LUCIANA DE OLIVEIRA

Avaliação da capacidade de biodegradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xileno por bactérias isoladas de área contaminada.

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

LUCIANA DE OLIVEIRA

Avaliação da capacidade de biodegradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xileno por bactérias isoladas de área contaminada.

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: René Peter Schneider

Versão original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Oliveira, Luciana de
Avaliação de capacidade de biodegradação de
benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xileno
por bactérias isoladas de área contaminada. /
Luciana de Oliveira; orientador René Peter
Schneider. -- São Paulo, 2017.
88 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Microbiologia Ambiental. 2. Compostos
aromáticos. 3. Bioremediação. I. Peter Schneider,
René , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luciana de Oliveira

Título da Tese: Avaliação de capacidade de biodegradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xileno por bactérias isoladas de área contaminada.

Orientador(a): René Peter Schneider

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CEUA - ICB/USP

RECEBIDO: 31/5/17

Ass: Katia

893/2017

São Paulo, 29 de maio de 2017.

Ilmo. Srs.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEPESH

Ref.: Solicitação de Certificado de Isenção

Prezados Professores,

Vimos por meio deste solicitar **Certificado de Isenção da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-ICB/USP) e da Comissão de Ética em Pesquisa Com Seres Humanos (CEPSH-ICB/USP)**, visto que o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação de capacidade de biodegradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros xilenos por bactérias isoladas de área contaminada" sob a responsabilidade do aluno "Luciana de Oliveira" e orientação do Prof.(a) Dr.(a) "René Peter Schneider" do Departamento de "Microbiologia", não fará coleta nem uso de amostras biológicas e/ou células primárias provenientes de seres humanos bem como não utilizará seres humanos como veículo ou hospedeiro para coleta e manutenção de insetos ou organismos invertebrados.

Declaro ainda que os animais utilizados no referido projeto não estão sob a égide da Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Por fim, informo que o projeto (X) não utilizará células imortalizadas/() utilizará células imortalizadas (caso afirmativo, preencha os dados abaixo).

Linhagem celular ____ () / ____ () / ____ () / ____ ()

Origem:

(A) animal

(H) humana

Atenciosamente,

Aluno (a): Luciana de Oliveira

Orientador (a): René Peter Schneider

ISENTO CEUA / ICB/USP

DATA: 31/06/2017

Ass. Bruno

ISENTO CEPSH / ICB/USP

DATA: 31/06/2017

Ass. Paolo

Obs.: Encaminhando o detalhamento do procedimento experimental que será utilizado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, meus exemplos de vida, força, caráter e meu porto seguro. Agradeço-lhes imensamente pela doação diária, por priorizar meus sonhos em detrimento dos seus, por terem me ensinado o inestimável valor do estudo e, sobretudo, pelo amor e apoio incondicionais durante todo este longo processo.

Às minhas irmãs, Fabiana e Luana, pela amizade, companheirismo, risadas, passeios. Por serem os pedaços que me completam, as mãos que me amparam e caminham sempre comigo, não importando o destino da viagem ou os percalços do caminho.

Aos meus avós, que sempre me incentivaram a estudar e acreditaram que eu era capaz de abraçar e concluir esse objetivo.

Ao companheiro que encontrei nos caminhos desta vida e que hoje os trilha junto a mim, por todo o amor, paciência, cumplicidade, pelas discussões dos meus resultados, pela ajuda no laboratório e por sempre ter estado lá por mim. Obrigada, B!

Às melhores amigas, Amanda e Beth, com quem eu tive o prazer de dividir o apartamento, as angústias, as pizzas, as conversas sobre o universo e tudo o mais. Meninas, vocês tornaram a volta para casa no fim de cada dia mais alegre!

Aos amigos de laboratório, que não poupam esforços para ajudar com o necessário e fazem os dias de trabalho mais divertidos e leves. Aos colegas do GenBio, que me receberam muito bem no seu bloco.

Ao especialista de laboratório Rodrigo Ricardo Ramos, por toda a valiosa ajuda com as análises cromatográficas na reta final do trabalho.

À secretária da pós graduação, Gisele, por toda a preocupação e ajuda nos processos burocráticos.

À Mariana Cacciacarro, que me acompanhou durante toda esta trajetória me ajudando a crescer como pessoa e me ensinando a ver o mundo por viéses que eu desconhecia. Obrigada por ter me mantido em pé quando os ventos contrários já haviam arrancado minhas estruturas.

Ao professor René Peter Schneider, pela oportunidade de realizar este trabalho.

*Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico*

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico, CNPq,
pelo apoio financeiro sob processo de número 158410/2011-4.

RESUMO

OLIVEIRA, L. **Avaliação de capacidade de biodegradação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xileno por bactérias isoladas de área contaminada.** 2017. 88 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Os compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) são os contaminantes mais frequentemente encontrados dentre os hidrocarbonetos de petróleo. A remoção destes compostos é dependente da atividade de uma população de micro-organismos adaptados capazes de promover a biodegradação dos mesmos. Neste estudo, foram utilizadas cinco cepas isoladas de área contaminada capazes de degradar estes compostos. As concentrações de BTEX foram determinadas por análises quantitativas realizadas por cromatografia gasosa com extração por *headspace*. Uma série de experimentos foi realizada para investigar a capacidade destas cepas de remover os compostos BTEX de forma individual e simultânea. Os ensaios de indução de vias metabólicas mostraram que cada um dos BTEX foi capaz de induzir as vias de degradação de todos os quatro substratos, resultado que foi visualizado a partir do crescimento das cepas em cada um dos BTEX após as mesmas terem sido ambientadas em apenas um deles. Para os ensaios de degradação, Os resultados revelaram que as cinco cepas foram capazes de degradar todos os BTEX, tanto na forma de um único substrato bem como em forma de mistura. As taxas de remoção de um único substrato ficaram entre 63,9% e 97,9%. Houve um aumento da degradação dos compostos quando os mesmo foram fornecidos em forma de mistura. Com exceção do benzeno, todos os compostos foram degradados até atingirem concentrações que ficaram abaixo do limite de potabilidade estipulados, dentro de 9 horas.

Palavras-chave: BTEX. Biodegradação. Vias metabólicas.

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. **Evaluation of biodegradation capacity of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers by bacteria isolated from contaminated area.** 2017. 88 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes) compounds are the most frequently encountered subsurface contaminants among the various petroleum hydrocarbons. Removal of these compounds is dependent on the activity of a population of microorganisms adapted to promote biodegradation of them. In this study, five strains isolated from contaminated groundwater able to degrade BTEX compounds were used. BTEX concentrations were determined by quantitative analysis performed by gaseous chromatography with headspace extraction. A series of batch experiments were carried out to investigate the ability of the strains for removing BTEX compounds using single and mixed substrates. The pathway induction assays showed that each one of the BTEX compounds was able to induce the degradation pathways of all four substrates, result that was visualized from the growth of the strains in each of the BTEX after they had been set in only one of them. For the degradation assays, the results revealed that the five strains were able to degrade all BTEX, both in the form of a single substrate as well as in the form of a mixture. The rates of removal of a single substrate were between 63.9% and 97.9%. There was an increased degradation of the compounds when they were provided as a mixture. With the exception of benzene, all compounds were degraded to concentrations below the stipulated drinking limit within 9 hours.

Keywords: BTEX. Biodegradation. Pathways.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
1.1 BTEX	13
1.2 Transporte de BTEX na subsuperfície	16
1.3 Biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos	18
1.4 Fatores que influenciam a biodegradação	22
<i>1.4.1 Características do poluente</i>	<i>22</i>
<i>1.4.2 Temperatura.....</i>	<i>22</i>
<i>1.4.3 pH</i>	<i>23</i>
<i>1.4.4 Disponibilidade de nutrientes</i>	<i>23</i>
<i>1.4.5 Aceptores finais de elétrons</i>	<i>24</i>
<i>1.4.6 Adaptação microbiana – Fatores biológicos</i>	<i>24</i>
1.5 Degradação aeróbia de BTEX	25
1.6 Micro-organismos na degradação de BTEX	36
1.7 Degradação de misturas de BTEX por culturas puras e consórcios.....	37
2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Análises por cromatografia gasosa/Fotoionização (CG/PID)	40
3.2 Meio Mínimo Líquido	41
3.3 Dinâmica de crescimento em BTEX para culturas puras.....	41
3.4 Microcosmos aeróbios para avaliação da cinética de degradação de BTEX	43
3.5 Curvas de peso seco	45
4 RESULTADOS e DISCUSSÃO	46
4.1 Calibração da metodologia de análise por cromatografia gasosa	46
4.2 Dinâmica de crescimento em BTEX para culturas puras.....	48
4.3 Microcosmos aeróbios para avaliação da cinética de degradação de BTEX	57

4.3.1 Degradação De um único substrato.....	58
4.3.2 Degradação da mistura de BTEX	65
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As águas subterrâneas representam mais de 95% das reservas de água doce em estado líquido do planeta, sendo, portanto, um recurso estratégico para o abastecimento público. Frente à crescente demanda dos recursos hídricos, a exploração das águas subterrâneas é uma alternativa bastante atraente para este propósito, em virtude da sua abundância, qualidade e relativo baixo custo de captação, principalmente considerando-se a condição inadequada de qualidade das águas superficiais associada ao elevado custo do tratamento dessas águas para os diversos usos e a escassez verificada em algumas regiões. Assim, o recurso hídrico subterrâneo vem se tornando uma opção viável para auxiliar no desenvolvimento econômico da sociedade, devendo, portanto ser protegido contra a poluição (Companhia De Tecnologia De Saneamento Ambiental – CETESB, 2007). No Brasil, esse recurso é responsável pelo abastecimento de alguns centros urbanos e comunidades rurais. No Estado de São Paulo, atualmente, aproximadamente 80% dos municípios são total ou parcialmente abastecidos por águas subterrâneas, atendendo uma população de mais de 5,5 milhões de habitantes (CETESB, 2007). No entanto, essas águas podem sofrer contaminações de origens diversas, estando, entre as mais comuns, aquelas relacionadas diretamente com atividades industriais, domésticas e agrícolas. Dependendo do tipo de contaminante, a recuperação pode levar anos e, até mesmo, não ser viável economicamente.

A contaminação de águas subterrâneas e solos por produtos orgânicos, como consequência de derramamentos, acidentes, ou resíduos industriais, representam hoje sérios problemas à saúde pública. Uma grande preocupação é a contaminação por produtos derivados do petróleo, como por exemplo, a gasolina que apresenta cerca de 10 a 59% de compostos aromáticos (EZQUERRO et al., 2004). A popularização dos automóveis no século XX aumentou ainda mais a necessidade e dependência do petróleo, trazendo como consequência o aumento do número de refinarias e postos de abastecimento (MARCHETTI, 2009). Segundo a Agência nacional de Petróleo (ANP), no ano de 2015 havia, no estado de São Paulo, 8.960 postos revendedores de combustíveis. Acompanhando este crescimento vêm os riscos de acidentes ambientais e contaminação de solos e águas. Os recursos financeiros disponibilizados para a recuperação de solos contaminados, segundo a U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, são de aproximadamente US\$ 125 mil. De acordo com Reggiani (1999), quando há a contaminação de águas subterrâneas, este valor gira em torno de US\$ 100 mil a US\$ 1 milhão por posto de serviço. Além dos custos, o tempo

requerido para recuperar esses locais é muito longo, geralmente maior que cinco anos. Nos derramamentos de gasolina, uma das principais preocupações é a contaminação dos aquíferos subterrâneos utilizados como fonte de abastecimento para o consumo humano. Os maiores problemas de contaminação são atribuídos aos hidrocarbonetos monoaromáticos, que são os constituintes mais solúveis, mais tóxicos e mais móveis da fração da gasolina. Estes hidrocarbonetos monoaromáticos, o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (*orto*-, *meta*-, *para*-), são denominados de BTEX e, em contato com a água se dissolverão parcialmente, sendo os primeiros contaminantes a atingir o lençol freático (SILVA et al., 2002).

Áreas contaminadas por vazamento de gasolina são frequentemente tratadas usando três processos principais: físicos, químicos e biológicos. O método físico mais comum, a deposição em aterros ou incineração, são procedimentos caros. Além de a incineração ser uma fonte de contaminação do ar (TING et al., 1999). O tratamento químico inclui a injeção de oxidantes diretamente no solo ou água contaminados, alterando a química aquática local (RISER-ROBERTS, 1998). Já o tratamento biológico envolve a quebra dos contaminantes em formas não tóxicas utilizando processos biológicos (RISER-ROBERTS, 1998). Nessa técnica, o contaminante é utilizado como fonte de carbono para o crescimento celular ou como co-substrato, sem causar distúrbios no aquífero (como rebaixamento do nível da água devido a técnicas de bombeamento) ou na zona vadosa (HOLLENDER et al., 2003; YEOM; DAUGULIS, 2001;).

Nas últimas décadas, em virtude da escassez do petróleo e do excesso de monóxido de carbono no ar atmosférico nos grandes centros urbanos, alguns países, entre eles o Brasil, passaram a utilizar como combustível alternativo uma mistura de álcool e gasolina. No Brasil, esta mistura corresponde a 22% de etanol e 78% de gasolina. Os BTEX são miscíveis nos alcoóis primários (metanol e etanol); estes são altamente solúveis em água. Quando a mistura gasolina-etanol entra em contato com a água, o etanol passa para a fase aquosa aumentando a solubilidade dos BTEX nesta fase. Este processo é denominado de cossolvência, definido como a capacidade de um determinado solvente em aumentar a solubilidade de um soluto em outro solvente. Segundo Fernandes & Corseuil (1996), em sistemas subsuperficiais, os principais aspectos que podem afetar o comportamento dos BTEX em presença de etanol são: o aumento da solubilidade dos BTEX em água, o aumento da mobilidade dos BTEX dissolvidos na água e a presença do etanol, que pode dificultar a biodegradação natural dos BTEX, aumentando a persistência destes compostos na água.

1.1 BTEX

Benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno são compostos orgânicos voláteis coletivamente chamados de BTEX. Este grupo constitui até 59% dos poluentes da gasolina (BARONA et al., 2007). Dentre os contaminantes presentes na gasolina, os BTEX são de particular preocupação, devido à sua toxicidade e também porque estes compostos são relativamente solúveis e, portanto, podem migrar com as águas subterrâneas (MARGESIN; SCHINNER, 2001). Estes poluentes são de difícil remoção e são capazes de se espalhar do ponto de origem da contaminação para uma vasta área (CHONG; CHIOU, 2010).

Figura 1- Fórmulas moleculares do benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros xilenos.

O benzeno é empregado na indústria sucroalcooleira para a produção de álcool anidro e também na produção de compostos orgânicos, inseticidas, fumigantes, solventes, borrachas sintéticas, plásticos, nylon e tintas. O tolueno é usado na gasolina de aviação e como agente de elevação da octanagem, como matéria-prima para benzeno, fenol e caprolactama, solvente para tintas e revestimentos, gomas elásticas, resinas, borrachas, diluente e solvente para lacas a base de nitrocelulose. O etilbenzeno é utilizado como um aditivo na gasolina de aviação e pode estar presente em produtos de consumo, como tintas, plásticos e pesticidas. É também usado como intermediário na produção de estireno. Os isômeros de xileno são usados na gasolina de aviação, corantes, inseticidas, asfalto, síntese farmacêutica (CETESB, 2008).

