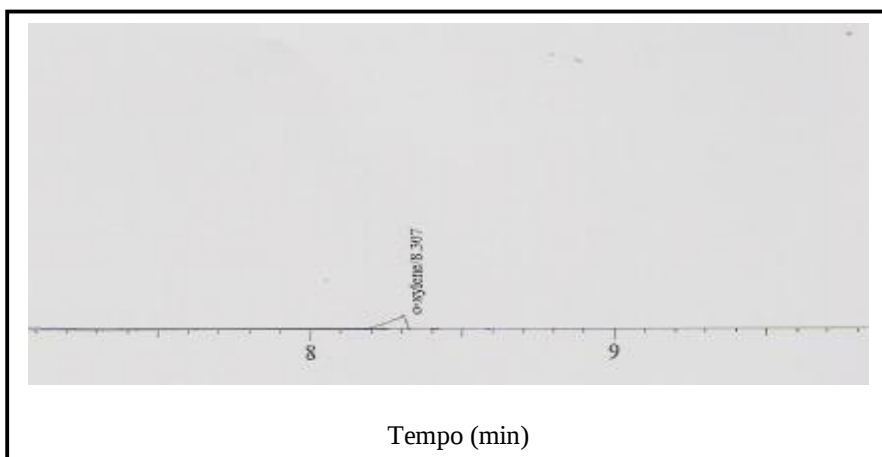


Figura 7.2 – Perfil cromatográfico de *orto*-xileno (pico 8.307) na amostra teste após 24h de bioprocessamento.

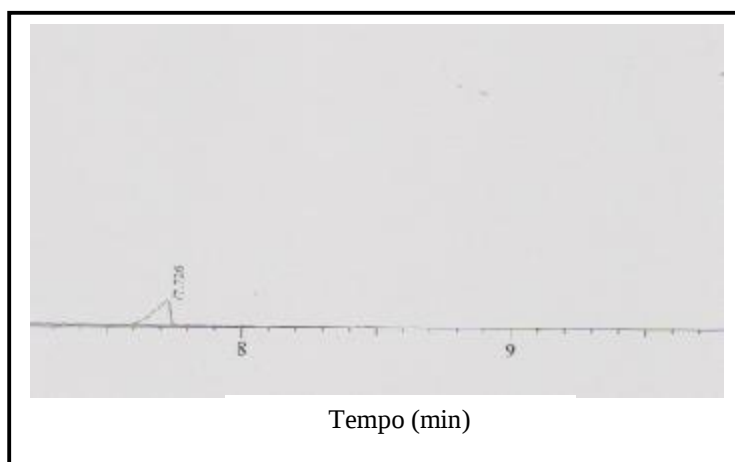


Figura 7.3 – Perfil cromatográfico de *meta*-xileno (pico 7.726) na amostra controle após 24h de bioprocessamento.

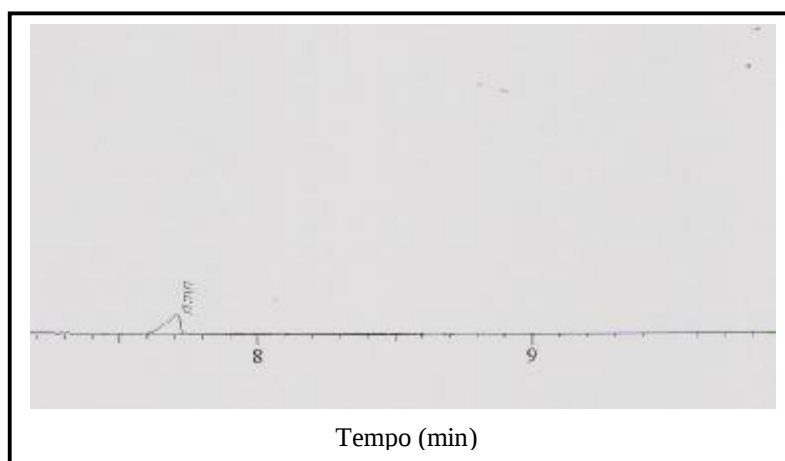


Figura 7.4 – Perfil cromatográfico de *meta*-xileno (pico 7.707) na amostra teste após 24h de bioprocessamento.

