

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E  
RECURSOS NATURAIS

UTILIZAÇÃO DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE BENZENO,  
TOLUENO E XILENO (COMPOSTOS BTX) COMO FONTE DE  
CARBONO POR LINHAGENS BACTERIANAS

Silvana Elizabeth de Méo Dulcini

SÃO CARLOS  
2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E  
RECURSOS NATURAIS

UTILIZAÇÃO DE ALTAS CONCENTRAÇÕES DE BENZENO, TOLUENO E  
XILENO (COMPOSTOS BTX) COMO FONTE DE CARBONO POR LINHAGENS  
BACTERIANAS

Silvana Elizabeth de Méo Dulcini

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

SÃO CARLOS

2002

### Ficha Catalográfica

Dulcini, Silvana Elizabeth de Méo

Utilização de altas concentrações de benzeno, tolueno e xileno  
(compostos BTX) como fonte de carbono por linhagens bacterianas  
/ Silvana Elizabeth de Méo Dulcini – São Carlos : UFSCar, 2002.

99 p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, 2002.

1. Biodegradação. 2. Bactérias. 3. Benzeno. 4. Tolueno. 5.  
Xileno. 6. BTX. I. Autor. II. Título

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant

À Sioni,

Seu entusiasmo pela ciência, seu  
otimismo irradiante e vontade de arriscar  
faziam-me crer que tudo daria certo,  
sempre.

Saudades...

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lúcia R. Durrant pela orientação e contribuição para a minha formação científica e pelo apoio, paciência e compreensão.

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. José Roberto Verani e ao Prof. Dr. José Eduardo dos Santos, coordenadores do PPG-ERN, pelo apoio e compreensão.

Ao Prof. Dr. Gilberto Moraes, ao Prof. Dr. Clóvis W. O. Souza e ao Prof. Antonio Sérgio Spanó Seixas pelo apoio e concessão de laboratório e equipamentos para o término da parte experimental desta tese.

À Profa. Dra. Mirna L. Godinho, pelo apoio e orientação na primeira parte deste trabalho.

Ao Paulo Cordeiro, Mauro R. Fernandes e Jarem R. Garcia, do Instituto de Química de São Carlos-USP, pela realização das análises cromatográficas e de espectroscopia de UV.

Aos amigos do DBAA: Léo, Bel, Roberta, Cris, Elaine, Gunther, Alexandre, Carol, Jarem, André, Mabel, Daiane, Elisângela, Marcelo e Marcos pela amizade e apoio.

Aos amigos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana da FEA-Unicamp, Daniela, Eliane, Andréa, Érica, Fabiana, Lara, Hamilton, Marta e Hélio pela receptividade e apoio.

À Andréa Spessoto pela amizade e pelas hospedagens em Campinas.

Aos funcionários da secretaria do PPG-ERN, João, Renata e Roseli, pela paciência e compreensão.

Ao Ronaldo pelo apoio e amizade.

À minha psicoterapeuta, Lisaine Ap. Prando, pelo apoio e carinho e por ensinar-me como apoiar-me a mim mesma.

Aos meus pais, sogros e todos os meus familiares pelo carinho e incentivo.

Ao meu marido e meus filhos pelo amor, grande estímulo e por estarem sempre ao meu lado.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Compostos BTX [benzeno, tolueno e isômeros do xileno (orto, meta e para)] são aromáticos leves presentes na gasolina, sendo tóxicos e relativamente solúveis em água, o que torna preocupante o seu efeito potencial no ambiente. Experimentos de crescimento de culturas isoladas de locais contaminados com derivados de petróleo, após pré-condicionamento, resultaram na seleção de linhagens tolerantes a altas concentrações de BTX, que foram então avaliadas quanto à habilidade de utilização de p-xileno. Duas linhagens foram responsáveis por altos percentuais de remoção de p-xileno do meio de cultura, com 3 dias de cultivo, o que foi atribuído à biodegradação, uma vez que este composto foi fornecido como fonte única de carbono e energia ao meio, sendo capaz de promover aumento do número de células viáveis. Para a determinação da concentração de BTX nas culturas, foram utilizadas técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama. Foi avaliada também a produção de biossurfactantes das culturas, através das determinações das atividades de emulsificação e dos índices de emulsificação (E24) das amostras. A emulsificação não se mostrou um fator importante para a degradação, uma vez que as linhagens degradadoras não mostraram capacidade de produção de biossurfactante.

## ABSTRACT

BTX compounds [benzene, toluene and xylene isomers (ortho, meta and para)] are light aromatics present in gasoline. They are toxic and relatively soluble in water. This high solubility in comparison with other petroleum hydrocarbons explains their potential effect in the environment. Experiments with pre-conditionated cultures, isolated from petroleum contaminated sites, were carried out with the aim of selecting solvent-tolerant strains able of growing in high concentrations of BTX. Those strains were evaluated for their ability of p-xylene utilization. After 3 days of incubation, two strains were responsible for high percentages of p-xylene removal from culture medium. It was concluded that these results were related to biodegradation, since the strains were able to grow in p-xylene as the sole source of carbon and energy. High performance liquid chromatography and gas chromatography with flame ionization detection were used for BTX-determinations. Biosurfactant production from the cultures was also evaluated, by emulsifying activity and emulsifying index (E24) determinations. Emulsification did not show any relationship with p-xylene biodegradation.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
SUMÁRIO.....	iv
ÍNDICE DE TABELAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Hidrocarbonetos do petróleo e compostos aromáticos BTX.....	1
1.2 Destino dos hidrocarbonetos de petróleo no ambiente.....	5
1.3 Mecanismos de captação dos hidrocarbonetos pelas bactérias.....	6
1.4 Biossurfactantes.....	7
1.5 Biodegradação dos compostos aromáticos.....	10
1.5.1 Biodegradação do benzeno.....	10
1.5.2 Biodegradação do tolueno.....	11
1.5.3 Biodegradação do xileno.....	13
1.6 Utilização de altas concentrações de compostos aromáticos BTX por bactérias.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Local de coleta.....	17
3.2 Isolamento de linhagens bacterianas com potencial para degradação de compostos aromáticos.....	17
3.3 Detecção ("screening") da produção de biossurfactantes.....	18
3.4 Constitubilidade x indutibilidade da produção de biossurfactantes.....	19
3.5 "Screening" de utilização de tolueno pelos isolados.....	20
3.6 Utilização de tolueno e de xileno pelos isolados.....	20
3.7 "Time-course" da produção de biossurfactantes.....	21
3.8 Monitoramento do crescimento.....	22
3.9 Linhagens cedidas.....	22
3.10 "Screening" da capacidade de crescimento.....	23
3.11 Pré-condicionamento das culturas.....	24

3.12 Experimentos de crescimento das culturas pré-condicionadas, em meio mineral M2 líquido, contendo diferentes concentrações de misturas de BTX ou frações individuais desses compostos.....	25
3.13 Testes de utilização de p-xileno.....	26
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
4.1 Isolamento de linhagens bacterianas com potencial para degradação de compostos aromáticos.....	28
4.2 Detecção ("screening") da produção de biossurfactantes.....	30
4.3 "Screening" de utilização de tolueno pelos isolados.....	30
4.4 Constitubilidade x indutibilidade da produção de biossurfactantes.....	33
4.5 Crescimento em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de benzeno.....	34
4.6 "Time-course" da produção de biossurfactantes em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de benzeno, determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987).....	35
4.7 Crescimento em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de tolueno.....	39
4.8 "Time-course" da produção de biossurfactantes em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de tolueno, determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987).....	40
4.9 Crescimento em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de xileno.....	43
4.10 "Time-course" da produção de biossurfactantes em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de xileno, determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987).....	44
4.11 Utilização de tolueno e de m-xileno pelos isolados.....	50
4.12 "Screening" de linhagens capazes de crescimento em meio mineral líquido M2 (BICCA et al., 1999) contendo diferentes concentrações de misturas de BTX ou frações individuais desses compostos e indicador de crescimento.....	52
4.13 Experimentos de crescimento em meio mineral líquido M2 (BICCA et al., 1999) contendo diferentes concentrações de misturas de BTX ou frações individuais desses compostos.....	54

4.14 Produção de biossurfactantes.....	67
4.15 Estudos de biodegradação.....	68
5 DISCUSSÃO.....	70
5.1 Considerações gerais.....	70
5.2 Produção de biossurfactantes.....	71
5.3 Constitubilidade x indutibilidade da produção de biossurfactantes.....	73
5.4 "Time-course" da produção de biossurfactantes.....	74
5.5 Avaliação da utilização de tolueno, m-xileno e p-xileno.....	75
5.6 Avaliação do crescimento.....	79
5.7 Utilização de altas concentrações de solventes orgânicos por bactérias.....	81
6 Conclusões.....	87
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	- Linhagens cedidas para a realização dos experimentos.....	23
Tabela 2	- Descrição morfológica das linhagens isoladas em meio LB.....	28
Tabela 3	- Detecção ("screening) da produção de biossurfactantes das culturas em meio mineral M1 líquido contendo tolueno 1,5% como fonte de carbono, a 25°C, com 48 horas de incubação, sob agitação de 150 rpm, determinada através do método da atividade de emulsificação (AE) (JOHNSON et al., 1992 e COOPER & GOLDENBERG, 1987). Remoção percentual de tolueno pelas culturas, em relação a frascos controles não inoculados.....	31
Tabela 4	- Detecção da produção de biossurfactantes das culturas selecionadas, em duplicatas, em meio mineral M1 líquido contendo dextrose 1% como fonte de carbono, a 25°C, com 48 horas de incubação, sob agitação de 150 rpm, determinada através do método da atividade de emulsificação (AE) (JOHNSON et al., 1992 e COOPER & GOLDENBERG, 1987).....	34
Tabela 5	- Crescimento de SC4-6, SC4-11 e SC8-3 em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de benzeno, avaliado através das leituras das DO 540 nm.....	35
Tabela 6	- Crescimento de SC4-6, SC4-11 e SC8-3 em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de tolueno, avaliado através das leituras das DO 540 nm.....	39
Tabela 7	- Crescimento de SC4-6, SC4-11 e SC8-3 em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de xileno, avaliado através das leituras das DO 540 nm.....	43
Tabela 8	- Classificação das emulsões água-em-óleo apresentadas pelas linhagens SC4-6, SC4-11 e SC8-3, nas 4 concentrações de benzeno testadas.....	47
Tabela 9	- Classificação das emulsões água-em-óleo apresentadas pelas linhagens SC4-6, SC4-11 e SC8-3, nas 4 concentrações de tolueno testadas.....	48

Tabela 10	- Classificação das emulsões água-em-óleo apresentadas pelas linhagens SC4-6, SC4-11 e SC8-3, nas 4 concentrações de xileno testadas.....	49
Tabela 11	- Remoção percentual em relação aos frascos controles abióticos, de diferentes concentrações de tolueno e de m-xileno do meio de cultura M1 líquido por SC4-6, SC4-11 e SC8-3, com 96 horas de incubação, avaliada por CLAE-fase reversa.....	50
Tabela 12	- Crescimento das culturas em meio mineral M2 líquido (BICCA et al., 1999) contendo frações individuais ou misturas de hidrocarbonetos aromáticos BTX, após 48 horas de incubação a 30°C, sob agitação de 150 rpm.....	53
Tabela 13	- Biodegradação percentual de p-xileno em relação a controles abióticos por 5 B2 e 5 E2.....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	- Vias metabólicas de degradação aeróbia de benzeno por bactérias.....	11
Figura 2	- Vias metabólicas iniciais de degradação aeróbia de tolueno por bactérias.....	12
Figura 3	- Reações iniciais de degradação aeróbia de m- e p-xileno por bactérias.....	14
Figura 4	- Linhagens cultivadas em meio mineral M1 líquido com 1,5% de tolueno (v/v) e avaliadas quanto à capacidade de produção de biossurfactantes.....	32
Figura 5	- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-6 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de benzeno.....	36
Figura 6	- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-11 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de benzeno.....	37
Figura 7	- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC8-3 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de benzeno.....	38
Figura 8	- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-6 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de tolueno.....	40
Figura 9	- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-11 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de tolueno.....	41
Figura 10	- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC8-3 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de tolueno.....	42
Figura 11	- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-6 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de xileno.....	44

Figura 12	- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-11 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de xileno.....	45
Figura 13	- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC8-3 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de xileno.....	46
Figura 14	- Crescimento da linhagem 5 A2 em meio mineral M2 com 5% de BTX (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	55
Figura 15	- Crescimento da linhagem 5 A2 em meio mineral M2 com 5% de BTX (v/v) e 0,05% de extrato de levedura.....	55
Figura 16	- Crescimento da linhagem 5 A2 em meio mineral M2 com 0,5% de xileno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	56
Figura 17	- Crescimento de <i>Actinobacillus lignieresii</i> 5 B2 em meio mineral M2 com 5% de BTX (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	57
Figura 18	- Crescimento de <i>Actinobacillus lignieresii</i> 5 B2 em meio mineral M2 com 5% de BTX e 0,05% de extrato de levedura.....	57
Figura 19	- Crescimento de <i>Actinobacillus lignieresii</i> 5 B2 em meio mineral M2 com 0,5% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	58
Figura 20	- Crescimento de <i>Actinobacillus lignieresii</i> 5 B2 em meio mineral M2 com 1% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	58
Figura 21	- Crescimento de <i>Actinobacillus lignieresii</i> 5 B2 em meio mineral M2 com 1% de p-xileno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	59
Figura 22	- Crescimento da linhagem 5 E1 em meio mineral M2 com 2% de p-xileno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	60
Figura 23	- Crescimento de <i>Moraxella nonliquefaciens</i> 5 E2 em meio mineral M2 com 0,5% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	60
Figura 24	- Crescimento de <i>Moraxella nonliquefaciens</i> 5 E2 em meio mineral M2 com 1% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	61

Figura 25	- Crescimento de <i>Moraxella nonliquefaciens</i> 5 E2 em meio mineral M2 com 5% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	62
Figura 26	- Crescimento de <i>Moraxella nonliquefaciens</i> 5 E2 em meio mineral M2 com 0,4% de p-xileno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	62
Figura 27	- Crescimento de <i>Enterobacter aerogenes</i> 4022 em meio mineral M2 com 0,5% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	63
Figura 28	- Crescimento de <i>Enterobacter aerogenes</i> 4022 em meio mineral M2 com 1% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	64
Figura 29	- Crescimento de <i>Flavobacterium</i> sp 5B4 em meio mineral M2 com 1% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia..	64
Figura 30	- Crescimento de <i>Aeromonas</i> sp 4019 em meio mineral M2 com 0,5% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	65
Figura 31	- Crescimento de <i>Aeromonas</i> sp 4019 em meio mineral M2 com 1% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	66
Figura 32	- Crescimento de <i>Enterobacter aerogenes</i> 4023 em meio mineral M2 com 0,5% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	66
Figura 33	- Crescimento de <i>Enterobacter aerogenes</i> 4023 em meio mineral M2 com 1% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	67
Figura 34	- Desaparecimento de p-xileno. Crescimento de <i>Moraxella nonliquefaciens</i> 5E2 em meio mineral M2 com 1% de p-xileno (v/v) como fonte única de carbono e energia.....	69

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Hidrocarbonetos do petróleo e compostos aromáticos BTX

Hidrocarbonetos são moléculas hidrofóbicas, compostas somente de carbono e hidrogênio. São insolúveis ou apresentam solubilidade muito baixa em água. Podem ser cíclicos ou alifáticos; de cadeia curta ou longa, linear ou ramificada; saturados (alcanos) ou insaturados (alcenos e alcinos). Acredita-se que tenham sido originalmente sintetizados por organismos vivos incluindo animais, plantas e microrganismos que, posteriormente, sofreram os efeitos combinados de calor e pressão, formando reservatórios maciços na Terra na forma de óleo cru e carvão.

De acordo com CORCHO-SÁNCHEZ (2000), o óleo cru é uma mistura complexa de hidrocarbonetos contendo n-alcanos (parafinas), alcanos ramificados, cicloalcanos e aromáticos e também podem conter pequenas quantidades de fenóis, álcoois, cetonas e ácidos graxos. A composição do óleo cru não é apenas complexa, mas apresenta considerável variação mesmo em amostras da mesma localidade. A proporção de compostos de anel (alícíclicos e aromáticos) é extremamente variável (2-40% do total).

Nas duas últimas centenas de anos, grandes quantidades de óleo cru têm sido extraídas da superfície terrestre e amplamente distribuídas e consumidas, como resultado de uma necessidade de óleo como combustível, lubrificante e principal matéria-prima da indústria do petróleo.

Até o início da década de noventa, estimava-se que o "input" global anual de petróleo situava-se entre 1,7 e 8,8 milhões de toneladas métricas, a maior parte derivada de fontes antropogênicas (LEAHY & COLWELL, 1990). O efeito ambiental dos hidrocarbonetos do petróleo surge principalmente de liberações locais em larga escala, tais como ocorrem quando um tanque de óleo acima ou abaixo do solo é danificado, ou há um derramamento sem controle de poços petrolíferos. Também, o transporte de produtos do petróleo em navios, caminhões e dutos regularmente leva a acidentes, aumentando a quantidade de hidrocarbonetos descarregados nos sistemas de águas subterrâneas, causando, em alguns casos, sérios problemas de contaminação.

Dessa forma, a contaminação de águas subterrâneas por hidrocarbonetos do petróleo é uma ocorrência generalizada. Para dimensionar o problema, estimava-se no início da década de 90, que 600.000 dos 2 milhões de tanques subterrâneos de gasolina nos Estados Unidos estariam vazando. No Brasil, não existem estatísticas de vazamentos. Até agora, as maiores preocupações estão focadas no estado de São Paulo, onde o aquífero subterrâneo é usado por 70% da população. Durante o crescimento econômico dos anos 70, o chamado "milagre brasileiro", houve um grande aumento do número de postos de gasolina no país. Considerando que o tempo de vida médio dos tanques de armazenamento é de cerca de 20 anos, o Brasil provavelmente logo estará tendo problemas de contaminação do aquífero subterrâneo semelhantes

àqueles atualmente encontrados nos Estados Unidos e Europa (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996).

Ainda de acordo com CORSEUIL & ALVAREZ (1996), a maior preocupação com o vazamento de tanques de gasolina é a contaminação das águas subterrâneas pelo grupo mais solúvel dos hidrocarbonetos do petróleo, os aromáticos leves, conhecido como compostos BTX, benzeno, tolueno, e isômeros do xileno (meta, orto e para). Esses componentes são tóxicos e relativamente solúveis em água. Esses hidrocarbonetos têm relativamente alto potencial de poluição devido à sua significativa concentração na gasolina, relativamente alta solubilidade em água e toxicidade crônica. CORCHO-SÁNCHEZ (2000) menciona que, especificamente no caso do benzeno, apesar desse componente constituir uma minúscula fração do combustível (não mais do que 3% do total), quando há um derramamento, o benzeno constitui a maioria da fração dissolvida no ambiente aquático. O benzeno é o composto BTEX com a maior solubilidade em água (cerca de 1700 mg/L). Essa alta solubilidade em comparação com outros hidrocarbonetos do petróleo, por exemplo, n-hexano (somente 9 mg/L) explica o efeito potencial na qualidade das águas subterrâneas.

Benzeno, tolueno, etilbenzeno, estireno e xileno estão entre os 50 químicos industriais produzidos em maior volume, cuja produção figura na ordem de milhões de toneladas por ano. Esses compostos são largamente usados como combustível e como solventes industriais (SMITH, 1990). Além disso, eles e os compostos poliaromáticos servem como matéria-prima para

a produção de farmacêuticos, agroquímicos, polímeros, explosivos e muitos outros produtos de uso comum no dia-a-dia (GIBSON, 1971).

Atualmente, os maiores produtores de benzeno são Estados Unidos, Japão e a Europa Ocidental, sendo que no início da década de 90 a produção mundial foi de 22 milhões de toneladas anuais. Enquanto os Estados Unidos produziram, em 1992, 4,5 milhões de toneladas, o Brasil produziu 600 mil toneladas (DE CARVALHO et al., 1995, apud COUTRIM et al., 2000). Nos Estados Unidos, o tolueno ocupa a vigésima sétima posição dentre os 50 produtos químicos produzidos em maior volume, com 931 milhões de galões ( $3,5 \times 10^9$  litros) de tolueno produzidos em 1994 (TAY et al., 1998). A indústria usa tolueno no refino da gasolina; produção de tintas, lacas e adesivos e alguns processos de impressão e de curtimento de couro. O tolueno é geralmente descartado como solvente usado.

Todos os compostos BTX são poderosos deprimores do sistema nervoso central e o benzeno é mutagênico e carcinogênico, podendo causar leucemia em humanos (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996). Conseqüentemente, BTX são poluentes prioritários e sua ocorrência tem levado ao desenvolvimento de vários métodos físicos, químicos e biológicos para sua remoção. Daí a importância ecológica de existirem organismos que degradem e portanto removam esses compostos do ambiente.

