

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

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS POR LINHAGENS DE MICRORGANISMOS NATIVOS ISOLADOS
DE SÍTIOS AMBIENTAIS AQUÁTICOS CONTAMINADOS
DO ESTADO DE SÃO PAULO

Candidata: Daniela Martins Mariuzzo
Engenheira de Alimentos
Mestre em Ciências de Alimentos

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Daniela Martins Mariuzzo, aprovada pela Comissão Julgadora em 10 de outubro de 2000.

Campinas, 10 de outubro de 2000



Prof. Dra. Adilma Regina P. Scamparini
Presidente da Banca

Orientador: Prof^a. Dr^a. Adilma Regina Pippa Scamparini

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos

Campinas, agosto de 2000.



89587009x

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA:
TI UNICAMP
M339e
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 43163
 PROC. 16-278/00
 C ☐ D ☒
 PREC. R\$ 11,00
 DATA 07/12/00
 N.º CPD

M339e

CM-00153957-2

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

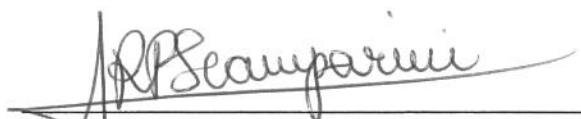
M339e Mariuzzo, Daniela Martins
 Estudo da biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos
 aromáticos por linhagens de microrganismos nativos isolados de
 sítios ambientais aquáticos contaminados do estado de São Paulo
 / Daniela Martins Mariuzzo. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Adilma Regina Pippa Scamparini
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
 Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Biodegradação. 2. Hidrocarbonetos policíclicos
 aromatizados. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência.
 3. Água – Contaminação. I. Scamparini, Adilma Pippa.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia
 de Alimentos. III. Título.

Agua x Poluição

BANCA EXAMINADORA



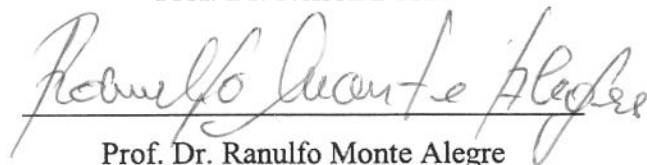
Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini



Profa. Dra. Claire Tondo Vendruscolo



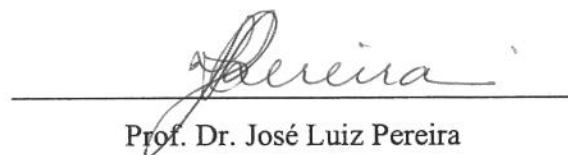
Prof. Dr. Nelson Durán



Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

Prof. Dr. Rubismar Stolf

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore



Campinas, ____ de ____ de 2000.

“Eu estava sentado à mesa a escrever o meu compêndio, mas o trabalho não rendia; os meus pensamentos estavam em outro sítio. Virei a cadeira para a lareira e comecei a dormir. Outra vez começaram os átomos às cambalhotas em frente dos meus olhos. Desta vez os grupos menores mantinham-se modestamente à distância. A minha visão mental, aguçada por repetidas visões desta espécie, podia distinguir agora estruturas maiores com variadas conformações; longas filas, por vezes alinhadas e muito juntas; todas torcendo-se e voltando-se em movimentos serpenteantes. Mas olha! O que é aquilo? Uma das serpentes tinha filado a própria cauda e a forma que fazia rodopiava trocistamente diante dos meus olhos. Como se se tivesse produzido um relâmpago, acordei;...passei o resto da noite a verificar as conseqüências da hipótese. Aprendamos a sonhar, senhores, pois então talvez nos apercebamos da verdade”. Augusto Kekulé, 1865.

Dedico este trabalho a todos os homens que sonham
e realizam seus sonhos...

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Adilma Regina Pippa Scamparini, por me ensinar a ver muito longe e acreditar que nada é impossível.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo excelente suporte financeiro para o desenvolvimento deste trabalho e pela excelência dos serviços prestados à comunidade científica de nosso Estado.

À minha universidade, UNICAMP, por sempre me acolher e me fazer sentir uma pessoa especial e à Faculdade de Engenharia de Alimentos pela possibilidade de desenvolver este trabalho.

Aos professores membros da banca examinadora, pelas sugestões que enriqueceram o trabalho.

À Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore por sempre me incentivar à pesquisa e por participar intensamente da minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. José Luiz Pereira, pela amizade e colaboração nos momentos difíceis.

Às professoras Magdalena Grifoll e Anna Maria Solanas (Universidade de Barcelona) pelo excelente treinamento técnico em seu laboratório.

À Mônica Camargo, pelos momentos felizes que sempre passamos juntas, pelo socorro imediato, e por muito mais...

Aos funcionários da CETESB em Campinas e em São Paulo, aos engenheiros André Camargo e Paulo (RHODIACO) e Plínio e Gonçalves (REPLAN) por toda atenção e boa vontade no fornecimento de amostras e informações.

Ao aluno de iniciação científica, Marcelo Veloso, pela dedicação e desempenho que contribuíram para os resultados deste trabalho.

Aos meus companheiros do laboratório Geral da Ciência, que conseguem transformar a rotina em festa! Obrigada pela paciência e consideração.

Aos funcionários do Departamento de Ciências, da Biblioteca da FEA, do Centro de Informática e da Secretaria de Pós-graduação por sempre oferecerem o apoio necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Luceli e Antonio José por sempre demonstrarem o seu amor por mim.
À minha querida Graziela, tão diferente e tão igual a mim.

Aos queridos Rita e Rayzildo Lobo pelo apoio constante, incentivo e carinho.
Ao Daniel que sempre me acompanhou nos meus vôos mais altos.

ÍNDICE ANALÍTICO

LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XVIII
ABREVIACÕES.....	XX
RESUMO.....	XXI
SUMMARY.....	XXIII
1. INTRODUÇÃO e OBJETIVOS.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Aspectos relacionados à presença de HPAs no meio ambiente.....	4
2.1.1. Origem e estrutura química dos HPAs.....	4
2.1.2. Propriedades físico-químicas dos HPAs.....	8
2.1.3. Presença de HPAs no ambiente.....	9
2.1.4. Biodisponibilidade dos HPAs no meio ambiente.....	11
2.2. Aspectos relacionados ao processo de biorremediação.....	13
2.2.1. Tecnologias de biorremediação de sítios ambientais contaminados.....	13
2.3. Aspectos relacionados à biodegradação de HPAs por bactérias.....	18
2.3.1. Biodegradação de misturas de HPAs.....	22
2.3.2. Rotas metabólicas de degradação microbiológica dos HPAs.....	25
3. METODOLOGIAS.....	30
3.1. Levantamento de informações sobre áreas industriais do Estado de São Paulo possivelmente contaminadas com HPAs.....	30

3.2. Caracterização dos sítios ambientais aquáticos contaminados com HPAs.....	30
3.3. Monitoramento dos sítios ambientais aquáticos.....	30
3.4. Análises Microbiológicas.....	31
3.4.1. Obtenção de linhagens de bactérias degradadoras de HPAs.....	31
3.4.2. Isolamento e purificação das linhagens de bactérias degradadoras de HPAs.....	33
3.4.3. Testes de identificação das linhagens de bactérias degradadoras de HPAs.....	33
3.5. Análises Químicas.....	34
3.5.1. Extração dos HPAs das amostras de água dos rios.....	34
3.5.2. Quantificação e identificação dos HPAs presentes nas amostras de água.....	34
3.5.2.1. Construção das Curvas de Padronização Externa dos HPAs.....	34
3.5.2.2. Condições de análises das amostras de água por CLAE.....	35
3.6. Experimentos de Biodegradação.....	39
3.6.1. Testes de biodegradação de HPAs em placas de Petri.....	39
3.6.2. Testes de biodegradação de HPAs em meio líquido.....	40
3.6.2.1. Avaliação da ação de diferentes surfactantes na solubilidade de HPAs.....	40
3.6.2.2. Avaliação de DMSO, SDS e Tween 80 como agentes inibidores do crescimento celular.....	41
3.6.2.3. Extração de HPAs do meio de cultivo utilizando diferentes solventes.....	41
3.6.3. Testes de biodegradação.....	42
3.6.3.1. Preparo dos inóculos.....	43
3.6.3.2. Preparo dos frascos contendo meio líquido.....	44
3.6.3.3. Avaliação da biodegradação dos HPAs por CLAE.....	44
3.6.3.4. Determinação de biomassa bacteriana.....	44