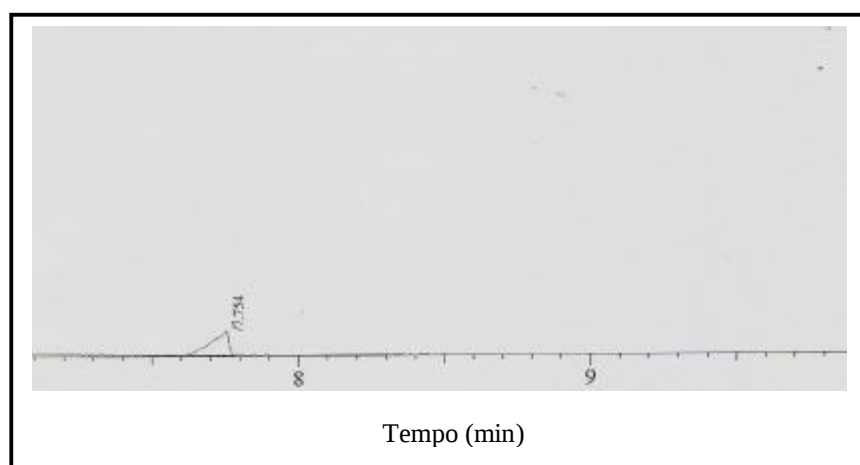


Figura 7.5 – Perfil cromatográfico de *para*-xileno (pico 7.754) na amostra controle após 24h de bioprocessamento.

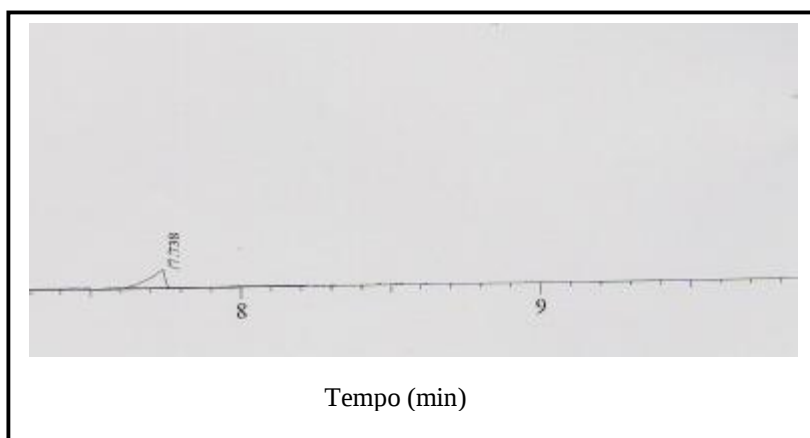


Figura 7.6 – Perfil cromatográfico de *para*-xileno (pico 7.738) na amostra teste após 24h de bioprocessamento.

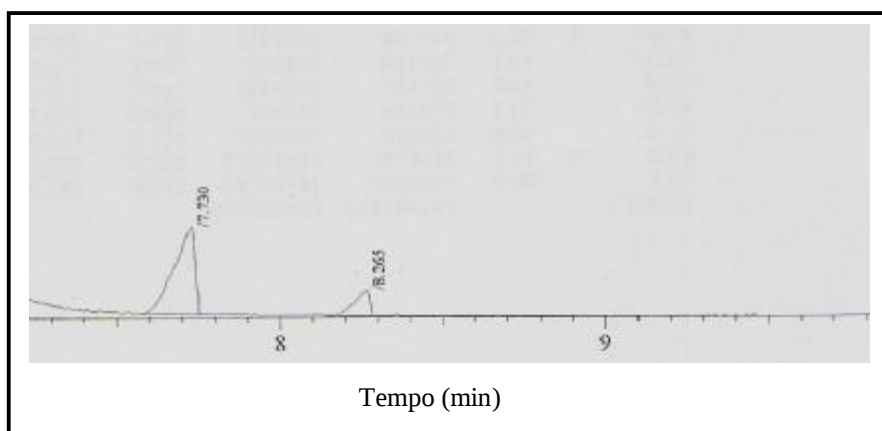


Figura 7.7 – Perfil cromatográfico da mistura dos isômeros: *orto*-xileno (pico 8.265); *meta*- e *para*-xileno (pico 7.730) na amostra controle após 24h de bioprocessamento.