## 1.2 Destino dos hidrocarbonetos de petróleo no ambiente

Uma vez que tenha ocorrido um derramamento de petróleo na superfície, a combinação de processos físicos, químicos e biológicos tendem a dispersar a contaminação. Os processos biológicos levam à degradação de alguns componentes do petróleo a dióxido de carbono e água na presença de nutrientes dissolvidos e aceptores de elétrons. LEAHY & COLWELL (1990) consideram que, apesar de que possam ocorrer fenômenos físicos e químicos como volatilização, fotodegradação e lixiviação, a biodegradação por populações naturais de microrganismos representa um dos mecanismos principais através dos quais o petróleo e outros hidrocarbonetos são eliminados do ambiente e entre esses, as bactérias desempenhariam um papel dominante na degradação de hidrocarbonetos.

Os componentes voláteis dos hidrocarbonetos, alcanos de cadeia curta, alcanos cíclicos e aromáticos são prontamente oxidados por muitos tipos de bactérias (ATLAS, 1981). De acordo com LEAHY & COLWELL (1990), as bactérias degradadoras de vários hidrocarbonetos, tanto em ambiente marinho quanto terrestre são: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas* spp. e as corineformes.

### 1.3 Mecanismos de captação dos hidrocarbonetos pelas bactérias

De modo a absorver esses substratos insolúveis da fase aquosa e metabolizá-los, os microrganismos tiveram que desenvolver uma variedade de mecanismos específicos de absorção. Assim sendo, três diferentes mecanismos foram propostos por KAPPELI & FINNERTY (1979) para explicar a absorção do hidrocarboneto pelas células microbianas, sendo que todos os três modelos são baseados na captação de um hidrocarboneto do tipo alcano:

- (1) absorção somente de hidrocarbonetos dissolvidos na fase aquosa.
- (2) contato direto das células com gotículas de hidrocarbonetos maiores do que as células (macrogotículas);
- (3) contato direto das células com microgotículas de hidrocarboneto "pseudo-solubilizadas" ou "acomodadas" (gotículas muito menores do que a célula microbiana).

O primeiro mecanismo é considerado geralmente válido para alcanos de cadeia curta, ou seja, alcanos de baixo peso molecular (menores de  $C_9$ ). Os outros dois mecanismos provavelmente ocorrem simultaneamente e envolvem a produção de substâncias surfactantes pelas células (biosurfactantes).

#### 1.4 Biossurfactantes

Biossurfactantes são compostos com atividade superficial produzidos biologicamente. Tais compostos promovem a emulsificação ou solubilização do hidrocarboneto, facilitando, em geral, a sua absorção pelas células microbianas.

Microorganismos com a habilidade de degradar hidrocarbonetos têm sido descritos e há um número considerável de trabalhos enfocando o papel de biossurfactantes na degradação de hidrocarbonetos alifáticos (KAPPELI & FINNERTY, 1979; ROY *et al.*, 1979; REDDY *et al.*, 1982, 1983; SAR & ROSENBERG, 1983; PINES & GUTNICK, 1984; HOMMEL, 1990; OBERBREMER *et al.*, 1990; WATKINSON & MORGAN, 1990; ZHANG & MILLER, 1992, 1994).- Vários trabalhos têm mostrado que o crescimento microbiano em meios contendo hidrocarbonetos como fonte de carbono é acompanhado da produção de biossurfactantes. ITOH & SUZUKI (1972) apud HOMMEL (1990), mostraram que linhagens mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* que perderam a capacidade de produção de biossurfactantes não cresceram em hidrocarbonetos e que a capacidade de crescer nesse tipo de substrato só foi restabelecida após a adição do biossurfactante ramnolípideo ao meio de cultura. KOCH *et al.* (1991) encontraram resultados semelhantes àqueles descritos por ITOH & SUZUKI (1972), utilizando mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* PG201.

Tipos de biossurfactantes produzidos por microrganismos são revistos por COOPER & ZAJIC (1980) e NEU (1996). Em sua revisão, NEU (1996)

considera o papel desses compostos não só na degradação de hidrocarbonetos, mas também sua função na adesão e desadesão das células bacterianas a interfaces, na emulsificação de compostos insolúveis em água como substratos, na locomoção de algumas bactérias, na interação célula-célula e propõe ainda uma função na regulação da hidrofobicidade celular.

Os compostos com atividade superficial compreendem desde pequenas moléculas, tais como glicolipídeos e peptolipídeos, até moléculas de elevado peso molecular, que podem ser polímeros anfifílicos ou polifílicos. Entretanto, a característica comum desses compostos é que eles são moléculas anfipáticas, ou seja, possuem uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica, daí a sua capacidade de interagir com interfaces.

Dentre os biossurfactantes já isolados, o tipo mais comum são os ramnolipídeos (ZHANG & MILLER, 1992), sendo o ramnolipídeo de *Pseudomonas aeruginosa* um dos mais estudados (HISATSUKA *et al.*, 1971 apud DÉZIEL *et al.*, 1996).

De acordo com GERSON & ZAJIC (1978), os biossurfactantes induzem os seguintes fenômenos:

(1) Eles diminuem o tamanho médio das partículas emulsificadas e aumentam a extensão da sua distribuição de tamanho;

(2) Quando a concentração do surfactante aumenta, microgotículas do hidrocarboneto são produzidas em maior escala. O consumo destas gotículas de hidrocarboneto pelas células microbianas parece ocorrer de dois modos: (a) as gotículas são fagocitadas ou (b) estas gotículas

umedecem a superfície do microrganismo e o hidrocarboneto se difunde por capilaridade através da parede celular para a membrana celular. Presumivelmente, os hidrocarbonetos se dissolvem na membrana celular e ficam assim disponíveis para as enzimas responsáveis pela oxidação destes compostos dentro da célula. SIKKEMA *et al.* (1995) também consideram que as evidências indicam que a absorção de hidrocarbonetos é um processo passivo.

Os hidrocarbonetos presentes no petróleo passíveis de serem degradados por microrganismos incluem moléculas com cadeias alifáticas lineares ou ramificadas, longas ou curtas, hidrocarbonetos cíclicos e aromáticos. Dentre os compostos acima citados, os hidrocarbonetos alifáticos representam um grande potencial de substratos para os microrganismos (WATKINSON & MORGAN, 1990) e como mencionado anteriormente, a relação entre hidrocarbonetos alifáticos e a produção de biosurfactantes e a sua influência nas taxas de degradação encontra-se já muito bem documentada na literatura.

Em comparação com os dados disponíveis de estudos realizados com hidrocarbonetos alifáticos, as informações a respeito da degradação de compostos aromáticos são escassas. Apesar de existirem já algumas informações detalhadas de algumas vias metabólicas do catabolismo de hidrocarbonetos aromáticos como benzeno, tolueno, xileno, naftaleno, fenantreno e bifenil para um número limitado de bactérias, principalmente do gênero *Pseudomonas* (MOLLER & INGVORSEN, 1993; WILLIAMS & SAYERS, 1994), pouco é conhecido a respeito da produção de

biossurfactantes por microrganismos degradadores de aromáticos (DÉZIEL *et al.*, 1996).

## **1.5 Biodegradação dos compostos aromáticos**

A biodegradação dos compostos aromáticos pode ser considerada, de um lado como parte do processo normal do ciclo do carbono, e, de outro lado, como a remoção do ambiente de poluentes fabricados pelo homem. Esse processo envolve aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, que foram revistos por GIBSON (1971) e SMITH (1990).

### **1.5.1 Biodegradação do benzeno**

SMITH (1990), em sua revisão, menciona as vias de biodegradação do benzeno, os metabólitos intermediários formados e os sistemas enzimáticos envolvidos. A Figura 1 mostra as duas vias divergentes empregadas. Ambas dividem o mesmo modo de ataque resultando na formação de catecol que é posteriormente catabolizado tanto pela catecol 1,2-dioxigenase (clivagem orto ou intradiol) e subseqüentemente via  $\beta$ -cetoadipato ou catecol 2,3-dioxigenase (clivagem meta ou extradiol). Ambas as rotas têm sido descritas em diferentes linhagens utilizadoras de benzeno. Apesar de terem havido relatos recentes do isolamento de novas cepas bacterianas capazes de crescerem em benzeno (TSAO *et al.* 1998) as rotas de biodegradação são as mesmas das mencionadas na Figura 1.

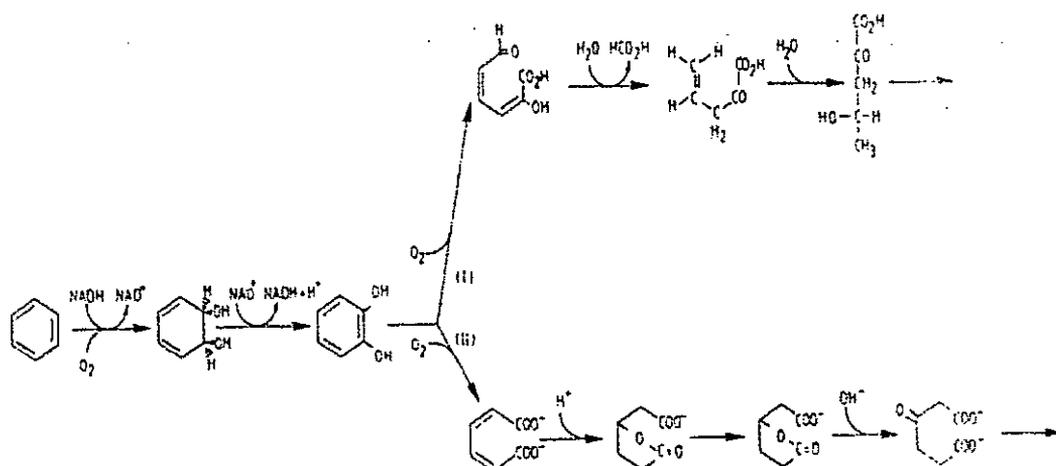


Figura 1- Vias metabólicas de degradação aeróbia de benzeno por bactérias.  
(I) meta-clivagem. (II) orto-clivagem (SMITH, 1990).

### 1.5.2 Biodegradação do tolueno

SMITH (1990) discute que a introdução de grupo(s) substituinte(s) no anel benzênico abre a possibilidade de modos alternativos de biodegradação, tanto pelo ataque da cadeia lateral quanto pelo ataque do anel. Tolueno, o mais simples desses benzenos substituídos, é biodegradado pelo ataque do anel ou pela hidroxilação do grupo metílico (Figura 2), posteriormente, é degradado via catecol e subseqüentemente via meta-clivagem por várias linhagens de *Pseudomonas* por enzimas codificadas por plasmídeos, designados TOL.

Nos últimos anos, tem havido um enorme número de trabalhos publicados a respeito da biodegradação codificada por plasmídeo do tolueno (WORSEY & WILLIAMS, 1975; MIKESELL et al., 1993; KUKOR & OLSEN, 1996; PARALES et al., 2000; SENTCHILO et al., 2000; ARENGHI et al., 2001; DINKLA et al., 2001; BUHLER et al., 2002).

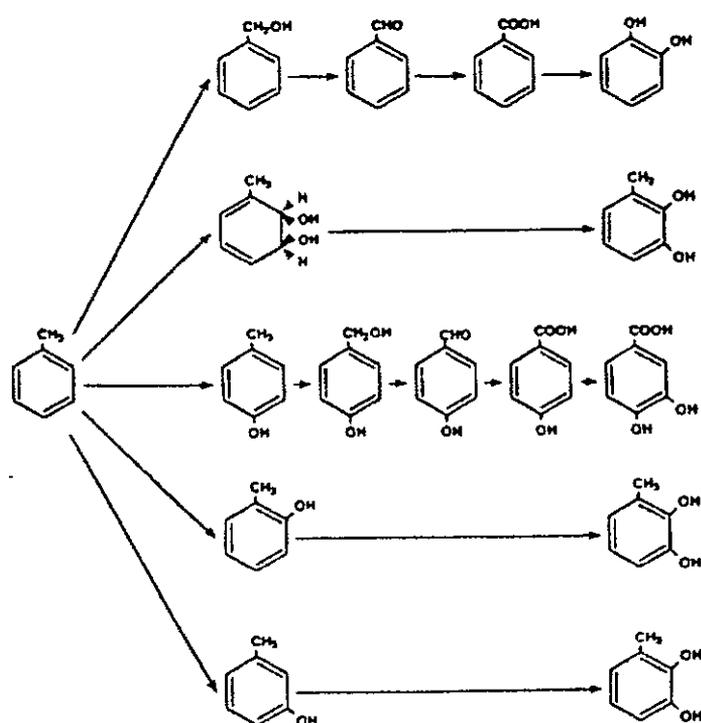


Figura 2- Vias metabólicas iniciais de degradação aeróbica de tolueno por bactérias (MIKESELL et al., 1993).

### 1.5.3 Biodegradação do xileno

Os isômeros m- e p- do xileno são biodegradados por certas linhagens de *Pseudomonas* (notadamente aquelas contendo o plasmídeo TOL) pela oxidação inicial de um dos grupos metílicos aos correspondentes metilbenzilálcoois, tolualdeídos, ácidos toluicos e metilcatecol. A biodegradação dos m- e p-xilenos aos metilcatecóis correspondentes é mostrada na Figura 3. Os catecóis resultantes então sofrem meta-clivagem.

Um modo alternativo de ataque dos p- e m-xilenos é via ataque direto da dioxigenase ao anel aromático originando o cis-dihidrodiol com subsequente conversão aos catecóis substituídos (3,6-dimetilcatecol do p-xileno; 3,5-dimetilcatecol do m-xileno) por enzimas tipo desidrogenases. Entretanto, apesar deste ser geralmente citado como uma via alternativa para a degradação de xilenos, os catecóis resultantes não são posteriormente degradados e esta rota deveria ser considerada como uma reação de biotransformação (SMITH, 1990).

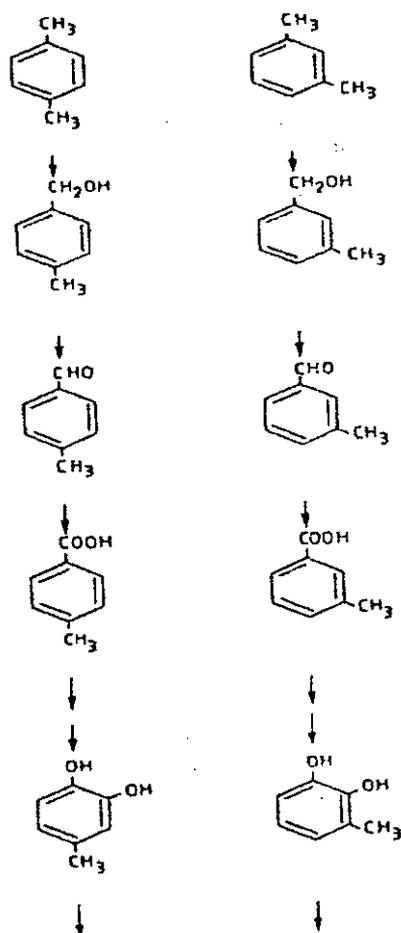


Figura 3- Reações iniciais de degradação aeróbia de m- e p-xileno por bactérias (SMITH, 1990).

### 1.6 Utilização de altas concentrações de compostos aromáticos BTX por bactérias

Microrganismos capazes de crescerem em baixas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos como fonte única de carbono e energia foram identificados pela primeira vez no início do século XX (GIBSON & SUBRAMANIAN, 1984), entretanto, apenas recentemente, pesquisadores

têm voltado sua atenção para a descoberta de novas linhagens de bactérias resistentes e capazes de crescerem em altas concentrações de solventes aromáticos como fonte única de carbono e energia (INOUE & HORIKOSHI, 1989; AONO et al., 1991; CRUDEN et al., 1992; AONO et al., 1995; ISKEN & DE BONT, 1996; RAMOS et al., 1995; PINKART et al., 1996; PINKART & WHITE, 1997, apud ISKEN et al., 1999; LI et al., 1998; RAMOS et al., 1998; ROJAS et al., 2001).

## 2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Isolamento e caracterização de linhagens de bactérias provenientes de um sítio contaminado com derivados de petróleo, e com potencial de degradação de benzeno, tolueno e xileno (BTX).
- Verificação da capacidade das linhagens isoladas de crescimento em meio mineral contendo altas concentrações de misturas de BTX ou frações individuais desses compostos, como fonte de carbono.
- Verificação da produção de biossurfactantes dos isolados, quando cultivados no meio descrito acima.
- Seleção de linhagens com base no melhor desempenho quanto a capacidade de produção de biossurfactantes e/ou crescimento.
- Verificação da capacidade dos microrganismos selecionados para utilização de altas concentrações de tolueno, xileno e p-xileno.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de coleta**

Amostras de água foram coletadas de local situado próximo a uma distribuidora de combustíveis (Refinaria de Paulínea-REPLAN) no município de Paulínea –SP. Esse local é um posto de lavagem de caminhões-tanques transportadores de derivados de petróleo em geral (gasolina, óleo diesel, etc.). A água de lavagem escorre para oito tanques de decantação – do primeiro para o segundo, do segundo para o terceiro e assim sucessivamente – dos quais foram retiradas amostras da superfície em frascos de vidro estéreis.

#### **3.2 Isolamento de linhagens bacterianas com potencial para degradação de compostos aromáticos**

Após a coleta, as amostras de água foram imediatamente transportadas para o laboratório, onde foram realizados a homogeneização, diluições em série das amostras de água, plaqueamento em meio LB (Luria-Bertani) sólido (triptona=10 g, extrato de levedura=5 g, NaCl=5 g, agar=20 g, por litro de água destilada, pH 7,0), incubação a 30°C e procedimento de purificação (técnica de esgotamento do inóculo em superfície) para obtenção de culturas puras, com base em diferentes morfologias de colônias

(SHIELDS et al., 19889; KOCH et al., 1991; JAIN et al., 1992). Os isolados foram mantidos em ágar LB inclinado, estocados a 4°C e repicados mensalmente (PEDERSEN et al., 1997).

### 3.3 Detecção (“screening”) da produção de biossurfactantes

A fim de se detectar a produção de biossurfactantes pelos isolados microbianos, esses foram pré-cultivados em meio LB sólido, a 30°C por 24 horas. Após esse período, o ágar foi raspado com alça de platina com diâmetro de 3 mm e uma alça cheia foi usada como inóculo em meio mineral M1 líquido, suplementado com baixas concentrações de extrato de levedura e peptona ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O = 5,0$  g;  $KH_2PO_4 = 1,0$  g;  $NaNO_3 = 3,0$  g; extrato de levedura = 1,0 g; peptona = 0,3 g por litro de água destilada, pH 7,0), contendo tolueno, nas concentrações de 1% (dados não mostrados) e 1,5% (v/v). As culturas foram incubadas em duplicatas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio, a 25°C, 150 rpm de agitação por 48 horas.

Após remoção das células por centrifugação, 3,5 mL dos caldos de cultura foram misturados com 2,0 mL de tolueno em tubos de ensaio com diâmetro de 1 cm. Foram efetuadas as leituras das absorvâncias a 610 nm, então, os tubos foram vigorosamente agitados por 1 minuto. Após a agitação, os tubos de ensaio contendo a mistura foram deixados em repouso a temperatura ambiente por 1 hora e a atividade de emulsificação das emulsões óleo-em-água foi determinada através do aumento da absorvância a 610 nm (JOHNSON et al., 1992). Após 24 horas, a altura da camada da

emulsão água-em-óleo foi medida e a atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo foi expressa em cm (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

A produção de biossurfactantes também foi detectada através da determinação do índice de emulsificação (E24), de acordo com IQBAL et al. (1995) apud BICCA et al. (1999). O E24 das amostras das culturas foi determinado adicionando-se 2 mL de hidrocarboneto a igual volume de cultura, agitando-se com Vortex por 2 minutos e deixando-se em repouso por 24 horas. O índice E24 é calculado em termos de porcentagem da altura da camada emulsificada (mm) dividida pela altura total da coluna líquida.

### **3.4 Constitubilidade x indutibilidade da produção de biossurfactantes**

Os isolados selecionados no "screening" da produção de biossurfactantes por sua habilidade de produzirem altas atividades de emulsificação em meio mineral contendo tolueno, foram também testados quanto a habilidade de produzirem atividade de emulsificação quando cultivados em meio mineral líquido com 1% de glicose (p/v), com o intuito de se verificar se essa capacidade era constitutiva, ou induzida pela presença do hidrocarboneto no meio de cultura. As condições de cultura e a metodologia para avaliação da produção de biossurfactantes foram idênticas àquelas utilizadas no "screening". A composição do meio também foi idêntica, porém, a diferença foi que, neste caso, a fonte de carbono foi glicose ao invés de tolueno.