3.7. Determinação dos metabólitos produzidos durante a biodegradação.....	45
3.7.1. Extração dos metabólitos.....	45
3.7.2. Análise dos extratos neutros e ácidos por CG-EM.....	46
3.8. Monitoramento do sítio aquático para implantação da biorremediação.....	46
3.8.1. Determinação da concentração de HPAs nas amostras de água.....	47
3.8.2. Determinação do número de bactérias nas amostras de água.....	47
3.9. Testes de biodegradação em microambiente.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.1. Levantamento de informações sobre áreas industriais no Estado de São Paulo possivelmente contaminadas com HPAs.....	49
4.2. Caracterização dos sítios ambientais aquáticos contaminados com HPAs.....	58
4.2.1. Isolamento das linhagens degradadoras de HPAs.....	58
4.2.2. Testes de identificação das linhagens.....	63
4.2.3. Quantificação e identificação de HPAs nas amostras de água.....	67
4.2.4. Monitoramento dos rios.....	83
4.3. Experimentos de biodegradação.....	90
4.3.1. Avaliação do crescimento das bactérias em placas contendo HPAs na superfície.....	90
4.3.2. Utilização dos diferentes agentes surfactantes.....	99
4.3.3. Extração de HPAs do meio de cultivo.....	103
4.3.4. Avaliação da biodegradação dos HPAs em meio líquido.....	104
4.3.4.1. Capacidade de biodegradação de HPAs pela bactéria 2B.....	108
4.3.4.2. Capacidade de biodegradação de HPAs pela bactéria 6B.....	111
4.3.4.3. Capacidade de biodegradação de HPAs pela bactéria 7F.....	114
4.3.4.4. Capacidade de biodegradação de HPAs pela bactéria 9D.....	117
4.3.4.5. Capacidade de biodegradação de HPAs por cultivos mistos de bactérias.....	120

4.4. Estudo dos metabólitos da biodegradação.....	123
4.4.1. Análises por CG-EM dos metabólitos produzidos durante os experimentos de biodegradação.....	123
4.5. Características da região do rio Jaguari	132
4.5.1. Medidas de temperatura e pH.....	133
4.5.2. Presença de HPAs nas amostras de água da lagoa.....	135
4.5.3. Avaliação da microflora bacteriana na água da lagoa.....	136
4.6. Biodegradação em microambiente.....	138
5. CONCLUSÕES.....	143
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	145

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Mecanismos de oxidação de HPAs por organismos procarióticos e eucarióticos.	28
FIGURA 2 – Curvas de padronização externa para a identificação e quantificação de HPAs nas amostras de água e nos experimentos de biodegradação em meio líquido.	37
FIGURA 3 – Mapa “Níveis Atuais e Tendências da Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo –1994”, fornecido pela CETESB.	52
FIGURA 4 – Mapa representativo do 3º Grupo de Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos, que inclui os rios Tietê, Pinheiros e Tamanduateí.	53
FIGURA 5 – Mapa representativo do 11º Grupo de Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos, que inclui os rios Cubatão, das Pedras e Quilombo.	54
FIGURA 6 – Mapa representativo do 4º Grupo de Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos, que inclui os rios Atibaia, Jaguari, Piracicaba e Capivari.	55
FIGURA 7 – Mapa representativo do 5º Grupo de Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos, que inclui o rio Sorocaba.	56
FIGURA 8 – Mapa representativo do 9º Grupo de Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos, que inclui o rio Paraíba do Sul.	57
FIGURA 9 – Colônias de bactérias isoladas a partir de amostra de água coletada no rio Atibaia. Meio LB sólido.	60
FIGURA 10 – Colônias de bactérias isoladas a partir de amostra de água coletada no rio Sorocaba. Meio LB sólido.	60
FIGURA 11 – Colônias de bactérias isoladas a partir de amostra de água coletada no rio Tietê. Meio LB sólido.	61
FIGURA 12 – Colônias de bactérias isoladas a partir de amostra de água coletada no rio Paraíba do Sul. Meio LB sólido.	61

FIGURA 13 – Colônias de bactérias isoladas a partir de amostra de água coletada no rio Cubatão. Meio LB sólido. 62

FIGURA 14 – Cromatograma obtido por CLAE para o pool de padrões. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda. 71

FIGURA 15 – Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Jaguari. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda. 72

FIGURA 16 – Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Atibaia. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda. 73

FIGURA 17 – Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Piracicaba. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda. 74

FIGURA 18 – Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Capivari. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda. 75

FIGURA 19 – Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Sorocaba. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda. 76

FIGURA 20 – Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Paraíba do Sul. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda. 77

FIGURA 21 – Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Tietê. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda. 78

FIGURA 22 – Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Pinheiros. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda. 79

FIGURA 23 – Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Tamanduateí. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda. 80

FIGURA 24 – Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Cubatão. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda. 81

FIGURA 25 – Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio das Pedras. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda. 82

FIGURA 26 – Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Quilombo. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T=30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda. 83

FIGURA 27 – Aspecto das colônias da linhagem 2A quando inoculadas em contato com benzo(b)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C. 93

FIGURA 28 – Aspecto das colônias da linhagem 2B quando inoculadas em contato com benzo(b)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C. 93

FIGURA 29 – Aspecto das colônias da linhagem 7D quando inoculadas em contato com benzo(b)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C. 94

FIGURA 30 – Aspecto das colônias da linhagem 7F quando inoculadas em contato com benzo(b)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C. 94

FIGURA 31 – Aspecto das colônias da linhagem 8E quando inoculadas em contato com benzo(b)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C. 95

FIGURA 32 – Aspecto das colônias da linhagem 9D quando inoculadas em contato com benzo(b)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C.	95
FIGURA 33 – Aspecto das colônias da linhagem 7D quando inoculadas em contato com benzo(k)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C.	96
FIGURA 34 – Aspecto das colônias da linhagem 8C quando inoculadas em contato com benzo(k)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C.	96
FIGURA 35 – Aspecto das colônias da linhagem 8E quando inoculadas em contato com benzo(k)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C.	97
FIGURA 36 – Aspecto das colônias da linhagem 7D quando inoculadas em contato com pireno, após 96 horas de crescimento a 25°C.	97
FIGURA 37 – Aspecto das colônias da linhagem 9C quando inoculadas em contato com pireno, após 96 horas de crescimento a 25°C.	98
FIGURA 38 – Aspecto das colônias da linhagem 9D quando inoculadas em contato com pireno, após 96 horas de crescimento a 25°C.	98
FIGURA 39 – Solubilização dos HPAs no meio de cultivo usando diferentes concentrações de DMSO.	100
FIGURA 40 – Solubilização dos HPAs no meio de cultivo usando diferentes concentrações de SDS.	101
FIGURA 41 – Solubilização dos HPAs no meio de cultivo usando diferentes concentrações de Tween 80.	101
FIGURA 42 – Efeito de diferentes surfactantes (0,2%, v/v) no crescimento celular.	102
FIGURA 43 – Efeito de diferentes surfactantes (0,4%, v/v) no crescimento celular.	102
FIGURA 44 – Efeito de diferentes surfactantes (0,6%, v/v) no crescimento celular.	103
FIGURA 45 – Ação dos solventes, acetato de etila, acetonitrila e diclorometano, na extração de fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno presentes no meio de cultivo.	104

FIGURA 46 – Cromatogramas obtidos por CLAE utilizados para a quantificação do fluoranteno no meio de cultivo com a bactéria 2B, EXP 1.	106
FIGURA 47 – Cromatogramas obtidos por CLAE utilizados para a quantificação de fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno no meio de cultivo com a bactéria 9D, EXP 24.	107
FIGURA 48 – Curvas de crescimento da bactéria 2B e consumo de fluoranteno.	108
FIGURA 49 – Curvas de crescimento da bactéria 2B e consumo de b(b)fluoranteno.	109
FIGURA 50 – Curvas de crescimento da bactéria 2B e consumo de b(k)fluoranteno.	109
FIGURA 51– Curvas de crescimento da bactéria 2B e consumo de b(a)pireno.	110
FIGURA 52 – Curvas de crescimento da bactéria 2B e consumo de mistura de HPAs.	110
FIGURA 53 – Curvas de crescimento da bactéria 6B e consumo de fluoranteno.	111
FIGURA 54 – Curvas de crescimento da bactéria 6B e consumo de b(b)fluoranteno.	112
FIGURA 55 – Curvas de crescimento da bactéria 6B e consumo de b(k)fluoranteno.	112
FIGURA 56– Curvas de crescimento da bactéria 6B e consumo de b(a)pireno.	113
FIGURA 57 – Curvas de crescimento da bactéria 6B e consumo de mistura de HPAs.	113
FIGURA 58 – Curvas de crescimento da bactéria 7F e consumo de fluoranteno.	114
FIGURA 59 – Curvas de crescimento da bactéria 7F e consumo de b(b)fluoranteno.	115
FIGURA 60 – Curvas de crescimento da bactéria 7F e consumo de b(k)fluoranteno.	115
FIGURA 61– Curvas de crescimento da bactéria 7F e consumo de b(a)pireno.	116
FIGURA 62 – Curvas de crescimento da bactéria 7F e consumo de mistura de HPAs.	116