Tabela 1- Propriedades físico-químicas dos compostos de BTEX.

Compostos	Peso Molecular (g/mol)	Densidade Espec. a 20 °C (g/cm³)	Viscosidade a 20 °C (cP)	Solubilidade em água a 20 °C (g/L)
Benzeno	78,11	0,877	0,647	1,78
Tolueno	92,14	0,867	0,580	0,52
Etilbenzeno	106,17	0,867	0,678	0,15
<i>orto</i> - Xileno	106,17	0,880 ⁽¹⁾	0,802	0,17
<i>Meta</i> - Xileno	106,17	0,864 ⁽¹⁾	0,608	0,20
<i>Para</i> - Xileno	106,17	0,861 ⁽¹⁾	0,635	0,20 ⁽¹⁾

Fonte: Environmental Protection Agency (EPA).

⁽¹⁾ Valores obtidos a 25 °C.

Os BTEXs são extremamente tóxicos à saúde humana, apresentando toxicidade crônica mesmo em pequenas concentrações. Todos compostos BTEX são poderosos depressores do sistema nervoso central de acordo com a IARC (*International Agency for Research on Cancer*). O benzeno é reconhecidamente o mais tóxico de todos os BTEX, pois se trata de uma substância comprovadamente carcinogênica (podendo causar leucemia, ou seja, câncer dos tecidos que formam os linfócitos do sangue). A exposição aguda (altas concentrações em curtos períodos) por inalação ou ingestão pode levar ao óbito. Segundo a lista de substâncias perigosas (CERCLA, 2007), o benzeno foi classificado em 6º lugar, de uma lista de 275 substâncias identificadas como sendo ameaças potenciais mais significativas para a saúde humana. O conjunto de BTEX ficou em 78º colocado nesta mesma lista. Segundo levantamento da CETESB (2013) os solvente aromáticos (BTEX) lideram a lista dos principais grupos de contaminantes nas áreas contaminadas do estado de São Paulo com 33,8%, seguidos por combustíveis líquidos (29,3%), hidrocarbonetos poliaromáticos – HPAs (19,3%) e metais (7,7%). Estudos realizados pela CETESB (2006) apontam que a principal causa de contaminação por BTEX é proveniente de vazamentos de tanques de armazenamento de combustível (tabela 2).

Tabela 2- Causas de vazamento de gasolina em postos de combustível no estado de São Paulo.

Causas	%
Vazamento de tanque	31,5
Passivo ambiental	17,7
Tubulação	16,3
Extravasamento	8,1
Descarte	5,4
Desativado	4,6
Tubulação e tanque	4
Bomba	3
Não identificado	2,1
Outros	7,3

Fonte: CETESB, 2006.

Em função destes fatores a legislação tem se tornado cada vez mais restritiva. A agência de proteção ambiental norte-americana (EPA), por exemplo, estabelece os limites máximos para a concentração de benzeno em 5 µg/L em água potável. No Brasil, dentre as normas que definem os limites máximos permitidos (LMP) para substâncias orgânicas e não orgânicas na água tem-se os “Valores Orientados para Solo e água Subterrânea no Estado de São Paulo” (CETESB, 2014) e o CONAMA 396 (2008); há, ainda, a portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde que estipula, na Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano, padrões de potabilidade da água para consumo.

Tabela 3- Padrões nacionais para BTEX na água.

Parâmetro	Valores de intervenção para águas subterrâneas* (CETESB, 2014)	Portaria de potabilidade da água para consumo humano* (MS 2914/2011)	Classificação para o enquadramento das águas subterrâneas – consumo humano* (CONAMA 396/2008)
Benzeno	5	5	5
Tolueno	300	200	200
Etilbenzeno	700	170	170
Xilenos totais	500	300	300

*Valores em µg/L.

1.2 Transporte de BTEX na subsuperfície

Embora os grandes vazamentos acidentais de petróleo sejam preocupantes, o vazamento de gasolina de tanques subterrâneos de armazenamento, instalações de distribuição e várias operações industriais, como tratamento de efluentes, processamento de madeira e manufatura de detergentes, químicos e tintas, são considerados fontes primárias de contaminação do solo e de aquíferos (ANDREONI; GIANFREDI, 2007; SWOBODA-COLBERG, 1995).

O transporte e comportamento do BTEX nos meios subterrâneos são governados por diversos fatores, que tendem a prevenir ou retardar sua migração através do solo, a partir da superfície para as zonas saturadas subjacentes (MARGENSIN et al., 2003). De maneira geral, quando o contaminante entra no solo, ele está sujeito a dois processos básicos: processos de transferência que realocam a substância sem alterar sua estrutura química (sorção, advecção, dissolução, volatilização) e processos degradativos que alteram a estrutura química e liberam produtos diferentes (ANDREONI; GIANFREDI, 2007).

Figura 2- Transporte de contaminantes através da subsuperfície.

Em um caso de vazamento de gasolina em solo, a percolação dos BTEX pode ser retardada por volatilização e sorção nas partículas de solo, principalmente se este for rico em matéria orgânica. Entretanto, quando o vazamento atinge a área vadosa, que constitui a parte do solo que está parcialmente preenchida por água, os compostos entram em contato com a água subterrânea e se dissolvem nela. Quando há vazamento de gasolina, apenas uma pequena porcentagem do BTEX fica retida na camada de solo acima do aquífero (zona vadosa)(MATTNEY, 1994). Devido suas propriedades físico-químicas, o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, tendem a migrar rapidamente em direção ao aquífero e se dissolver na água formando extensas plumas de contaminação (DEEB; COHEN, 1999; MARGESIN et al., 2003). Da fração de BTEX que fica retida na zona vadosa, apenas uma pequena porcentagem fica adsorvida ao solo, o restante é distribuído entre a fase gasosa e dissolvida (MATTNEY, 1994).

Figura 3- Mecanismos de partição do contaminante na zona vadosa.

Os mecanismos que regem a movimentação e degradação de BTEX na subsuperfície incluem (USEPA, 1995; YANG et al., 1995): Retenção por adsorção às partículas de solo; retenção de fase dissolvida por capilaridade; perda por volatilização; transporte na fase aquosa (que gera plumas); transporte na fase líquida pura (fase livre/LNAPL); atividade biológica; reações de oxidação-redução. A importância de cada um destes mecanismos depende da quantidade de água que chega ao solo, da espessura e natureza do solo e da distribuição e interações que cada fase do BTEX sofre com os componentes presentes no solo. A lenta dissolução do BTEX residual a partir da fonte da contaminação usualmente forma uma pluma de contaminantes no aquífero. (CHEN et al., 2010).

Tabela 4- Percentagem média de distribuição de cada composto pelas três fases.

Compostos	Adsorvidos às Partículas (%)	Volatilizados (%)	Solúveis na água subterrânea (%)
Benzeno	5	60	35
Tolueno	5	75	20
Etilbenzeno	20	60	20
Xileno (o-xileno)	15	55	30

Fonte: Mattney, 1994.

1.3 Biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos

A contaminação de aquíferos por BTEX levou ao desenvolvimento de várias técnicas físicas, químicas e biológicas para sua remoção (CORSEUIL; ALVAREZ, 1996).

- **Pump and Treat:** “Pump and Treat” é um sistema de contenção de plumas que consiste em bombear constantemente grandes volumes de água contaminada do aquífero e tratá-la na superfície por processos físicos, químicos ou biológicos para remover o contaminante. Em seguida, a água tratada pode ser descartada ou reinjetada no aquífero.
- **Soil Vapor Extraction (SVE):** “Soil Vapor Extration” é um método de remediação de zona vadosa em que os contaminantes adsorvidos no solo ou imobilizados como fase livre são removidos através de um sistema de vácuo. O gás extraído do solo é tratado na superfície por técnicas de adsorção ou de tratamentos biológicos para a remoção dos contaminantes.
- **Air Sparging” (AS):** A tecnologia de “Air Sparging” é utilizada na remediação de aquíferos contaminados por compostos orgânicos voláteis, particularmente hidrocarbonetos de petróleo dissolvidos (MARLEY et al., 1992; REDDY *et al.*, 1995). Esta técnica também é conhecida como “*in situ* air stripping” ou “*in situ* volatilization”. Neste sistema, os contaminantes são removidos do aquífero por volatilização dos compostos orgânicos voláteis, dissolvidos no volume de ar injetado, e pela biodegradação aeróbia (JOHNSON *et al.*, 1993). Usualmente o sistema de

injeção de ar é complementado com o sistema de “Soil Vapor Extration” para canalizar o fluxo dos gases no solo (BRAIDA; ONG, 2001).

- Biorremediação: é um método de remediação *in situ* onde o contaminante, presente no aquífero e na zona vadosa, é degradado por microrganismos naturais ou não da área (CUNHA; LEITE, 1997; SCHREIBER; BAHR, 2002; THOMAS; WARD, 1989; YANG et al., 1995).

Devido ao potencial de uma remediação efetiva de áreas contaminadas com intervenção mínima e baixo custo, a atenuação natural constitui uma ótima alternativa de tratamento. Os processos de atenuação natural incluem biorremediação, diluição, dispersão, adsorção e volatilização. Atenuação natural monitorada é um sistema de tratamento *in situ* que utiliza a ocorrência de processos naturais para a remoção de poluentes de solos e água subterrânea. Dentre os processos naturais, a biorremediação é um dos mecanismos mais importantes no que tange à remoção de contaminação (CHEN et al., 2006; MAIER et al., 2007; SUTHERLAND et al., 2004;) e a única que resulta na degradação dos hidrocarbonetos, com consequente redução de sua massa (BHUPATHIRAJU et al., 2002).

A biorremediação pode ser definida como a degradação biológica natural ou controlada de poluição ambiental. É normalmente realizada por microrganismos naturalmente encontrados no local afetado, capazes de detoxificar ou degradar poluentes orgânicos até níveis indetectáveis ou abaixo dos limites aceitáveis pelas agências regulatórias (ALEXANDER, 1999; TORTORA et al., 2000). Esta tecnologia utiliza o potencial fisiológico de bactérias e/ou fungos, que transformam o poluente em biomassa, água, dióxido de carbono e outros compostos. Sua eficácia pode ser testada em laboratório pela determinação das taxas de degradação do composto. (CRAPEZ et al., 2002). A biodegradação é a habilidade metabólica de transformar ou mineralizar contaminantes orgânicos em compostos menos nocivos, substâncias não perigosas, as quais são, então, integradas aos ciclos biogeoquímicos (ALLARD; NIELSON, 1997). Na maioria dos sistemas hidrogeológicos a biodegradação é o processo mais importante que remove BTEX da água subterrânea. Os processos de biodegradação de BTEX em águas subterrâneas incluem respiração aeróbia, desnitrificação, redução de ferro ou manganês, redução de sulfato e metanogênese. (WIEDEMEIER et al, 1996). Os contaminantes podem ser degradados em ambientes aeróbios ou anaeróbios, sendo que as taxas de degradação aeróbias para BTEX são

mais altas do que as registradas em anaerobiose (ATTEIA; GUILLOT, 2007). Devido às taxas de biorremediação serem limitadas pelos fatores ambientais, pode ser aplicada a técnica de bioestimulação *in situ*, para que a degradação seja estimulada pela adição de nutrientes ao ambiente.

A equação genérica que representa o processo geral da biodegradação aeróbia de hidrocarbonetos é (LEHMAN, COWELL, 1990):

Na equação 1, $(\text{HC})_x$ representa os hidrocarbonetos derivados do petróleo e (N,P,S) nitrogênio, fósforo e enxofre, nutrientes necessários para o metabolismo e crescimento celular.

A redução na concentração do oxigênio dissolvido numa pluma contendo BTEX é um forte indício de que bactérias nativas já estão transformando os contaminantes via respiração aeróbia. De maneira geral, a concentração de oxigênio dissolvido encontrada em ambientes contendo BTEX será mais baixa do que aquela em ambientes naturais. Kampbell et al. (1996), observaram a biodegradação aeróbia dos compostos BTEX em um aquífero de areia, enquanto Alvarez e Vogel (1991) observaram a completa remoção dos compostos benzeno, tolueno e *p*-xileno (em conjunto) em solos de aquíferos com culturas puras entre 3 e 13 dias de incubação. Chiang et al. (1989) mediram uma taxa de remoção de 80 a 100% de BTX em um aquífero de Michigan, utilizando testes em microcosmos.

Figura 4- Fornecimento de oxigênio à liberação de petróleo-hidrocarboneto em atenuação natural. Adaptado de Seagren et al., 2002.

A taxa da biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo na subsuperfície dependerão de vários fatores: pH e temperatura, quantidade e qualidade dos nutrientes e dos aceptores de elétrons; número e capacidade metabólica dos micro-organismos e quantidade dos doadores de elétrons. Esses fatores determinarão se a biodegradação desses compostos poderá ser mais rápida ou mais lenta no ambiente subterrâneo.

As tecnologias normalmente empregadas para a biorremediação de solos e água impactados incluem: atenuação natural monitorada, bioventilação, landfarming, fitorremediação, além de técnicas auxiliares, como bioaumento e bioestímulo (BENTO et al., 2005). A técnica deve ser escolhida caso a caso, e vai depender primeiramente da caracterização do local e do contaminante. A atenuação natural monitorada é uma forma passiva de remediação, que envolve a atividade microbiana sem qualquer forma de intervenção humana (NYER, 1998 apud ROSADO, 2005). É uma técnica simples, normalmente lenta, que depende dos processos naturais para reduzir a massa e/ou a mobilidade de um contaminante no solo (SCOW; HICKS, 2005). No entanto, as condições ambientais devem ser adequadas para se empregar tal técnica. Além disso, é necessária a presença de microrganismos nativos capazes de biodegradar o contaminante presente no solo (BAPTISTA, 2007). Em geral, os microrganismos estão presentes na área impactada, e quanto maior o tempo de exposição deles aos compostos xenobiontes, maior a probabilidade de alguns adquirirem a capacidade genética de decodificar enzimas que atuem na degradação desses compostos (DIAS, 2000). Segundo Juck et al. (2000) e Roling et al. (2002), a poluição orgânica pode reduzir a variedade de comunidades microbianas no ambiente. No entanto, o enriquecimento de uma população microbiana específica também ocorre. Os micro-organismos podem desenvolver vários mecanismos para acessar os compostos adsorvidos em partículas de solo e sedimentos, bem como utilizar poluentes insolúveis em água, esperar por um novo estado de equilíbrio, criar novos gradientes de concentração, provocar mudanças de pH em microambientes, produzir surfactantes, solventes e agente quelantes, secretar enzimas extracelulares (CHUNG; ALEXANDER, 2002).

1.4 Fatores que influenciam a biodegradação

1.4.1 Características do poluente

Diversos fatores como solubilidade, volatilidade, coeficiente de partição e biodisponibilidade, são muito importantes para a biodegradação. Por exemplo, quanto mais volátil, mais rapidamente o poluente é degradado (MATTNEY, 1994). Hidrocarbonetos de petróleo contém uma mistura de compostos que não são degradados na mesma velocidade. A taxa que os micro-organismos degradam estes hidrocarbonetos depende da estrutura química e da concentração dos mesmos (SIHAG et al., 2014).