### 3.5 "Screening" de utilização de tolueno pelos isolados

Culturas puras das linhagens bacterianas previamente isoladas foram avaliadas quanto a capacidade de utilização de tolueno, fornecido na concentração de 1,5% (v/v), através do decaimento das concentrações desse composto no meio de cultura, em relação a frascos controles abióticos, após 48 horas de incubação.

O meio de cultura utilizado e as condições de cultivo foram idênticos aos adotados para os testes de "screening" da **produção de biossurfactantes pelos isolados**. Após a remoção das células por centrifugação, a 5000 x g, por 10 minutos, a 4°C, as concentrações de tolueno foram determinadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo Shimadzu LC-6A, nas seguintes condições: coluna Nucleosil C18-fase reversa, 150 x 4,6 mm; detecção por detector de UV (Shimadzu SPD-6A): 254 nm; fase móvel: acetonitrila:água (50:50); fluxo: 0,8 ml/min, de acordo com GOULDING et al. (1988); BARBIERI et al. (1993) e RAMOS et al. (1995).

### 3.6 Utilização de tolueno e de xileno pelos isolados

Culturas puras das linhagens bacterianas previamente selecionadas por sua habilidade de produzirem altas atividades de emulsificação em meio mineral contendo tolueno, foram também avaliadas quanto a capacidade de utilização de tolueno e de xileno, fornecidos individualmente às culturas, nas

concentrações de 1; 1,5; 2 e 3% (v/v), através do decaimento das concentrações desses compostos no meio de cultura, em relação a frascos controles abióticos, após 96 horas de incubação.

O meio de cultura utilizado e as condições de cultivo foram idênticos aos adotados para os testes de **“screening” da produção de biossurfactantes pelos isolados**. Após a remoção das células por centrifugação, as concentrações de tolueno foram determinadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em condições idênticas às adotadas no “screening” de utilização de tolueno pelos isolados.

### **3.7 “Time-course” da produção de biossurfactantes**

Culturas puras das linhagens bacterianas previamente selecionadas por sua habilidade de produzirem altas atividades de emulsificação em meio mineral contendo tolueno, tiveram também a produção de biossurfactantes estimada periodicamente (24, 48, 72 e 96 horas de incubação), através do método da atividade de emulsificação das emulsões óleo-em-água (JOHNSON et al., 1992) e das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987). Uma alça cheia com diâmetro de 3 mm de pré-culturas puras, cultivadas em meio LB sólido, a 30°C, por 24 horas, foi usada como inóculo em meio mineral M1 (anteriormente descrito), mas neste caso contendo benzeno, tolueno ou xileno individualmente, nas concentrações 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0% (v/v). As culturas foram incubadas em duplicatas em

frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio, a 25°C, 150 rpm de agitação por 96 horas.

### **3.8 Monitoramento do crescimento**

As culturas puras (anteriormente descritas) utilizadas nos experimentos de **“time-course” da produção de biossurfactantes**, foram também avaliadas, quanto a capacidade de crescimento, monitorado através da leitura da densidade óptica (DO) a 540 nm, com zero e 96 horas de incubação, de acordo com BARBIERI et al (1993) e HAIGLER et al. (1992).

### **3.9 Linhagens cedidas**

Na segunda etapa deste estudo, foram utilizadas linhagens isoladas de amostras de solo de local contaminado com derivados de petróleo, próximo à Refinaria de Paulínea (REPLAN), e identificadas pela equipe da Dra. Lúcia R. Durrant (Tabela 1) e cedidas para a realização dos experimentos a seguir descritos. As linhagens congeladas foram reativadas em meio LB líquido, transferidas para meio LB sólido e estocadas (a) a 4°C em tubos de ensaio contendo LB sólido inclinado, (b) em tubos de ensaio com LB sólido inclinado, com tampões de algodão dentro de um recipiente de vidro hermeticamente fechado contendo atmosfera saturada de xileno.

Tabela 1- Linhagens cedidas para a realização dos experimentos.

Código	Microrganismo
5A2	Colônia creme, bordo liso, forma circular, não identificada
5B2	<i>Actinobacillus lignieresii</i>
5B4	<i>Flavobacterium</i> sp
5C2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
5E1	Bastonetes gram negativos não identificados
5E2	<i>Moraxella nonliquefaciens</i>
5E3	não identificada
4019	<i>Aeromonas</i> sp
4022	<i>Enterobacter aerogenes</i>
4022V	não identificada
4023	<i>Enterobacter aerogenes</i>

### 3.10 "Screening" da capacidade de crescimento

Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) foi usado como indicador de crescimento. Culturas incapazes de catabolizar o substrato-teste permanecem incolores, enquanto que células capazes de catabolizar o substrato-teste reduzem o TTC ao formazan vermelho, da seguinte maneira: a oxidação do substrato forma NADH, que doa elétrons à cadeia de transporte de elétrons, conseqüentemente reduzindo irreversivelmente o

TTC, de sua forma incolor ao formazan vermelho (STRONG-GUNDERSON & PALUMBO, 1994; EL-SAYED et al., 1996; ROQUE & MELO, 2000). As 11 linhagens descritas acima foram avaliadas quanto à capacidade de crescimento em meio mineral contendo 0,5% de xileno (v/v), 5% de BTX (v/v) e 5% de tolueno (v/v), separadamente, como fonte de carbono e TTC (2,5 mg/L) como indicador de crescimento. O crescimento foi considerado positivo quando as culturas foram capazes de modificar a coloração do meio, de incolor para vermelho ou variantes de vermelho, e negativo quando as culturas foram incapazes de modificar a coloração do meio.

### **3.11 Pré-condicionamento das culturas**

As linhagens foram pré-cultivadas em meio mineral M2 ( $\text{MgSO}_4$  0,20 g/l;  $\text{CaCl}_2$  0,02 g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,0 g/l;  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2,0 g/l;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,05 g/l;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2,0 g/l.; pH 7,0) (BICCA et al., 1999) contendo frações individuais ou misturas de hidrocarbonetos aromáticos BTX. Após 48 horas de incubação a 30°C, sob agitação de 150 rpm, foram transferidos dessas pré-culturas, volumes correspondentes a 2% de inóculo, para meio novo.

### **3.12 Experimentos de crescimento das culturas pré-condicionadas, em meio mineral M2 líquido, contendo diferentes concentrações de misturas de BTX ou frações individuais desses compostos**

As linhagens bacterianas acima descritas foram avaliadas, em culturas puras quanto a capacidade de crescimento em meio mineral líquido contendo compostos aromáticos BTX. Assim, as culturas pré-condicionadas foram transferidas para meio novo, contendo frações individuais ou misturas de hidrocarbonetos aromáticos BTX. Foram utilizadas as seguintes concentrações de compostos aromáticos:

- a) 5% de BTX (1:1:1), sem adição de extrato de levedura;
- b) 5% de BTX (1:1:1), com adição de 0,05% de extrato de levedura;
- c) 0,5% de tolueno, sem adição de extrato de levedura;
- d) 1% de tolueno, sem adição de extrato de levedura;
- e) 5% de tolueno, sem adição de extrato de levedura;
- f) 0,5% de xileno, sem adição de extrato de levedura;
- g) 0,4% de p-xileno, sem adição de extrato de levedura;
- h) 1% de p-xileno, sem adição de extrato de levedura;
- i) 2% de p-xileno, sem adição de extrato de levedura.

As culturas foram incubadas em duplicatas em frascos Erlenmeyer de 125 mL, com tampa rosqueada, contendo 25 mL de meio a 25°C, sob agitação (150 rpm) pelo tempo necessário para observação de crescimento (até 52 dias). Periodicamente, alíquotas de cada frasco foram plaqueadas em ágar nutriente, para as determinações do crescimento microbiano

através da avaliação da biomassa viável (ufc/ml), de acordo com CUNHA & LEITE (2000).

### 3.13 Testes de utilização de p-xileno

Culturas puras das linhagens bacterianas selecionadas com base na sua melhor capacidade de crescimento em frações individuais e em misturas de hidrocarbonetos aromáticos BTX, foram avaliadas quanto a capacidade de utilização de p-xileno, através do decaimento das concentrações desses compostos em relação a frascos controles abióticos. As culturas foram pré-condicionadas por 48 horas em meio mineral M2 ( $MgSO_4$  0,20 g/l;  $CaCl_2$  0,02 g/l;  $KH_2PO_4$  2,0 g/l;  $NH_4NO_3$  2,0 g/l;  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  0,05 g/l;  $K_2HPO_4$  2,0 g/l.; pH 7,0) (BICCA et al., 1999) contendo p-xileno, fornecido nas concentrações de 0,4 e 1% (v/v), centrifugadas a 5000 x g, por 10 minutos, lavadas duas vezes com tampão fosfato e ressuspensas em meio novo. Volumes correspondentes a 5% desse inoculo de células lavadas foram transferidos para meio novo contendo as mesmas concentrações de p-xileno (EL-SAYED, 1996).

Após a remoção das células por filtração em filtros com poros de 0,22  $\mu m$ , as concentrações dos compostos foram determinadas na Central de Análises Químicas Instrumentais do Instituto de Química de São Carlos-USP, através de: (a) espectroscopia de varredura na faixa do ultra-violeta (MOLLER & INGVOSEN, 1993) (dados na mostrados), (b) cromatografia gasosa em cromatógrafo a gás com detector por ionização em Chama, nas

seguintes condições: temperatura inicial 80°C, mantidos por 2,6 minutos após a injeção da amostra, com rampa de aquecimento de 14°C/min, temperatura final de 250°C, volume de injeção de 2 µL. Para a determinação do tempo de retenção, foram preparadas soluções de p-xileno em metanol.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Isolamento de linhagens bacterianas com potencial para degradação de compostos aromáticos

Os valores de densidade celular das amostras coletadas nos 8 tanques, determinada através de diluições em série e plaqueamento em duplicata em meio LB sólido, após 24 horas de incubação, situaram-se entre  $4,2 \cdot 10^6$  e  $7,6 \cdot 10^6$  ufc/ml. Foram isoladas 28 linhagens bacterianas e 1 de levedura, de acordo com a morfologia apresentada (Tabela 2).

Tabela 2. Descrição morfológica das linhagens isoladas em meio LB.

Cultura	Morfologia
SC1-1	Bastonetes longos gram negativos, alguns com endosporos, individuais ou agrupados em fileiras, colônia creme clara, bordo ondulado, forma circular.
SC1-2	Coco-bacilos gram positivos, individuais ou em dupla, com mucilagem, colônia alaranjada, bordo levemente ondulado, forma circular.
SC1-3	Coco-bacilos gram positivos, individuais ou agrupados em fileiras, colônia creme, bordo liso, forma circular.
SC2-2	Coco-bacilos, colônia creme clara translúcida, bordo liso, forma circular, perfil convexo.
SC2-4	Coco-bacilos gram positivos, individuais ou em cadeia, colônia creme, forma circular, perfil irregularmente convexo.
SC2-5	Coco-bacilos bem pequenos, gram negativos, colônia creme, bordo levemente ondulado, forma circular, perfil convexo.
SC3-1	Bastonetes bem longos e finos gram positivos, colônia amarela, bordo liso, forma circular.
SC3-2	Coco-bacilos individuais ou em dupla, com mucilagem, colônia creme, bordo liso, forma circular.

SC3-3	Bastonetes extremamente finos e compridos, colônia creme, puntiforme, bordo liso.
SC3-4	Coco-bacilos bem pequenos gram positivos, individuais ou em cadeia, colônia creme, bordo ondulado, forma circular.
SC4-3	Bastonetes finos gram positivos, colônia amarela, bordo liso, forma circular.
SC4-4	Bastonetes em dupla, com mucilagem, colônia creme, bordo liso, forma circular.
SC4-5	Coco-bacilos, colônia creme, puntiforme, bordo liso.
SC4-6	Coco-bacilos curvos, colônia creme, bordo ondulado, forma circular.
SC4-7	Cocos em dupla, móveis, colônia creme, puntiforme, bordo liso.
SC4-10	Cocos, colônia amarela clara, bordo liso, forma circular.
SC4-11	Cocos minúsculos, colônia creme, bordo liso, forma circular.
SC4-14	Bastonetes curtos e finos, individuais ou em dupla, com mucilagem, colônia creme clara, bordo ondulado, forma circular.
SC4-15	Cocos minúsculos, individuais ou em cadeia, com mucilagem, colônia creme, bordo levemente ondulado, forma circular.
SC5-1	Bastonetes bem finos, colônia amarela, bordo liso, forma circular, perfil convexo.
SC5-5	Coco-bacilos individuais ou agrupados, com mucilagem, colônia creme, bordo levemente ondulado, forma circular, textura cremosa.
SC5-6	Coco-bacilos, colônia creme, lisa brilhante, bordo ondulado, perfil irregularmente convexo
SC5-8	Colônia creme, puntiforme.
SC7-3	Levedura, colônia creme-amarelada, bordo liso, forma circular.
SC7-5	Bastonetes curtos individuais ou em dupla, colônia creme, bordo ondulado, forma circular.
SC8-1	Bastonetes bem finos e compridos, colônia amarela, bordo liso, forma circular.
SC8-2	Coco-bacilos, colônia creme, bordo ondulado, forma circular.
SC8-3	Bastonetes bem finos, móveis, colônia creme, puntiforme bordo liso.
SC8-5	Bastonetes bem finos, colônia alaranjada, transparente, superfície lisa brilhante, puntiforme, bordo liso.

#### **4.2 Detecção (“screening”) da produção de biossurfactantes**

Do total de 29 linhagens isoladas inicialmente, 23 mantiveram-se estáveis para cultivo em laboratório. Essas 23 linhagens foram então cultivadas em meio mineral M1 líquido com 1,5% de tolueno (v/v) e avaliadas quanto à capacidade de produção de biossurfactantes, determinada através do método da atividade de emulsificação das emulsões óleo-em-água (JOHNSON et al., 1992) e das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987), permitindo, dessa forma, a seleção de três linhagens (SC4-6, SC4-11 e SC8-3) com altas atividades de emulsificação para ensaios posteriores (Tabela 3 e Figura 4). Para efeito de classificação da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo, adotou-se o seguinte critério: altas atividades de emulsificação são maiores ou igual a 1 cm e baixas atividades de emulsificação são menores do que 1 cm. Para classificação da atividade de emulsificação das emulsões óleo-em-água, foi adotado o critério de JOHNSON et al. (1992), que considera valores altos como maiores ou igual a 1,0 e valores baixos, menores do que 1,0 (DO 610 nm).

#### **4.3 “Screening” de utilização de tolueno pelos isolados**

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do “screening” de utilização de tolueno pelos isolados após retirada das células por centrifugação, determinada por CLAE-fase reversa, através da remoção

percentual em relação a frascos controles não inoculados. As linhagens SC4-6 e SC4-11 foram responsáveis por altos níveis percentuais de desaparecimento de tolueno do meio de cultura nas 48 horas de incubação consideradas. Já a linhagem SC8-3, apesar de ter sido responsável por níveis significantes de remoção de tolueno do meio de cultura durante o tempo de duração do experimento, não demonstrou desempenho comparável ao das outras duas.

Tabela 3: Detecção ("screening") da produção de biossurfactantes das culturas em meio mineral M1 líquido contendo tolueno 1,5% como fonte de carbono, a 25°C, com 48 horas de incubação, sob agitação de 150 rpm, determinada através do método da atividade de emulsificação (AE) (JOHNSON et al., 1992 e COOPER & GOLDENBERG, 1987). Remoção percentual de tolueno pelas culturas, em relação a frascos controles não inoculados.

Culturas	AE das emulsões água-em-óleo (cm)	Classificação das emulsões água-em-óleo*	AE das emulsões óleo-em-água (DO 610 nm)	Remoção (%)
SC1-1	0		0,1	NT
SC1-2	0		0,3	NT
SC1-3	0,7	+	0,2	12,7
SC2-4	0,2	++	0,2	NT
SC2-5	0		0,3	NT
SC3-1	0		0,2	19,8
SC3-4	0		0,3	NT
SC4-3	0		0	NT
SC4-5	0		0,1	NT
SC4-6	1,3	++++	0	95,3
SC4-7	0		0,4	NT
SC4-10	0		0,2	NT
SC4-11	1,7	++++	0	91,1
SC4-14	0		0,3	NT

SC4-15	0,6	++	0,2	NT
SC5-1	0		0,1	NT
SC5-5	0		0,3	NT
SC5-6	0		0,2	NT
SC7-3	0,5	++	0,2	34,2
SC7-5	0		0,1	NT
SC8-1	0		0,2	NT
SC8-2	0		0,2	NT
SC8-3	2,0	++++	0,2	43,8

NT: não testado.

Classificação das emulsões água-em-óleo\*:

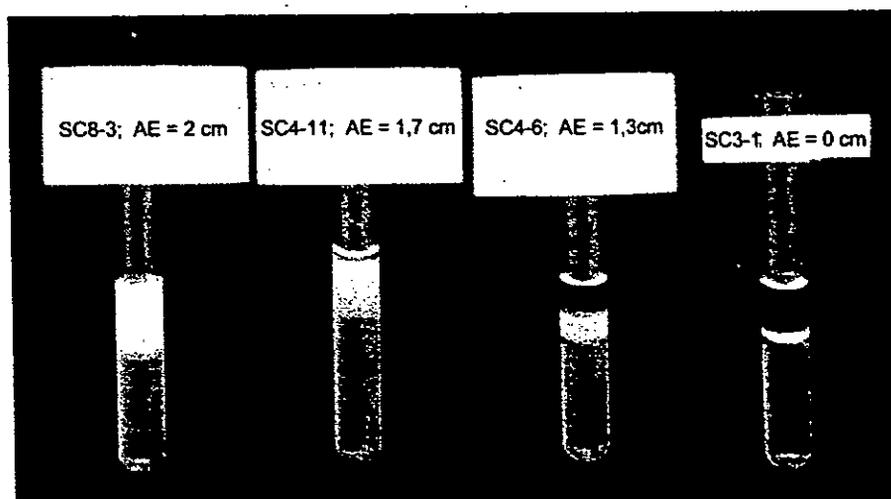


Figura 4- Linhagens cultivadas em meio mineral M1 líquido com 1,5% de tolueno (v/v) e avaliadas quanto à capacidade de produção de biossurfactantes. AE: atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

#### **4.4 Constitubilidade x indutibilidade da produção de biossurfactantes**

As linhagens SC4-6, SC4-11 e SC8-3, selecionadas no "screening" da produção de biossurfactantes por sua habilidade de produzirem altas atividades de emulsificação em meio mineral contendo tolueno, foram posteriormente testadas quanto a habilidade de produzirem atividade de emulsificação quando cultivadas em meio mineral M1 líquido com 1% de glicose como fonte de carbono, com o intuito de se verificar se essa capacidade era constitutiva, ou induzida pela presença do hidrocarboneto no meio de cultura. Os resultados exibidos na Tabela 4 revelaram que apenas SC8-3 tem a produção de biossurfactantes constitutiva, ou seja, ela produz biossurfactantes mesmo quando não há hidrocarbonetos presentes no meio de cultura.

Tabela 4- Detecção da produção de biossurfactantes das culturas selecionadas, em duplicatas, em meio mineral M1 líquido contendo dextrose 1% como fonte de carbono, a 25°C, com 48 horas de incubação, sob agitação de 150 rpm, determinada através do método da atividade de emulsificação (AE) (JOHNSON et al., 1992 e COOPER & GOLDENBERG, 1987).

Cultura	AE das emulsões água-em-óleo (cm)	Classificação das emulsões água-em-óleo*	AE das emulsões óleo-em-água (DO 610 nm)
SC4-6	0,2	+++	0,2
SC4-11	0		0,1
SC8-3	2,5	++++	0,1

Classificação das emulsões água-em-óleo\*:



#### 4.5 Crescimento em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de benzeno

O crescimento das 3 linhagens foi monitorado através das leituras das densidades ópticas em comprimento de onda de 540 nm, no início e no final do período de incubação (Tabela 5).

Tabela 5- Crescimento de SC4-6, SC4-11 e SC8-3 em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de benzeno, avaliado através das leituras das DO 540 nm.

Culturas	DO 540 nm (0 h)	DO 540 nm (96 h)
<b>Benzeno 1% (v/v)</b>		
SC4-6	0,2	0,3
SC4-11	0,1	0,2
SC8-3	0,1	0,2
<b>Benzeno 1,5% (v/v)</b>		
SC4-6	0,2	0,3
SC4-11	0,1	0,2
SC8-3	0,1	0,2
<b>Benzeno 2% (v/v)</b>		
SC4-6	0,2	0,3
SC4-11	0,1	0,2
SC8-3	0,1	0,2
<b>Benzeno 3% (v/v)</b>		
SC4-6	0,2	0,3
SC4-11	0,1	0,2
SC8-3	0,1	0,2

**4.6 "Time-course" da produção de biossurfactantes em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de benzeno, determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987)**

A Figura 5 mostra os resultados de produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-6 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de benzeno. Pode-se observar por meio desta figura que a

linhagem apresentou em geral, baixas atividades de emulsificação, sendo a maior na concentração de 1% de benzeno (v/v). Apresentou curvas idênticas nas concentrações de 1,5% e 2% de benzeno (v/v) e não demonstrou atividade de emulsificação com 3% de benzeno (v/v) presente no meio de cultura.