FIGURA 63 – Curvas de crescimento da bactéria 9D e consumo de fluoranteno.	117
FIGURA 64 – Curvas de crescimento da bactéria 9D e consumo de b(b)fluoranteno.	118
FIGURA 65 – Curvas de crescimento da bactéria 9D e consumo de b(k)fluoranteno.	118
FIGURA 66– Curvas de crescimento da bactéria 9D e consumo de b(a)pireno.	119
FIGURA 67 – Curvas de crescimento da bactéria 9D e consumo de mistura de HPAs.	119
FIGURA 68– Curvas de crescimento da cultura mista de bactérias (2B, 6B, 7F e 9D) e consumo da mistura de HPAS.	120
FIGURA 69– Curvas de crescimento da cultura mista de bactérias (2B, 6B, 7F e 9D) e consumo da mistura de HPAS.	121
FIGURA 70– Curvas de crescimento da cultura mista de bactérias (2B e 6B) e consumo da mistura de HPAS.	122
FIGURA 71– Curvas de crescimento da cultura mista de bactérias (2B e 6B) e consumo da mistura de HPAS.	122
FIGURA 72 – Cromatograma obtido por CG dos metabólitos neutros produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17). Picos 1, 2 e 3 correspondem aos compostos das FIGURAS 78, 76 e 77, respectivamente.	125
FIGURA 73 – Cromatograma obtido por CG dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17). Picos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem aos compostos das FIGURAS 81, 86, 87, 88, 85 e 84, respectivamente.	125
FIGURA 74 – Cromatograma obtido por CG dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Os picos 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem aos compostos das FIGURAS 81, 83, 82, 85 e 84, respectivamente.	126
FIGURA 75 – Cromatograma obtido por CG dos metabólitos neutros produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Os picos 1, 2, 3 e 4 correspondem aos compostos das FIGURAS 76, 79, 80 e 77, respectivamente.	126

FIGURA 76 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos neutros produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17) e pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: 9-oxo-9,10,11,12-tetra-hidrobenzo(b)fluoranteno. 127

FIGURA 77 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos neutros produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17) e pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: 7-oxo-7,8,9,10-tetra-hidrobenzo(a)pireno. 127

FIGURA 78 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos neutros produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17). Composto provável: 1-oxo-1,2,3,3a-tetra-hidrobenzo(b)fluoranteno. 127

FIGURA 79 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos neutros produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: 12-oxo-9,10,11,12-tetra-hidrobenzo(b)fluoranteno. 128

FIGURA 80 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos neutros produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: 8-oxo-8,9,10,11-tetra-hidrobenzo(k)fluoranteno. 128

FIGURA 81 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17) e pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: ácido benzóico (ácido protocatechuico). 128

FIGURA 82 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: 3-hidroxibenzo(a)pireno. 129

FIGURA 83 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: trans-8,9-di-hidro-8,9-di-hidroxibenzo(k)fluoranteno. 129

FIGURA 84 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17) e pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: trans-7,8-di-hidro-7,8-di-hidroxibenzo(a)pireno. 129

FIGURA 85 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17) e pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: 4,5-di-hidrodiol-benzo(a)pireno. 130

FIGURA 86 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17). Composto provável: trans-1,2-di-hidro-1,2-di-hidroxibenzo(b)fluoranteno. 130

FIGURA 87 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17). Composto provável: trans-1,12-di-hidro-1,12-di-hidroxibenzo(b)fluoranteno. 130

FIGURA 88 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17). Composto provável: trans-9,10-di-hidro-9,10-di-hidroxibenzo(b)fluoranteno. 131

FIGURA 89 – Alterações de temperatura e pH do ponto de coleta de amostras na lagoa de tratamento da REPLAN em Paulínia, durante os meses de julho/97 até junho/99. 134

FIGURA 90 – Concentração de HPAs presentes nas amostras de água da lagoa de tratamento da REPLAN em Paulínia, durante os meses de julho/97 a dezembro/97. 135

FIGURA 91 – Concentração de HPAs presentes nas amostras de água da lagoa de tratamento da REPLAN em Paulínia, durante os meses de abril/98 a dezembro/98. 135

FIGURA 92 – Concentração de HPAs presentes nas amostras de água da lagoa de tratamento da REPLAN em Paulínia, durante os meses de janeiro/99 a junho/99. 136

FIGURA 93 – População de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de HPAs presentes nas amostras de água da lagoa de tratamento da REPLAN em Paulínia, durante os meses de julho/97 a dez/97. 137

FIGURA 94 – População de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de HPAs presentes nas amostras de água da lagoa de tratamento da REPLAN em Paulínia, durante os meses de abril/98 a dezembro/98. 137

FIGURA 95 – População de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de HPAs presentes nas amostras de água da lagoa de tratamento da REPLAN em Paulínia, durante os meses de janeiro/99 a junho/99. 138

FIGURA 96 – Alterações na concentração dos HPAs presentes nas amostras de água em contato com sedimento, coletadas na lagoa de tratamento da REPLAN. As amostras foram submetidas ao tratamento de biorremediação em microambiente no laboratório. 139

FIGURA 97 – Alterações na população de bactérias heterotróficas totais presentes nas amostras de água em contato com sedimento, coletadas na lagoa de tratamento da REPLAN. As amostras foram submetidas ao tratamento de biorremediação em microambiente no laboratório. 140

FIGURA 98 – Alterações na população de bactérias degradadoras de HPAs presentes nas amostras de água em contato com sedimento, coletadas na lagoa de tratamento da REPLAN. As amostras foram submetidas ao tratamento de biorremediação em microambiente no laboratório. 140

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Estruturas químicas e efeitos tóxicos dos 16 HPAs considerados como poluentes de prioridade nacional pela Agência de Proteção Ambiental norte-americana.	5
TABELA 2 – Alguns metabólitos de HPAs após oxidação por microrganismos, reportados na literatura.	27
TABELA 3 – Rios do estado de São Paulo de onde foram obtidas as amostras de água para isolamento de bactérias degradadoras de HPAs.	31
TABELA 4 – Concentrações dos padrões de HPAs utilizados nos meios de cultivo.	32
TABELA 5 – Programação de comprimento de onda utilizada para análise dos HPAs por CLAE.	35
TABELA 6 – Soluções de HPAs em éter etílico utilizadas para spray nas placas de Petri.	39
TABELA 7 – Testes de biodegradação com diferentes linhagens de bactérias e diferentes HPAs.	42
TABELA 8 – Testes de biodegradação realizados com bactérias isoladas e na forma de culturas mistas, na presença de misturas de HPAs.	43
TABELA 9 – Número de amostras e de linhagens de bactérias obtidas a partir da metodologia de enriquecimento aeróbio na presença de HPAs como única fonte de carbono.	59
TABELA 10 – Resultado dos testes bioquímicos e morfológicos realizados com as linhagens de bactérias possíveis degradadoras de HPAs, isoladas a partir de amostras de água dos rios do estado de São Paulo.	63
TABELA 11 – Resultado dos testes bioquímicos e morfológicos realizados com as linhagens de bactérias possíveis degradadoras de HPAs, isoladas a partir de amostras de água dos rios do estado de São Paulo.	63
TABELA 12 – Resultado dos testes bioquímicos e morfológicos realizados com as linhagens de bactérias possíveis degradadoras de HPAs, isoladas a partir de amostras de água dos rios do estado de São Paulo.	64
TABELA 13 – Resultado dos testes bioquímicos e morfológicos realizados com as linhagens de bactérias possíveis degradadoras de HPAs, isoladas a partir de amostras de água dos rios do estado de São Paulo.	64

TABELA 14 – Resultado dos testes bioquímicos e morfológicos realizados com as linhagens de bactérias possíveis degradadoras de HPAs, isoladas a partir de amostras de água dos rios do estado de São Paulo.	65
TABELA 15 – Resultado dos testes bioquímicos e morfológicos realizados com as linhagens de bactérias possíveis degradadoras de HPAs, isoladas a partir de amostras de água dos rios do estado de São Paulo.	65
TABELA 16 – Classificação das linhagens de bactérias possíveis degradadoras de HPAs isoladas a partir dos rios do estado de São Paulo.	66
TABELA 17 – Concentrações de HPAs encontrados em rios de várias regiões do mundo.	69
TABELA 18 – Rios pesquisados, tipos de HPAs e concentração total de HPAs encontrados nas amostras de água.	70
TABELA 19 – Condições dos rios no mês de julho de 97.	85
TABELA 20 – Condições dos rios no mês de agosto de 97.	85
TABELA 21 – Condições dos rios no mês de setembro de 97.	86
TABELA 22 – Condições dos rios no mês de outubro de 97.	86
TABELA 23 – Condições dos rios no mês de novembro de 97.	87
TABELA 24 – Condições dos rios no mês de dezembro de 97.	87
TABELA 25 – Condições dos rios no mês de abril de 98.	88
TABELA 26 – Condições dos rios no mês de maio de 98.	88
TABELA 27 – Condições dos rios no mês de junho de 98.	89
TABELA 28 – Condições dos rios no mês de julho de 98.	89