É muito importante estudar a interação do substrato em diferentes concentrações, uma vez que existe a possibilidade de haver toxicidade celular, especialmente em altas concentrações. No entanto, alguns estudos dizem que a inibição do crescimento devido às concentrações críticas é dependente da cepa bacteriana (EL-NAAS et al., 2014). A interação entre substratos pode alterar as taxas de degradação tanto sinergicamente quanto de forma antagonista (DOU et al., 2008; WANG; DESHUSSES, 2007). As interações sinérgicas aumentam as taxas de degradação de contaminantes individuais através da indução da enzima catabólica necessária. Por outro lado, interações antagonistas inibem a degradação de outros contaminantes por exercerem toxicidade, diauxia, repressão catabólica, inibição competitiva por enzimas ou depleção dos aceptores finais de elétrons (ALVAREZ; VOGEL, 1991).

1.4.2 Temperatura

A biodegradação de hidrocarbonetos pode ocorrer em uma larga faixa de temperatura, sendo que micro-organismos psicrófilos, mesófilos e termofílicos capazes de utilizar estes compostos já foram isolados. A temperatura influencia na biodegradação de derivados de petróleo pelo seu efeito na natureza física destes compostos, na taxa de metabolismo dos micro-organismos e também na composição da comunidade microbiana (ATLAS, 1981). As taxas de degradação normalmente diminuem quando a temperatura diminui; acredita-se que este seja o resultado da redução da atividade enzimática (GIBS et al., 1975). Temperaturas mais altas aumentam a taxa de degradação de hidrocarbonetos ao seu máximo, tipicamente na faixa de 30 a 40 °C, acima da qual a toxicidade destes compostos é aumentada (BOSSERT;

BARTHA, 1984). A maioria dos micro-organismos é ativa na faixa mesotérmica, de 20 a 35 °C, e atingem taxas de degradação ótimas dentro desta faixa de temperatura. Em geral, as taxas de degradação serão menores em temperaturas mais frias do que em climas mais quentes (SIHAG et al., 2014).

1.4.3 pH

A maioria das bactérias e fungos heterotróficos têm preferência por pHs próximos à neutralidade. Quando existe um pH extremo, espera-se haver um impacto negativo na habilidade das populações microbianas de degradar hidrocarbonetos. Verstraete et al. (1976), relataram que as taxas de biodegradação da gasolina de um ambiente ácido (pH 4,5) praticamente dobraram quando o pH foi ajustado para 7,4. No entanto, essas taxas diminuíram significativamente quando o pH foi aumentado para 8,5. Águas subterrâneas são tipicamente bem tamponadas dentro dos limites necessários a atividade microbiológica, o que significa que os requerimentos referentes a esta variável são usualmente atendidos (CHAPELLE, 1993). No entanto, durante a biodegradação o pH normalmente sofre uma diminuição, devido à produção de metabólitos ácidos e CO₂, podendo provocar a diminuição da atividade microbiana (MATTNEY, 1994).

1.4.4 Disponibilidade de nutrientes

Para que ocorra a biodegradação de fontes de carbono, os micro-organismos precisam de nutrientes minerais como nitrogênio, fósforo e potássio para o metabolismo celular. Em áreas contaminadas, nas quais os níveis de carbono são altos, os nutrientes disponíveis podem ser rapidamente exauridos, devido às altas taxas de metabolismo (SUTHERLAND, 1995). Em vazamentos de gasolina, existe uma massa de carbono disponível para o crescimento microbiano dentro de uma área limitada. Uma vez que os micro-organismos necessitam de fósforo e nitrogênio para a incorporação na biomassa, a disponibilidade destes nutrientes dentro da mesma área da pluma é crítica (ATLAS, 1981). Micro-organismos aeróbicos utilizam diversos tipos de nutrientes, além do nitrogênio e fósforo, como: cálcio, enxofre, magnésio, ferro, manganês, que são nutrientes vitais para o funcionamento celular e praticamente não são encontrados em gasolinas e óleos (CUNNINGHAM, 1990). A falta

desses nutrientes poderá causar uma diminuição nas taxas de degradação. Para compensar a falta de nutrientes, fertilizantes podem ser aplicados, para aumentar a quantidade de nutrientes no ambiente e suprir as necessidades microbiológicas para o crescimento (LEAHY; COLWELL, 1990).

1.4.5 Aceptores finais de elétrons

O benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno são poluentes biodegradados em tanto em condições aeróbicas quanto anaeróbicas, porém muitos estudos demonstram que a degradação de BTEX é mais rápida sob condições aeróbicas (ALVAREZ, 2004; ANDERSON, LOVLEY, 2000; GIEG et al., 1999; SILVA;). Os passos iniciais no catabolismo aeróbio de hidrocarbonetos por bactérias envolve a oxidação do substrato por oxigenases, portanto, oxigênio molecular é requerido. Deste modo, condições aeróbicas são necessárias para esta rota de degradação (CERNIGLIA, 1984). De forma geral, são necessários de 3-4 mg de oxigênio dissolvido para oxidar 1 mg/L de hidrocarbonetos (U.S. Congress Office of Technology Assessment).

1.4.6 Adaptação microbiana – Fatores biológicos

A taxa de biodegradação depende da presença e do número de microrganismos capazes de degradar os compostos orgânicos. Existe uma relação direta entre a velocidade de degradação e o tamanho da população, já que quanto maior o número de microrganismos capazes de degradar o composto, mais rápida será a sua degradação (DRAGUN, 1998). De acordo com Atlas (1981), em ecossistemas não poluídos, os microrganismos degradadores de hidrocarbonetos geralmente constituem menos do que 0,1% da população microbiana. O aumento dessa comunidade pode estar relacionado à sua exposição aos hidrocarbonetos em um ambiente contaminado. Spain e Van Veld (1983) definiram como adaptação o fenômeno da mudança na comunidade microbiana que aumenta a taxa de transformação de um composto como resultado da exposição prévia a este composto. Existem três mecanismos inter-relacionados pelos quais a adaptação pode ocorrer: 1) indução de enzimas específicas; 2) mudanças genéticas que resultam em novas habilidades metabólicas; e 3) enriquecimento seletivo de organismos capazes de transformar o composto ou compostos de interesse (SPAIN; VAN VELD, 1983). Alguns estudos mostraram que o número de micro-organismos

degradadores de hidrocarbonetos e a sua proporção na comunidade heterotrófica aumentou após a exposição a petróleo e outros hidrocarbonetos e que o número de espécies de micro-organismos capazes de degradar estes poluentes geralmente refletem o grau de contaminação de um ecossistema (ATLAS, 1981; BOSSERT; BARTHA, 1984; COONEY, 1985; FLOODGATE, 1984).

Tabela 5- Efeito de alguns parâmetros ambientais nos micro-organismos e contaminantes.

Parâmetro	Efeito nos micro-organismos	Efeito nos contaminantes
Umidade do solo	hidratação inadequada diminui o metabolismo e movimento microbianos a água limita o transporte de oxigênio	hidratação inadequada diminui o transporte tanto dos contaminantes quanto dos nutrientes através do solo
Tipo de solo	o movimento microbiano é afetado pelo tipo de solo	a sorção dos contaminantes depende do tipo de solo
Oxigênio	necessário para a respiração dos micro-organismos	vários compostos sofrem reações de oxidação para fins catabólicos
pH	a atividade microbiana depende do pH do meio para acontecer	a sorção ao solo e solubilidade em água podem variar de acordo com o pH
Temperatura	o metabolismo microbiano é afetado diretamente pela temperatura	é a temperatura pode afetar a solubilidade, sorção, viscosidade e volatilização do contaminante

Fonte: Providenti et al. 2003.

1.5 Degradação aeróbia de BTEX

Todos os componentes do BTEX podem ser degradados por microrganismos aeróbios (WIEDEMEIER et al., 1999), sendo que a degradação aeróbia desempenha importante papel na remoção deste composto de águas subterrâneas. A mineralização desses compostos a dióxido de carbono e água envolve reações de oxidação-redução; o oxigênio molecular serve comoceptor final de elétrons, enquanto os hidrocarbonetos servem como doador de elétrons

ou fonte de energia no metabolismo heterotrófico (RISER-ROBERTS,1992). No entanto, significantes porções de aquíferos contaminados com petróleo ou seus derivados são anaeróbios devido à respiração microbiana consumir as baixas concentrações de oxigênio que podem se dissolver nas águas subterrâneas e porque as taxas de difusão do oxigênio vindo da atmosfera são relativamente baixas. Frente a isto, a adição de oxigênio a aquíferos contaminados a fim de estimular a biodegradação de BTEX é uma prática comum de biorremediação (SALANITRO, 1993).

Tabela 6- Propriedades dos compostos monoaromáticos e estequiometria da sua degradação.

Composto	Algumas propriedades	Reação geral
Benzeno	C_6H_6 Demanda de oxigênio teórica para 1 ppm de benzeno em água = 3,076 ppm	$C_6H_6 + 7,5O_2 \rightarrow 6CO_2 + 3H_2O$
Tolueno	C_7H_8 Demanda de oxigênio teórica para 1 ppm de tolueno em água = 3,13 ppm	$C_7H_8 + 9O_2 \rightarrow 7CO_2 + 4H_2O$
Etilbenzeno e isômeros de Xileno	C_8H_{10} Demanda de oxigênio teórica para 1 ppm de E ou X em água = 3,17 ppm	$C_8H_{10} + 10,5O_2 \rightarrow 8CO_2 + 5H_2O$

Adaptado de: Langwaldt and Puhakka, 2000; Cunningham et al., 2001; Villatoro-Monzon et al., 2003; Roychoudhury and Merrett, 2006.

As oxidações biológicas ocorrem a partir da incorporação de moléculas de oxigênio em compostos orgânicos, através de reações de oxidação mediadas por enzimas *oxigenase*. Quando grandes concentrações de contaminantes são liberadas no ambiente subterrâneo, estes podem ficar rapidamente sem oxigênio devido ao grande uso deste composto para a degradação da fonte de carbono presente. Quando este for o caso, a taxa de biodegradação aeróbia será limitada mais pelo fornecimento de oxigênio do que pela concentração de nutrientes (BORDEN; BEDIANT, 1986).

O tolueno já foi identificado como sendo o composto mais facilmente degradável dentre os seis componentes do BTEX. Isto pode ser devido à presença do grupo substituinte no anel, que oferece uma rota alternativa de ataque. O processo requer oxigênio dissolvido, que é utilizado tanto na ativação do anel quanto na clivagem do núcleo aromático e também

como aceptor final de elétrons para a completa degradação microbiológica (EL-NAAS et al., 2010).

As vias de degradação metabólicas para BTEX são feitas por dois grupos de enzimas: as dioxigenases e as monoxigenases. As monoxigenases atacam os substituintes metil ou etil do anel aromático (KHAN et al., 2001; TSAO et al., 1998), que são subsequentemente transformados por diversas oxidações em pirocatecóis ou fenilglioal, respectivamente. As dioxigenases compõem a via TOD e atacam o anel aromático formando compostos 2-hidroxi (JINDROVÁ et al., 2002; TSAO et al., 1998;).

Figura 5- Visão geral do metabolismo de compostos aromáticos.

O primeiro passo na oxidação do benzeno é hidroxilação, catalisada por uma dioxigenase. A presença de um grupo substituinte no anel de benzeno permite dois mecanismos possíveis: ataque às cadeias laterais ou oxidação do anel aromático (FRITSCHER; HOFRICHTER, 2000). Ambas as vias convergem para a formação de intermediários de catecol (FARHADIAN et al., 2008).

Para o benzeno, o principal intermediário é o catecol, enquanto que o tolueno e etilbenzeno são degradados em vias distintas, levando à produção dos seus respectivos intermediários mais importantes: 3-metilcatecol e 3-etilcatecol (TSAO et al., 1998; JOHNSON et al., 2003; ZHANG et al., 2013). Os xilenos são metabolizados à catecois mono-metilados, por exemplo: m-xileno é degradado a 3-metilcatecol (STEPHENS, 2011). Subsequentemente, estes intermediários de catecol são clivados por uma enzima catecol 1,2-dioxigenase (também chamada de clivagem orto- ou intra-diol ou, ainda, via superior) e também pela via majoritária destas vias metabólicas por uma enzima catecol 2,3-dioxigenase (também conhecida como clivagem meta- ou extadiol ou, ainda, via inferior) (ANDREONI; GIANFREDA, 2007; JINDROVÁ et al. 2002; SMITH, 1991;). O anel é aberto e então degradado (AL-KHALID; EL-NAAS, 2011; AN et al., 2001), produzindo compostos de baixo peso molecular, como piruvato e acetaldeído, os quais podem ser oxidados via ciclo de Krebs (COZARELI; BAHER, 2003).

Figura 6- Via de degradação aeróbia do benzeno.

Figura 7- Vias de degradação aeróbia do tolueno.

cis-2-hidroxi-penta-2,4-dienoato

4-hidróxi-2-oxo-valerato

acetaldeído

+

piruvato

Figura 8- Vias de degradação aeróbia do etilbenzeno.

Figura 9- Vias de degradação aeróbia dos isômeros *o*-, *p*- e *m*-xileno.

Tsao et al. (1998) relataram que culturas enriquecidas de solo usam a via TOD somente para a metabolização de benzeno, enquanto tolueno e xilenos podem ser oxidados tanto pela via TOD quanto pela via TOL. No entanto, o p-xileno só pode ser degradado pela via TOD, produzindo 3,5-dimetilcatecol como intermediário. Este tipo de transformação também foi observada para o metabolismo de p- e o-xileno em *Pseudomonas putida* PP01 (EL-NAAS et al., 2014). Baseado em um estudo feito por Mazzeo et al. (2010), *P. putida* foi

capaz de degradar todos os BTEX por uma via metabólica baseada na oxidação direta do anel através de uma mono ou dioxigenase para formar catecol, que é subsequentemente quebrado pela 2,3-dioxigenase e então seus metabólitos são consumidos no ciclo de Krebs.

1.6 Micro-organismos na degradação de BTEX

Um grande número de organismos é capaz de degradar BTEX, incluindo bactérias, fungos e algas. A degradação de BTEX, tanto aeróbia (ATTAWAY; SCHMIDT, 2002) quanto anaeróbia (CHEN et al., 2008), tem sido extensivamente estudada há mais duas décadas. A degradação destes compostos foi descoberta quando a bactéria *Bacillus hexabovorum* cresceu aerobicamente em um meio de cultura contendo tolueno e xileno (ZOBEL, 1946).