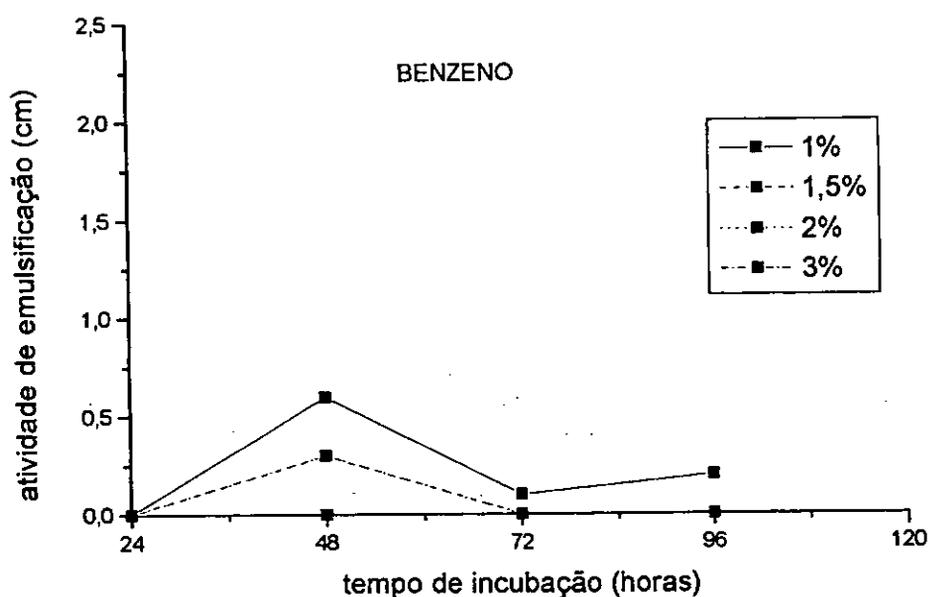


Figura 5- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-6 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de benzeno, determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

A Figura 6 mostra os resultados de produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-11 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de benzeno. Neste gráfico, pode-se observar que a maior atividade de emulsificação apresentada foi na concentração de 1% de

benzeno (v/v). Atividades de emulsificação foram diminuindo progressivamente com o aumento da concentração de benzeno presente no meio de cultura.

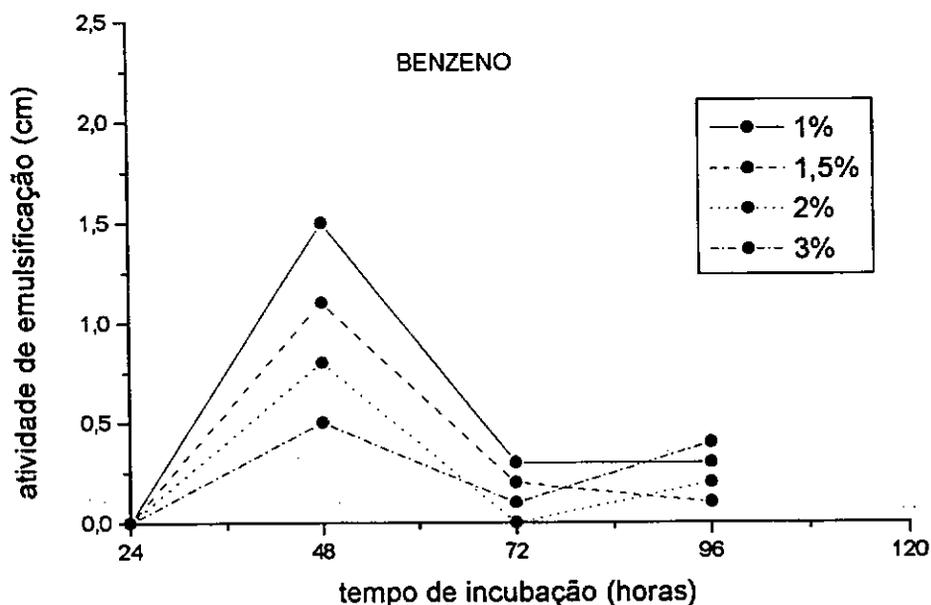


Figura 6- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-11 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de benzeno, determinada pelo método da atividade de emulsificação determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

A Figura 7 mostra os resultados de produção de biossurfactantes pela linhagem SC8-3 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de benzeno. Por meio desta figura, observa-se que a linhagem SC8-3 apresentou altas atividades de emulsificação, com maior ou

menor oscilação, dependendo da concentração de benzeno presente no meio de cultura, mas nunca abaixo de 1,3 cm nas concentrações avaliadas durante o tempo de duração dos experimentos.

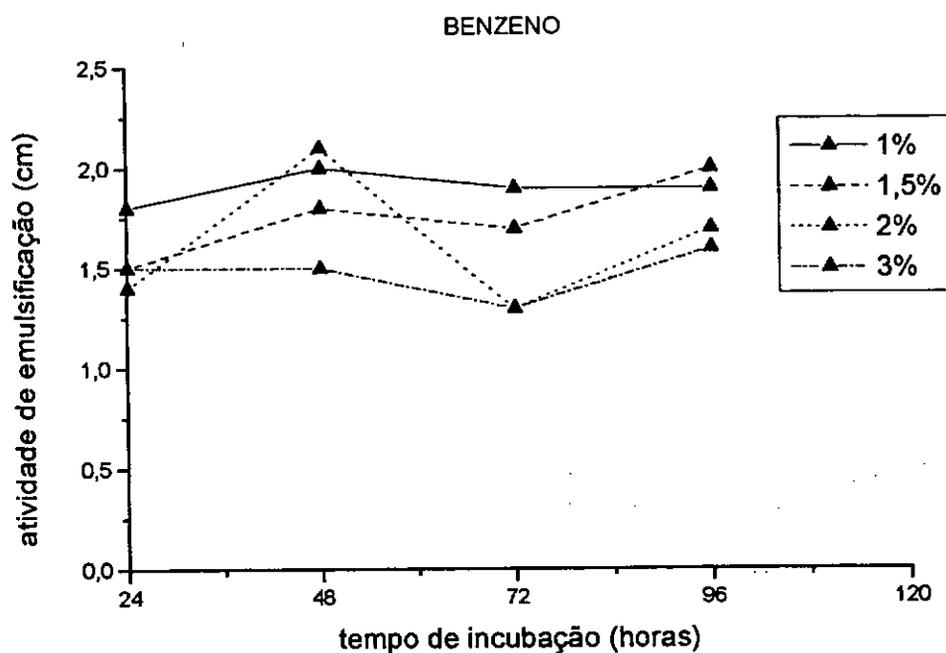


Figura 7- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC8-3 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de benzeno, determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

#### 4.7 Crescimento em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de tolueno.

O crescimento das 3 linhagens foi monitorado através das leituras das densidades ópticas em comprimento de onda de 540 nm, no início e no final do período de incubação (Tabela 6).

Tabela 6- Crescimento de SC4-6, SC4-11 e SC8-3 em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de tolueno, avaliado através das leituras das DO 540 nm.

Culturas/Substrato	DO 540 nm (0 h)	DO 540 nm (96 h)
<b>Tolueno 1% (v/v)</b>		
SC4-6	0,3	0,4
SC4-11	0,2	0,3
SC8-3	0,2	0,4
<b>Tolueno 1,5% (v/v)</b>		
SC4-6	0,3	0,4
SC4-11	0,2	0,3
SC8-3	0,2	0,3
<b>Tolueno 2% (v/v)</b>		
SC4-6	0,3	0,4
SC4-11	0,2	0,3
SC8-3	0,2	0,4
<b>Tolueno 3% (v/v)</b>		
SC4-6	0,3	0,4
SC4-11	0,2	0,3
SC8-3	0,2	0,4

**4.8 "Time-course" da produção de biossurfactantes em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de tolueno, determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987)**

A Figura 8 mostra os resultados de produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-6 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de tolueno. Observa-se que esta linhagem apresentou, em geral, baixíssimas atividades de emulsificação.

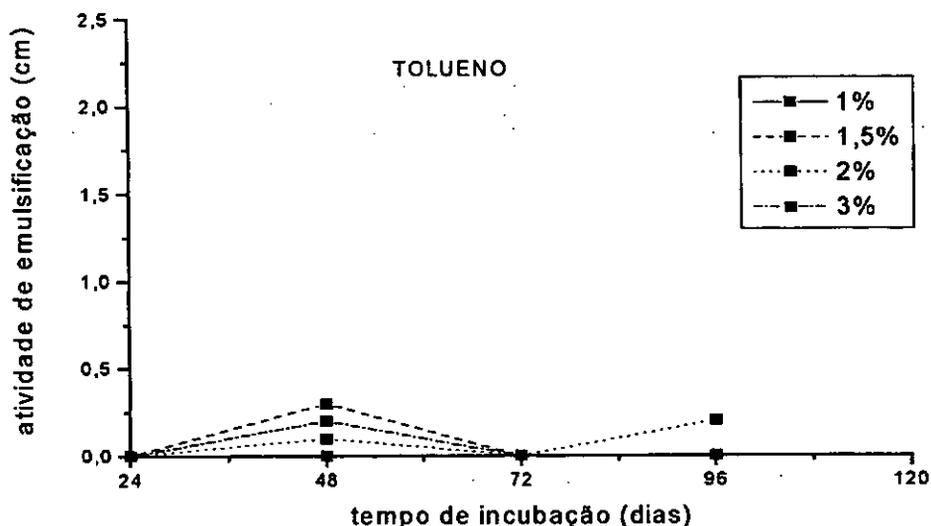


Figura 8- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-6 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de tolueno, determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

Na Figura 9 são mostrados os resultados de produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-11 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de tolueno. Esta linhagem SC4-11 apresentou atividades de emulsificação muito baixas nas 4 concentrações de tolueno testadas.

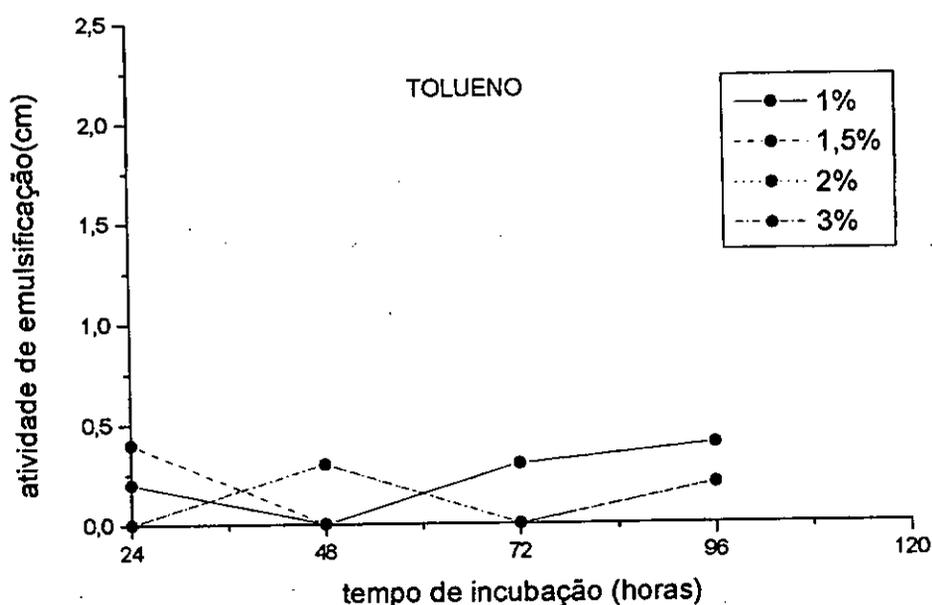


Figura 9- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-11 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de tolueno, determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

Como esperado, uma vez que a linhagem SC8-3 produz biossurfactantes constitutivamente, esta apresentou altas atividades de emulsificação, quando cultivada em meio mineral contendo diferentes concentrações de tolueno (Figura 10).

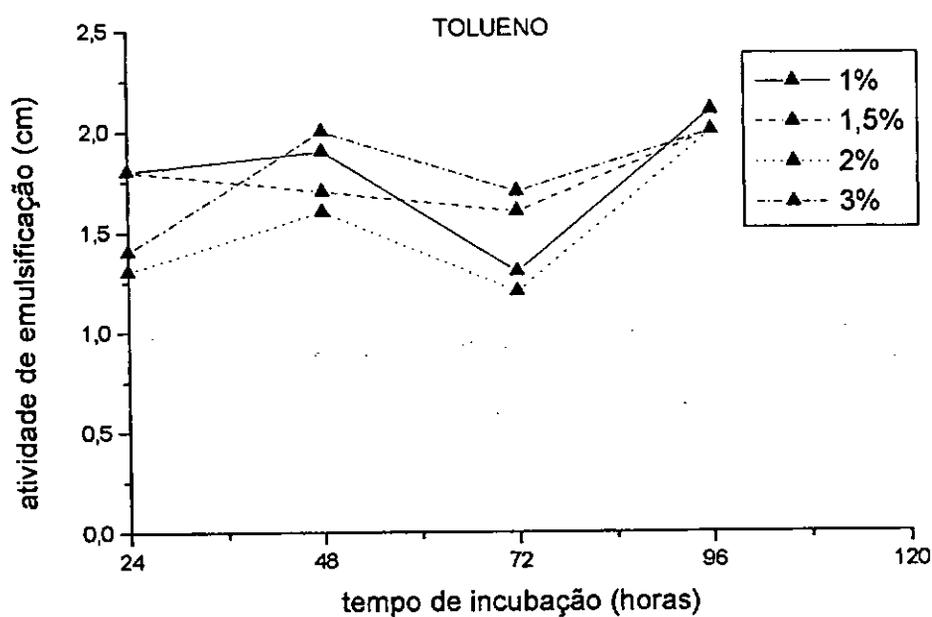


Figura 10- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC8-3 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de tolueno, determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

#### 4.9 Crescimento em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de xileno

O crescimento das 3 linhagens foi monitorado através das leituras das densidades ópticas em comprimento de onda de 540 nm, no início e no final do período de incubação (Tabela 7).

Tabela 7- Crescimento de SC4-6, SC4-11 e SC8-3 em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de xileno, avaliado através das leituras das DO 540 nm.

Culturas/Substrato	DO 540 nm (0 h)	DO 540 nm (96 h)
<b>Xileno 1% (v/v)</b>		
SC4-6	0,1	0,3
SC4-11	0,1	0,3
SC8-3	0,1	0,2
<b>Xileno 1,5% (v/v)</b>		
SC4-6	0,1	0,2
SC4-11	0,1	0,3
SC8-3	0,1	0,2
<b>Xileno 2% (v/v)</b>		
SC4-6	0,2	0,4
SC4-11	0,1	0,2
SC8-3	0,1	0,2
<b>Xileno 3% (v/v)</b>		
SC4-6	0,1	0,3
SC4-11	0,1	0,2
SC8-3	0,1	0,2

**4.10 "Time-course" da produção de biossurfactantes em meio mineral M1 líquido contendo diferentes concentrações de xileno, determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987)**

A linhagem SC4-6 apresentou, em geral, altas atividade de emulsificação nas 4 concentrações de xileno testadas (Figura 11).

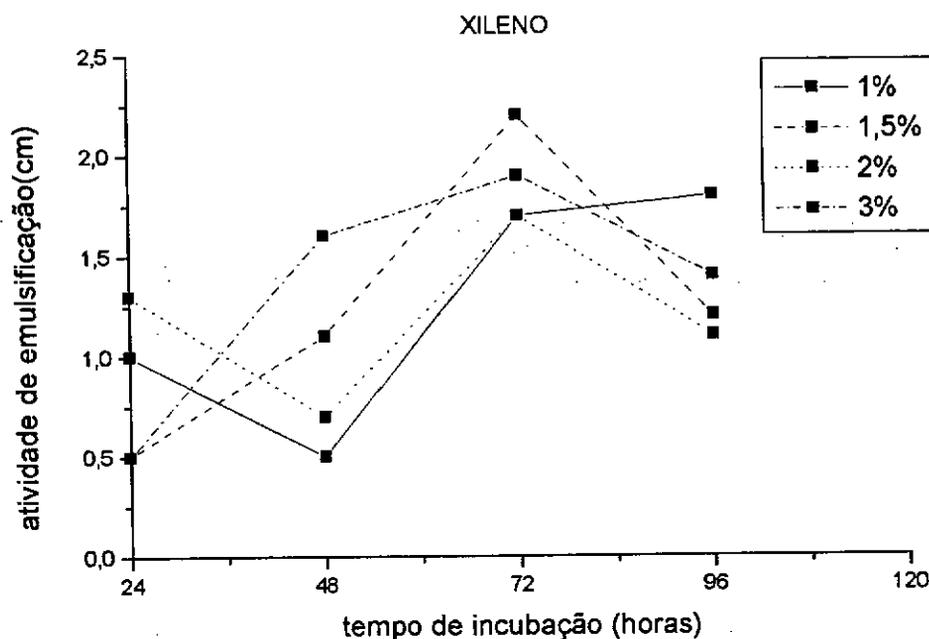


Figura 11- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-6 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de xileno, determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

A Figura 12 mostra os resultados de produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-11 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de xileno. A linhagem SC4-11 não apresentou atividade de emulsificação com 24 horas de incubação em nenhuma das 4 concentrações testadas. No entanto, após este período foram detectadas altas atividades, com AE máximas em 72 h (1,6; 2,1; 1,6 e 1,3 cm) para as concentrações 1; 1,5; 2 e 3% de xileno (v/v), respectivamente. A mais alta AE observada foi na concentração 1,5% (v/v) com 72 horas de incubação (2,1 cm). Aparentemente, SC4-11 precisou de um tempo para indução da produção de biossurfactantes de, no mínimo 24 horas.

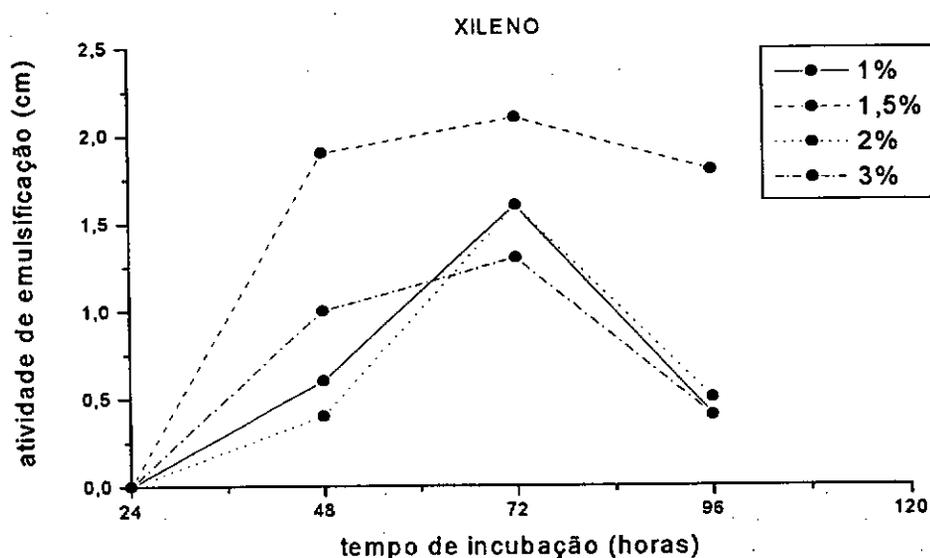


Figura 12- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC4-11 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de xileno, determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

A Figura 13 mostra os resultados de produção de biossurfactantes pela linhagem SC8-3 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de xileno. SC8-3 apresentou altas atividades de emulsificação, com maiores ou menores oscilações, dependendo da concentração de xileno, mas nunca inferior a 1,2 cm.