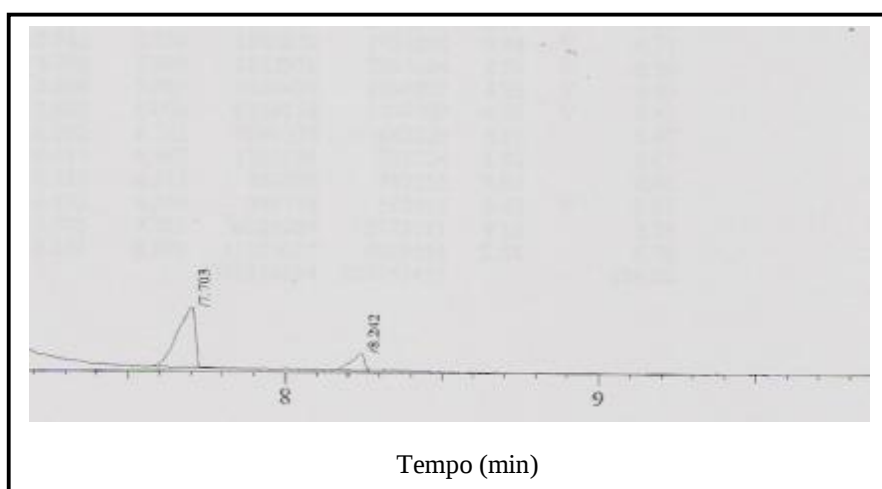


Figura 7.8 – Perfil cromatográfico da mistura dos isômeros: *orto*-xileno (pico 8.242); *meta*- e *para*-xileno (pico 7.703) na amostra teste após 24h de bioprocessamento.

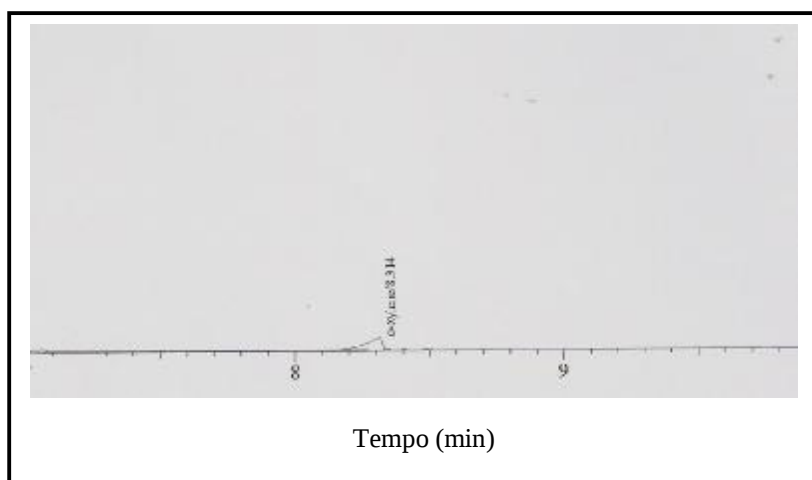


Figura 7.9 – Perfil cromatográfico de *orto*-xileno (pico 8.314) na amostra controle após 72h de bioprocessamento.

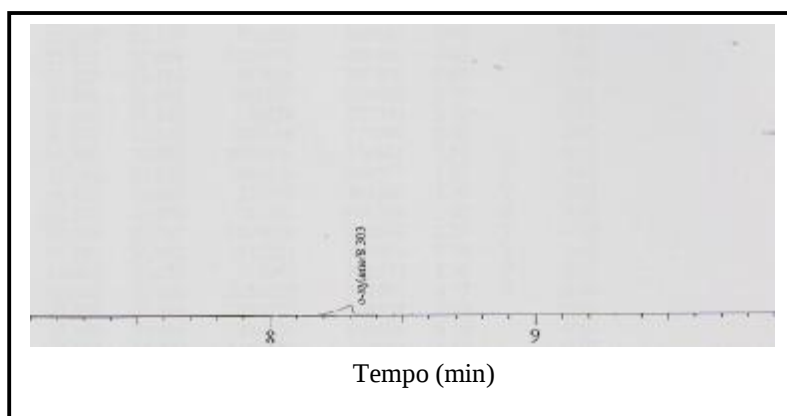


Figura 7.10 – Perfil cromatográfico de *orto*-xileno (pico 8.303) na amostra teste após 72h de bioprocessamento.