De acordo com Gibson e Subramanian (1984) e Corseuil e Alvarez (1996), pesquisadores encontraram mais de 200 espécies de bactérias presentes em amostras de solos não contaminados capazes de degradar hidrocarbonetos. Dentro do gênero *Pseudomonas*, *P. putida* (ABUHAMED, 2004; REARDON; ROGERS, 2000; SHIM et al., 2002) é a espécie mais comumente empregada em estudos de degradação de hidrocarbonetos aromáticos. Degradores de BTEX têm sido encontrados em diversos ambientes e incluem: *Rhodococcus*, *Marinobacter*, *Acinetobacter* (WANG; SHAO, 2006). Degradores de BTEX encontrados em amostras de solo incluem: *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Acidovorax*, *Agrobacterium*, *Aquaspirillum*, *Brevibacterium*, *Bradyrhizobium*, *Variovorax* e *Stenotrophomonas* (HENDRICKX et al., 2006). Alguns degradores de BTEX também são isolados de águas superficiais e esgoto, como: *Ralstonia* (RYAN; PEMBROKE, 2007), *Microbacterium*, *Mycobacterium*, *Azoarcus* (CAVALCA et al., 2004), *Thauera* (SHINODA et al., 2004), *Burkholderia* (JOHNSON; OLSEN, 1997) e *Sphingomonas* (FREDRICKSON et al., 1995).

Tabela 7- Micro-organismos degradadores de compostos aromáticos.

Organismo	Contaminante Degradado	Referências
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	BTEX	Deeb e Alvarez Cohen (1999)
<i>Pseudomonas sp. ATCC 55595</i>	BT (p-)X	Collins e Daugulis (1999)
<i>Pseudomonas putida</i>	BTEX (o-)X	Shim e Yang (1999)
<i>Rhodococcus sp. RR1 e RR2</i>	BTE (m-/p-)X	Deeb e Alvarez Cohen (2000)
<i>Pseudomonas putida F1</i>	BTE, TCE	Parales et al. (2000)
<i>Burkholderia cepacia G4</i>	T	Lee e Lee (1998)
<i>Pseudomonas putida</i>	BTEX	Attaway e Schimidt (2002)
<i>Rhodococcus sp. Cepa DK17</i>	BTE (o-)X	Kim et al. (2002)
<i>Pseudomonas putida cepa mt-2</i>	T (m-/p-)X	Morasch et al. (2002)
<i>Blastochloris sulfovirdidis ToP1</i>	T	Van Hamme et al. (2003)
<i>Pseudomonas putida</i>	BTEX	Shim et al. (2005)
<i>Pseudomonas putida PaW1</i>	Compostos aromáticos	Leahy et al. (2003)
<i>Rhodococcus pyridinocorans PYJ-1</i>	BT (m-)X	Jung e Park (2004)
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	BTEX	Nielsen et al. (2006)
<i>Geobacteraceae</i>	BTX	Botton et al. (2007)

1.7 Degradação de misturas de BTEX por culturas puras e consórcios

Para entender o potencial de degradação de BTEX das culturas isoladas ou de consórcios que são previamente aclimatados, é necessário que se realizem testes de cinética de degradação dos substratos em laboratório. Para estimar os efeitos da interação dos compostos, se torna imprescindível conduzir os ensaios de forma que os substratos sejam fornecidos individualmente aos micro-organismos e também em forma de misturas binárias, ternárias e quaternárias. Assim, é possível observar se os compostos exercem papel sinérgico ou antagonista durante a sua degradação por determinadas espécies. Desta forma pode-se determinar qual micro-organismo ou consórcio de micro-organismos é mais apropriado para aplicações na bioremediação.

Em seu estudo, Khodaei et al. (2017) desenvolveram microcosmos aeróbios para o enriquecimento de amostras de água contaminada e posterior isolamento de bactérias degradadoras de BTEX, a partir de suplementação das amostras com meio de cultura e 205 mg/L de cada um dos BTE(m-)X. Como resultado, obtiveram taxas de remoção de benzeno, tolueno e etilbenzeno, quando fornecidos individualmente, maiores que 90% para uma cepa de *Pseudomonas sp* BTEX 30. Não foi observada degradação de m-xileno nestas condições. No entanto, quando o experimento foi realizado oferecendo os compostos de BTEX em forma

de mistura ou juntamente com benzeno ou tolueno, a bactéria foi capaz de co-metabolizar o isômero de xileno.

Jiang et al. (2015), utilizaram a cepa *Comamonas sp.* JB, isolada pelo próprio grupo, que foi capaz de degradar 50 mg/L de todos os BTEX, quando fornecidos individualmente, e 30 mg/L de cada um quando os mesmo foram ministrados em forma de mistura.

Um consórcio que foi enriquecido em tolueno foi submetido a ensaios de microcosmos aeróbios tendo como fonte de carbono 50 mg/L de BTEX, tanto individualmente quanto em misturas binárias, por Chang e colaboradores (2001). O consórcio foi capaz de degradar totalmente, quando fornecidos sozinhos, benzeno, tolueno e etilbenzeno em um intervalo de tempo de 35 horas, mas não degradou completamente o isômero *m*-xileno, mesmo depois de 50 horas de experimento. Os autores testaram todas as possibilidades de misturas binárias, sendo os isômeros *m*- e *p*-xileno foram degradados rapidamente na presença de benzeno, enquanto o etilbenzeno reduziu as taxas de degradação destes compostos. O isômero *o*-xileno não foi degradado sob nenhuma circunstancia testada.

Já um estudo realizado por Jo et al. (2008) usando uma mistura de bactérias (*Pseudomonas sp.*, *Yarrowia sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Corynebacterium sp.*, e *Sphingomonas sp.*) em microcosmos aeróbios, contendo meio mineral e aportados com 45 mg/L de cada um dos BTEX, demonstrou que o consórcio degradou totalmente todos os compostos dentro de um período 20 horas.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Em relação ao tratamento de derivados da gasolina, os processos biológicos ainda são a melhor opção em termo de custo-benefício. Os micro-organismos estão presentes nos mais diversos ambientes em grande quantidade de espécies e representantes, sendo a forma de vida mais abundante no solo. Desta forma, os micro-organismos tem um papel fundamental na recuperação de águas subterrâneas contaminadas com BTEX, mas, de acordo com a literatura, a capacidade de degradação destes compostos varia mesmo entre bactérias da mesma espécie e também de acordo com a forma que o BTEX é fornecido, individual ou simultaneamente. Para este trabalho foram selecionadas cinco cepas isoladas de área contaminada com BTEX para que se possa estudar o comportamento das mesmas frente aos substratos de interesse.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análises por cromatografia gasosa/Fotoionização (CG/PID)

As análises foram executadas em um cromatógrafo a gás (Trace GC Ultra, Thermo Electron Corporation, Milan, MI, Italy) acoplado a um detector de fotoionização – PID (Thermo Electron Corporation, Milan, MI, Italy) e um injetor automático de *headspace* (Triplus RSH, Thermo Electron Corporation, Milan, MI, Italy) conectados a um computador com o software *ChromQuest*.

Para a calibração do método foi estabelecido um protocolo baseado nos métodos U.S. EPA 5021 (compostos orgânicos voláteis em solos e outras matrizes sólidas usando análise de equilíbrio de *headspace*) e U.S. EPA 8260b (compostos orgânicos voláteis por cromatografia gasosa e espectrometria de massa). Foram utilizados padrões de calibração certificados de BTEX (AccuStandard, Inc., New Haven, CT) e, como padrão interno, o composto clorobenzeno-d5 (AccuStandard, Inc., New Haven, CT).

As amostras, pré-diluídas em metanol em concentrações definidas, foram preparadas em solução modificadora de matriz (solução saturada de NaCl com pH 2,0). Para amostragem por *headspace*, o amostrador automático foi programado para equilibrar a temperatura das amostras a 80 °C por 3 minutos, com agitação de 10 segundos em intervalos de 10 segundos e, depois do equilíbrio, a agulha coletou 500 µL do headspace, injetando 100 µL na coluna capilar.

Para a separação dos compostos pelo método de cromatografia gasosa, foi utilizada uma coluna capilar TR-1 com comprimento de 30 m, 0,32 mm de diâmetro interno e 3 µm de espessura de filme (Thermo Electron Corporation, Milan, MI, Italy), com a seguinte rampa térmica: temperatura inicial de 70 °C, mantida por 1 minuto, aquecimento de 70 °C a 100 °C a 20 °C/min, mantida por 7 minutos. O injetor foi mantido a 230 °C no modo splitless. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio com um fluxo de 5 mL/min. A detecção dos compostos foi realizada à temperatura de 200 °C no detector. A presença dos analitos-alvo foi avaliada pelo tempo de retenção dos mesmos, analisado a partir do pelo programa *ChromQuest*, sendo os resultados comparados com testes realizados pela injeção de compostos de alta pureza isoladamente.

3.2 Meio Mínimo Líquido

Foi utilizado, no preparo dos microcosmos e ensaios de crescimento, o meio mínimo líquido para prover nutrientes inorgânicos essenciais aos microrganismos, e tamponar as soluções a pH 7,0.

Para a preparação do meio foram adicionados, à água esterilizada: 1,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 g/L de EDTA, 15 mL/L de tampão fosfato de potássio 15 mM (pH 7,0), 0,5 mL de solução estoque de vitaminas e 0,5 mL de solução estoque de elementos-traço.

A solução de vitaminas continha 50 mg/L de ácido p-amino benzóico, 100 mg/L de piridoxina, 50 mg/L de tiamina, 50 mg/L de riboflavina, 50 mg/L de ácido nicotínico, 50 mg/L de pantotenato de cálcio, 50 mg/L de ácido lipóico, 50 mg/L de nicotinamida, 50 mg/L de vitamina B12, 20 mg/L de biotina e 20 mg/L de ácido fólico. A solução de elementos-traço, por sua vez, é composta de 8 g/L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 70 mg/L de ZnCl_2 , 100 mg/L de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 120 mg/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 25 mg/L de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 15 mg/L de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 25 mg/L de $\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

3.3 Dinâmica de crescimento em BTEX para culturas puras

Para os testes de dinâmica de crescimento em BTEX, foram utilizadas as cepas previamente isoladas por DORR (2008) disponíveis no laboratório. Os organismos utilizados são provenientes de uma indústria de tintas imobiliárias que se encontra em uma área de 10,2 ha, próximo à Rodovia Raposo Tavares, no município de Cotia, São Paulo. A contaminação ocorreu devido a vazamentos dos tanques de armazenamento de solventes e tubulações subterrâneos. A amostra proveniente do campo foi dividida em três alíquotas, sendo que uma delas foi prontamente usada, uma permaneceu sob-refrigeração por três semanas e a outra foi acondicionada sob temperatura ambiente por três semanas. As alíquotas foram utilizadas como inoculo em erlenmeyers contendo meio mínimo líquido. Cada ensaio recebeu um dos BTEX isoladamente, para permitir o enriquecimento dos micro-organismos. Após o crescimento nos compostos de BTEX, foi realizado o isolamento dos micro-organismos presentes em cada erlenmeyer através do plaqueamento das culturas em meio R2A e TSA. Os organismos isolados no meio R2A receberam o prefixo R em sua nomenclatura, enquanto aqueles que foram isolados das placas contendo TSA iniciam seus nomes com a letra T. A segunda letra de cada cepa corresponde ao nome do composto que foi fornecido para o seu

enriquecimento (B= benzeno, por exemplo). A terceira e última letra diz respeito a forma de armazenamento da amostra do campo (A = amostra utilizada prontamente; B = amostra refrigerada á 4 °C durante 3 semanas e C = amostra mantida a temperatura ambiente por 3 semanas).

Tabela 8- Cepas previamente isoladas e identificadas usadas para repetição dos testes microbiológicos.

cepa	sequenciamento do DNAr 16S
RBB	<i>Serratia marcescens</i>
TTA	<i>Serratia marcescens</i>
TBB	<i>Burkholderia cepacia</i>
REB	<i>Burkholderia cepacia</i>
RTC	<i>Enterobacter sp.</i>

Foram montados cultivos com culturas puras para verificar a capacidade de um dos compostos do BTEX de induzir as vias metabólicas de degradação dos outros compostos. Para tanto, as cepas foram cultivadas tendo como fonte de carbono os quatro BTEX e quando apresentaram densidade óptica de 1, foram inoculadas em novos meios, que continham, como única fonte de carbono, um dos quatro compostos do BTEX. Após atingirem uma densidade óptica de 1, cada cultivo foi utilizado como inóculo para mais quatro cultivos, cada um deles contendo um dos quatro BTEX. Para a montagem dos microcosmos, em Erlenmeyers de 250 mL esterilizados, foram adicionados 1 mL de inóculo em 100 mL de meio mínimo. Os compostos BTEX foram fornecidos no interior de pequenos tubos de ensaio com um furo de 0,7 mm na tampa, de onde o composto volatiliza e é solubilizado no meio de cultura. Cada cepa foi testada em triplicata, na presença de 1 dos 4 diferentes substratos (benzeno, tolueno, etilbenzeno ou xileno), individualmente. Para verificação do crescimento foram realizadas medições em espectrofotômetro, por densidade ótica, a 520 nm.

Figura 10- Esquema de experimentos de dinâmica de crescimento de cada uma das cepas em B, T, E e X.

3.4 Microcosmos aeróbios para avaliação da cinética de degradação de BTEX

A partir das culturas puras foram montados microcosmos para avaliar a taxa de degradação do BTEX. Cada uma das cinco cepas foi submetida aos quatro compostos individualmente (B, T, E e X) e simultaneamente (BTEX) (Figura 11). Foram testadas três concentrações de biomassa para os ensaios de biodegradação individual de BTEX: 0,01 g/L, 0,05 g/L e 0,1 g/L. Para o teste de biodegradação simultânea foi testada apenas a concentração de 0,1 g/L de biomassa. Foi feito um controle que não teve adição de inoculo para avaliar as perdas de BTEX para o ambiente e também um controle somente com a adição de células, para garantir que as mesmas não estavam carregando contaminação. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Figura 11- Microcosmos aeróbios para avaliação da cinética de degradação. Cada uma das condições foi testada para três concentrações de biomassa diferentes, gerando 51 microcosmos para cada cepa estudada. As letras A, B e C indicam as biomassas usadas, sendo que: A = 0,01 g/L; B = 0,05 g/L; e C = 0,1 g/L.

Para a montagem dos microcosmos, foram adicionados 50 mL de meio mínimo em frascos de penicilina de 100 mL. Os frascos foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min a 1 atm. Cada frasco recebeu 1000 µg/L de um dos BTEX individualmente ou 1000 µg/L de cada um dos quatro BTEX simultaneamente. Esta concentração foi escolhida visando não causar toxicidade celular, uma vez que estudos prévios com estas cepas mostraram que grandes quantidades de substrato afetam negativamente o crescimento das mesmas. Os frascos foram tampados com septo de butila e lacrados com lacre de alumínio. Os microcosmos foram incubados a temperatura ambiente. As amostras foram coletadas em intervalos de 1 hora para tolueno, etilbenzeno e xilenos e em intervalos de 1,5 horas para o benzeno, devido sua conhecida recalcitrância. Nos ensaios com os quatro BTEX, o intervalo de coleta foi de 1 hora. As amostras coletadas foram diluídas em solução modificadora de matriz para a injeção no cromatógrafo.