TABELA 29 – Avaliação do crescimento de bactérias em contato com diferentes HPAs em placas de Petri.	90
TABELA 30 – Avaliação do crescimento de bactérias em contato com diferentes HPAs em placas de Petri.	90
TABELA 31 – Avaliação do crescimento de bactérias em contato com diferentes HPAs em placas de Petri.	91
TABELA 32 – Porcentagens de HPAs presentes no meio de cultivo após período de 40 dias de incubação a 25°C e 200 rpm, com diferentes culturas de bactérias indígenas isoladas de sítios ambientais contaminados com HPAs.	105
TABELA 33 – Compostos neutros e ácidos obtidos pelo processo de biodegradação de misturas de HPAs pelas bactérias <i>Moraxella</i> sp, <i>Pseudomonas</i> sp e <i>Acinetobacter</i> sp, na forma de culturas mistas (EXP 17) e pela bactéria <i>Acinetobacter</i> sp como cultura pura (EXP 24).	123

ABREVIACÕES

B(k)F – Benzo(k)fluoranteno
BaP – Benzo(a)pireno
BbF – Benzo(b)fluoranteno
BDH – Bactérias degradadoras de hidrocarbonetos
BHT – Bactérias heterotróficas totais
DMSO – Sulfóxido de metila
EXP – Experimentos de biodegradação
FLU – Fluoranteno
HPA – Hidrocarboneto policíclico aromático
IQA – Índice de qualidade das águas
MA – Microambiente
MIX – Solução de mistura de HPAs
SDS – Dodecil sulfato de sódio

RESUMO

Com a crescente contaminação do meio ambiente devido às atividades realizadas pelo homem, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de apresentar possíveis soluções para a redução da presença de poluentes no meio ambiente. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são considerados poluentes prioritários, sendo agentes mutagênicos e cancerígenos já comprovados. Alguns HPAs de baixo peso molecular são extremamente tóxicos e a maioria dos HPAs com quatro ou mais anéis aromáticos, são considerados agentes genotóxicos e capazes de se acumularem na cadeia alimentar. Os HPAs se originam da combustão incompleta de material orgânico e são eliminados para o meio ambiente através de queimadas, processos industriais, derramamentos de óleo e seus derivados, dentre outras fontes. Devido ao potencial tóxico desses compostos, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para definir os possíveis destinos dos HPAs no meio ambiente. A degradação microbiana, ou biodegradação, é a rota mais utilizada para a eliminação dos HPAs do meio ambiente, sendo os processos de volatilização, sedimentação e fotodecomposição, também responsáveis por sua eliminação. A biorremediação é um processo natural, onde os microrganismos nativos do meio ambiente contaminado são capazes de utilizar os compostos poluentes como única fonte de carbono, transformando-os através de sua biodegradação, em metabólitos não tóxicos, gás carbônico e água. Algumas vezes, os metabólitos intermediários produzidos são mais tóxicos que os contaminantes originais, sendo necessário o estudo da rota metabólica através da qual os compostos são degradados.

O objetivo principal deste trabalho foi o de investigar a ocorrência de microrganismos nativos degradadores de HPAs presentes em sítios ambientais aquáticos do estado de São Paulo, e sua capacidade de biodegradar HPAs presentes nesses locais. Inicialmente, foi feito um levantamento de informações sobre os rios do Estado possivelmente contaminados com HPAs, sendo selecionados 12 rios: Piracicaba, Atibaia, Jaguari, Capivari, Sorocaba, Paraíba do Sul, Tietê, Pinheiros, Tamanduateí, Cubatão, Pedras e Quilombo. A partir desses rios foram retiradas amostras de água para testes microbiológicos e químicos. Para o isolamento e seleção de bactérias degradadoras de HPAs foi utilizada a metodologia de enriquecimento seletivo em Erlenmeyers contendo

meio mineral mínimo e diferentes concentrações de HPAs como única fonte de carbono e energia. Através desta técnica, foi possível o isolamento de 136 linhagens de bactérias, das quais, 25 foram identificadas por testes morfológicos e bioquímicos. Essas 25 linhagens foram testadas em placas de Petri contendo meio mineral sólido e uma camada de spray de HPAs, para verificar a sua resistência e capacidade de crescimento na presença de diferentes HPAs. A partir destes testes, foram selecionadas 4 linhagens que foram utilizadas para os testes de biodegradação em meio líquido, tendo sido testada a capacidade de biodegradação de linhagens de bactérias isoladas e atuando em conjunto, na presença de HPAs puros ou na forma de misturas. A avaliação da capacidade das bactérias em biodegradar os HPAs foi feita através de medidas da biomassa celular contra concentração de HPAs no meio de cultivo (analisada por CLAE). Os metabólitos produzidos durante e ao final do período de incubação foram extraídos do meio de cultivo, analisados por CG-EM, e tentativamente identificados. As amostras de água dos rios também foram analisadas quanto à presença de HPAs, sendo utilizada para isso a metodologia de extração de HPAs estabelecida pela EPA, seguida da análise dos extratos por CLAE. Os 12 rios foram monitorados por vários meses quanto à variação de temperaturas da água e do ambiente, pH, odor e coloração da água, visando obter informações sobre a sazonalidade dessas características. O sítio aquático do rio Jaguari próximo à REPLAN apresentou as concentrações mais elevadas de HPAs em suas amostras, e a lagoa de tratamento final da REPLAN foi escolhida para um monitoramento mais detalhado envolvendo medições mensais da concentração de HPAs, número de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de HPAs. Foi possível a construção de testes piloto em laboratório, chamados testes de biodegradação em microambiente, onde foram reproduzidas as condições ambientais da lagoa de tratamento, obtendo-se resultados para uma posterior reintrodução das linhagens de bactérias degradadoras de HPAs no meio ambiente.

SUMMARY

During many years human activities are being the mainly cause of the increasing levels of environmental pollution. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are a class of potentially hazardous chemicals of environmental and human health concern. Some low-molecular-weight PAH are acutely toxic. Most higher-molecular-weight PAH containing four or more rings are genotoxic and there is a potential for their bioaccumulation into food chains. PAHs are generated during the incomplete combustion of organic material. Usually, PAHs reach the environment during burnt, industrial processes, oil and its derivatives spills and other several processes. Given the knowing hazards associated with these chemicals, there is much interest in their environmental fate. Microbial degradation is the major route through which PAHs are removed from contaminated environment, although other mechanisms such as volatilization, leaching and photodegradation may also be effective. Bioremediation is a natural process in which indigenous microorganisms from the contaminated site are capable of growing using toxical compounds as single carbon source, transforming them to less toxic compounds, carbon dioxide and water. Sometimes, intermediary metabolites are more dangerous than original contaminants, than it is necessary to search which are the metabolics pathways through which bacteria degrade this compounds.

The main purpose of this research was to investigate the indigenous microorganisms occurrence in aquatic sites from São Paulo state and their capability on biodegrade PAHs present in this sites. Initial studies involved the search for information about rivers from São Paulo state possibly contaminated with PAHs. Twelve rivers were found: Piracicaba, Atibaia, Jaguari, Capivari, Sorocaba, Paraíba do Sul, Tietê, Pinheiros, Tamanduateí, Cubatão, Pedras and Quilombo. Water samples from the rivers were analysed through microbiological and chemical tests. Screening of PAHs degraders bacteria was done using a selective enrichment methodology, in Erlenmeyers with mineral minima medium and different PAHs concentrations as sole carbon and energy source. It was possible to isolate 136 bacterial strains, from which, 25 were morphologically and biochemically tested. These 25 strains were tested in Petri dishes containing solid mineral minima medium and a sprayed layer of PAH in its surface. This test was done in order to

verify strains resistance and growth capability in the presence of PAHs. Four strains were selected and submitted to liquid medium biodegradation tests. Strains were inoculated purely or in a mixture of strains in the presence of different PAHs mixtures. Biodegradation of PAHs was tested using cellular biomass x PAHs concentration in the growth medium (using HPLC analysis). Metabolic production during and after incubation period was measured using GC-MS analysis. PAHs concentration in water samples from rivers were determined using EPA extraction procedures and HPLC analysis of extracts. The 12 rivers studied were monitored monthly during one year. Water temperature, pH, odour and colour alterations during different seasons were measured. The Jaguari river aquatic site, close to REPLAN, an oil refinery, showed the highest PAHs concentrations and waste treatment site from REPLAN was chosen to be closely monitored. PAH concentration, total heterotrophic and PAHs degraders bacterial populations were measured monthly. It was possible to conduct pilot-scale tests in laboratory – microcosms bioremediation tests – where waste treatment site conditions were reproduced in order to obtain information for further PAHs degraders bacterial strains re-introduction in the site.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são considerados compostos poluentes de importância prioritária (KEITH & TELLARD, 1979), que possuem características mutagênicas e carcinogênicas já estabelecidas por várias pesquisas (WHITE, 1986; PAHLMANN & PELKONEN, 1987; JACOB *et alli*, 1986 e ZEDECK, 1980).