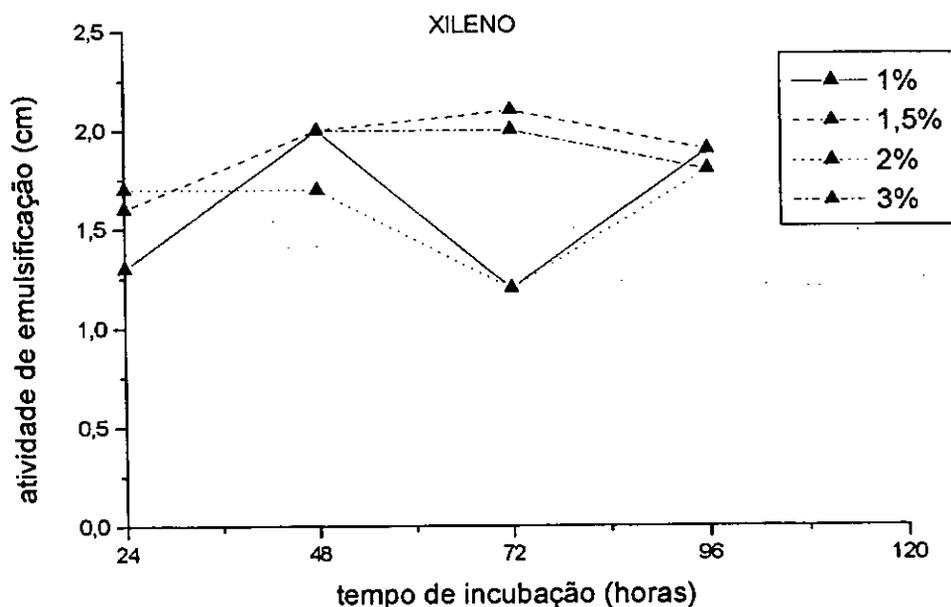


Figura 13- "Time-course" da produção de biossurfactantes pela linhagem SC8-3 em meio mineral M1 líquido, contendo diferentes concentrações de xileno, determinada pelo método da atividade de emulsificação das emulsões água-em-óleo (COOPER & GOLDENBERG, 1987).

As emulsões água-em-óleo produzidas pelas linhagens SC4-6, SC4-11 e SC8-3 apresentaram variações quanto à densidade e coesão das

bolhas formadas, de acordo com a concentração e o composto aromático utilizado. Essas variações são relatadas a seguir (Tabelas 8, 9 e 10).

Tabela 8- Classificação das emulsões água-em-óleo apresentadas pelas linhagens SC4-6, SC4-11 e SC8-3, nas 4 concentrações de benzeno testadas.

Culturas/Substrato	Classificação da emulsão*
SC4-6 / B 1%	++++
SC4-6 / B 1,5%	++++
SC4-6 / B 2%	+++
SC4-6 / B 3%	0
SC4-11 / B 1%	++++
SC4-11 / B 1,5%	++++
SC4-11 / B 2%	++++
SC4-11 / B 3%	+++
SC8-3 / B 1%	++++
SC8-3 / B 1,5%	++++
SC8-3 / B 2%	++++
SC8-3 / B 3%	+++

B: benzeno

Classificação da emulsão\*:

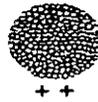
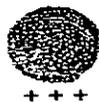
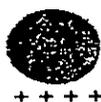


Tabela 9- Classificação das emulsões água-em-óleo apresentadas pelas linhagens SC4-6, SC4-11 e SC8-3, nas 4 concentrações de tolueno testadas.

Culturas/Substrato	Classificação da emulsão*
SC4-6 / T 1%	0
SC4-6 / T 1,5%	++
SC4-6 / T 2%	++
SC4-6 / T 3%	+++
SC4-11 / T 1%	++++
SC4-11 / T 1,5%	+++
SC4-11 / T 2%	++
SC4-11 / T 3%	++
SC8-3 / T 1%	++++
SC8-3 / T 1,5%	++++
SC8-3 / T 2%	++++
SC8-3 / T 3%	++++

T: tolueno

Classificação da emulsão\*:

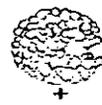
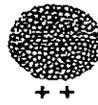
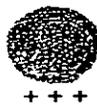
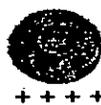


Tabela 10- Classificação das emulsões água-em-óleo apresentadas pelas linhagens SC4-6, SC4-11 e SC8-3, nas 4 concentrações de xileno testadas.

Culturas/Substrato	Classificação da emulsão*
SC4-6 / X 1%	++++
SC4-6 / X 1,5%	++++
SC4-6 / X 2%	++++
SC4-6 / X 3%	++++
SC4-11 / X 1%	++++
SC4-11 / X 1,5%	++++
SC4-11 / X 2%	++++
SC4-11 / X 3%	++++
SC8-3 / X 1%	++++
SC8-3 / X 1,5%	++++
SC8-3 / X 2%	++++
SC8-3 / X 3%	++++

X: xileno

Classificação da emulsão\*:



As atividades de emulsificação das emulsões óleo-em-água formadas pelos sobrenadantes dos caldos de cultura centrifugados foram determinadas através do aumento da absorbância a 610 nm (JOHNSON et al., 1992) em intervalos de 24 horas e revelaram valores considerados muito baixos, que variaram entre 0,01 e 0,35, no caso do benzeno, considerando-se as 4 concentrações testadas [1; 1,5; 2 e 3% (v/v)] e entre 0,04 e 0,26, nos casos do tolueno e do xileno.

#### 4.11 Utilização de tolueno e de m-xileno pelos isolados

Culturas puras de SC4-6, SC4-11 e SC8-3 foram avaliadas quanto a capacidade de utilização de tolueno e de xileno, através do decaimento das concentrações desses compostos no meio mineral líquido em relação a frascos controles abióticos, com 96 horas de incubação. Após a remoção das células por centrifugação, as concentrações dos compostos foram determinadas por CLAE-fase reversa (Tabela 11).

Tabela 11- Remoção percentual em relação aos frascos controles abióticos, de diferentes concentrações de tolueno e de m-xileno do meio de cultura M1 líquido por SC4-6, SC4-11 e SC8-3, com 96 horas de incubação, avaliada por CLAE-fase reversa.

Composto aromático	Remoção do composto aromático após 96h de incubação (%)		
	SC 4-6	SC4-11	SC8-3
Tolueno 1%	21,0	NT	17,7
m-Xileno 1%	22,0	0	0
Tolueno 1,5%	0	8,3	NT
m-Xileno 1,5%	0	32,0	21,5
Tolueno 2%	13,7	NT	16,5
m-Xileno 2%	33,8	0	0
Tolueno 3%	0	NT	0
m-Xileno 3%	NT	NT	NT

NT: Não testado.

Como observado na Tabela 11, as linhagens, ou simplesmente não removeram nada do composto aromático, ou foram capazes de remover pequenas quantidades desses compostos do meio de cultura no período avaliado, o que foi um fato inesperado, uma vez que no experimento de "screening" de biodegradação de tolueno (Tabela 2), essas culturas, em idênticas condições de cultivo, foram capazes de remover quantidades significativas desses compostos do meio, com apenas 48 horas de incubação. Essa ocorrência, aliada ao fato de que no experimento de "screening" de produção de biossurfactantes em meio mineral líquido com tolueno 1,5% como fonte de carbono (Tabela 2), as 3 linhagens produziram altas atividades de emulsificação e durante a realização dos experimentos de "time-course" de produção de biossurfactantes em meio mineral líquido com diferentes concentrações de tolueno, as culturas SC4-6 e SC4-11 produziram atividades de emulsificação muito baixas, levou à adoção de outro tipo de abordagem na condução dos experimentos. Essas linhagens foram então deixadas de lado e iniciou-se uma série de experimentos de crescimento de outras bactérias, também isoladas de locais contaminados com derivados do petróleo, em meio mineral líquido M2 (BICCA et al., 1999) contendo diferentes concentrações de misturas de BTX ou frações individuais desses compostos.

#### 4.12 "Screening" de linhagens capazes de crescimento em meio mineral líquido M2 (BICCA et al., 1999) contendo diferentes concentrações de misturas de BTX ou frações individuais desses compostos e indicador de crescimento

As linhagens 5 A2 (não identificada), *Actinobacillus lignieresii* 5B2, *Flavobacterium* sp 5B4, *Acinetobacter calcoaceticus* 5C2, 5E1 (não identificada), *Moraxella nonliquefaciens* 5E2, 5E3 (não identificada), *Aeromonas* sp 4019, *Enterobacter aerogenes* 4022, 4022V (não identificada) e *Enterobacter aerogenes* 4023, foram avaliadas, em culturas puras quanto a capacidade de crescimento em meio mineral M2 líquido contendo:

- a) 0,5% de xileno (v/v) como fonte única de carbono e energia e TTC (2,5 mg/L) como indicador de crescimento.
- b) 5% de BTX (v/v) como fonte única de carbono e energia TTC (2,5mg/L) como indicador de crescimento.
- c) 5% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia e TTC (2,5 mg/L) como indicador de crescimento.

Uma alça cheia raspada de cada cultura estocada em LB-inclinado, foi utilizada como inóculo em meio mineral M2 líquido. Após 48 horas de incubação a 30°C, sob agitação de 150 rpm, foram transferidos dessas pré-culturas, volumes correspondentes a 2% de inóculo, para meio novo. Após 24-48 horas, observou-se a coloração das culturas. Culturas com capacidade de crescimento apresentaram coloração avermelhada ou

variantes de vermelho e culturas sem capacidade de crescimento continuaram incolores. Os resultados são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12- Crescimento das culturas em meio mineral M2 líquido (BICCA et al., 1999) contendo frações individuais ou misturas de hidrocarbonetos aromáticos BTX, após 48 horas de incubação a 30°C, sob agitação de 150 rpm.

Substrato	Culturas										
	5 A2	5 B2	5 B4	5 C2	5 E1	5 E2	5 E3	4019	4022	4022V	4023
0,5% xileno	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
5% BTX	+	+	NT	+	NT	+	-	-	NT	-	-
5% tolueno	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-

+: crescimento positivo / -: nenhum crescimento.

Dessa forma, foram selecionadas as linhagens 5 A2, 5 B2, 5 C2, 5 E1, 5 E2 e 4022, que foram consideradas tolerantes, para ensaios posteriores de crescimento em meio líquido com altas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos BTX como fonte de carbono. Mesmo dentre as linhagens que mostraram-se sensíveis, 5 B4, 5 E3, 4019, 4022V e 4023, tentou-se fazer um pré-condicionamento com 5 B4, 4019 e 4023 para utilização em ensaios posteriores.

#### **4.13 Experimentos de crescimento em meio mineral líquido M2 (BICCA et al., 1999) contendo diferentes concentrações de misturas de BTX ou frações individuais desses compostos**

Nos experimentos de crescimento, os isolados foram pré-condicionados em meio mineral líquido M2 (BICCA et al., 1999) contendo frações individuais ou misturas de hidrocarbonetos aromáticos BTX. Após 48 horas de incubação a 30°C, sob agitação de 150 rpm, foram transferidos dessas pré-culturas, volumes correspondentes a 2% de inóculo, para meio novo.

Foram utilizadas as seguintes concentrações de compostos aromáticos:

- a) 5% de BTX (1:1:1) (v/v), sem adição de extrato de levedura;
- b) 5% de BTX (1:1:1) (v/v), com adição de 0,05% de extrato de levedura;
- c) 0,5% de tolueno (v/v), sem adição de extrato de levedura;
- d) 1% de tolueno (v/v), sem adição de extrato de levedura;
- e) 5% de tolueno (v/v), sem adição de extrato de levedura;
- f) 0,5% de xileno (v/v), sem adição de extrato de levedura;
- g) 0,4% de p-xileno (v/v), sem adição de extrato de levedura;
- h) 1% de p-xileno (v/v), sem adição de extrato de levedura;
- i) 2% de p-xileno (v/v), sem adição de extrato de levedura.

As Figuras 14 e 15 mostram as curvas de crescimento de 5 A2 em meio M2 líquido com 5% de BTX, sem e com extrato de levedura, respectivamente. A adição de extrato de levedura ao meio de cultura,

aparentemente, retardou ligeiramente o início da fase exponencial de crescimento.

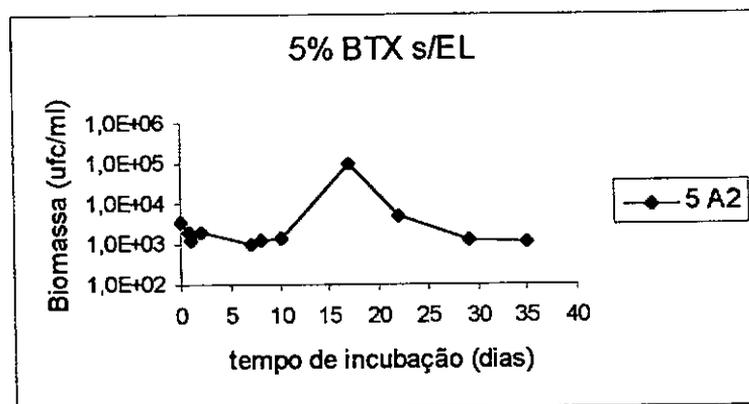


Figura 14- Crescimento da linhagem 5 A2 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 5% de BTX (v/v) como fonte única de carbono e energia.

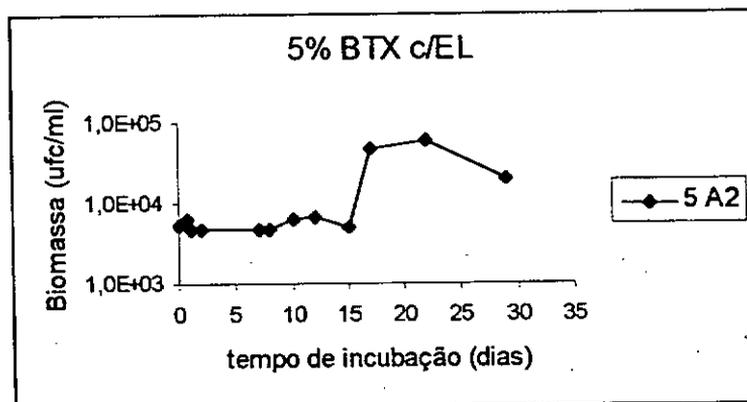


Figura 15- Crescimento da linhagem 5 A2 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 5% de BTX (v/v) e 0,05% de extrato de levedura.

A Figura 16 expressa a curva de crescimento de 5 A2 em meio M2 líquido com 0,5% de xileno (v/v), sem extrato de levedura. Essa linhagem

mostrou crescimento mais rápido neste composto, nesta concentração, do que nos compostos e nas concentrações anteriormente testadas.

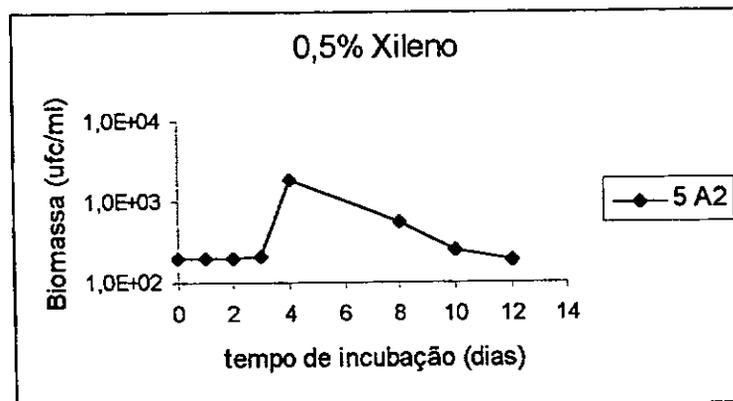


Figura 16- Crescimento da linhagem 5 A2 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 0,5% de xileno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

As Figuras 17 e 18 indicam o crescimento de 5 B2 em meio M2 líquido com 5% de BTX (v/v) sem e com extrato de levedura, respectivamente. Comparando-se estas duas Figuras com as Figuras 14 e 15, observa-se que esta linhagem exibiu crescimento mais rápido do que 5 A2, nas mesmas condições de cultivo.

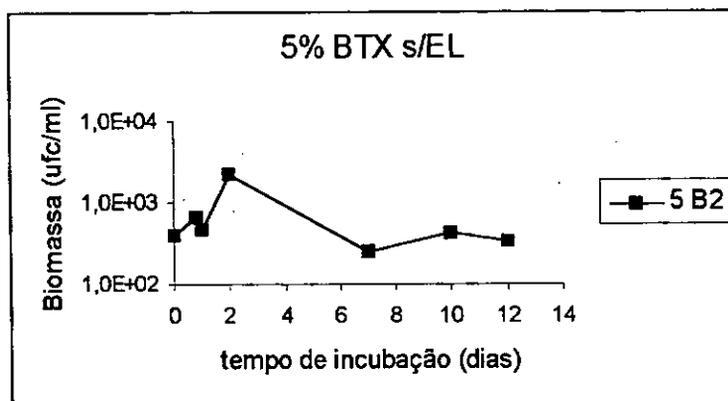


Figura 17- Crescimento de *Actinobacillus lignieresii* 5 B2 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 5% de BTX (v/v) como fonte única de carbono e energia.

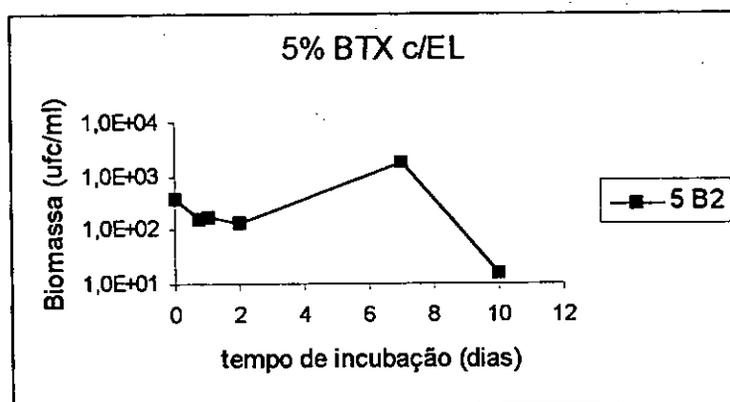


Figura 18- Crescimento de *Actinobacillus lignieresii* 5 B2 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 5% de BTX e 0,05% de extrato de levedura.

A Figura 19 indica o crescimento de 5 B2 em meio M2 líquido com 0,5% de tolueno (v/v) sem adição de extrato de levedura. Assim como nas Figuras anteriores, também observa-se crescimento rápido, porém com pouco aumento em termos de densidade celular.

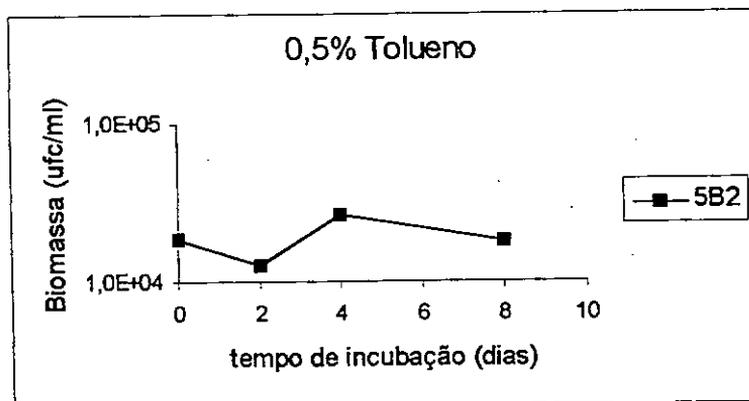


Figura 19- Crescimento de *Actinobacillus lignieresii* 5 B2 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 0,5% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

A Figura 20 indica o crescimento de 5 B2 em meio M2 líquido com 1% de tolueno (v/v) sem adição de extrato de levedura. Assim como nas Figuras anteriores, também observa-se crescimento rápido, com melhor aumento em termos de densidade celular comparado com 0,5% de tolueno (v/v).

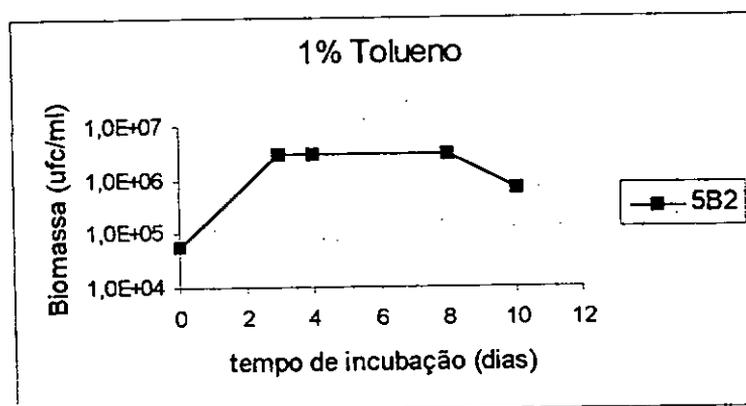


Figura 20- Crescimento de *Actinobacillus lignieresii* 5 B2 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 1% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

A Figura 21 representa o crescimento de 5 B2 em meio M2 líquido com 1% de p-xileno (v/v) sem adição de extrato de levedura. Nesta Figura observa-se uma longa fase lag, com declínio da densidade celular no início e, depois, crescimento com pouco aumento de densidade celular. Esta curva de crescimento foi obtida concomitantemente à avaliação de biodegradação de p-xileno por 5 B2 (Tabela 13).