3.5 Curvas de peso seco

Para que fosse possível fazer o ajuste das concentrações de biomassa nos microcosmos, foram construídas curvas de peso seco x densidade óptica para cada cepa a ser testada. Para tanto, as culturas foram centrifugadas em dois tubos falcons de 50 ml à 8000 rpm durante 10 minutos. Os pellets de células foram ressuspensos em meio de cultura e centrifugados novamente. Este processo foi repetido mais duas vezes. Ao final da centrifugação, as células de um dos tubos foram ressuspensas em aproximadamente 10 ml de meio mínimo, e as células do segundo falcon foram ressuspensas em 100 ml de água destilada. Após este processo, 10 ml da segunda suspensão foram levados à estufa a 80 °C durante 24 horas para a quantificação do peso seco da suspensão mãe. Também foram feitas diluições seriadas da suspensão mãe para a medição da densidade óptica. A partir do peso seco obtido da suspensão mãe foi possível calcular o peso seco de cada diluição realizada e, com estes dados, construir um gráfico do peso seco x densidade óptica. Também foi medida a densidade óptica das células ressuspensas em meio mínimo, para posterior diluição nos microcosmos.

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Calibração da metodologia de análise por cromatografia gasosa

A Figura 6 apresenta o cromatograma obtido pelo método cromatográfico modificado para a análise de compostos BTEX. Pode-se verificar que ocorreu boa separação de todos os compostos da mistura, inclusive entre etilbenzeno e m,p-xileno, que são compostos que praticamente co-eluem, e que não houve formação de caudas.

Figura 12- Cromatograma de mistura de BTEX, referente ao ponto de concentração de 200 µg/L da curva de calibração. Do terceiro ao último pico: benzeno, tolueno, clorobenzeno, etilbenzeno, m,p-xileno e o-xileno, respectivamente.

Uma vez obtidos índices satisfatórios de reprodutibilidade, repetibilidade e robustez, foi possível construir uma curva de calibração utilizando padrões certificados e avaliando-se a integração dos picos. Para cada composto construiu-se uma curva de calibração de 6 pontos, com concentrações de padrões que variaram de 3 a 200 µg/L.

A relação entre a área do pico e a concentração do analito é expresso por uma equação matemática, a curva de calibração. Para definir adequadamente a relação entre a concentração e a resposta é necessário que se utilize um número suficiente de padrões (de 5 a 8) devendo abranger toda a gama de concentrações esperadas (SHAH et al., 1991).

A qualidade do resultado de um método analítico é altamente dependente da qualidade da curva de calibração, uma vez que a concentração do composto de interesse em uma amostra desconhecida é calculada a partir dos resultados de análise de regressão obtidos da curva de calibração. De acordo com o método U.S. EPA 8000, para o propósito de quantificação, o coeficiente de correlação deve ser superior a 0,9, em uma calibração linear.

As curvas de calibração foram construídas com seis pontos, com as seguintes concentrações: 3 µg/L; 10 µg/L, 25 µg/L, 50 µg/L, 100 µg/L e 200 µg/L. Para o o-xileno não foi possível utilizar o primeiro ponto da curva, pois este ficou abaixo do limite de quantificação do equipamento. São apresentadas as curvas de calibração para cada composto, com os respectivos coeficientes de correlação (r) e equações de reta (figura 7). Observa-se boa linearidade para todos os compostos, evidenciada pelos coeficientes bastante próximos de 1.

Figura 13- Curvas de calibração dos compostos BTEX.

4.2 Dinâmica de crescimento em BTEX para culturas puras

Os resultados obtidos pela construção de curvas de crescimento frente aos diferentes substratos, utilizando culturas puras enriquecidas em benzeno, tolueno, etilbenzeno e mistura dos isômeros de xileno e posteriormente usadas como inóculo para novos cultivos podem ser visualizados nas Figuras 14, 15, 16, 17 e 18.

Figura 14- Perfis de crescimento da cepa RBB (*Serratia marcescens*) frente aos quatro substratos (B, T, E, X), onde: $\diamond$ = benzeno; $\square$ = tolueno; $\triangle$ = etilbenzeno e $\circ$ = xileno. A= crescimento da cepa adaptada em benzeno, repicada em B, T, E e X isoladamente; B= crescimento da cepa adaptada em tolueno, repicada em B, T, E e X isoladamente; C= crescimento da cepa adaptada em etilbenzeno, repicada em B, T, E e X isoladamente; D= crescimento da cepa adaptada em xileno, repicada em B, T, E e X isoladamente.

Figura 15-Perfis de crescimento da cepa TBB (*Burkholderia cepacia*) frente aos quatro substratos (B, T, E, X), onde: $\diamond$ = benzeno; $\square$ = tolueno; $\triangle$ = etilbenzeno e $\circ$ = xileno. A= crescimento da cepa adaptada em benzeno, repicada em B, T, E e X isoladamente; B= crescimento da cepa adaptada em tolueno, repicada em B, T, E e X isoladamente; C= crescimento da cepa adaptada em etilbenzeno, repicada em B, T, E e X isoladamente; D= crescimento da cepa adaptada em xileno, repicada em B, T, E e X isoladamente.

Figura 16- Perfis de crescimento da cepa REB (*Burkholderia cepacia*) frente aos quatro substratos (B, T, E, X), onde: $\diamond$ = benzeno; $\square$ = tolueno; $\triangle$ = etilbenzeno e $\circ$ = xileno. A= crescimento da cepa adaptada em benzeno, repicada em B, T, E e X isoladamente; B= crescimento da cepa adaptada em tolueno, repicada em B, T, E e X isoladamente; C= crescimento da cepa adaptada em etilbenzeno, repicada em B, T, E e X isoladamente; D= crescimento da cepa adaptada em xileno, repicada em B, T, E e X isoladamente.

Figura 17- Perfis de crescimento da cepa TTA (*Serratia marcescens*) frente aos quatro substratos (B, T, E, X), onde: $\diamond$ = benzeno; $\square$ = tolueno; $\triangle$ = etilbenzeno e $\circ$ = xileno. A= crescimento da cepa adaptada em benzeno, repicada em B, T, E e X isoladamente; B= crescimento cepa adaptada em tolueno, repicada em B, T, E e X isoladamente; C= crescimento da cepa adaptada em etilbenzeno, repicada em B, T, E e X isoladamente; D= crescimento da cepa adaptada em xileno, repicada em B, T, E e X isoladamente.

Figura 18- Perfis de crescimento da cepa RTC (*Enterobacter sp.*) frente aos quatro substratos (B, T, E, X), onde: $\diamond$ = benzeno; $\square$ = tolueno; $\triangle$ = etilbenzeno e $\circ$ = xileno. A= crescimento da cepa adaptada em benzeno, repicada em B, T, E e X isoladamente; B= crescimento da cepa adaptada em tolueno, repicada em B, T, E e X isoladamente; C= crescimento da cepa adaptada em etilbenzeno, repicada em B, T, E e X isoladamente; D= crescimento da cepa adaptada em xileno, repicada em B, T, E e X isoladamente.

A cepa RBB apresentou perfis de crescimento semelhantes para benzeno, tolueno e etilbenzeno, independente de qual tenha sido o substrato em que foi previamente adaptada. O crescimento em xileno foi claramente mais lento para todos os quatro experimentos. A cepa TBB, que assim como a RBB também foi isolada a partir de um cultivo em benzeno, apresentou perfis de crescimento muito similares para benzeno, tolueno e etilbenzeno, independente do substrato do qual foram provenientes. O crescimento em xileno foi mais discreto que aquele apresentado nos outros substratos.

A cepa REB (figura 16), proveniente de enriquecimento em etilbenzeno, apresentou melhores crescimentos em tolueno e baixo crescimento quando o substrato foi xileno. No entanto, não foi verificada fase lag quando o xileno foi a única fonte de carbono. As cepas TTA e RTC (figuras 17 e 18), ambas isoladas de cultivos com tolueno, tiveram crescimento ligeiramente melhor no composto em que foram enriquecidas, mas este crescimento foi bastante semelhante ao de benzeno e etilbenzeno. Assim como para as outras cepas, elas apresentaram menor crescimento em xileno.

Em áreas contaminadas, existe a presença de todos os compostos BTEX, e não apenas um deles. Sendo assim, a degradação dos mesmos pode ocorrer de forma simultânea pela microbiota presente, ou ainda pode haver interações negativas ou positivas entre os compostos. Frente a este cenário, foi realizado um experimento que visou avaliar se as culturas puras disponíveis no laboratório têm suas vias metabólicas induzidas quando expostas a um composto diferente daquele em que foram previamente cultivadas. A observação da ocorrência, ou não, de fase lag, é um bom indicativo para inferir se as vias

metabólicas estão induzidas quando os microrganismos são expostos a algum composto. Se existe a fase lag, a via metabólica precisa ser ativada, pois há a necessidade da expressão de enzimas específicas, o que causa um atraso no início da degradação de um determinado composto. As duas principais vias de degradação aeróbias que levam a degradação dos compostos BTEX são o ataque de dioxigenases no anel aromático (via TOD) e o ataque das monooxigenases aos substituintes metil (via TOL) (MIKESELL et al., 1993). Hidrocarbonetos aromáticos geralmente são hidroxilados a dióis (catecóis) (CAFARO et al., 2004) e os anéis são subsequentemente degradados a intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, por *orto*- ou *meta*-dioxigenases (ATLAS, 1995). Segundo Gibson et al. (1974), o benzeno pode ser metabolizado pela via TOD, unicamente, enquanto que o tolueno pode estar sujeito à oxidação por ambas as vias.

Zhang et al. (2013), testaram a capacidade de indução da atividade degradadora de cada um dos BTEX, em um estudo semelhante a este apresentado, medindo o consumo de oxigênio da bactéria *Mycobacterium cosmeticum* byf-4. As células cultivadas com apenas um dos BTEX induziram o consumo de oxigênio não apenas para o composto em que foram pré-cultivadas, mas também para os outros três compostos, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho. Deeb e Alvarez-Cohen (1999) obtiveram resultados que mostraram que um consórcio enriquecido em tolueno foi capaz de crescer utilizando apenas xileno como fonte de carbono, da mesma forma que ocorreu nos presentes experimentos para todas as cepas testadas.

Deng e colaboradores (2017) não observaram fase lag em seus cultivos quando as concentrações de BTEX fornecidas para o crescimento foram mais baixas do que 50 mg/L. Os resultados também mostraram que quanto maiores as concentrações do substrato, maior era o tempo de fase lag apresentada e maior a biomassa gerada, sugerindo que é necessário um tempo adicional para a indução de enzimas usadas para a oxidação de uma grande quantidade de BTEX. No presente trabalho também não foi observada ocorrência de fase lag, apoiando a afirmação feita pelos referidos autores.

As cepas estudadas neste projeto apresentaram um baixo crescimento quando o xileno foi a única fonte carbono disponível no meio, independente de qual tenha sido o substrato de onde o inóculo foi proveniente. A razão para este acontecimento pode residir no fato de que crescimento na presença de xileno envolve a oxidação dos seus isômeros *p*-, *m*- e *o*-, sendo que a degradação dos mesmos depende de enzimas específicas para cada isômero em algumas reações. Desta forma, o crescimento em xileno pode demorar mais tempo para ocorrer devido à necessidade de síntese destas enzimas específicas (ALVAREZ; VOGEL, 1991). Nagarajan e

Loh (2015) relataram que o *o*-xileno é mais recalcitrante do que os outros dois isômeros. Sendo assim, as cepas podem necessitar de mais tempo para apresentar maior crescimento quando utiliza estes isômeros como única fonte de carbono. A composição do reagente usado neste trabalho é de 20% do isômero *orto*-, 40% do *meta*- e 20% de *para*-xileno,

Os genes que codificam uma das vias de degradação de tolueno, etilbenzeno e xileno mais conhecidas, que empregam uma monooxigenase, estão localizados em plasmídeos TOL. Embora esses plasmídeos variem entre eles, codificam vias que são muito semelhantes (JINDROVÁ et al., 2001). Em muitos casos, a degradação de contaminantes orgânicos é iniciada por sistemas de degradação que já se encontram presentes, ou mesmo ativos, no metabolismo dos micro-organismos, os quais possuem indução gênica e especificidade a substratos mais flexíveis (HAIGLER et al., 1992; WACKETT, 1996). Desta forma, observamos resultados como os aqui apresentados, nos quais os micro-organismos são capazes de crescer em substratos diferentes daqueles em que foram adaptados, conferindo vantagens para a biorremediação de áreas contaminadas. Na via metabólica TOD as primeiras reações de degradação são cruciais para substitutos de benzeno serem catabolizados, uma vez que as últimas reações enzimáticas, aquelas que ocorrem a partir da formação do piruvato, usam os mesmos intermediários, independente de qual o tipo de substituição no anel aromático (EATON; MOSQUEDA et al., 1999; TIMMIS, 1986). Cho et al. (2000) relataram que as três primeiras enzimas da via metabólica TOD possuem especificidade relaxada ao substrato, ou seja, podem se ligar a um grande conjunto de compostos, conferindo aos micro-organismos capacidade de degradar mais de um composto aromático através de uma única via. O sistema TOD tem uma vasta gama de substratos, incluindo compostos monoaromáticos, alguns halogenados aromáticos e vários compostos alifáticos clorados (WOO et al., 2000).

A figura 19 traz as taxas de crescimento médio de cada uma das cepas testadas para os compostos BTEX. Fica claro que para todas as cepas o crescimento específico em xileno foi muito baixo e que as velocidades de crescimento em tolueno se destacam, exceto para um caso na cepa RTC e um na cepa REB (*Enterobacter sp.* e *Burkholderia cepacia*). De um modo geral, as taxas de crescimento obtidas estão suportadas pelos achados de outros autores, que também encontraram um crescimento melhor em tolueno, seguido de benzeno, etilbenzeno e xilenos (BOTTON; PARSONS, 2006; CHANG et al., 2001; KHODAEI et al., 2017; LOH, 2015; NAGARAJAN;).

Figura 19- Taxas de crescimento médio das cepas RBB, TBB, TTA, REB e RTC para cada um dos quatro substratos de BTEX.

A velocidade de crescimento dos micro-organismos, como um crescimento mais rápido em tolueno do que em xileno, depende não somente das características microbiológicas, mas também das características físico-químicas dos compostos fornecidos como fonte de carbono, no caso dos experimentos realizados, nos quais os substratos foram fornecidos em forma de vapor. A pressão de vapor é uma medida da tendência de evaporação de um líquido, quanto maior for a sua pressão de vapor, mais volátil será o líquido. Qualquer que seja a temperatura, a tendência é de o líquido volatilizar até atingir equilíbrio termodinâmico com o vapor. Em termos cinéticos, esse equilíbrio se manifesta quando a taxa de líquido vaporizado é igual à taxa de vapor condensado. Para as culturas neste trabalho, foram usados Erlenmeyers com um tubo de tampa furada que permitiu que os compostos volatilizassem para o *headspace* e depois ficassem solúveis no meio de cultura, atingindo um equilíbrio entre todas as fases. Só pode haver mais volatilização quando houver algum tipo de perda no meio de cultura ou no vapor presente no *headspace*. Este tipo de cultivo representa melhor as condições encontradas em campo, onde existe a água, o ar e os compostos, muitas vezes em fase livre, volatilizando e se solubilizando. O benzeno é o composto que possui as maiores solubilidade e pressão de vapor (tabela 6) devendo haver assim, maior disponibilidade deste composto no meio de cultura. Por outro lado, etilbenzeno e xilenos possuem uma pressão de vapor baixa, não havendo a evaporação destes compostos se não houver perdas do mesmo, pois o sistema tende sempre ao equilíbrio. Uma vez que os isômeros de xileno podem não ser considerados substratos de crescimento para algumas bactérias (KHODAEI et al., 2017), é possível que este seja o motivo de as densidades ópticas e taxas de crescimento em xileno serem baixas. Já o tolueno, por estar mais disponível no meio de cultura do que etilbenzeno e xilenos e por poder ser degradado pelas vias TOD e TOL, é um substrato no qual o crescimento é mais bem sucedido para os micro-organismos.