As atividades antropogênicas têm resultado em um aumento da concentração dos HPAs nos mais variados ambientes, tanto terrestres quanto aquáticos (BJORSETH & RAMDAHL, 1985; LAFLAMME & HITES, 1978 e HITES *et alli*, 1980). Dentre outras fontes de emissão, a combustão incompleta de materiais orgânicos, a descarga de resíduos industriais e os vazamentos de óleo são frequentemente os fatores que mais contribuem para a presença dos HPAs no meio ambiente próximo a sítios urbanos e industriais (LAKE *et alli*, 1979; HITES 1976 e BROWN & MAHER, 1992).

Os rápidos avanços tecnológicos nas indústrias e o desenvolvimento das áreas petroquímica, de solventes, óleos e outros compostos químicos contribuíram para um imenso consumo de produtos químicos elaborados pelo homem. Os compostos aromáticos estão entre os 50 compostos químicos mais produzidos pela indústria, com uma produção anual de milhões de toneladas (BOWER *et alli*, 1992). Estes compostos são largamente usados como combustível e solvente industrial de tintas e desengordurantes, além disso, sua estrutura química é a base para a obtenção de produtos farmacêuticos, agroquímicos, explosivos e poliméricos. Apesar das políticas internacionais do meio ambiente pregarem a filosofia da “clean production” (MACGARVIN & JOHNSTON, 1993), a grande maioria das indústrias ainda não adaptou as suas linhas de produção para redução da emissão de resíduos poluentes, e sabe-se que este não será um objetivo facilmente alcançado, devido à resistência das mesmas em modificarem suas linhas de produção.

Visando obter um entendimento completo sobre a permanência, biodegradabilidade e eliminação dos HPAs em um meio ambiente em particular, estudos sobre a atividade que

os microrganismos exercem sobre estes compostos vêm sendo elaborados em várias partes do mundo.

A biorremediação ou biorrecuperação caracteriza-se como uma tecnologia de recuperação de locais contaminados que utiliza os microrganismos de ocorrência natural (fungos, bactérias e protozoários), para biodegradar compostos perigosos até substâncias não tóxicas. Os microrganismos são capazes de biodegradar poluentes tóxicos, para obtenção de energia, até substâncias como dióxido de carbono, água, sais minerais e gases como metano e sulfeto. Para que este processo ocorra, os contaminantes devem ser substâncias orgânicas, tais como petróleo e seus derivados, preservantes de madeira, como creosoto e pentaclorofenol, compostos halogenados, alifáticos, aromáticos e pesticidas. O poluente funciona como fonte de carbono, sendo necessário o fornecimento de nitrogênio e fósforo, e de um agente oxidante que funcione como receptor de elétrons, além de outros nutrientes específicos (COMITTEE ON *IN SITU* BIOREMEDIATION, 1993). O processo de biorremediação estudado em escala-piloto, quando transferido para o ecossistema onde será aplicado, apresenta falhas, pois o controle preciso das condições de biodegradação e a otimização da atividade catalítica de certos compostos não é possível devido à presença de misturas variadas de poluentes, em diferentes concentrações que irão afetar a taxa de crescimento dos microrganismos.

Para que a credibilidade na biorremediação seja alcançada, profissionais de várias áreas devem trabalhar mantendo estreitas relações, demonstrando que a degradação dos poluentes no meio ambiente é significativa, reprodutível e pode ser monitorada (COLWELL, 1994).

Nos países desenvolvidos, a existência há muitos anos de legislações específicas de proteção ao meio ambiente, forçou o desenvolvimento de pesquisas nesta área. No Brasil, onde somente há alguns anos tem sido voltada atenção para esta área, faz-se necessária a aplicação de princípios científicos básicos em conjunto com os esforços de grandes indústrias e entidades que incentivem esses tipos de projetos.

Este trabalho teve como objetivos:

- Avaliação de sítios ambientais aquáticos através da coleta de amostras de água e sedimentos contaminados para verificar a presença e identificar HPAs. Determinação do sítio ambiental para estudo da biorremediação.
- Isolamento de microrganismos nativos de sítios ambientais aquáticos contaminados por HPAs.
- Estudo da capacidade de biodegradação de HPAs encontrados no sítio, realizada por microrganismos nativos.
- Estudo da capacidade de biodegradação de misturas de HPAs, por microrganismos nativos, atuando isoladamente e em conjunto.
- Estudo da biodegradação de HPAs em escala piloto no laboratório.

2.1. Aspectos relacionados à presença de HPAs no meio ambiente

2.1.1. Origem e estrutura química dos HPAs

Durante os três últimos séculos, a relação entre a alta incidência de câncer em áreas urbanas e industriais em comparação com áreas rurais, e a exposição dos seres humanos aos HPAs, induziu pesquisas consideráveis sobre as fontes, ocorrência, bioacumulação, metabolismo e disposição destes poluentes em meios aquáticos e terrestres. Historicamente, o médico John Hill em 1761 reconheceu esta relação e documentou a alta incidência de câncer nasal como uma consequência do uso excessivo do pó de tabaco. Percival Pott, em 1775, similarmente notou tal relação em seus estudos, devido à alta taxa de câncer na pele escrotal dos limpadores de chaminés, como consequência do contato direto com a fuligem. Em 1915, 140 anos mais tarde, YAMAGIWA & ICHIKAWA (citados por CERNIGLIA, 1984), induziram tumores em orelhas de coelhos por aplicações repetidas de alcatrão de hulha e seus estudos estabeleceram que as frações carcinogênicas do carvão continham HPAs.

Na TABELA 1 são mostradas as estruturas e os efeitos tóxicos dos 16 HPAs considerados poluentes de prioridade nacional pela Agência de Proteção Ambiental norte-americana (SIMS, *et alli*, 1988).

Os HPAs são compostos que contém carbono e hidrogênio na forma de anéis de benzeno fundidos em arranjos lineares, angulares e aglomerados. Os HPAs também podem conter substituintes alquilas e nitrilas ou podem se apresentar na forma de moléculas heterocíclicas com a substituição de um carbono do anel aromático por nitrogênio, oxigênio ou enxofre.

TABELA 1 – Estruturas químicas e efeitos tóxicos dos 16 HPAs considerados como poluentes de prioridade nacional pela Agência de Proteção Ambiental norte-americana (SIMS *et alli*, 1988). Continua na próxima página.

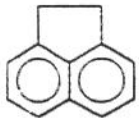
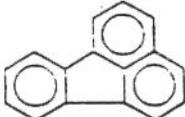
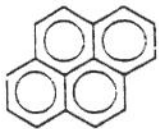
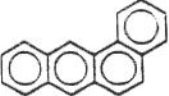
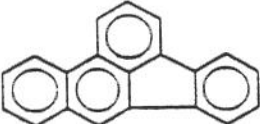
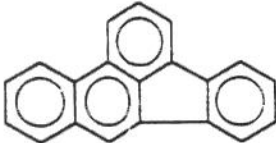
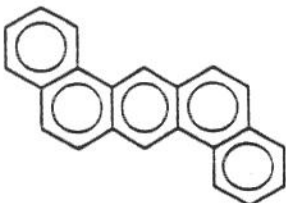
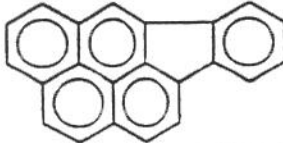
Composto	Fórmula	Efeito
<u>1 - 2 anéis aromáticos</u>		
Naftaleno		tóxico
<u>2 - 3 anéis aromáticos</u>		
Acenafteno		mutagênico
Acenaftileno		mutagênico
Fluoreno		mutagênico
Antraceno		mutagênico
Fenantreno		tóxico e mutagênico
<u>3 - 4 anéis</u>		
Fluorano		co-carcinogênico e mutagênico
pireno		co-carcinogênico e mutagênico
benzo(a)antraceno		mutagênico e carcinogênico
<u>4 - 5 anéis</u>		
benzo(b)fluoranteno		mutagênico e carcinogênico

TABELA 1 – Continuação.