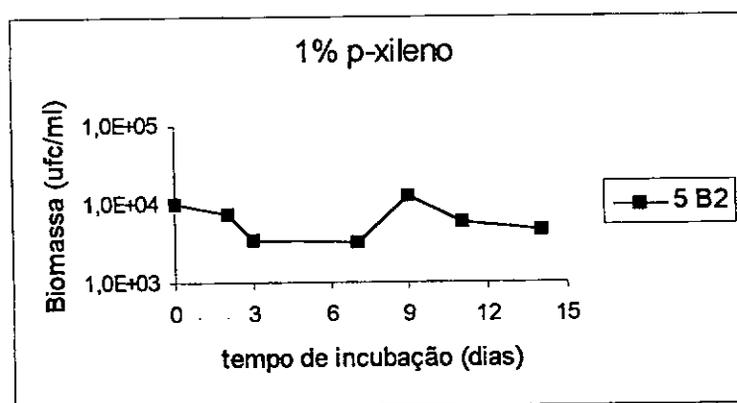


Figura 21- Crescimento de *Actinobacillus lignieresii* 5 B2 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 1% de p-xileno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

A Figura 22 representa o crescimento de 5 E1 em meio M2 líquido com 2% de p-xileno (v/v) sem adição de extrato de levedura. Aqui, observa-se uma fase lag relativamente curta e crescimento relativamente rápido, com considerável aumento da densidade celular, quando se compara com outras linhagens crescendo em p-xileno. Ao contrário das curvas obtidas, que, como se verá a seguir, mostraram-se características de linhagens crescendo em p-xileno, não se observa declínio inicial da densidade celular.

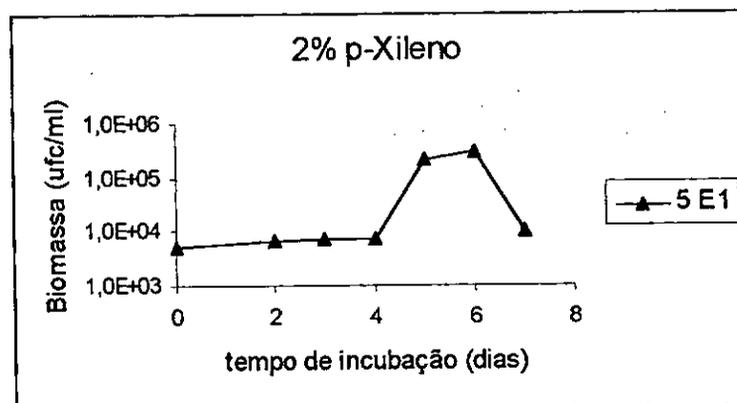


Figura 22- Crescimento da linhagem 5 E1 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 2% de p-xileno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

A Figura 23 representa o crescimento de 5 E2 em meio M2 líquido com 0,5% de tolueno (v/v) sem adição de extrato de levedura. Observa-se crescimento rápido, com considerável aumento da densidade celular.

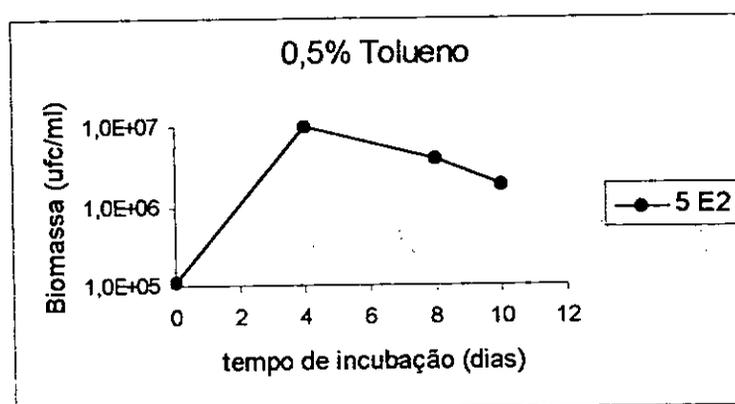


Figura 23- Crescimento de *Moraxella nonliquefaciens* 5 E2 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 0,5% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

A Figura 24 representa o crescimento de 5 E2 em meio M2 líquido com 1% de tolueno (v/v) sem adição de extrato de levedura. Observa-se crescimento rápido, com considerável aumento da densidade celular e duração da fase de crescimento maior do que quando se compara com 0,5% de tolueno (v/v).

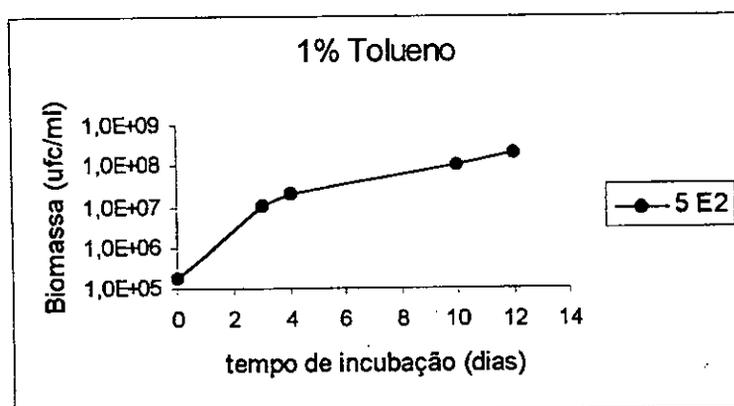


Figura 24- Crescimento de *Moraxella nonliquefaciens* 5 E2 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 1% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

A Figura 25 representa o crescimento de 5 E2 em meio M2 líquido com 5% de tolueno (v/v) sem adição de extrato de levedura. Observa-se crescimento bem lento, com considerável aumento da densidade celular ao final do período de crescimento. Comparando-se as Figuras 24 e 25, nota-se que, aumentando-se a concentração de tolueno de 1% para 5% (v/v), há um retardamento de aproximadamente vinte dias no início da fase exponencial.

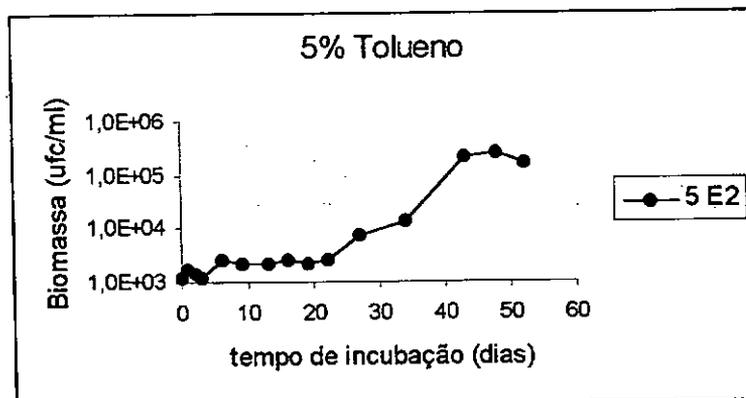


Figura 25- Crescimento de *Moraxella nonliquefaciens* 5 E2 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 5% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

A Figura 26 representa o crescimento de 5 E2 em meio M2 líquido com 0,4% de p-xileno (v/v) sem adição de extrato de levedura. Observa-se uma longa fase lag, com declínio da densidade celular no início e, depois, crescimento com pouco aumento de densidade celular. Esta curva foi obtida concomitantemente à avaliação de biodegradação de p-xileno por 5 E2 (Tabela 13).

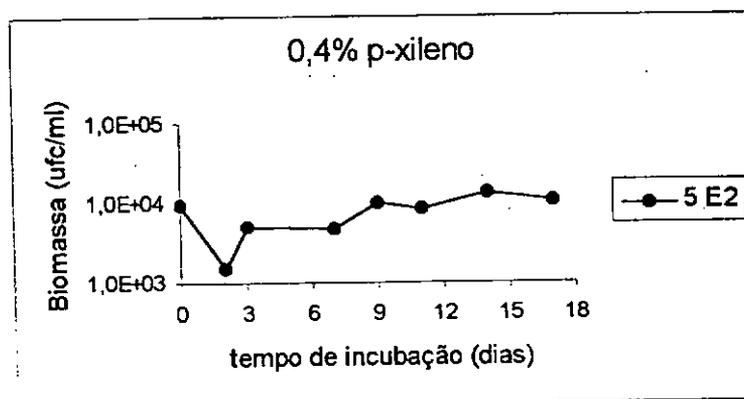


Figura 26- Crescimento de *Moraxella nonliquefaciens* 5 E2 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 0,4% de p-xileno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

A Figura 27 indica o crescimento de 4022 em meio M2 líquido com 0,5% de tolueno (v/v) sem adição de extrato de levedura. Observa-se crescimento rápido, porém com pouco aumento em termos de densidade celular.

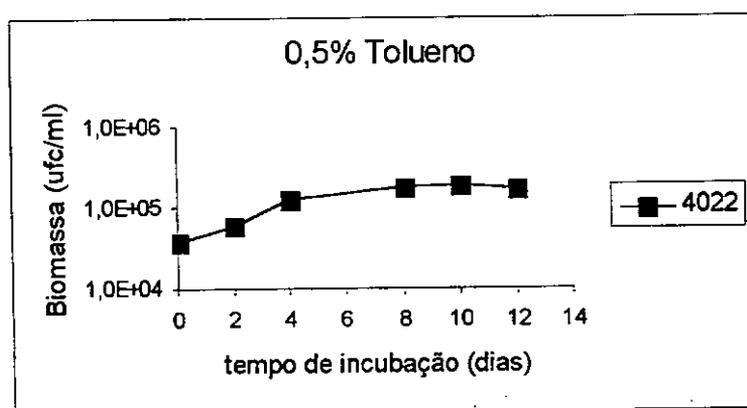


Figura 27- Crescimento de *Enterobacter aerogenes* 4022 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 0,5% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

A Figura 28 indica o crescimento de 4022 em meio M2 líquido com 1% de tolueno (v/v) sem adição de extrato de levedura. Assim como na Figura anterior, também observa-se crescimento rápido, com melhor aumento em termos de densidade celular comparado com 0,5% de tolueno (v/v).

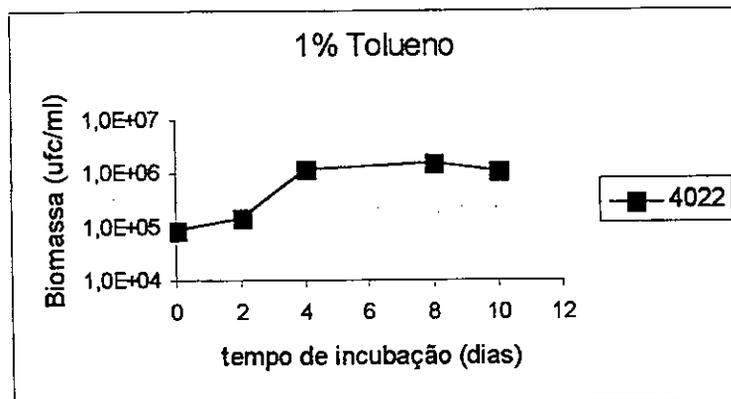


Figura 28- Crescimento de *Enterobacter aerogenes* 4022 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 1% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

A Figura 29 indica o crescimento de 5 B4 em meio M2 líquido com 1% de tolueno (v/v) sem adição de extrato de levedura. Durante este estudo, 5 B4 foi considerada uma linhagem sensível a altas concentrações de solventes. Observa-se crescimento rápido, porém com pouco aumento em termos de densidade celular e declínio na densidade celular após 2 dias de incubação.

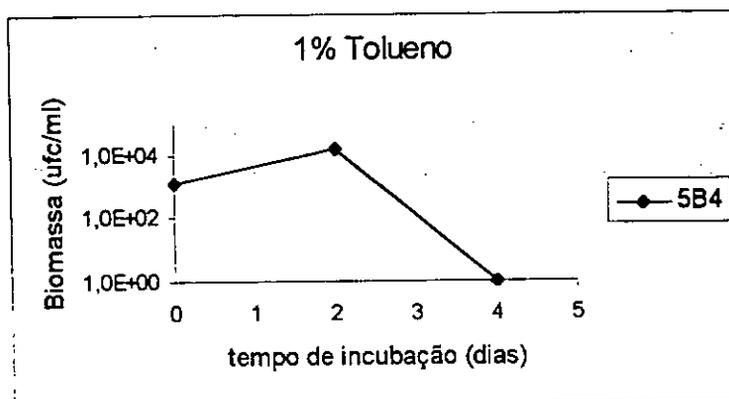


Figura 29- Crescimento de *Flavobacterium* sp 5B4 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 1% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

As Figuras 30, 31, 32 e 33 indicam as curvas de crescimento de 4019 e 4023 em meio M2 líquido com 0,5 e 1% de tolueno (v/v), respectivamente, sem adição de extrato de levedura. Durante este estudo, estas foram consideradas linhagens sensíveis a altas concentrações de solventes. Assim como para a outra linhagem sensível (5 B4), observou-se crescimento, porém com pouco aumento em termos de densidade celular e após 2 dias de incubação as culturas entraram em fase de declínio e morte.

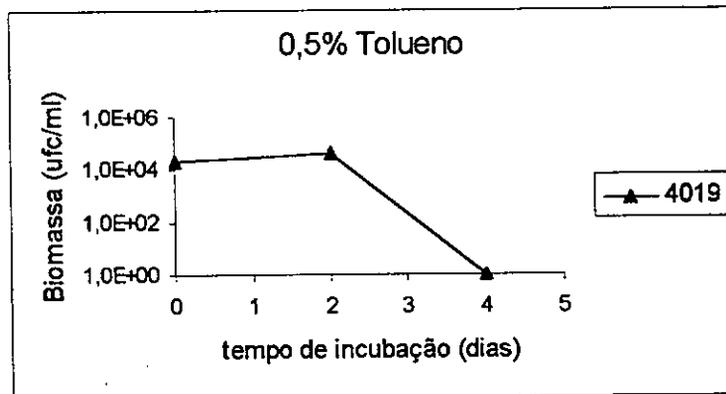


Figura 30- Crescimento de *Aeromonas* sp 4019 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 0,5% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

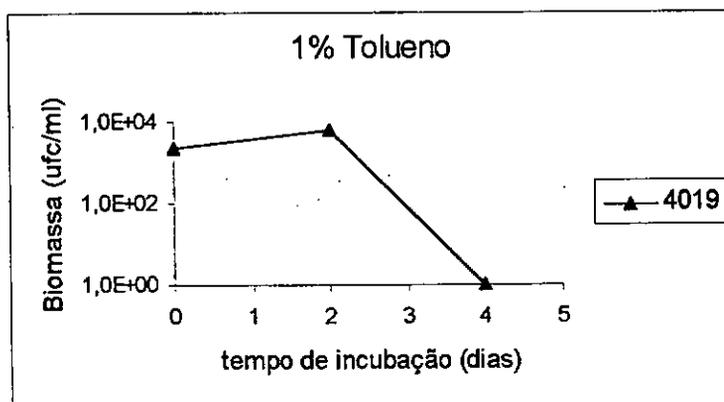


Figura 31- Crescimento de *Aeromonas* sp 4019 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 1% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

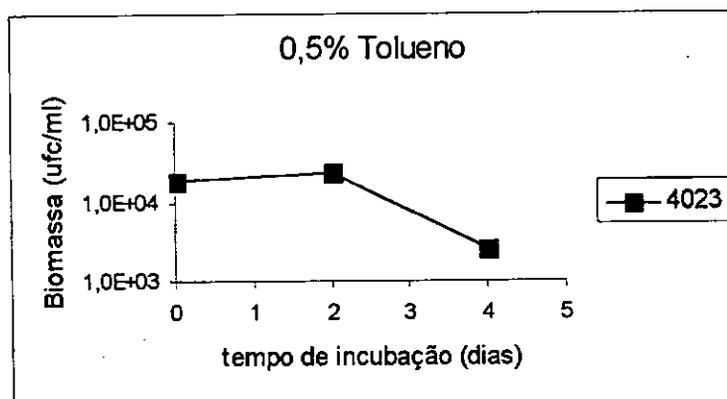


Figura 32- Crescimento de *Enterobacter aerogenes* 4023 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 0,5% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

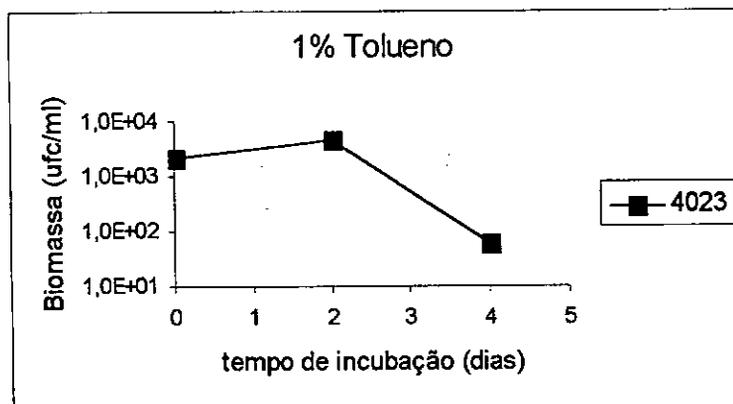


Figura 33- Crescimento de *Enterobacter aerogenes* 4023 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 1% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia.

A linhagem 5 C2, apesar de ter provocado mudança na coloração dos meios M2 contendo 0,5% de xileno (v/v), 5% de BTX (v/v) e 5% de tolueno (v/v), com indicador de crescimento (TTC), não demonstrou aumento de número de células viáveis (ufc/mL) quando cultivada nas mesmas condições. O número de células viáveis (ufc/ml) foi monitorado por 10, 15 e 22 dias, respectivamente em cada um desses experimentos (dados não mostrados), mas este período não foi suficiente para 5 C2 demonstrar quaisquer indícios de crescimento.

#### 4.14 Produção de biossurfactantes

Das 11 linhagens, 7 foram ensaiadas para produção de biossurfactantes, através da determinação do índice de emulsificação (E24), de acordo com IQBAL et al. (1995) apud BICCA et al. (1999). O índice E24 é calculado em termos de porcentagem da altura da camada emulsificada

(mm) dividida pela altura total da coluna líquida. Foram testadas amostras de culturas de 5 B2, 5 E2, 4019, 4022 e 4023 crescidas em M2 contendo 0,5% e 1% de tolueno (v/v), separadamente e 5 B4 crescidas em M2 contendo 1% de tolueno (v/v). Após 7 dias de cultivo, nenhuma das culturas foi capaz de produzir atividade de emulsificação. Também foram testadas amostras de culturas de 5 B2 crescidas em M2 contendo 1% de p-xileno (v/v); de 5 E2 crescidas em M2 contendo 0,4% e 1% de p-xileno (v/v) e de 5 E1 crescidas em M2 contendo 2% de p-xileno (v/v). Dessas, apenas 5 E1 foi capaz de produzir atividade de emulsificação (E24 = 65%).

#### **4.15 Estudos de biodegradação**

A partir dos experimentos anteriores, foram escolhidas 2 linhagens com crescimento mais rápido para testes de biodegradação do composto aromático (5B2 e 5E2). Para a realização desses testes, culturas de 5 B2 e de 5 E2 foram pré-condicionadas em M2 líquido (BICCA et al., 1999) com 0,4% e 1% de p-xileno (v/v) como fonte de carbono. Após 48 horas de incubação, a 30°C e 150 rpm de agitação, as células crescidas foram separadas por centrifugação, lavadas duas vezes com tampão fosfato e ressuspensas em meio novo. Volumes correspondentes a 5% de inóculo dessas células lavadas, foram transferidos para meio novo contendo p-xileno. As curvas de degradação foram obtidas através do decaimento das concentrações dos compostos no meio líquido em relação a frascos controles não inoculados. Após a remoção das células por filtração, as

concentrações dos compostos foram determinadas por cromatografia gasosa (Tabela 13 e Figura 34).

Tabela 13- Biodegradação percentual de p-xileno em relação a controles abióticos por 5 B2 e 5 E2

Culturas	Biodegradação (%)		
	0 h	20 h	72 h
5B2 em 1% p-xileno (v/v)	0	0	80,8
5E2 em 0,4% p-xileno (v/v)	0	77,4	79,6

Na Figura 34 observa-se a degradação de p-xileno ao longo do crescimento de 5 E2 em M2 líquido com 1% de p-xileno (v/v), após uma fase lag na qual houve declínio na densidade celular.