4.3 Microcosmos aeróbios para avaliação da cinética de degradação de BTEX

Estudos com microcosmos são valiosos para se distinguir as reações químicas bióticas das abióticas, estudar processos biogeoquímicos isoladamente, investigar os efeitos tóxicos e avaliar o impacto de receptores e doadores de elétrons sobre as taxas de biodegradação relacionadas às estratégias de bioremediação. Os micro-organismos cultivados a partir dos microcosmos podem, ainda, ser isolados por técnicas de cultura apropriadas, permitindo assim uma ligação entre a identidade microbiana e o processo biogeoquímico apresentado em determinada área (MADSEN, 2005).

4.3.1 Degradação De um único substrato

Foram feitos microcosmos com concentrações iniciais de 1000 µg/L de cada um dos BTEX para cada uma das cepas estudadas. Foi observado que todas elas foram capazes de degradar os BTEX individualmente, com taxas de remoção que variaram de 59% a 97,9%, no caso mais promissor. As figuras 20 a 24 trazem os resultados da degradação individual dos BTEX realizada por cada uma das bactérias.

Figura 20- Degradação de um único substrato cepa RBB (*Serratia Marcescens*) onde: $\diamond$ = 0,01 g/L de biomassa; $\square$ = 0,05 g/L de biomassa; $\triangle$ = 0,1 g/L de biomassa.

As cepas RBB e TTA se mostraram mais hábeis na degradação do tolueno, que teve sua porcentagem de remoção acima dos 90% para todas as condições de biomassa testadas, dentro do tempo de amostragem realizado. A cepa RBB removeu 86% de benzeno, 96,5% de

tolueno, 92,9% de etilbenzeno e 87,4% de xilenos totais. Para a cepa TTA, os resultados de remoção foram: 91,8% de benzeno, 94,4% de tolueno, 90,6% de etilbenzeno e 70,6% de xilenos totais, considerando os ensaios com a maior quantidade de biomassa para ambas as cepas.

Figura 21- Degradação de um único substrato cepa TTA (*Serratia marscescens*) onde: $\diamond$ = 0,01 g/L de biomassa; $\square$ = 0,05 g/L de biomassa; $\triangle$ = 0,1 g/L de biomassa.

A cepa TBB degradou 89,5% de tolueno, 89,3% de benzeno, 89% de etilbenzeno e 74,6% de xilenos totais. Pode-se observar que as taxas de remoção de tolueno, benzeno e etilbenzeno foram muito similares, diferente do resultado encontrado para as outras cepas. Para a cepa REB, da mesma espécie da cepa anterior, os valores de remoção foram: 89,5% de tolueno, 89,3% de benzeno, 89% de etilbenzeno e 74,6% de xilenos totais.

Figura 22- Degradação de um único substrato cepa TBB (*Burkholderia cepacia*) onde: $\diamond$ = 0,01 g/L de biomassa; $\square$ = 0,05 g/L de biomassa; $\triangle$ = 0,1 g/L de biomassa.

Figura 23- Degradação de um único substrato cepa REB (*Burkholderia cepacia*) onde: $\diamond$ = 0,01 g/L de biomassa; $\square$ = 0,05 g/L de biomassa; $\triangle$ = 0,1 g/L de biomassa.

Figura 24- Degradação de um único substrato cepa RTC (*Enterobacter sp.*) onde: $\diamond$ = 0,01 g/L de biomassa; $\square$ = 0,05 g/L de biomassa; $\triangle$ = 0,1 g/L de biomassa.

A cepa RTC foi a que mais eficientemente degradou os compostos, removendo cerca de 98% do tolueno fornecido, seguido por 94,6% de remoção de benzeno, 90,3% de etilbenzeno e 89,3% de xilenos totais.

Degradadoras de amplo espectro, bactérias pertencentes ao gênero *Serratia* foram identificadas como capazes de utilizar hidrocarbonetos de petróleo por Machín-Ramírez et al. (2008) e Abu e Dike (2008). A bactéria *Serratia marcescens*, especificamente, foi descrita, dentre outros compostos, como degradadora de gasolina, querosene, óleo diesel e óleo lubrificante (WONGSA et al., 2004), dibenzofurano (JAISWAL; THAKUR, 2007), pentaclorofenol (SINGH et al., 2008), dos herbicidas glufosinato (HSIAO et al., 2007) e 2,4-D (SILVA et al., 2007), e do pesticida diclorodifeniltricloroetano (DDT) (BIDLAN; MANONMANI, 2002).

Espécies pertencentes ao gênero *Burkholderia* já foram encontradas em locais contaminados (YOSHIDA et al. 2005) e a sua capacidade de utilizar hidrocarbonetos foi estudada em detalhes (MARÍN et al. 2001).

Bactérias pertencentes ao gênero *Enterobacter* foram descritas como degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos (ADOKI e ORUGBANI, 2007; OJO, 2006; TOLEDO et al., 2006), piridina (ADAV et al., 2007), pesticidas (SINGH et al., 2006), inseticida (KARPOUZAS et al., 2000) e di- e triclorobenzeno (ADEBUSOYE et al., 2007). SIDDIQUE et al. (2007) caracterizam a bactéria *Enterobacter hormaechei* como redutora de selênio (Se^{6+}).

Alguns estudos (ABUHAMED et al. 2004; REARDON et al. 2000; YU et al. 2001) observaram a degradação completa do tolueno em microcosmos em um período de 6 horas, o mesmo usado neste projeto, para concentrações iniciais de 15 e 30 mg/L do referido composto. É possível que as cepas aqui estudadas possuam o mesmo potencial de biodegradação, sendo necessário realizar testes com maior quantidade biomassa. Zhang et al. (2013) usaram uma nova cepa, a *Mycobacterium cosmeticum* byf-4, para degradar simultânea e individualmente os compostos BTE(o-)X. Esta bactéria mostrou preferência pela degradação do tolueno, seguida de benzeno, etilbenzeno e *o*-xileno, o mesmo perfil de preferência que os micro-organismos estudados neste estudo apresentaram.

A tabela 7 sumariza as porcentagens de remoção dos compostos quando fornecidos individualmente. É possível observar que a degradação dos isômeros de xileno foi a mais favorecida com a alteração da quantidade de biomassa fornecida, enquanto que a degradação dos outros compostos não sofreu grandes alterações.

Tabela 7- Porcentagem de remoção de cada um dos compostos BTEX, quando fornecidos individualmente.

Composto	Biomassa (g/L)	Porcentagem de remoção				
		RBB	TTA	TBB	REB	RTC
B	0,01	83,2	82,8	86,1	88,1	93,8
	0,05	85,4	89,5	87,6	89,6	94,1
	0,1	86,0	91,8	89,3	90,5	94,6
T	0,01	94,8	91,6	88,5	87,5	97,0
	0,05	95,4	92,9	89,0	89,0	97,5
	0,1	96,5	94,4	89,5	90,8	97,9
E	0,01	90,1	86,3	84,5	86,5	87,5
	0,05	91,5	89,7	86,1	88,1	88,1
	0,1	92,9	90,6	89,0	90,2	90,3
X	0,01	63,9	59,5	67,5	69,5	82,5
	0,05	74,8	65,7	71,7	72,7	86,1
	0,1	87,4	70,6	74,6	76,6	89,3

A indução de enzimas degradadoras envolve a ativação de regiões específicas do genoma bacteriano. Quando alguns substratos-alvo estão presentes, as bactérias iniciam uma cascata de reações bioquímicas que resultam na transcrição de genes que codificam para a síntese das enzimas necessárias para que ocorra a degradação. A via metabólica de degradação de BTEX é dividida em dois estágios: no primeiro estágio ocorre a produção de catecol, 3-metil catecol e 3,4-dimetil catecol, provenientes da oxidação do benzeno, tolueno e xilenos; no segundo estágio estes intermediários são completamente mineralizados a CO_2 e H_2O através de reações que liberam elétrons, energia e carbono para o crescimento (YU et al. 2001).

A figura 25 apresenta as taxas de degradação média que as cepas apresentaram para cada uma das quantidades de biomassa utilizada. Para a taxa de degradação média dos substratos, não foi notado o mesmo padrão visualizado nas porcentagens de remoção dos mesmos, em que os xilenos foram mais favorecidos com o aumento da biomassa disponível nos microcosmos. As taxas de degradação média dos compostos foram ligeiramente maiores quando mais biomassa estava presente.

Figura 25- Taxas de degradação média apresentadas pelas cepas para cada um dos quatro substratos fornecidos em diferentes concentrações de biomassa, onde: ■ = 0,01 g/L de biomassa; ■ = 0,05 g/L de biomassa; e ■ = 0,1 g/L de biomassa.

Uma vez que já é conhecido que um número maior de organismos consegue degradar uma quantidade maior de biomassa, o resultado obtido está dentro do esperado, sendo que o tempo de experimento pode não ter permitido uma grande proliferação dos micro-organismos, que atuaram, essencialmente, com a quantidade de biomassa fornecida no início do ensaio.

É possível que a concentração de substrato não tenha sido a necessária para a promoção do crescimento da biomassa, o que vai de acordo com Jo et al. (2008), que relataram que níveis muito altos ou muito baixos de substrato afetam negativamente este crescimento.

4.3.2 Degradação da mistura de BTEX

As figuras 26 a 30 apresentam os resultados da degradação simultânea dos BTEX para cada cepa. É possível afirmar que houve degradação biológica em todos os casos, uma vez que o controle abiótico não apresentou perdas significativas dos compostos para o ambiente. Foi possível observar um aumento da degradação de benzeno, etilbenzeno e xilenos totais quando todos os BTEX foram fornecidos simultaneamente. Os relatos sobre a taxa de degradação de BTEX quando fornecidos simultaneamente são contraditórios. Os autores Alvarez e Vogel (1991) sugerem que o aumento da degradação de benzeno quando pequena quantidade de tolueno foi fornecida, indica que o tolueno promove aumento da atividade microbiana pelo fato de afetar a indução enzimática. Esta mesma indução enzimática pode ter sido a causa do aumento da biodegradação dos outros compostos, quando na presença de tolueno, no presente caso. Já os autores Lee e Lee (2002), mostraram que a cepa de *Ralstonia sp.* PSH1 apresentou menores tempos para a degradação dos compostos BTEX quando estes foram fornecidos de forma individual do que quando estavam presentes em forma de mistura.

Figura 26- Degradação simultânea de BTEX pela cepa RBB (*Serratia Marcescens*) onde: $\diamond$ = benzeno; $\square$ = tolueno; $\triangle$ = etilbenzeno; $\times$ = xileno e $*$ = branco.

A cepa RBB foi capaz de degradar 96,6% do tolueno durante as 9 horas do experimento, enquanto esta taxa ficou em 94,9% para benzeno, 95,3% para etilbenzeno e 91,5% para xilenos totais. Já a cepa TTA, pertencente a mesma espécie da cepa anterior, apresentou um aumento de 1,7% na degradação de tolueno, 0,6% para benzeno, 3,4% para etilbenzeno e 19,4% para xileno, quando comparada a degradação individual destes substratos.

Figura 27- Degradação simultânea de BTEX pela cepa TTA (*Serratia Marcescens*) onde: $\diamond$ = benzeno; $\square$ = tolueno; $\triangle$ = etilbenzeno; $\times$ = xileno e $*$ = branco.

A cepa TBB, da espécie *Burkholderia cepacia*, apresentou taxas de remoção de 94% de tolueno, 91,5% de benzeno, 92% de etilbenzeno e 85% de xilenos totais, resultando em um aumento na remoção de todos os compostos, quando comparado com os resultados do fornecimento individual dos BTEX. Para a cepa REB, os valores de degradação de BTEX na forma de mistura foram de 95,6%, 93,9%, 94,3% e 91,5% para tolueno, benzeno, etilbenzeno e xilenos, respectivamente.

Figura 28- Degradação simultânea de BTEX pela cepa TBB (*Burkholderia cepacia*) onde: $\diamond$ = benzeno; $\square$ = tolueno; $\triangle$ = etilbenzeno; $\times$ = xileno e $*$ = branco.

Figura 29- Degradação simultânea de BTEX pela cepa REB (*Burkholderia cepacia*) onde: $\diamond$ = benzeno; $\square$ = tolueno; $\triangle$ = etilbenzeno; $\times$ = xileno e $*$ = branco.

A cepa RTC foi a que apresentou maiores taxas de remoção dos BTEX quando fornecidos em forma de mistura, seguindo o padrão apresentado no ensaio de biodegradação de substratos individuais. Para este ensaio, as quantidades dos compostos que foi removida ficaram em 97,6% para o tolueno, 96,9% para o benzeno, 95,3% para o etilbenzeno e 92,6% para xilenos totais.

Figura 30- Degradação simultânea de BTEX pela cepa RTC (*Enterobacter sp.*) onde: $\diamond$ = benzeno; $\square$ = tolueno; $\triangle$ = etilbenzeno; $\times$ = xileno e $*$ = branco.

Deeb e Alvarez-Cohen (1999) relataram que a presença de benzeno ou tolueno tiveram efeitos negativos nas taxas de degradação de xileno durante um ensaio de degradação de misturas de BTEX, indo contra os achados deste trabalho, no qual a degradação dos xilenos foi maior quando na presença dos outros BTEX do que quando foi fornecido individualmente.

Abuhamed et al. (2004) estudaram a biodegradação de benzeno, tolueno e fenol como misturas binárias e ternárias. Eles constataram que a presença de benzeno e fenol como cosubstratos não afetou a biodegradação de tolueno. No entanto, a presença de tolueno e fenol afetaram negativamente a degradação de benzeno, efeito esse que não foi percebido neste estudo. Em contraste com o estudo citado anteriormente, Yoshikawa et al. (2016) sugeriram que o tolueno não causou efeito algum sobre a degradação de benzeno.

Diversos fatores ambientais podem ativar ou reprimir a expressão gênica e, assim, modular a atividade microbiana (ANDREONI; GIANFREDI, 2007). Com relação à degradação de BTEX, muitas enzimas requerem indução, e o indutor deve estar presente em concentrações maiores do que o limite mínimo de indução necessário (CORSEUIL; ALVAREZ, 1996). Na Tabela 8 estão representados alguns indutores e a proteína reguladora vinculados à degradação de alguns compostos aromáticos por bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*.

Tabela 8- Indutores requeridos para degradação de substratos específicos por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*.