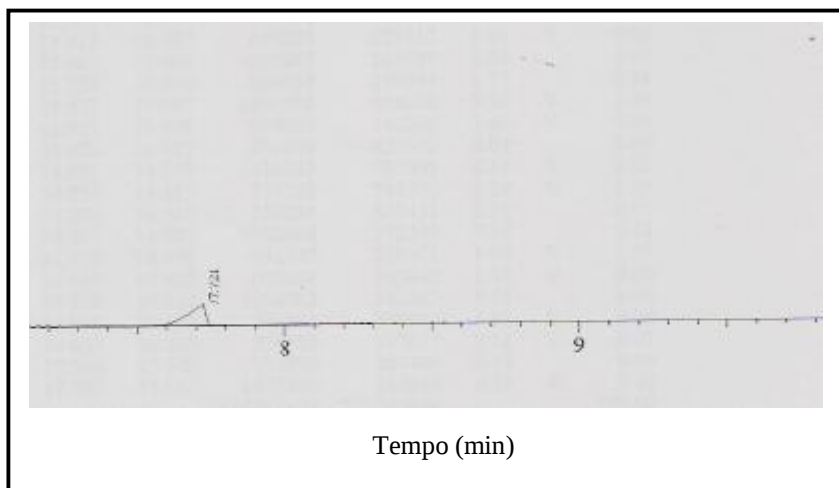


Figura 7.11 – Perfil cromatográfico de *meta*-xileno (pico 7.721) na amostra controle após 72h de bioprocessamento.

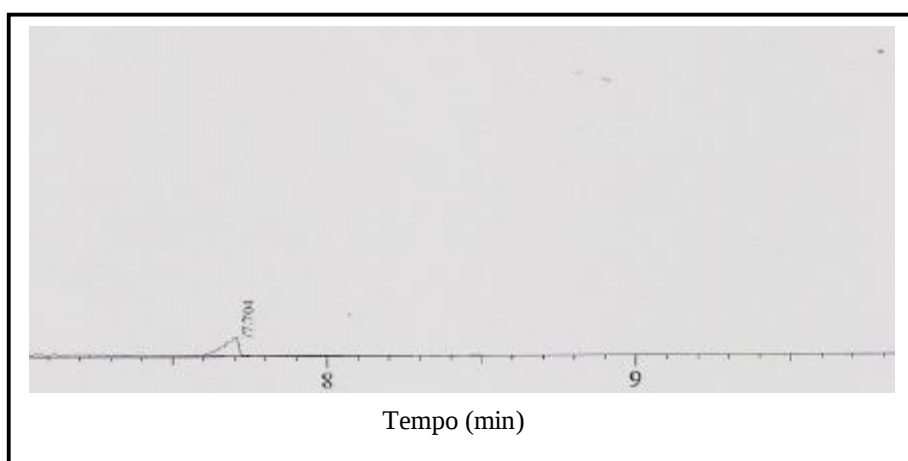


Figura 7.12 – Perfil cromatográfico de *meta*-xileno (pico 7.704) na amostra teste após 72h de bioprocessamento.

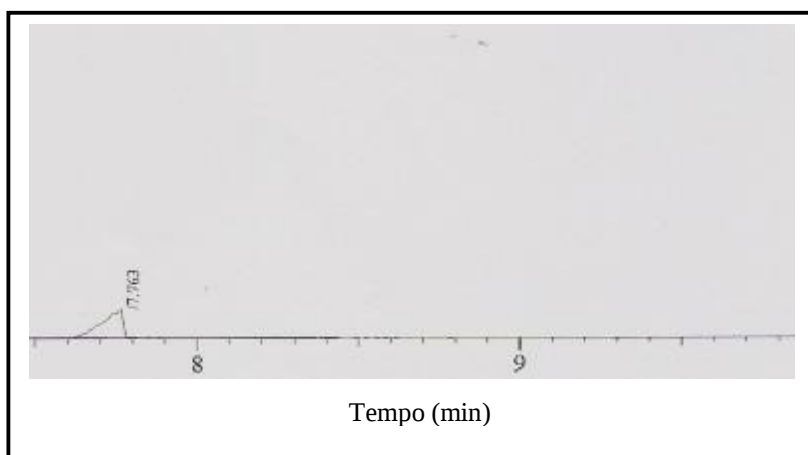


Figura 7.13 – Perfil cromatográfico de *para*-xileno (pico 7.763) na amostra controle após 72h de bioprocessamento.