Composto	Fórmula	Efeito
benzo(k)fluoranteno		mutagênico e carcinogênico
benzo(a)pireno		mutagênico, carcinogênico, fetotóxico e teratogênico
dibenzo(a, h)antraceno		mutagênico e carcinogênico
<u>5 - 6 anéis</u>		carcinogênico
benzo(g, h, i)perileno		
indeno(1,2,3-cd)pireno		carcinogênico

Os HPAs são produtos que se originam da combustão incompleta da matéria orgânica, sendo formados durante a combustão de hidrocarbonetos saturados e insaturados, peptídeos, carboidratos e outros compostos orgânicos. Algumas das maiores fontes de HPAs são as queimadas em florestas, cinzas vulcânicas, geração de calor e força, emissões de motores de veículos, processos industriais, derramamentos de petróleo, inversão do ar urbano, liquefação do carvão, processos de gaseificação e fumaça de cigarro (CERNIGLIA, 1984).

Os aspectos relacionados à formação dos HPAs durante a combustão de compostos orgânicos têm sido amplamente estudados por cientistas de todo mundo (VINCITORE *et alli*, 1998). Estudos iniciais mostraram que os HPAs são formados durante as reações de

pirólise e de combustão de compostos orgânicos à altas temperaturas. A combustão incompleta da madeira, do carvão e do óleo, também levam à formação de HPAs.

BADGER *et alli* (1958), conduziram estudos sobre o mecanismo de formação do 3,4-benzo(a)pireno a altas temperaturas (500 a 1250°C), a partir de compostos alifáticos, e concluíram que a seqüência das reações mais importantes envolvidas na formação dos HPAs seria primeiramente o craqueamento, seguido da síntese de dienos, desidrogenações e finalmente, ciclodesidrogenações.

Complementando suas pesquisas, BADGER *et alli*. (1964) determinaram a temperatura ótima de formação do 3,4-benzo(a)pireno a partir da pirólise de vários hidrocarbonetos simples como acetileno, butadieno, estireno, etilbenzeno e butilbenzeno. Foram encontradas várias faixas de temperaturas ótimas para formação dos HPAs, sendo estas temperaturas dependentes do composto de origem. Os autores concluíram através dos resultados obtidos, que as fissões das ligações carbono-carbono e carbono-hidrogênio para formação de radicais e subsequente formação de HPAs, somente acontecerem na faixa de temperatura de 500 a 800°C. Em temperaturas menores, as cinzas continham somente compostos mono e dicíclicos e em temperaturas mais elevadas, os HPAs foram degradados a produtos gasosos. A temperatura ótima para a formação dos HPAs ficou definida em torno de 700°C.

Atualmente, dois principais mecanismos de reação foram propostos para descrever a formação do primeiro anel aromático, o anel benzênico. A primeira rota envolve a reação de espécies contendo C₄ e C₂ formando compostos C₆, seguida da ciclização e desidrogenação do complexo. A formação do HPA aconteceria pela ativação do anel aromático seguida da adição de C₂H₂ e outras porções de carbono (FRENKLACH *et alli* citados por VINCITORI *et alli*, 1998). A segunda rota envolve a recombinação de estruturas ressonantes C₃ estabilizadas, resultando na formação direta do anel aromático (MILLER & MELIUS citados por VINCITORI *et alli* 1998).

Existe também um novo mecanismo proposto que envolve a recombinação do ciclopentadieno produzindo naftaleno diretamente, eliminando assim, a necessidade de formação do anel benzênico (VINCITORI *et alli* 1998).

2.1.2. Propriedades físico-químicas dos HPAs

Os HPAs são compostos relativamente insolúveis em água. BANERJEE (1985) mediu a solubilidade de uma ampla gama de HPAs e encontrou resultados muito variados. Por exemplo, a solubilidade do naftaleno em água destilada a 27°C é de 31.690 ng/g, já para o criseno, composto aromático de quatro anéis, esta solubilidade é de 1,8 ng/g. A propriedade hidrofóbica dos HPAs é o fator que mais afeta o seu destino no ambiente e as suas taxas de biodegradação (LANDRUM, 1989; MCELROY *et alli*, 1989 e VARANASI *et alli*, 1985). As baixas solubilidades em água também causam dificuldades na determinação experimental de suas taxas de biodegradação e seu destino final. Os HPAs hidrofóbicos se associam fortemente com partículas presentes na água, fator este que faz com que os HPAs se depositem posteriormente em superfícies sedimentares (MAY, 1980). Em geral, a solubilidade dos HPAs decresce com o aumento do peso molecular e do número de anéis aromáticos. A temperatura e salinidade da água também afetam diretamente a solubilidade desses compostos. Um aumento de 4°C na temperatura pode aumentar as solubilidades do fenantreno, antraceno, benzo(a)antraceno e benzo(a)pireno na água do mar, como concluiu WHITEHOUSE (1984).

Os HPAs são sensíveis à luz, sofrendo fotodecomposição através da oxidação. Assim como a solubilidade, a fotodegradação é influenciada pela temperatura, salinidade e tipo de HPA (FUKUDA *et alli*, 1988 e NORKRANS, 1966). Por exemplo, a taxa de degradação de um naftaleno alquilado aumentou em água do mar artificial quando comparada com a degradação em água destilada. Os HPAs que contêm moléculas de nitrogênio foram oxidados mais lentamente que HPAs não substituídos, e as taxas de fotooxidação são maiores a 27°C do que a 10°C (PAALME *et alli*, 1990).

Experimentos realizados por HINGA *et alli*, (1980), demonstraram que a fotooxidação influencia o destino final e presença dos HPAs em colunas de água e em sedimentos. A fotólise ocorre preferencialmente com os HPAs de maior peso molecular, sendo que os produtos da reação também adsorvem em partículas e persistem nos sedimentos (MILLER *et alli*, 1988). Estudos envolvendo os produtos da fotodegradação dos HPAs em ambientes aquáticos são necessários para elucidar seu papel no destino final dos HPAs e nas suas taxas de degradação. Durante experimentos em laboratório, a fotodegradação dos HPAs também pode levar à estimativas errôneas da degradação dos mesmos (WOOD *et alli*, 1979).

Os HPAs de menor peso molecular, especialmente o naftaleno, são voláteis. Os HPAs com pesos moleculares intermediários entre o naftaleno e o dibenzo(a,h)antraceno volatilizam a partir de soluções aquosas em uma taxa inversamente proporcional aos seus pesos moleculares (LAUGHILIN *et alli*, 1979). A volatilização acontece preferencialmente a partir da superfície da água, podendo acontecer em sistemas onde os sedimentos foram ressuspensos, devendo ser monitorada durante os experimentos em laboratório.

2.1.3. Presença de HPAs no ambiente

Apesar dos sedimentos aquáticos atuarem como depósitos de HPAs e contribuírem para a sua liberação nas águas, são as atividades realizadas pelo homem que contribuem predominantemente para a presença de HPAs nas águas urbanas. As rotas naturais primárias dos HPAs no ambiente ocorrem através de vazamentos de óleos e queimadas de florestas (YOUNGBLOOD & BLUMER, 1975). As maiores fontes antropogênicas de HPAs incluem a combustão e o transporte de combustíveis fósseis (NAS, 1983). Os HPAs alcançam os ambientes aquáticos através de inversões térmicas, descarga de resíduos, navegação comercial e de recreação e vazamentos de óleos (GUERIN & JONES, 1989 e NEFF, 1979).

Os HPAs gerados por atividades industriais e relacionadas à energia vem sendo depositados há anos no meio ambiente, e o exame de sedimentos abaixo da superfície de

áreas próximas à essas atividades mostra claramente a presença de vários HPAs (HITES *et alli*, 1977). Por exemplo, regiões próximas ao porto de Boston, possuíam uma concentração de HPAs de 100 mg/g de sedimento (HITES *et alli*, 1972; JOHNSON *et alli*, 1985; SHIARIS & JAMBARD-SWEET, 1986 e YOUNGBLOOD & BLUMER, 1975). Uma vez presentes no meio aquático, os HPAs persistem por longos períodos, sendo que sua toxicidade irá depender das condições ambientais e da estrutura de suas moléculas.