Gênero bacteriano	Substrato (s)	Proteína reguladora	Indutor(es)
<i>Pseudomonas</i>	tolueno, <i>m</i> - e <i>p</i> -xileno	XylR	tolueno, xileno, <i>p</i> -clorobenzaldeído, alquilbenzil álcoois, <i>m</i> -amino- e <i>o</i> - e <i>p</i> -nitrotolueno
<i>Pseudomonas</i>	tolueno, <i>o</i> -xileno e fenol	TouR	<i>o</i> -, <i>m</i> -, e <i>p</i> -cresol, 2,3-, 2,4-, 2,5- e 3,4-dimetilfenol
<i>Burkholderia</i>	tolueno	TbuT	benzeno, tolueno, etilbenzeno, <i>o</i> -xileno, fenol, <i>o</i> - e <i>m</i> -cresol e trichloroetileno
<i>Burkholderia</i>	tolueno e benzeno	TbmR	benzeno, tolueno, etilbenzeno, <i>o</i> -xileno, fenol, <i>o</i> - e <i>m</i> -cresol e triclouroetileno

Fonte: Adaptado de Tropel e van der Meer, 2004.

O aumento da taxa de degradação de tolueno e benzeno para a *Burkholderia* pode ser explicado através da tabela 8, que mostra que todos os BTEX atuam como indutores para a degradação destes dois compostos.

A tabela 9 traz a comparação nas porcentagens de remoção de BTEX, comparando a degradação dos mesmos quando fornecidos individualmente e em forma de mistura.

Tabela 9- Diferença nas porcentagens de remoção dos compostos BTEX comparando os resultados dos testes de degradação simultânea com a degradação de um único substrato.

Cepas	<i>Diferença em %</i>			
	B	T	E	X
RBB	8,9	0,1	2,4	4,1
TTA	1,7	0,6	3,4	19,4
TBB	2,2	4,5	3,0	10,4
REB	3,4	4,8	4,1	14,9
RTC	2,3	0,3	-5	3,3

De forma geral, a degradação dos compostos foi maior quando estes foram fornecidos em forma de mistura. Em seu estudo, Khodaei e colaboradores (2017), obtiveram resultados que mostraram que o *m*-xileno não foi degradado quando fornecido sozinho, mas quando este foi fornecido em forma de mistura com os outros BTEX, ele foi metabolizado. Ainda de acordo com os autores, isto pode ter ocorrido por conta das enzimas metabólicas, que são essenciais para a degradação do *m*-xileno, estarem sendo produzido durante a degradação dos

outros compostos presentes, o que possivelmente resultou na oxidação de um substrato não considerado adequado para o crescimento. O aumento expressivo na degradação dos xilenos obtido no presente estudo pode ter sido pelo mesmo motivo, podendo ter havido indução das enzimas de degradação do m-xileno quando este estava presente na mistura de BTEX, fazendo com que o consumo deste isômero tenha aumentado a porcentagem total de remoção. Lee e Lee (2002) demonstraram em seu trabalho que uma cepa de *Ralstonia sp.* PHS1 foi capaz de degradar m- e p-xileno quando estes estavam presentes em forma de mistura juntamente com os outros BTEX, no entanto, esta bactéria não apresentou capacidade de crescer nestes substratos quando fornecidos sozinhos. Este resultado sugere que ambos os compostos podem ser co-metabolizados em conjunto com outros compostos.

Alguns estudos provaram que os isômeros de xileno podem ser melhor removidos por co-metabolismo pelas seguintes razões: 1) os produtos da fissão do anel de diferentes catecóis são catabolizados por diferentes sistemas enzimáticos (DUGGLEBY; WILLIAMS, 1986) ; e 2) possível acúmulo e polimerização de intermediários como ácido toluóico, tolualdeído e ácido metilsalicílico durante a degradação de xileno (CHANG et al., 1993; DAVEY; GIBSON, 1974).

Jo et al. (2008) fizeram um estudo estatístico sobre sinergismo e antagonismo durante a remoção de misturas de BTEX e relataram que altas concentrações de tolueno na mistura resultaram em uma inibição de 24% na degradação do etilbenzeno. Da mesma forma, obtivemos uma redução na porcentagem de remoção de etilbenzeno para a cepa RTC, que pode ter sido causada pelo efeito antagonista do tolueno. Rogers e Reardon (2000) atribuíram a degradação concomitante dos compostos aromáticos à indução não específica de enzimas de biodegradação de substratos similares ou a convergência de vias catabólicas para a degradação de diversos substratos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Todas as cepas demonstraram preferência pelo crescimento em tolueno, assim como baixa densidade celular quando xileno foi a única fonte de carbono disponível.
- Os quatro BTEX são capazes de induzir as vias de degradação uns dos outros nas cinco cepas estudadas.
- A cepa que melhor degradou os compostos foi a RTC, uma *Enterobacter sp.* No caso das duas *Serratia marscescens* e as duas *Burkholderia cepacia*, uma cepa de cada espécie se mostrou melhor degradadora que a outra.
- Tolueno foi o composto mais bem degradado para todas as cepas. Em contraste com o tolueno, a degradação do xileno foi a mais lenta.
- Todas as cepas degradaram tolueno, etilbenzeno e xilenos até concentrações abaixo dos valores de potabilidade estipulados. No entanto, isto não ocorreu quando o substrato foi benzeno.
- A quantidade de biomassa utilizada neste trabalho não apresentou diferenças relevantes na taxa de remoção dos compostos.
- Quando os BTEX foram fornecidos em forma de mistura, houve um aumento nas taxas de remoção dos mesmos, provavelmente ocorrida pela ação sinérgica que os compostos têm sobre as vias de degradação.

REFERÊNCIAS

ABU, G. O.; DIKE, P. O. A study of natural attenuation processes involved in a microcosm model of a crude oil-impacted wetland sediment in the Niger Delta. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4761-4767, 2008.

ABUHAMED, T.; BAYRAKTAR, E.; MEHMETOĞLU, T.; MEHMETOĞLU, U. Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 983–988, 2004.

ADOKI, A.; ORUGBANI T. Removal of crude petroleum hydrocarbons by heterotrophic bacteria in soils amended with nitrogenous fertilizer plant effluents. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 13, p. 1529-1535, 2007.

AL-KHALID, T.; EL-NAAS, M. H. Aerobic biodegradation of phenols: a comprehensive review, **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 1631–1690, 2011.

ALVAREZ, P.; VOGEL, T. Substrate interactions of benzene, toluene, and *para* -xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 2981–2985, 1991.

AN, H. R.; PARK, H. J.; KIM, E. S. Cloning and expression of thermophilic catechol 1,2-dioxygenase gene (catA) from *Streptomyces setonii* , **FEMS Microbiology Letters**, v. 195, p. 17–22, 2001.

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

ATLAS, R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, p. 178-182, 1995.

ATTAWAY, H.; SCHMIDT, M. Tandem biodegradation of BTEX components by two *Pseudomonas* sp. **Current Microbiology**, v. 45, p. 30–36, 2002.

ATTEIA, O.; GUILLOT, C. Factors controlling BTEX and chlorinated solvents plume length under natural attenuation conditions. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 90, p. 81–104, 2007.

BAPTISTA, S. J. *Avaliação do Emprego de Biossurfactante na Biorremediação de Solos Contaminados com Óleo Diesel*. 2007. 141 f. Tese (Doutorado em Química) – Escola de Química, Universidade federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BARONA, A., ELIAS, A., ARIAS, R., ACHA, E., CANO, I. Desorption and biofiltration for the treatment of residual organic gases evolved in soil decontamination processes. **Chem. Eng. Technol.**, V 30, p. 1499–1505, 2007.

BENTO, F.M., CAMARGO, F.A.O., OKEKE, B.C., FRANKENBERGER, W.T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1049-1055, 2005.

BIDLAN, R.; MANONMANI, H. K. Aerobic degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by *Serratia marcescens* DT-1P. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 49-56, 2002.

BOSSERT, I.; BARTHA, R. The fate of petroleum in soil ecosystems. In Atlas, R. M. (ed.), *Petroleum microbiology*. New York: Macmillan Publishing Co., 1984. p. 434-476.

BOTTON, S.; VAN HARMELEN, M.; BRASTER, M.; PARSONS, J. R.; RÖLING, W. F. M. Dominance of Geobacteraceae in BTX-degrading Enrichments From an Iron-Reducing Aquifer. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 62, p. 118-130, 2007.

BOTTON, S.; PARSONS, J. R. Degradation of BTEX compounds under iron-reducing conditions in Contaminated aquifer microcosms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, p. 2630–2638, 2006.

BRAIDA, W.J.; ONG, S.K. Air sparging effectiveness: laboratory characterization of air-channel mass transfer zone for VOC volatilization. **Journal of Hazardous Material**, v. B87, p. 241-258, 2001.

CAFARO, V.; IZZO, V.; SCOGNAMIGLIO R.; NOTOMISTA, E.; CAPASSO, P.; CASBARRA, A.; PUCCI, P.; DI DONATO, A. Phenol hydroxylase and toluene/*o*-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, p. 2211–2219, 2004

CAMPOS, J.L.E., 1999. Análise numérica do transporte de contaminantes em meios Porosos com reações Químicas, Tese de Doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Civil, Rio de Janeiro.

CAVALCA, L.; DELL'AMICO, E.; ANDREONI, V. Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p 576–587, 2004.

CERNIGLIA, C. E. 1984. Microbial transformation of aromatic hydrocarbons, p. 99-128. In R. M. Atlas (ed.), *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 26 mar. 2017.

CETESB - COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 26 mar. 2017.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução nº 420. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas, 2009.

CHANG, M. K.; VOICE, T. C.; CRIDDLE, C. S. Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in the biodegradation of benzene, toluene and *p*-xylene by two *Pseudomonas* isolates. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 41, p. 1057–1065, 1993.

CHANG, S. W. LA, H. J. LEE, S. J. Microbial degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers (BTEX) contaminated groundwater in Korea. **Water Science and Technology**, v. 44, p. 165–171, 2001.

CHAPELLE, F. H. **Ground-water microbiology and geochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 424 p.

CHEN, K.; KAO, C.; CHEN, C.; SURAMPALLI, R. Y.; LEE, M. Control of petroleum-hydrocarbon contaminated groundwater by intrinsic and enhanced bioremediation. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, p. 864–871, 2010.

CHEN, Y. D.; BARKER, J. F.; GUI, L. A strategy for aromatic hydrocarbon bioremediation under anaerobic conditions and the impacts of ethanol: a microcosm study. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 96, p. 17–31, 2008.

CHONG, N.; CHIOU, J. Biodegradation of BTE in soil by indigenous microbial populations with and without biogenic substrates. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 26, p. 1587–1594, 2010.

CLEARY, R.W., 1991. Qualidade da Água Subterrânea, *In*: Hidrogeologia Ambiental, Rubem La Laina Porto (editor), Editora ABRH.

CLEMENT, T.P., SUN, Y., HOOKER, B.S.; PETERSEN, J.N., 1997. Modeling natural attenuation of contaminants in saturated groundwater, Proceedings of the Fourth International *in situ* and on Site Bioremediation Conference, New Orleans, 37 – 42.

COLLINS, L. D.; DAUGULIS, A J. Benzene/toluene/*p*-xylene degradation. Part I. Solvent selection and toluene degradation in a two-phase partitioning bioreactor. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 52, p. 354-359, 1999.

COONEY, J. J. 1984. **The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems**, p. 399-434. In Atlas, R. M. (ed.), *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Co., New York.

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, P. J. J. Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Water Science and Technology**, v. 34, p. 311–318, 1996.

COZZARELLI, I. M.; BAEHR, A. L. **Volatile fuel hydrocarbons and MTBE in the environment**, In: Heinrich, D. H.; Karl, K. T. (Eds.). *Treatise on Geochemistry*. Oxford: Pergamon, 2003. p. 433–474.

CUNHA, C.D.; LEITE, S.G.F. Optimization of some environmental conditions to enhance gasoline biodegradation in soil microcosm bioaugmented with *Pseudomonas putida*. **Revista de Microbiologia**, v. 2, p. 129-124, 1997.

CUNNINGHAM, D. "The Biodegradation of Crude Oil in the Marine Environment". Masters of Science Thesis, Department of Civil Engineering, Texas A and M University. (1990).

DAVEY, J. F.; GIBSON, D. T. Bacterial metabolism of *para*- and *meta*-xylene: oxidation of a methyl substituent, **J. Bacteriol.**, v. 119, p. 923–929, 1974.

DEEB, R. A. COHEN, L. A. Aerobic Biotransformation of Gasoline Aromatics in MultiComponent Mixtures. **Biorremediation journal**, v. 4, p. 171-179, 2000.

DEEB, R.A.; COHEN, L.A. Temperature effects and substrate interaction during the aerobic biotransformation of BTEX mixture by toluene-enriqueched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n.5, p. 526-536, 1999.

DENG, Y.; YANG, F.; DENG, C.; YANG, J.; JIA, J.; YUAN, H. Biodegradation of BTEX Aromatics by a Haloduric Microbial Consortium Enriched from a Sediment of Bohai Sea, China. **Appl Biochem Biotechnol**, 2017.

DIAS, A. E. X. O. (2000) Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos. In: SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA, R. M. (Org.) Resíduos Sólidos, Ambiente e Saúde: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 142 p.

DOU, J.; LIU, X.; HU, Z. Substrate interactions during anaerobic biodegradation of BTEX by the mixed cultures under nitrate reducing conditions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 158, p. 264–272, 2008.

DRAGUN, J. 1998. The soil chemistry of hazardous materials. Massachusetts: Amherst Scientific Publishers Ed., 830 p.

DUGGLEBY, C. J.; WILLIAMS, P. A. Purification and some properties of the 2-hydroxy-6-oxohepta-2,4-dienoate hydrolase (2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase) encoded by the TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonasputida* MT-2, J. **Gen. Microbiol.**, v. 132, p. 717–726, 1986.

EZQUERRO, O.; TENA, M.; ORTIZ, G.; PONS, B. Determination of BTEX in soils by multiple headspace solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1035, p.17- 22, 2004.

FARHADIAN, M.; VACHELARD, C.; DUCHEZ, D.; LARROCHE, C. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5296–5308, 2008.

FLOODGATE, G. 1984. **The fate of petroleum in marine ecosystems**. 355-398. In Atlas R. M. (ed.), Petroleum microbiology. Macmillan Publishing Co., New York.

FRASER, M.; BARKER, J. F.; BUTLER, B.; BLAINE, F.; JOSEPH, S.; COOKE, C. Natural attenuation of a plume from an emplaced coal tar creosote source over 14 years. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 100, p. 101–115, 2008.

FREDRICKSON, J.K.; BALKWILL, D. L.; DRAKE, G. R.; ROMINE, M. F.; RINGELBERG, D. B.; WHITE, D. C. Aromatic-degrading *sphingomonas* isolates from the deep subsurface. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, 1995.

FRITSCH, W.; HOFRICHTER, M. Aerobic degradation by microorganisms. Biotechnology, Wiley-VCH Verlag, p. 144–167, 2001.

GIBBS, C. F.; PUGH, K. B.; ANDREWS, A. R. Quantitative studies on marine biodegradation of oil. **Proc. R. Soc. London Ser.**, v. 188, p. 83-94, 1975.

GIBSON, D. T. Subramanian. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons, In: GIBSON, D. T. (Ed.). Microbial Degradation of Organic Compounds. New York: Dekker, 1984. p. 181-252.

GIBSON, D. T.; MAHADEVAN, V.; DAVEY, J. F. Bacterial metabolism of *para*- and *meta*-xylene: oxidation of the aromatic ring. **Journal of Bacteriology**, v. 119, n. 3, p. 930-936, 1974.