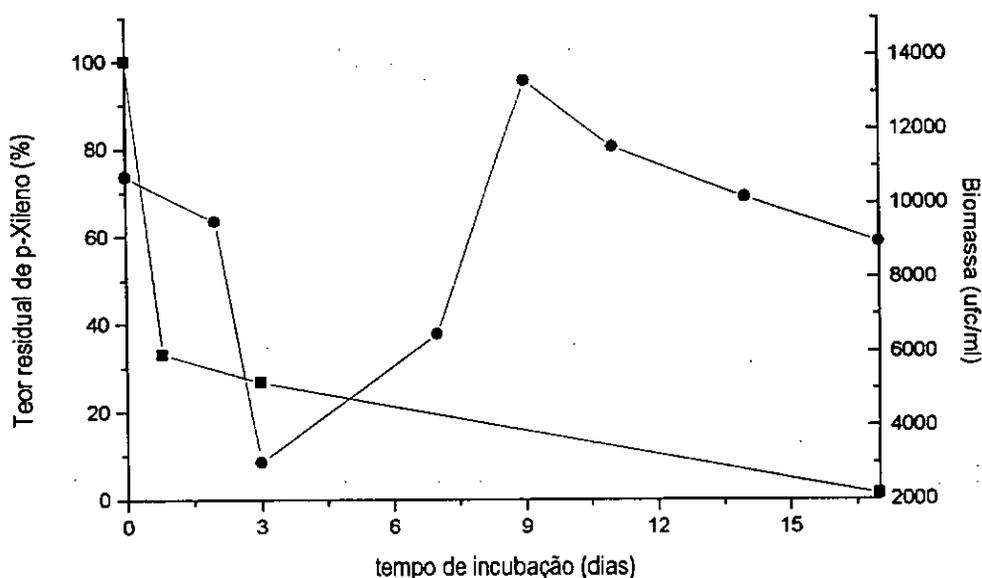


Figura 34- Teor residual de p-xileno determinado por cromatografia gasosa, em % (■). Crescimento de *Moraxella nonliquefaciens* 5E2 em meio mineral M2 (BICCA et al., 1999) com 1% de p-xileno (v/v) como fonte única de carbono e energia, em ufc/ml (●).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Considerações gerais

Sabe-se que a biodegradação pelos microrganismos representa um dos mecanismos principais através dos quais o petróleo e outros hidrocarbonetos são eliminados do ambiente (LEAHY & COLWELL, 1990). Em muitos casos esse processo é acelerado pela adaptação dos organismos devido à exposição crônica a esses poluentes (HEITKAMP et al., 1988). VAN DER MEER et al. (1992) fizeram uma revisão dos mecanismos moleculares da adaptação genética a compostos xenobióticos através das seguintes respostas: (a) indução de enzimas específicas; (b) crescimento de uma subpopulação específica de uma comunidade microbiana capaz de captar o substrato e metabolizá-lo; e (c) seleção adaptativa de mutantes com especificidades enzimáticas alteradas ou novas atividades metabólicas.

Por esse motivo, durante este estudo utilizou-se como inóculo para o isolamento, água de tanques contaminados por compostos derivados do petróleo. Esses inóculos foram utilizados a fim de se isolar e caracterizar bactérias com capacidade de crescimento e utilização de hidrocarbonetos aromáticos BTX. Compostos BTX utilizados por bactérias foram escolhidos como objeto de estudo deste trabalho, por constituírem-se esses solventes, poluentes ambientais de alta prioridade em escala global (LEAHY & COLWELL, 1990). Além disso, são tóxicos, depressores do sistema nervoso

central e o benzeno é mutagênico e carcinogênico (CORSEUIL & ALVAREZ, 1996).

Assim, na primeira etapa, foram selecionadas 3 linhagens com capacidade de crescimento em meio mineral líquido contendo altas concentrações de benzeno, tolueno, e xileno, separadamente, como fonte de carbono em culturas puras. As três apresentaram níveis significantes, e, dentre as três, duas delas apresentaram altos níveis de remoção de tolueno do meio de cultura, num primeiro momento ("screening"), porém, ao longo do desenvolvimento da parte experimental deste estudo, essa capacidade foi perdida, o que será discutido posteriormente. Na segunda etapa deste estudo, foram avaliados os crescimentos de linhagens também isoladas de locais contaminados com compostos xenobióticos. Cinco linhagens mostraram-se tolerantes e três linhagens sensíveis a altas concentrações de compostos BTX. As linhagens tolerantes foram *Actinobacillus lignieresii* 5B2, *Moraxella nonliquefaciens* 5E2, *Enterobacter aerogenes* 4022, e duas linhagens não identificadas (5A2 e 5E1). As linhagens sensíveis foram *Flavobacterium* sp 5B4, *Aeromonas* sp 4019 e *Enterobacter aerogenes* 4023.

## 5.2 Produção de biossurfactantes

Vários trabalhos têm mostrado que o crescimento microbiano em meios contendo hidrocarbonetos como fonte de carbono é acompanhado da produção de biossurfactantes (REDDY et al., 1982; WATKINSON &

MORGAN, 1990, HOMMEL, 1990; KOCH et al., 1991; RATLEDGE, 1992; NEU, 1996). Das 23 linhagens microbianas testadas inicialmente durante a primeira etapa e das 7 testadas durante a segunda etapa deste estudo, 4 culturas mostraram capacidade de produção de altas atividades de emulsificação (emulsões água-em-óleo): SC4-6, SC4-11 e SC8-3 e 5 E1. Portanto, do total de 30 linhagens testadas, apenas 4 (aproximadamente 13%) produziram altas atividades de emulsificação. HOMMEL (1990) discute que, (a) em contraste com o grande número de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos, há somente um número limitado de bactérias e fungos conhecidos que produzem biossurfactantes, e que (b) os princípios regulatórios da síntese de biossurfactantes são diferentes e respondem a diferentes tipos de limitação de nutrientes. As enzimas envolvidas na biossíntese são normalmente reprimidas em células em crescimento ativo. A exaustão das fontes, tanto de carbono, como de nitrogênio ou fósforo é considerada um fator que leva à desrepressão das enzimas do metabolismo secundário. Portanto, as bactérias testadas neste estudo que não produziram biossurfactantes, ou não teriam a informação genética para produção, ou não encontraram as condições necessárias para a desrepressão das enzimas envolvidas no processo. Para saber ao certo qual seria a hipótese mais provável, seria necessária a realização de estudos mais detalhados utilizando outras técnicas de detecção, estudos genéticos e regulatórios da biossíntese, o que fugiria do propósito deste estudo.

### 5.3 Constitubilidade x indutibilidade da produção de biossurfactantes

A produção de atividade emulsificante por algumas bactérias quando crescidas na presença de glicose como fonte única de carbono indica que esses metabólitos são constitutivos (GUERRA-SANTOS et al., 1984). Em outros casos, a produção de biossurfactantes é aparentemente induzida pela presença de substratos insolúveis em água (RATLEDGE, 1988). Durante este estudo, verificou-se que duas das linhagens selecionadas (SC4-6 e SC4-11) produziram baixos níveis de atividade de emulsificação quando glicose foi utilizada como fonte de carbono, porém altos níveis quando xileno foi utilizado. A linhagem SC8-3 produziu altos níveis de atividade de emulsificação tanto com glicose quanto com benzeno, tolueno ou xileno como fonte de carbono. Este resultado indica que para as linhagens SC4-6 e SC4-11, o xileno induz ou maiores quantidades, ou a produção de um agente emulsificante quimicamente diferente, mais efetivo do que é sintetizado na presença de glicose somente. Já SC8-3 tem a produção de biossurfactantes expressada constitutivamente. Essa observação, similar à encontrada por GUERRA-SANTOS et al.(1984), indicaria que o biossurfactante expressado constitutivamente poderia desempenhar outros papéis que não sejam relacionados com a solubilização do substrato hidrofóbico, tais como uma função na adesão e desadesão das células bacterianas a interfaces, na locomoção, na interação célula-célula, ou ainda uma função na regulação da hidrofobicidade celular

(NEU, 1996). HOMMEL (1990), comenta ainda que alguns biossurfactantes teriam propriedades antimicrobianas.

#### **5.4 "Time-course" da produção de biossurfactantes**

Resultados de culturas com capacidade de produção de biossurfactantes apontam para várias possibilidades de aplicação. Nos últimos anos tem havido um crescente interesse nos biossurfactantes, os quais, além do uso na biorremediação, têm sido apontados como potenciais substitutos para surfactantes sintéticos em aplicações no solo e em processos industriais, agrícolas e de alimentos, uma vez que eles são ecologicamente mais aceitáveis (são biodegradáveis e geralmente não-tóxicos) e podem ser produzidos por fermentação de substratos de baixo custo (BANAT et al., 1991; ROCHA et al., 1992; BENTO & GAYLARDE, 1996). Outras vantagens apresentadas pelos biossurfactantes incluem: diversidade de estrutura e função para diferentes aplicações e seletividade para interfaces específicas de hidrocarboneto/água (COOPER & ZAJIC, 1980).

De modo geral, SC4-6 produziu baixas atividades de emulsificação nas 4 concentrações testadas, tanto de benzeno como de tolueno e altas atividades de emulsificação nas 4 concentrações testadas de xileno como fonte de carbono em meio mineral líquido.

A linhagem SC4-11 produziu baixas atividades de emulsificação quando crescendo em qualquer das 4 concentrações testadas de tolueno e

em benzeno 2% e 3% (v/v) e altas atividades de emulsificação quando crescendo em xileno nas 4 concentrações e em benzeno 1% e 1,5% (v/v). Apesar de SC4-11 ter produzido altas atividades de emulsificação quando xileno foi a fonte de carbono, parece ter requerido um tempo de indução para a produção de biossurfactantes maior quando comparado com SC4-6.

A linhagem SC8-3, produziu altas atividades de emulsificação quando crescendo em benzeno, tolueno e xileno, em todas as concentrações.

Verificou-se, portanto, que para SC4-6 e SC4-11, a emulsificação foi dependente da fonte de carbono e da concentração utilizada. O composto responsável pelas mais altas atividades de emulsificação foi xileno, tanto quantitativa (atividade de emulsificação) como qualitativamente (coesão das bolhas).

A linhagem 5 E1, crescendo em meio contendo 2% de p-xileno (v/v) como fonte de carbono, produziu alta atividade de emulsificação ( $E_{24}=65\%$ ), formando uma emulsão com alto grau de coesão das bolhas e capaz de permanecer estável por muitos dias.

### **5.5 Avaliação da utilização de tolueno, m-xileno e p-xileno**

Durante a primeira etapa deste estudo, somente colônias muito pequenas foram observadas em placas contendo benzeno, tolueno e xileno como fonte de carbono e energia, dessa maneira, houve muita dificuldade em se cultivar e manter os isolados em meio sólido, uma vez que não era possível obter-se biomassa suficiente para a realização dos experimentos.

Após várias tentativas de manter os isolados em placas contendo BTX como fonte de carbono, optou-se pela manutenção dos isolados em meio não seletivo, de acordo com SHIELDS et al. (1989); KOCH et al. (1991) e JAIN et al. (1992). Essa escolha, no entanto, acarretou um outro problema, pois sabe-se que, de modo geral, compostos BTX são degradados via enzimas codificadas por plasmídeos e que, quando bactérias são cultivadas em meio rico, esses podem ser perdidos, o que, então explicaria a perda da capacidade de utilização de tolueno pelas linhagens SC4-6, SC4-11 e SC8-3, observada durante este estudo. Então, iniciou-se uma série de experimentos com outras linhagens e, dessa vez, estas foram mantidas congeladas em glicerol, reativadas em LB e foi feito um pré-condicionamento das culturas, de acordo com EL-SAYED et al. (1996), antes dos experimentos. Após 3 dias de incubação, culturas pré-condicionadas de 5 E2 foram capazes de crescer e de remover 79,6% de p-xileno do meio com concentração de 0,4% (v/v); 73,3% de p-xileno do meio com concentração de 1% (v/v) e culturas pré-condicionadas de 5B2 foram capazes de crescer e de remover 80,8% de p-xileno na concentração de 1% (v/v) presente no meio. O pré-condicionamento das amostras revelou-se muito importante, pois as culturas, mesmo as tolerantes, quase não haviam crescido sem pré-condicionamento (dados não mostrados). Similarmente, EL-SAYED et al. (1996), observaram a importância do pré-condicionamento das culturas de *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Arthrobacter*, crescendo em combustível de Jet-A e óleo de motor. Da mesma forma, RAMOS et al. (1995) estudando a sobrevivência de células de *Pseudomonas putida* DOT-

T1 após choque de tolueno e a indutibilidade da tolerância a solventes, discutiram a importância do pré-condicionamento das culturas. E ainda, RAMOS et al. (1998) estudaram *Pseudomonas putida* DOT-T1E, uma linhagem tolerante a tolueno e m-xileno, porém sensível a benzeno, discutiram a sobrevivência a curto prazo das células, pré-condicionadas e não pré-condicionadas após choque de solvente e a indutibilidade da tolerância a solventes.

Os mecanismos pelos quais os microrganismos atuam sobre compostos xenobióticos incluem biotransformação (cometabolismo), bioacumulação e biodegradação. Desses processos, apenas a biodegradação é capaz de promover o crescimento da população microbiana em número ou biomassa, uma vez que a biotransformação consiste da ação microbiana que modifica a estrutura química sem rendimento de energia para crescimento (REINEKE, 1984, apud NAKAYAMA, 1999). Portanto, os dados obtidos neste estudo indicam que pelo menos parte do desaparecimento de p-xileno do meio seja resultado da degradação, apesar de que possa ter havido também bioacumulação em algum grau, uma vez que esse composto é lipossolúvel e tem afinidade pelas membranas lipídicas.

Diversos trabalhos têm mostrado amplas variações nos tempos necessários para biodegradação de compostos BTX, de acordo com as condições de cultivo, as concentrações utilizadas e os organismos usados como inóculo. BURBACK & PERRY (1993) demonstraram que *Mycobacterium vaccae* JOB-5 degradou completamente tolueno na

concentração de 100 ppm [0,01% (v/v)] em 48 horas, e benzeno na concentração de 50 ppm em 72 horas. GOULDING et al. (1988) utilizaram uma cultura mista composta de linhagens de *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Rhodococcus* e 2 linhagens de fungos, que foram capazes de remover totalmente tolueno na concentração de 200 mg/l em 72 horas. SOLANO-SERENA et al. (1999), observaram a completa degradação de benzeno, tolueno e m-xileno, fornecidos na concentração de 150 mg/l, por uma suspensão microbiana obtida de lodo ativado, em 2 dias.

CUNHA & LEITE (2000) obtiveram de 49,1 a 53,7% de degradação de tolueno presente na gasolina, fornecida na concentração de 5% (v/v), por culturas mistas, em 72 horas de incubação.

TSAO et al. (1998) verificaram que vapores de tolueno (3 µl / g de solo) tornaram-se totalmente exauridos sem fase lag com uma semana de incubação. A degradação de benzeno, o-xileno e p-xileno apresentaram fases lag de aproximadamente 5 dias, devido a isso, as exaustões foram completas somente por volta do 13º dia de incubação.

As porcentagens de degradação após 3 dias de incubação, obtidas neste estudo, foram menores do que as obtidas por BURBACK & PERRY (1993); GOULDING et al. (1988) e SOLANO-SERENA et al. (1999), que utilizaram baixas concentrações de BTX, porém mais altas do que as obtidas por CUNHA & LEITE (2000) e TSAO et al. (1998).

Neste estudo, a emulsificação não se mostrou um fator importante para a degradação, uma vez que as linhagens degradadoras não mostraram capacidade de produção de biossurfactante.

## 5.6 Avaliação do crescimento

Neste estudo foi usado cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) como um indicador geral de crescimento. Células capazes de catabolizar o substrato-teste reduzem o TTC ao formazan vermelho, enquanto que culturas incapazes de catabolizar o substrato-teste permanecem incolores (STRONG-GUNDERSON & PALUMBO, 1994; EL-SAYED, 1996; ROQUE & MELO, 2000). Neste estudo, avaliou-se o crescimento de 11 linhagens em meio mineral contendo 0,5% de xileno (v/v), 5% de BTX (v/v) e 5% de tolueno (v/v), separadamente, como fonte de carbono e TTC como indicador de crescimento. Das 11 linhagens, 6 foram selecionadas como tolerantes (5 A2, 5 B2, 5 C2, 5 E1, 5 E2 e 4022) e 5 foram consideradas sensíveis (5 B4, 5 E3, 4019, 4022V e 4023) a altas concentrações de solventes.

Experimentos de crescimento de 3 linhagens sensíveis após pré-condicionamento, mostraram que 5 B4 em 1% de tolueno (v/v), e 4019 e 4023 em 0,5 e 1% de tolueno (v/v) como fonte única de carbono e energia, apresentaram leve capacidade de crescimento, porém depois de 2 dias de incubação, as culturas entravam em fase de declínio e morte.

Das linhagens consideradas tolerantes, quase todas foram capazes de crescer nas fontes de carbono testadas, com algumas variações nos períodos de tempo necessário para início e duração do crescimento e nos rendimentos em termos de células viáveis. A única exceção foi 5 C2, que não foi capaz de crescer em meio M2 contendo 0,5% de xileno (v/v), 5% de BTX (v/v) e 5% de tolueno (v/v), separadamente, como fonte única de

carbono e energia. O número de células viáveis (ufc/ml) foi monitorado por 10, 15 e 22 dias, respectivamente em cada um desses experimentos (dados não mostrados), mas este período não foi suficiente para 5 C2 demonstrar quaisquer indícios de crescimento.

Quanto às exigências nutricionais, as bactérias tolerantes mostraram-se pouco exigentes, pois foram capazes de crescer em meio mineral sem a adição de quaisquer fatores de crescimento. No caso específico de *Enterobacter aerogenes* 4022, essa é uma característica do grupo. STANIER et al. (1986) relatam que apesar de ser costumário o cultivo de bactérias entéricas em meio complexo, as exigências nutricionais mínimas desses organismos são geralmente simples. Nos casos de *Enterobacter*, assim como de membros do grupo (*Escherichia*, *Serratia* e muitas espécies de *Salmonella*), nenhum fator de crescimento é necessário.

Quase todas as culturas apresentaram fases lag, com maior ou menor duração, dependendo das concentrações de hidrocarbonetos utilizadas. Os maiores períodos lag foram verificados quando foram utilizadas concentrações de 5% (v/v), tanto de BTX, sem e com extrato de levedura, quanto de tolueno (10, 15 e 22 dias, para 5 A2 e 5 E2, respectivamente). Interessante notar que o aumento de fornecimento de tolueno no meio de cultura de 1% para 5%, resultou em crescimento muito mais lento da linhagem 5 E2 (aumento da duração do período lag em aproximadamente 20 dias). Fato interessante aconteceu também com as culturas 5 B2 e 5 E2, que não mostraram fase lag evidente quando crescidas em 1% de tolueno (v/v); porém, quando crescidas em 1% de p-

xileno (v/v), mostraram um período lag inicial com morte celular, após o qual seguiu-se o período de crescimento exponencial. Resultados semelhantes foram obtidos por CRUDEN et al. (1992), que, durante crescimento de *P. putida* Idaho em p-xileno [20% (v/v)], observaram um período lag inicial acompanhado por morte celular. De todas as linhagens cultivadas em p-xileno, a única que não apresentou diminuição do número de células viáveis no período lag inicial, foi 5 E1. De forma parecida, TSAO et al. (1998) não observaram períodos lag de degradação de tolueno por bactérias do solo, porém observaram período lag quando se utilizou p-xileno.

### **5.7 Utilização de altas concentrações de solventes orgânicos por bactérias**

A sensibilidade de microrganismos a solventes orgânicos tóxicos é relacionada ao logaritmo do coeficiente de partição do solvente em uma mistura de octanol e água ( $\log P_{ow}$ ). Hidrocarbonetos aromáticos com um  $\log P_{ow}$  entre 1,5 e 3,5, tais como benzeno, tolueno e xilenos, são extremamente tóxicos aos organismos vivos. Esses compostos químicos dissolvem a membrana citoplasmática, desorganizam-na e colapsam o potencial da membrana celular; isto, juntamente com a perda induzida de lipídeos e proteínas, levam a dano irreversível resultando na morte da célula (SIKKEMA et al., 1995). Como exemplo da importância dessa correlação, no estudo de RAMOS et al. (1998) foi encontrado que, p-xileno, consistente com seu valor mais baixo de  $\log P_{ow}$  ( $\log P_{ow} = 3,1$ ), foi mais tóxico do que

n-hexano ( $\log P_{ow} = 3,9$ ), de modo que *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 foi incapaz de crescer na presença de p-xileno 1% (v/v) ou mesmo 0,5% (v/v), apesar de ter crescido bem em hexano 2% (v/v).

Considerando-se todas essas informações, não é surpresa, portanto, que microrganismos capazes de crescerem em baixas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos como fonte única de carbono e energia tenham sido identificados pela primeira vez no início do século XX (GIBSON & SUBRAMANIAN, 1984) e no entanto, bactérias capazes de crescerem na presença de altas concentrações de solventes aromáticos tenham sido relatadas apenas recentemente, conforme discutido anteriormente.