O transporte e a distribuição dos HPAs no meio ambiente aquático têm sido relacionados com seu peso molecular, volatilidade e com a concentração de matéria orgânica em um dado ecossistema. Em um estudo detalhado feito por READMAN *et alli* (1982) sobre a distribuição e degradação dos HPAs no estuário de Tamar, na Inglaterra, os HPAs foram divididos em dois grupos, com base no seu destino final: (1) HPAs de baixo peso molecular (naftaleno, fenantreno e antraceno) e (2) HPAs de alto peso molecular (fluoranteno, pireno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno). A distribuição dos HPAs de baixo peso molecular não exibiu uma correlação com a concentração de partículas na coluna de água, sendo que a volatilização dos mesmos pareceu ser o fator mais importante na determinação de seu destino final. Por outro lado, a distribuição dos HPAs de elevado peso molecular apresentou uma correlação com a concentração de partículas suspensas na água e o seu depósito nos sedimentos foi classificado como o destino primário desses compostos. Em outros estudos, a partição dos HPAs entre água e sedimento foi relacionada com o conteúdo orgânico da água e do sedimento (MEANS, 1980). Em um estudo feito com sedimentos obtido de rios, foi encontrado que sítios de deposição que contém partículas menores de sedimentos geralmente contém um alto conteúdo orgânico e elevadas concentrações de HPAs (KARICKHOF *et alli*, 1979 e O'CONNOR & CONNOLY, 1980).

Outros fatores que afetam a partição dos HPAs são o material orgânico dissolvido (MOD) e o material coloidal. BOHEM & QUINN (1973) sugeriram que o MOD aumenta a solubilidade dos HPAs nos ambientes aquáticos. Interações específicas entre os hidrocarbonetos e o material orgânico dissolvido foram estudadas de acordo com o tipo de HPA e a origem do MOD. Os HPAs mais hidrofóbicos mostraram uma crescente associação

com o MOD, e o complexo MOD-HPA foi capaz de aumentar o transporte dos HPAs (MAGEE *et alli*, 1991). A formação deste complexo é favorecida quando o MOD é de origem terrestre, devido à presença de compostos húmicos (WHITEHOUSE, 1985). Os colóides naturais parecem possuir um papel importante no transporte e destino final de compostos hidrofóbicos, como os HPAs, até o meio ambiente aquático.

Em conclusão, os HPAs tendem a ser carregados por pequenas partículas cobertas com compostos orgânicos que tendem a se depositar em áreas de deposição de partículas, no entanto, algumas quantidades de HPAs devem permanecer na coluna de água ou nas proximidades dos sedimentos, quando associadas com material orgânico dissolvido e com material coloidal (BROWNAVELL & FARRINGTON, 1986 e MEANS & WIJAYARATNE, 1982).

2.1.4. Biodisponibilidade dos HPAs no meio ambiente

Os recentes avanços no conhecimento do processo de partição dos HPAs entre diferentes frações como água, partículas, colóides e MOD levaram ao delineamento de alguns mecanismos de distribuição dos HPAs e do fluxo dos HPAs nos sedimentos e na água. Processos similares também afetam a disponibilidade dos HPAs para o consumo microbiano e seu metabolismo. Ligações irreversíveis às partículas reduzem a disponibilidade dos HPAs tanto para os microrganismos como para os organismos bênticos. Portanto, medições químicas do conteúdo de HPAs nos ambientes aquáticos, não necessariamente refletem a biodisponibilidade desses compostos para as bactérias.

Os processos responsáveis pela transferência dos HPAs do meio ambiente para os organismos, e os fatores ambientais que governam esses processos não estão ainda bem esclarecidos. Várias revisões recentes (FARRINGTON, 1991; LANDRUN & ROBBINS, 1990 e MCELROY *et alli*, 1989) resumem a biodisponibilidade dos HPAs nos ambientes aquáticos, mas estas informações, são na maioria das vezes, limitadas aos animais bênticos, que por sua vez, absorvem os HPAs de uma maneira diferente que microrganismos bênticos.

A biodisponibilidade dos HPAs está relacionada com as suas características físico-químicas, sendo o coeficiente de partição do HPA em octanol/água, K_{ow} , o parâmetro mais utilizado para medir a sua solubilidade em água (LANDRUN, 1989). Conforme a solubilidade do HPA em água decresce, o K_{ow} aumenta, e o composto é mais lentamente liberado das partículas de sedimentos, tornando-se menos disponível para o consumo microbiano.

FARRINGTON (1991) advertiu que a relação entre o K_{ow} e a biodisponibilidade é frequentemente específica para cada sítio, pois ela é afetada pela composição e características de cada sedimento. Essas características incluem conteúdo de carbono orgânico, distribuição do tamanho das partículas, tipo de argila e conteúdo do solo, capacidade de troca de cátions e pH. A determinação experimental da biodisponibilidade dos HPAs pode ser ainda afetada pelo comportamento e pela fisiologia do organismo bêntico em estudo.

A biodegradação dos compostos orgânicos é limitada pela biodisponibilidade e pela taxa de dessorção dos HPAs dos solos (ROBINSON *et alli*, 1990), argilas (MACINTYRI & DEFUR, 1985) e materiais húmicos (JOHNSEN, 1987). A taxa de degradação microbiana de HPAs de baixo peso molecular, como o naftaleno, é supostamente governada pelas baixas taxas de dessorção, como demonstrado em solos anaeróbicos (AL-BASHIR *et alli*, 1990 e MIHELICIC & LUTHY, 1988). Acredita-se que as taxas de dessorção tornam-se cada vez mais lentas com o aumento do peso molecular dos HPAs presentes nos sedimentos, sendo necessários mais estudos para confirmar tal hipótese.

A questão da biodisponibilidade dos HPAs é crucial para o entendimento da degradação dos mesmos. Existe a necessidade do desenvolvimento de novos métodos para a determinação da biodisponibilidade dos HPAs para os microrganismos. KING *et alli* (1990), reportaram a utilização de um plasmídeo bioluminescente durante o catabolismo do naftaleno na tentativa de definir a sua biodisponibilidade em uma variedade de ambientes.

2.2. Aspectos relacionados ao processo de biorremediação

2.2.1. Tecnologias de biorremediação de sítios ambientais contaminados

O desenvolvimento de novas tecnologias para eliminar as contaminações provocadas pelas atividades do homem no meio ambiente tornou-se um sério desafio. A cada ano, somente nos EUA, bilhões de dólares têm sido gastos na descontaminação de solos e ambientes aquáticos. Os custos totais para a remediação de sítios contaminados com petróleo e seus derivados, nos EUA, é estimado acima de um trilhão de dólares, (BREDEHOEFT, 1994). Mundialmente são produzidas dois bilhões de toneladas de petróleo por ano, e durante as etapas de exploração, transporte, processamento e aplicação, os vazamentos acidentais ou planejados são comuns (NAS, 1985).

Estas tecnologias de “clean up” apoiam-se nas atividades degradativas dos microrganismos, sendo seu principal foco o aumento do processo de biodegradação já existente na natureza. Tecnologias que colocam os compostos químicos em contato mais próximo com os microrganismos, em reatores, permitindo sua rápida degradação, também têm sido exploradas (ALEXANDER, 1994).

GIBSON & SAYLER (1992) definiram a biorremediação como “o uso de microrganismos vivos para reduzir ou eliminar contaminações ambientais resultantes do acúmulo de compostos químicos tóxicos e outros resíduos poluentes”.

A biorremediação de sítios ambientais contaminados com compostos orgânicos é uma tecnologia emergente que graças ao seu custo relativamente baixo, vem sendo utilizada em vários países, tendo sido aprovada pela Agência de Proteção Ambiental norte-americana (EPA), pela Environment Canada, e outras agências reguladoras em todo o mundo (BIOGROUP, 1998).

O objetivo principal da biorremediação é a degradação de compostos poluentes até níveis não detectáveis, ou se detectáveis, até concentrações abaixo dos limites

estabelecidos como seguros ou aceitáveis pelas agências reguladoras (ALEXANDER, 1994).

A biorremediação tem sido usada para a destruição de compostos químicos poluentes presentes no solo, reservatórios naturais de água, águas residuárias, lodos, sistemas de eliminação de resíduos industriais e gases. A lista de compostos que podem ser submetidos à destruição biológica por um ou outro sistema de biorremediação é longa. No entanto, grande interesse foi dirigido para produtos do petróleo, gasolina e seus constituintes, HPAs, compostos alifáticos clorados como tetracloroetileno, e compostos aromáticos clorados, já que esses compostos estão espalhados por todo o ambiente, representando riscos para a saúde e para os ecossistemas, e são susceptíveis à biodegradação. Apesar de não serem biodegradáveis, os metais são de interesse para a biorremediação pois podem ser alterados, tornando-se menos tóxicos para os microrganismos.