HANG, L.; ZHANG, C.; CHENG, Z.; YAO, Y.; CHEN, J. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by the bacterium *Mycobacterium cosmeticum* byf- 4. **Chemosphere**, v. 90, p. 1340–1347, 2013.

HENDRICKX, B.; JUNCA, H.; VOSAHLOVA, J.; LINDNER, A.; RUEGG, I.; Bucheli-Witschel, M. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, p. 250–265, 2006.

HOLLENDER, J.; ALTHOFF, K.; MUNDT, M.; DOTT, W. Assessing the microbial activity of soil samples, its nutrient limitation and toxic effects of contaminants using a simple respiration test. **Chemosphere**, v. 53, p. 269-275, 2003.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Carcinogenicity evaluation of BTEX, v. 71, p. 829, 1999. Disponível em: <<http://www.iarc.fr>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

JAISWAL, P. K.; THAKUR, I. S. Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading *Serratia marcescens* from alkalophilic bacterial consortium of the chemostat. **Current Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 447-454, 2007

JIANG, B.; ZHOU, Z.; DONG, Y.; TAO, W.; WANG, B.; JINGWEI, J.; GUAN, X. Biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and o-, m-, and p-Xylenes by the Newly Isolated Bacterium *Comamonas* sp. JB. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 176, p. 1700–1708, 2015.

JINDROVA, E.; CHOCOV 'A, M.; DEMNEROV 'A, K.; BRENNER, V. Bacterial aerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene. **Folia Microbiologica**, v. 47, p. 83–93, 2002.

JO, M.; RENE, E. R.; KIM, S.; PARK, H. An analysis of synergistic and antagonistic behavior during BTEX removal in batch system using response surface methodology. **Journal of Hazardous Materials**, v. 152, p. 1276–1284, 2008.

JOHNSON, G.; OLSEN, R. Multiple pathways for toluene degradation in *Burkholderia* sp. strain JS150. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4047–4052, 1997.

JOHNSON, R.L.; JOHNSON, P.C.; McWHORTER, D.B.; HINCHEE, R.E.; GOODMAN, I. An overview of in situ air sparging. **Groundwater Monitoring Remediation**, v. 13, n. 4, p. 127-135, 1993.

JOHNSON, S. J.; WOOLHOUSE, K. J.; PROMMER, H.; Barry, D. A.; CHRISTOFI, N. Contribution of anaerobic microbial activity to natural attenuation of benzene in groundwater. **Engineering Geology**, v. 70, p. 343–349, 2003.

JUCK, D.; CHARLES, T.; WHITE, L.G.; GREER, G.W. Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 33, p. 241–249, 2000.

KAO, C. M.; CHEN, S. C.; LIU, J. K.; WANG, Y. S. Application of microbial enumeration technique to evaluate the occurrence of natural bioremediation. **Water Research**, v. 35, p. 1951–1960, 2001.

KARPOUZAS, D. G.; MORGAN, J. A. W.; WALKER, A. Isolation and characterization of ethoprophos-degrading bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 33, p. 209-218, 2000.

KHAN, R.F.; WANG, W.W.; CAO, D.R.; DOERGE, D.; WENNERSTROM, C.E. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of genes encoding a polycyclic aromatic ring dioxygenase from *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3577–85, 2001.

KHODAEI, K.; NASSERY, H. R.; ASADI, M. M.; MOHAMMADZADEH, H.; MAHMOODLU, M. G. BTEX biodegradation in contaminated groundwater using a novel strain (*Pseudomonas* sp. BTEX-30). **Int. Biodeterior. Biodegr.**, v. 116, p. 234–242, 2017.

KIM, D.; KIM, Y-S.; KIM, S-K.; KIM, S. W. ZYLSTRA, G. J. KIM, Y. M.; KIM, E. Monocyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by *Rhodococcus* sp. Strain DK17. **Appl Environ Microbiol.** 2002 Jul; v. 68, p.3270–3278, 2002.

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

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

LEE, S.; LEE, J.; JAHNG, D. Degradation of BTEX and trichloroethylene by *Pseudomonas putida* F1 and *Burkholderia cepacia* G4. **Korean J. Biotechnol. Bioeng.**, vol. 13, p. 561-568, 1998.

LEE, S.; LEE, S. B. Substrate Utilization Patterns During BTEX Biodegradation by an o-Xylene-Degrading Bacterium *Ralstonia* sp. PHS1 J. **Microbiol. Biotechnol.**, v. 12, p. 909–915, 2002.

MACDONALD, M.G. & HARBAUGH, A.W., 1988. A modular three - dimensional finite difference groundwater flow model, Book 6 Modeling Techniques, Scientific Software Group, Washington.

MACHÍN-RAMÍREZ, C.; OKOH, A. I.; MORALES, D.; MAYOLO-DELOISA, K.; QUINTERO, R.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R. Slurry-phase biodegradation of weathered oily sludge waste. **Chemosphere**, v. 70, p. 737-744, 2008.

MADSEN, E. L. Identifying microorganisms responsible for ecologically significant biogeochemical processes. **Nat Rev Microbiol.**, v. 3, p. 439–446, 2005.

MAIER, U.; RUGNER, H.; GRATHWOHL, P. Gradients controlling natural attenuation of ammonium. **Applied Geochemistry**, v. 22, p. 2606–2617, 2007.

MARGENSIN, R.; WALDER, G.; SCHINNER, F. Bioremediation assessment of a BTEX-contaminated soil. **Acta Biotechnology**, v. 23, v. 1, p.29-36, 2003.

MARÍN, M. M.; SMITS, T. H. M.; VAN BEILEN, J. B.; ROJO, F. The alkane hydroxylase gene of *Burkholderia cepacia*RR10 is under catabolite repression control. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 4202–4209, 2001.

MARLEY, M.C.; HAZEBOUCK, D.V.; WALSH, M.T. The application of in situ air sparging as an innovative soils and ground water remediation technology. **Ground Water Monitoring e Remediation**, v. 12, n. 2, p. 137-145, 1992.

MATTNEY, G. C. **Assessment and remediation of petroleum contaminated sites**. Flórida: CRC Press, 1994. 384 p.

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; ANGELIS, D.d.F. de; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 4334–4340, 2010.

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.

MORASCH, B.; RICHNOW, H. H.; SCHINCK, B.; VIETH, A.; MECKENSTOCK, R. U. Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5191-5194, 2002.

NAGARAJAN, K.; LOH, K-C. Formulation of microbial cocktails for BTEX biodegradation. **Biodegradation**, v. 26. P. 51-63, 2015.

NEUHAUSER, E. F.; RIPP, J. A.; AZZOLINA, N. A.; MADSEN, E. L.; MAURO, D. M.; TAYLOR, T. Monitored natural attenuation of manufactured gas plant tar mono- and polycyclic aromatic hydrocarbons in ground water: A 14-year field study. **Ground Water Monitoring and Remediation**, v. 29, p. 66–76, 2009.

NIELSEN, D. R.; MCLELLAN, P. J.; DAUGULIS, A. J. Direct estimation of the oxygen requirements of *Achromobacter xylosoxidans* for aerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in a bioscrubber. **Biotechnol. Lett.**, v. 28 p. 1293–1298, 2006.

NYER, E.K. (1998) In: Groundwater and soil remediation: practical methods and strategies. Ann Arbor Press, Michigan apud ROSADO, A. (2005) Microbiologia e Biorremediação de Petróleo e Derivados. Rio de Janeiro: Núcleo de Ciências Ambientais/UFRJ, 62 p.

OJO, O. A. Petroleum-hydrocarbon utilization by native bacterial population from a wastewater canal Southwest Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 333-337, 2006.

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, p. 4098–4104, 2000.

PROVIDENTI, M.A., LEE, H.; TREVORS, J.T. Selected factors limiting the microbial degradation of recalcitrant compounds. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 12, p. 379-395, 1993.

REARDON, M. D.; ROGERS, J. B. Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, p. 385–400, 2000.

REDDY, K.R.; KOSGI, S.; ZHOU, J. A review of in situ air sparging for the remediation of VOC-contaminated saturated soils and groundwater. **Hazard Waste Hazard Mat**, v. 12, p. 97-118, 1995.

REGGIANI, L. postos têm dívida ambiental de R\$ 3 bi. Folha de São Paulo, 29 de agosto de 1999.

RISER-ROBERTS, E. **Remediation of Petroleum Contaminated Soil: Biological, Physical, and Chemical Processes**. Boca Raton: CRC Press LLC. 1998.

ROLING, W.F.M.; MILNER, M.G.; JONES, D.E.; LEE, K.; DANIEL, F.; Swannell, R.J.P.; HEAD, I.M. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, p. 5537–5548, 2002.

RYAN, M. P.; PEMBROKE, J. T.; ADLEY, C. C. *Ralstonia pickettii* in environmental biotechnology: potential and applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 754-764, 2007.

SCHEREIBER, M.E.; BAHR, J.M. Nitrate-enhanced bioremediation of BTEX-contaminated groundwater: parameter estimation from natural-gradient tracer experiment. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 55, p. 29-56, 2002.

SCOW, K.M., HICKS, K.A. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p.1-8, 2005.

SEAGREN, E. A.; ASCE, A. M.; BECKER, J. G. Review of Natural Attenuation of BTEX and MTBE in Groundwater. **Pract. Period. Hazard. Toxic Radioact. Waste Manage.**, v. 6, p. 156-172, 2002.

SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I. J.; SKELLY, J. P.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C. T.; COOK, C. E.; MCDOWALL, R. D. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.*, v. 16, p. 249-255, 1991.

SHIM, H. YANG, S. T. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* immobilized in a fibrous-bed bioreactor. **J Biotechnol.**, v. 67, p. 99-112, 1999.

SHIM, H.; HWANG, B.; LEE, S-S.; KONG, S-H. Kinetics of BTEX Biodegradation by a Coculture of *Pseudomonas Putida* and *Pseudomonas Fluorescens* Under Hypoxic Conditions. **Biodegradation**, v. 16, p. 319-327, 2005.

SHIM, H.; SHIN, E.; YANG, S.-T. A continuous fibrous-bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 203–216, 2002.

SHINODA, Y.; SAKAI, Y.; UENISHI, H.; UCHIHASHI, Y.; HIRAISHI, A.; YUKAWA, H. Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. Strain DNT-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1385–1392, 2004.

SIDDIQUE, T.; FEDORAK, P. M.; MACKINNON, M. D.; FOGHT, J. M. Metabolism of BTEX and naphta to methane in oil sands tailing. **Environmental Science Technology**, v. 41, p. 2350-2356, 2007.

SIHAG, S.; PATHAK, H.; JAROLI, D. P. Factors Affecting the Rate of Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons. **Int. J. Pure App. Biosci**, v. 2, p. 185-202, 2014.

SILVA, R. L. B.; TEÓFILO, C. M. B.; MONTEIRO, C. N.; BRILHANTE, O. M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a

saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 18, p. 1599-1607, 2002.

SILVA, T. M.; STETS, M. I.; MAZZETTO, A. M.; ANDRADE, F. D.; PILEGGI, S. A. V.; FAVERO, P. R.; CANTU, M. D.; CARRILHO, E.; CARNEIRO, P. I. B.; PILEGGI M. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 522-525, 2007.

SINGH, B. K.; WALKER, A.; WRIGHT, D. J. Bioremedial potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: Influence of different environmental conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 2682-2693, 2006.

SINGH, S.; CHANDRA, R.; PATEL, D. K.; REDDY, M. M. K.; RAI, V. Investigation of the biotransformation of pentachlorophenol and pulp paper mill effluent decolorisation by the bacterial strains in a mixed culture. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5703-5709, 2008.

SMITH, M. R. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria, In: Ratledge, C. (Ed.). *Physiology of Biodegradative Microorganisms*. Netherlands: Springer, 1991. p. 191–206.

SPAIN, J. C.; VAN VELD, P.A. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum, and chemical structure. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, 428-435, 1983.

SPAIN, J. C.; PRITCHARD, P. H.; BOURQUIN, A. W. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 40, p. 726-734, 1980.

STEPHENS, S. BTEX Metabolism Metapathway Map. 2011.

SUTHERLAND, J.B. RAFII, F. KHAN, A.A., CERNIGLIA, C.E. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation, in *Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. **Wiley-Liss**, p. 269–306, 1995.

SWOBODA-COLBERG, N.G. **Chemical contamination of the environment: sources, types, and fate of synthetic organic chemicals.** In: LY Young & CE Cerniglia (Eds) *Microbial Transformations and Degradation of Toxic Organic Chemicals*. P. 27–74, 1995. Wiley-Liss Inc., New York.

THOMAS, J.M.; WARD, C.H. In situ bioremediation of organic contaminants in the subsurface. **Environmental Science Technology**, v. 23, p. 760-766, 1989.

TOLEDO, F. L.; CALVO, C.; RODELAS, B.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 244-252, 2006.

TROPEL, D.; VAN DER MEER, J. R. Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 3, p. 474-500, 2004.

TSAO, C. W.; SONG, H. G.; BARTHA, R. Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4924–4929, 1998.

U.S. Congress Office of Technology Assessment, "Bioremediation for Marine Oil Spills - Background Paper.

VAN HAMME, J.D.; SINGH, A.; WARD, O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 67, p. 503–549, 2003.

VERSTRAETE, W.; VANLOOKE, R.; DEBORGER, R.; VERLINDE, A..Modelling of the breakdown and the mobilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers. In Sharpley, J. M.; Kaplan, A. M. (ed.), *Proceedings of the 3rd International Biodegradation Symposium*. London: Applied Science Publishers Ltd., 1976. p. 99-112.

WANG, L.; SHAO, Z. Isolation and characterization of 4 benzene / toluene degrading bacterial strains and detection of related degradation genes. **Chinese Journal of Microbiology**, v. 46, 2006.

WANG, X.; DESHUSSES, M. A. Biotreatment of groundwater contaminated with MTBE: interaction of common environmental co-contaminants, **Biodegradation**, v. 18, p. 37–50, 2007.

WOO, H.J., SANSEVERINO, J., COX, C.D., ROBINSON, K.G., SAYLER, G.S., 2000. The measurement of toluene dioxygenase activity in biofilm culture of *Pseudomonas putida* F1. **J. Microbiol. Meth.**, v. 40, p. 181–191, 2000.

YEOM, S.; DAUGULIS, A.J. Benzene degradation in a two-phase partitioning bioreactor by *Alcaligenes xylosoxidans* Y234. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 765-772, 2001.

YOSHIDA, N.; YAGI, K.; SATO, D. Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles. **J Biosci Bioeng.**, v. 99, p. 143–149, 2005.

YOSHIKAWA, M.; ZHANG, M.; TOYOTA, K. Enhancement and Biological Characteristics Related to Aerobic Biodegradation of Toluene with Co-Existence of Benzene. **Water Air Soil Pollut.**, p. 227-340, 2016.

ZHANG, L.; ZHANG, C.; CHENG, Z.; YAO, Y.; CHEN, J. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by the bacterium *Mycobacterium cosmeticum* byf-4. **Chemosphere**, v. 90, p. 1340–1347, 2013.

ZOBEL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Bacteriological Reviews**, v. 10, p. 1-49, 1946.