Atualmente, as concentrações dos compostos BTX comumente utilizadas na maioria dos trabalhos de biodegradação situam-se entre  $1,1\mu\text{M}$  e  $22,8\text{ mM}$ , que correspondem a  $0,0000125\%$  e  $0,3\%$  (v/v) (SHIELDS, et al., 1989; BARBIERI et al., 1993; MIKESSELL et al., 1993; CORSEUIL & ALVAREZ, 1996; SOMMER, et al., 1998; TAY et al., 1998; BOLOGNESE et al., 1999; GOUDAR et al., 1999; ISKEN et al., 1999; SOLANO-SERENA et al., 1999; KHANG et al., 2000). Exemplos de concentrações comparáveis às utilizadas neste trabalho somente foram encontrados em investigações de linhagens tolerantes a altas concentrações [ $\geq 1\%$  (vol/vol)] de solvente (INOUE & HORIKOSHI, 1989; AONO et al., 1991; CRUDEN et al., 1992; AONO et al., 1995; ISKEN & DE BONT, 1996; RAMOS et al., 1995; PINKART et al., 1996; PINKART & WHITE, 1997, apud ISKEN et al., 1999; LI et al., 1998; RAMOS et al., 1998; ROJAS et al., 2001).

Porém, com frequência, quando bactérias são capazes de crescer em altas concentrações, elas não são capazes de utilizar esses compostos, e, portanto, são necessárias outras fontes de carbono e energia. Como exemplo, *Pseudomonas putida* IH-2000 (INOUE & HORIKOSHI, 1989) é capaz de crescer em meio de cultura contendo mais do que 50% de tolueno (vol/vol), no entanto, *P. putida* IH-2000 é incapaz de utilizar tolueno como nutriente. Na verdade, dentre os trabalhos utilizando altas concentrações de solvente acima citados, apenas nos de CRUDEN et al. (1992), RAMOS et al. (1995) e RAMOS et al. (1998), as linhagens bacterianas são capazes de crescer às expensas do composto aromático. Os demais trabalhos discutem outros aspectos relacionados com o crescimento de bactérias em altas concentrações de solventes.

RAMOS et al. (1995) estudaram as modificações estruturais das células de *Pseudomonas putida* DOT-T1 crescidas em altas concentrações de tolueno, tais como aumento do espaço periplásmico e evaginações da membrana; e o catabolismo de tolueno. Nesse estudo eles observaram que, apesar da linhagem DOT-T1 ser tolerante a altas concentrações de m- e p-xileno, esses hidrocarbonetos não puderam ser utilizados como fonte única de carbono para crescimento.

ISKEN & DE BONT (1996) investigando os mecanismos de resistência a solventes orgânicos da linhagem *Pseudomonas putida* S12, obtiveram evidências da presença de um sistema de exportação dependente de energia responsável pela resistência a tolueno.

PINKART et al. (1996) estudaram as mudanças nos envoltórios celulares de linhagens de *Pseudomonas putida* sensíveis e tolerantes a solventes após exposição a o-xileno. Ambas linhagens produziram ácidos graxos trans-insaturados. A linhagem tolerante mostrou aumento em ácidos graxos totais, aumento em ácidos graxos saturados e lipolissacarídeos modificados, sugerindo que essas modificações no envoltório suprimiriam os efeitos dos solventes na estabilidade das membranas ou limitariam sua taxa de difusão para o interior celular, aumentando a sobrevivência em altas concentrações de solventes.

PINKART & WHITE (1997) citados por ISKEN et al. (1999) relataram taxas aumentadas de biossíntese de fosfolipídeos, aumentando a velocidade dos processos de reparo.

RAMOS et al. (1998) estudando *Pseudomonas putida* DOT-T1E, uma linhagem tolerante a tolueno e m-xileno, porém sensível a benzeno, mostraram aumento da rigidez da membrana celular de células expostas a tolueno na fase gasosa e duas bombas de efluxo, uma expressada constitutivamente e uma induzida por hidrocarbonetos aromáticos. Comenta ainda que o sistema de efluxo de solventes exclui tolueno; m-xileno; 1,2,4-triclorobenzeno, mas não funciona com benzeno.

LI et al. (1998) estudaram os mecanismos que conferem tolerância a altas concentrações de p-xileno em *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados obtidos por esses pesquisadores indicaram que essa propriedade resulta principalmente da atividade de 3 sistemas de efluxo multidrogas, dependentes de energia, de ampla especificidade, ou seja, que, além de

responderem a muitas classes de antibióticos, corantes e detergentes, responderiam também a solventes orgânicos. Esses pesquisadores acreditam que os sistemas de efluxo multidrogas acessariam os solventes de maneira similar aos antibióticos, ou seja, os antibióticos, por serem geralmente moléculas anfipáticas, particionam na camada interior (maioria dos antibióticos) ou exterior ( $\beta$ -lactamas) da membrana citoplasmática, de onde eles são acessados pelos sistemas de efluxo. Dado que solventes orgânicos são conhecidos por dissolverem nas membranas lipídicas e que seu efeito letal provavelmente envolve comprometimento do funcionamento da membrana citoplasmática, seria aceitável que esses sistemas de efluxo também acessassem solventes orgânicos do interior da bicamada lipídica.

ROJAS et al. (2001) relatam a identificação e caracterização de uma terceira bomba de efluxo presente em *P. putida* DOT-T1E, não relatada anteriormente.

Até o presente momento, os relatos de linhagens tolerantes a altas concentrações de solventes são de *Pseudomonas* (a maioria *P. putida*) e de *Escherichia coli* (AONO et al., 1991 e AONO et al., 1995). Até onde se sabe, não existem relatos de linhagens de *Moraxella*, de *Actinobacillus* e de *Enterobacter* resistentes e capazes de crescerem em altas concentrações de tolueno e de xileno como fonte única de carbono e energia, essa descoberta abre uma ampla variedade potencial de estudos, pois surgem várias questões. Por exemplo, se, estas linhagens, quando crescendo em solventes, apresentariam também, modificações estruturais tais como as observadas por RAMOS et al. (1995) em linhagens de *P. putida*; ou

modificações nos envoltórios celulares, como verificado por PINKART et al. (1996) e RAMOS et al. (1998) em linhagens de *P. putida*; ou ainda, sistemas de efluxo dependentes de energia, tais como observados em linhagens de *P. putida* e de *P. aeruginosa* (INKEN & DE BONT, 1996; RAMOS et al., 1998; LI et al., 1998 e ROJAS et al., 2001). Além disso, há a potencial aplicação em biorremediação, há interesse econômico na conversão desses compostos aromáticos em compostos tais como cis-dióis, epóxidos e índigo, entre outros. Finalmente, o entendimento dos mecanismos de tolerância aos solventes poderiam ser aproveitados no futuro para gerar microrganismos com potencial biocatalítico aumentado.

## 6 Conclusões

1. As atividades de emulsificação das linhagens SC4-6 e SC4-11 foram dependentes da fonte de carbono e da concentração empregada. O composto responsável pelas mais altas AE foi xileno.
2. A linhagem SC8-3 produziu altas AE quando crescendo tanto em benzeno, quanto em tolueno, ou xileno e também em glicose, indicando que a produção de biossurfactante por esta linhagem é expressada constitutivamente.
3. A linhagem 5E1 produziu altas AE e foi a linhagem com melhor crescimento em p-xileno como fonte de carbono.
4. Experimentos de crescimento realizados com 11 linhagens mostraram, 6 linhagens que foram consideradas tolerantes (5 A2, 5 B2, 5 C2, 5 E1, 5E2 E 4022) e 5 que foram consideradas sensíveis (5 B4, 5 E3, 4019, 4022V e 4023) a altas concentrações de solventes.
5. O pré-condicionamento das culturas mostrou-se importante para o crescimento das linhagens em altas concentrações de solventes, com exceção das linhagens sensíveis, para as quais o pré-condicionamento não teve efeito no sentido de incrementar o crescimento.

6. Após 3 dias de cultivo, culturas pré-condicionadas de 5 E2 foram capazes de remover 79,6% de p-xileno do meio, fornecido na concentração de 0,4% (v/v) e 73,3%, na concentração de 1% (v/v) de p-xileno fornecido ao meio. Enquanto que, culturas pré-condicionadas de 5 B2, foram capazes de remover 80,8% de p-xileno, fornecido na concentração de 1% (v/v) no meio. Este fato foi atribuído à biodegradação deste composto, pelo menos em parte, uma vez que ele foi adicionado ao meio como fonte única de carbono e energia e foi capaz de promover aumento do número de células viáveis.

7. A emulsificação não se mostrou um fator importante para a degradação, uma vez que as linhagens degradadoras não mostraram capacidade de produção de biossurfactante.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AONO, R., et al. Preparation of organic solvent-tolerant mutants of *Escherichia coli*. **Agric. Biol. Chem.**, v. 55, p. 1935-1938, 1991.

AONO, R., et al. A close correlation between improvement of organic solvent tolerance levels and alteration of resistance toward low levels of multiple antibiotics in *Escherichia coli*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 59, p. 213-218, 1995.

ARENGHI, F. L. G.; BERLANDA, D.; GALLI, E.; SELLO, G.; BA, P. Organization and regulation of meta cleavage pathway genes for toluene and o-xylene derivative degradation in *Pseudomonas stutzeri* OX1. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 7, p. 3304-3308, 2001.

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

BANAT, I.M. et al. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. **World J. Microbiol Biotechnol.**, v. 7, p. 80-88, 1991.

BARBIERI, P.; PALLADINO, L. DI GENNARO, P.; GALLI, E. Alternative pathways for o-xylene or m-xylene and p-xylene degradation in a *Pseudomonas stutzeri* strain. **Biodegradation**, v. 4, p. 71-80, 1993.

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

BICCA, F.C., FLECK, L.C., AYUB, M.A. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Rev. Microbiol.**, v. 30, n. 3, 1999.

BOLOGNESE, F. et al. Activation and inactivation of *Pseudomonas stutzeri* methylbenzene catabolism pathways mediated by a transposable element. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 5, p. 1876-1882, 1999.

BUHLER et al. Characterization and application of xylene monooxygenase for multistep biocatalysis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 2, p. 560-568, 2002.

BURBACK, B.L. & PERRY, J.J. Biodegradation and biotransformation of groundwater pollutant mixtures by *Mycobacterium vaccae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, n. 4, p. 1025-1029, 1993.

COOPER, D. G. & GOLDENBERG, B.G. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.

COOPER, D. G. & ZAJIC, J. E. Surface-active compounds from microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, v. 26, p. 229-253, 1980.

CORCHO-SÁNCHEZ, D. **Biodegradation of MTBE and other ether oxygenates by a cyclohexane utilising culture: the development of a novel bioreactor based on a dual polymeric membrane for the in situ biotreatment of groundwater contaminated with ether oxygenates.** Sheffield, 2000. 195 p. PhD thesis. University of Sheffield, Department of Civil and Structural Engineering.

CORSEUIL, H.X., ALVAREZ, P.J.J. Natural bioremediation of aquifer material contaminated with gasoline-ethanol mixtures. **Rev. Microbiol.**, v. 27, n. 1, p. 19-26, 1996.

COUTRIM, M. X.; CARVALHO, L. R. F.; ARCURI, A. S. A. Avaliação dos métodos analíticos para a determinação de metabólitos do benzeno como potenciais biomarcadores de exposição humana ao benzeno no ar. **Química Nova**, v. 23, n. 5, 2000.

CUNHA, C. D.; LEITE, S. G. F. Gasoline biodegradation in different soil microcosms. **Braz. J. Microbiol.**, v. 31, n. 1, 2000.

CRUDEN, D. L.; WOLFRAM, J. H.; ROGERS, R. D.; GIBSON, D. T. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with p-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, n. 9, p. 2723-2729, 1992.

DÉZIEL, E.; PAQUETTE, G.; VILLEMUR, R.; LÉPINE, F.; BISAILLON, J. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 6, p. 1908-1912, 1996.

DINKLA, I. J. T.; GABOR, E. M.; JANSSEN, D. B. Effects of iron limitation on the degradation of toluene by *Pseudomonas* strains carrying the TOL (pWWO) plasmid. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 8, p. 3406-3412, 2001.

EL-SAYED, A.H.M.M., et al. Growth of hydrocarbon-utilizing isolates in chemically defined media. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 61-68, 1996.

GERSON, D. F. & ZAJIC, J. E. Surfactant production from hydrocarbons by *Corynebacterium lepus*, sp. nov. and *Pseudomonas asphaltenicus*, sp. nov. **Dev. Ind. Microbiol.**, v. 19, p. 577-599, 1978.

GIBSON, D.T. The microbial oxidation of aromatic hidrocarbons. **Critical Reviews in Microbiology**, v.1, p. 199, 1971.

GIBSON, D.T. & SUBRAMANIAN, V. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: GIBSON, D.T. (Eds). **Microbial degradation of organic compounds**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1984.

GOUDAR, C. et al. Competitive substrate biodegradation during surfactant-enhanced remediation. **Journal of Environmental Engineering**, v. 125, n. 12, p. 1142-1148, 1999.

GOULDING, C.; GILLEN, C. J.; BOLTON, E. Biodegradation of substituted benzenes. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 65, p. 1-5, 1988.

GUERRA-SANTOS, L., KAPPELI, O. & FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glicose as carbon source. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 48, p. 301-305, 1984.

HAIGLER, B.E., PETTIGREW, C.A., SPAIN, J.C. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. Strain JS150. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, n. 7, p. 2237-2244, 1992.

HEITKAMP, M.A. , FRANKLIN, W. CERNIGLIA, C.E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, n. 10, p. 2549-2555, 1988.

HOMMEL, R. K. Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms - Biosurfactants in hydrocarbon utilization. **Biodegradation**, v. 1, p. 107-119, 1990.

INOUE, A.; HORIKOSHI, K. A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. **Nature**, v. 338, p. 264-266, 1989.

ISKEN, S.; DE BONT, J. A. Active efflux of toluene in a solvent-resistant bacterium. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 20, p. 6056-6058, 1996.

ISKEN, S.; DERKS, A., WOLFFS, P. F. G.; DE BONT, J. A. M. Effect of organic solvents on the yield of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n.6, p. 2631-2635, 1999.

JAIN, D. K.; COLLINS-THOMPSON, D. L.; LEE, H.; TREVORS, J. T. A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. **J. Microbiol. Methods**, v. 13, p. 271-279, 1992.

JOHNSON, V. et al. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 6, p. 487-490, 1992.

KAHNG, H.-Y. et al. Characterization and role of tbu X in utilization of toluene by *Ralstonia pickettii* PKO1. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 5, p. 1232-1242, 2000.

KAPPELI, O. & FINNERTY, W. R. Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. **J. Bacteriol.**, v. 140, n. 2, p. 707-712, 1979.

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

KUKOR, J. J.; OLSEN, R. H. Catechol 2,3-dioxygenases functional in oxygen-limited (hypoxic) environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 5, p. 1728-1740, 1996.

LEAHY, J. G. & COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiol. Rev.**, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.

LI, X-Z; ZHANG, L.; POOLE, K. Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 11, p. 2987-2991, 1998.

MIKESELL, M. D.; KUKOR, J. J.; OLSEN, R. H. Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer. **Biodegradation**, v. 4, p. 249-259, 1993.

MOLLER, J. & INGVORSEN, H. Biodegradation of phenanthrene in soil microcosms stimulated by an introduced *Alcaligenes* sp. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 102, p. 271-278, 1993.

NAKAYAMA, C.R. **Avaliação da biodegradação de pentaclorofenol por bactérias**. São Carlos, 1999. 141 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - UFSCar – CCBS.

NEU, T. R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. **Microbiol. Rev.**, v. 60, n. 1, p. 151-166, 1996.

OBERBREMER, A.; MOLLER-HURTIG, R.; WAGNER, F. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. **Appl. Microbiol Biotechnol.**, v. 32, p. 485-489, 1990.

PARALES, R. E.; DITTY, J. L.; HARWOOD, C. S. Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 9, p. 4098-4104, 2000.

PEDERSEN, A. R.; MOLLER, S.; MOLIN, S.; & ARVIN, E. Activity of toluene-degrading *Pseudomonas putida* in the early growth phase of a biofilm for waste gas treatment. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 54, n. 2, p. 131-141, 1997.

PINES, O. & GUTNICK, D. Alternate hydrophobic sites on the cell surface of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 22, p. 307-311, 1984.

PINKART, H. C.; WOLFRAM, J. W.; ROGERS, R.; WHITE, D. C. Cell envelope changes in solvent-tolerant and solvent-sensitive *Pseudomonas putida* strains following exposure to o-xylene. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, n. 3, p. 1129-1132, 1996.

RAMOS, J. L. et al. Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 14, p. 3911-3916, 1995.

RAMOS, J. L.; DUQUE, E.; GODOY, P.; SEGURA, A. Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 13, p. 3323-3329, 1998.

RATLEDGE, C. Hydrocarbons. In: HOUGHTON, D.R., SMITH, R.N. & EGGINS, H.O.W. (Eds). **Biodeterioration** – Products of hydrocarbon-microorganism interaction.. Elsevier, London, 1988.

RATLEDGE, C. Biochemistry of aliphatic hydrocarbon assimilation and degradation. In: 1º SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE BIODETERIORAÇÃO, 1992, Campos do Jordão. **Anais do 1º Simpósio Latino Americano de Biodeterioração**. São Paulo: TecArt Editora, p. 236-250.

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

REDDY, P. G.; SINGH, H. D.; PATHAK, M. G.; BHAGAT, S. D.; BARUAH, J. N. Isolation and functional characterization of hydrocarbons emulsifying and solubilizing factors produced by a *Pseudomonas* species. **Biotechnology and Bioengineering**, v. XXV, p. 387-401, 1983.

ROCHA, C. et al. Biosurfactant production by two isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 125-128, 1992.

ROJAS, A.; DUQUE, E.; MOSQUEDA, G.; GOLDEN, G.; HURTADO, A.; RAMOS, J. L.; SEGURA, A. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 13, p. 3967-3973, 2001.

ROQUE, M.R., MELLO, I.S. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron. **Sci. Agric.**, v. 57, n. 4, 2000.

ROY, P. K.; SINGH, H. D.; BHAGAT, S. D.; BARUAH, J. N. Characterization of hydrocarbon emulsification and solubilization occurring during the growth of

*Endomycopsis lipolytica* on hydrocarbons. **Biotechnology and Bioengineering**, v. XXI, p. 955-974, 1979.

SAR, N. & ROSENBERG, E. Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains. **Current Microbiology**, v. 9, p. 309-314, 1983.

SENTCHILO, V. S.; PEREBITUK, A. N.; ZEHNDER, A. J. B.; VAN DER MEER, J. R. Molecular diversity of plasmids bearing genes that encode toluene and xylene metabolism in *Pseudomonas* strains isolated from different contaminated sites in Belarus. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 7, p. 2842-2852, 2000.

SHIELDS, M.S. et al. Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, n. 6, p. 1624-1629, 1989.

SIEGMUND, I. & WAGNER, F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnol. Tech.**, v. 5, p. 265-268, 1991.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SMITH, M. R. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. **Biodegradation**, v. 1, p. 191-296, 1990.

SINGER, M. E. & FINNERTY, W. R. Microbial metabolism of straight-chain and branched alkenes. In: ATLAS, R. M. **Petroleum Microbiology**. New York: Macmillan Publishing, 1984.

SOLANO-SERENA, F. et al. Biodegradation of gasoline: kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 1008-1016, 1999.

SOMMER, H.M. et al. Examination of reproducibility in microbiological degradation experiments. **Biodegradation**, v. 9, p. 65-82, 1998.

STANIER, R.Y., INGRAHAM, J.L., WHEELIS, M.L. **The microbial world**. 5 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1986. 689 p.

STRONG-GUNDERSON, J.M., PALUMBO, A.V. Alternative method for rapidly screening microbial isolates for their potential to degrade volatile contaminants. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 13, p. 361-366, 1994.

TAY, S. T. -L.; HEMOND, H. F.; POLZ, M. F.; CAVANAUGH, C. M.; DEJESUS, I.; KRUMHOLZ, L. R. Two new *Mycobacterium* strains and their role in toluene degradation in a contaminated stream. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 5, p. 1715-1720, 1998.

TSAO, C. -W.; SONG, H. -G; BARTHA, R. Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 12, p. 4924-4929, 1998.

VAN DER MEER, et al. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 677-694, 1992.

WATKINSON, R. J. & MORGAN, P. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Biodegradation**, v. 1, p. 79-92, 1990.

WILLIAMS, P. A. & SAYERS, J. R. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*. **Biodegradation**, v. 5, p. 195-217, 1994.

WORSEY, M.J. & WILLIAMS, P.A. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. **J. Bacteriol.**, v. 124, p. 7-13, 1975.

ZHANG, Y. & MILLER, R. M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, n. 10, p. 3276-3282, 1992.

ZHANG, Y. & MILLER, R. M. Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecane. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, n. 6, p. 2101-2106, 1994.