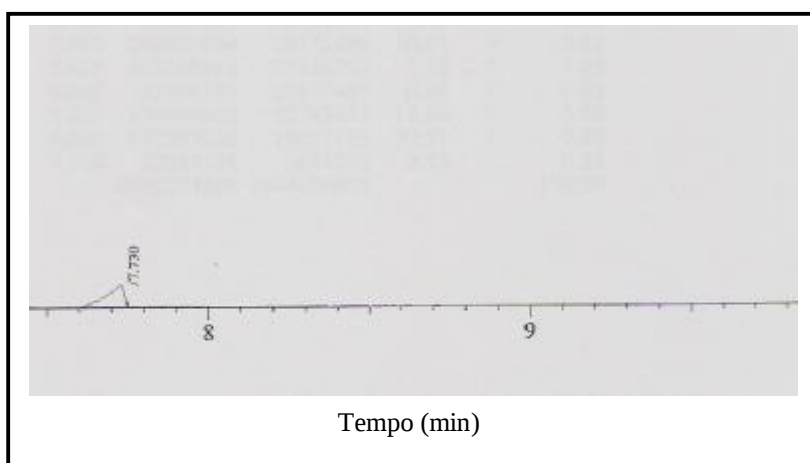


Figura 7.14 – Perfil cromatográfico de *para*-xileno (pico 7.730) na amostra teste após 72h de bioprocessamento.

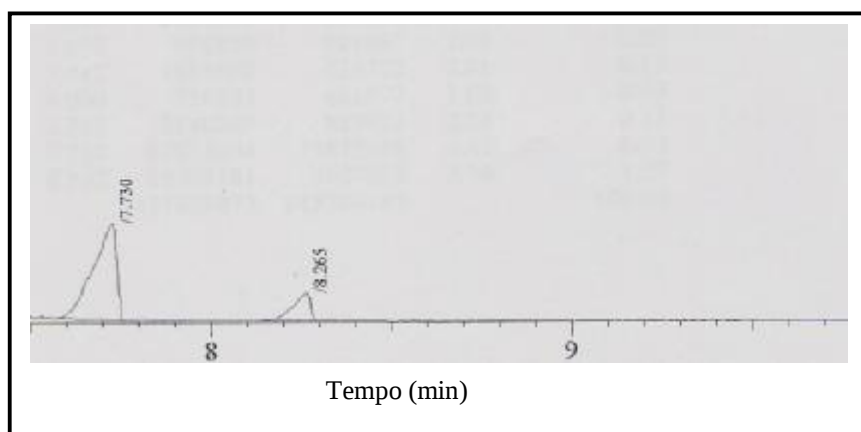


Figura 7.15 – Perfil cromatográfico da mistura dos isômeros: *orto*-xileno (pico 8.265); *meta*- e *para*-xileno (pico 7.730) na amostra controle após 72h de bioprocessamento.

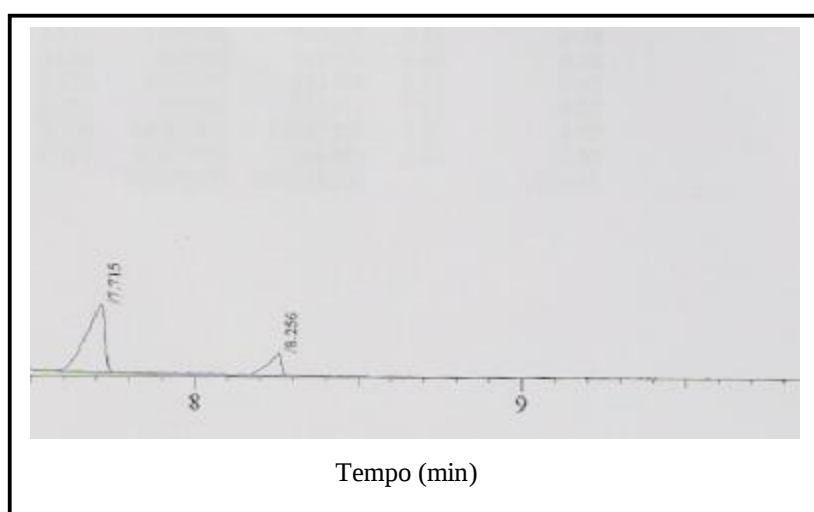


Figura 7.16 – Perfil cromatográfico da mistura dos isômeros: *orto*-xileno (pico 8.256); *meta*- e *para*-xileno (pico 7.715) na amostra teste após 72h de bioprocessamento.