Certos critérios devem ser considerados na biorremediação, para que esta possa ser um processo sério e um modo prático de tratamento. (a) Devem existir microrganismos que possuam a atividade catabólica necessária. (b) Estes microrganismos devem ter a capacidade de transformar os compostos a taxas razoáveis e trazer a concentração para níveis estabelecidos pelos órgãos reguladores. (c) Os microrganismos não devem gerar produtos que sejam tóxicos e que possam acumular-se durante o processo. (d) O sítio contaminado não pode conter concentrações ou combinações de produtos químicos que são marcadamente inibidores para as espécies biodegradadoras, ou devem existir meios de diluir ou transformar estes compostos em produtos inócuos. (e) O composto alvo deve estar biodisponível para os microrganismos. (f) As condições no sítio ou no bioreator devem suportar o crescimento microbiológico ou sua atividade, por exemplo, uma suplementação adequada de nutrientes inorgânicos, suficiente oxigênio, ou outro aceptor de elétrons, conteúdo de umidade favorável, temperatura adequada, e uma fonte de carbono e energia para o crescimento, se o poluente for co-metabolizado. (g) O custo da tecnologia deve ser menor, ou igual ao custo de outras tecnologias que poderiam também destruir o composto químico. Se as condições existentes não estão de acordo com os

critérios mínimos acima estabelecidos, o processo de biodegradação deverá ser rejeitado (ALEXANDER, 1994).

A Agência de Proteção Ambiental norte-americana (DEVINE, 1992) conduziu uma pesquisa sobre áreas sob tratamento biológico para eliminação de compostos poluentes e obteve dados sobre a existência de 240 casos de biorremediação. Desses 240 casos, 132 apresentaram informações suficientes para detalhamento, como por exemplo, 75 casos de biorremediação eram nas áreas envolvidas com petróleo e materiais relacionados, 13 com preservativos da madeira, 10 com solventes contaminantes, 7 com pesticidas, 5 com piche, e 4 com munições. A maioria dos casos de biorremediação foi realizada em solos e águas subterrâneas, sendo poucos casos realizados com lodos.

Uma variedade de tecnologias diferentes e procedimentos estão em uso corrente, e um número de novas e alterações promissoras já foram sugeridas ou alcançaram estágios avançados de desenvolvimento. Algumas dessas tecnologias são o tratamento *in situ*, em que o solo ou a água contaminados não são removidos do local original. O tratamento *in situ* apresenta a vantagem de um custo relativamente baixo, mas a desvantagem de não haver um controle rigoroso do processo. Outras tecnologias de biorremediação requerem a remoção do material contaminado do seu local original. Tal remoção aumenta o custo apreciavelmente, mas o processo é mais facilmente controlável (ALEXANDER, 1994).

Os microrganismos no solo possuem uma ampla gama de atividades catabólicas, e um modo simples de destruir os poluentes é adicionar os materiais contendo esses contaminantes ao solo e deixá-lo sofrer a degradação pela microflora nativa. Este procedimento, normalmente chamado "land farming", tem sido frequentemente usado pela indústria petrolífera para destruir resíduos. A considerável quantidade de carbono presente nesses resíduos tem o potencial de suportar uma grande biomassa, mas o solo possui muito pouco nitrogênio e fósforo – e outros nutrientes orgânicos – para suportar uma biomassa tão grande; então adiciona-se N e P ao solo, normalmente na forma de fertilizantes comerciais. Além do mais, a demanda de oxigênio da microflora aumenta com o carbono orgânico presente, havendo a necessidade de suplementar também o oxigênio. A

efetividade deste tipo de remediação no solo contendo diesel foi mostrada por WANG *et alli* (1990). A remediação por esses meios é limitada pelas estações do ano, ocorrendo preferencialmente quando a temperatura do solo se mantém em uma faixa que permite rápido crescimento microbiano (ALEXANDER, 1994).

Microrganismos nativos são aqueles que já estão presentes no sítio contaminado. Para estimular o crescimento desses microrganismos, condições como temperatura, presença de oxigênio e nutrientes devem ser providas. Por outro lado, se a atividade biológica necessária para degradar um determinado contaminante não está presente em nenhum microrganismo nativo, microrganismos de outros locais, que foram efetivamente testados quanto à sua capacidade de degradação, podem ser adicionados ao sítio contaminado, sendo chamados então microrganismos exógenos. As condições do novo sítio devem ser ajustadas para assegurar que o novo microrganismo venha a sobreviver (KERR, 1994).

Já o processo de tratamento das águas subterrâneas, também chamado biorrestauração, envolve a introdução de nutrientes e oxigênio nos aquíferos subterrâneos, sendo que a microflora indígena existente realiza a degradação das moléculas indesejáveis. A maioria dos sítios tratados contém hidrocarbonetos do petróleo como contaminantes.

Inicialmente, é feita uma remoção física eficiente do contaminante presente, já que a biorremediação sem a remoção da fonte de contaminação não faz sentido, pois esta fonte continuaria adicionando poluentes ao depósito de água. Também são feitos testes em laboratório para determinar a quantidade ótima de nutrientes a serem adicionados, já que a falta de nutrientes irá resultar em uma lenta degradação, ao passo que o excesso de nutrientes proporcionará um aumento muito rápido da biomassa, causando a interrupção da biorremediação. Nitrogênio e fósforo são normalmente dissolvidos na água que circula pelo sítio contaminado. Um procedimento comum é a adição dos nutrientes através de poços de injeção. A concentração dos contaminantes e dos nutrientes é monitorada nas amostras de água coletadas através dos poços (THOMAS & WARD, 1989).

Existe um grande interesse na biorremediação de manchas de óleo no mar, em portos e na água para consumo, e o uso de microrganismos para diminuir a presença de contaminantes nesses sítios tem sido aplicado há vários anos. Em março de 1989, o petroleiro Exxon Valdez derramou cerca de 42 milhões de litros de óleo no mar, contaminando as águas e praias da região do recife Prince William, no Alasca. Imediatamente, foi montado um programa para determinar, em laboratório e no sítio contaminado, como promover a biorremediação. O subsequente processo de “clean up” que se realizou representou o maior processo de biorremediação já relatado (ALEXANDER, 1994).

Os estudos em laboratório, feitos imediatamente após o vazamento, mostraram que N e P eram limitantes e que quase todos os alcanos e uma quantidade apreciável de HPAs foram metabolizados em seis semanas com a adição de uma solução salina inorgânica ou um fertilizante oleofínico contendo N e P. Posteriormente, observou-se que a degradação desses compostos ocorreu mesmo sem a adição de N e P (TABAK *et alli*, 1991). Estudos do sítio mostraram a existência de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos (PRINCE, 1992).

Todas as técnicas de biorremediação descritas aqui, foram realizadas na presença de microrganismos nativos. Técnicas envolvendo o uso de microrganismos introduzidos ao ambiente podem ser exemplificadas na utilização de bioreatores dispostos acima da superfície das águas subterrâneas, que são alimentados através do bombeamento da água contaminada para a superfície (STINSON *et alli*, 1991; LITCHFIELD, 1991), biofiltros para gases (SHODA, 1991 e DASU & SUBLETTE, 1989) e filmes e células imobilizadas (HALLAS *et alli*, 1992).

As fases envolvidas na biorremediação de um sítio contaminado podem ser resumidas como: 1 – caracterização do sítio, 2 – desenvolvimento de uma estratégia de remediação, 3 – implementação da estratégia e 4- monitoramento do processo de biorremediação.

Por ser o primeiro passo na implantação da biorremediação, e também um dos mais importantes, a caracterização do sítio ambiental contaminado, pode ser feita através do levantamento de informações específicas como: tipo e quantidade de contaminantes e um histórico de contaminação do local, onde e como se encontram estes contaminantes (dissolvidos, em partículas, nos sedimentos), as condições hidrogeológicas e geoquímicas do local, qual os possíveis destinos dos contaminantes presentes no sítio, e qual a capacidade de biodegradação dos compostos contaminantes pela microbiota do local (KERR, 1994).

A implantação de um processo de biorremediação caracteriza-se por sua multidisciplinaridade, sendo necessários esforços de diversas áreas atuando em conjunto para se obter o sucesso do processo.

2.3. Aspectos relacionados à biodegradação de HPAs por bactérias

O metabolismo dos HPAs pelos mamíferos tem sido demonstrado em muitos tecidos como fígado, pulmões, rins, placenta, trato intestinal e pele. Usualmente, a atividade mais elevada é encontrada em células do retículo endoplasmático hepático, que converte os compostos lipofílicos em metabólitos solúveis em água e portanto facilmente excretados pelo organismo. Resultados de pesquisas pioneiras demonstraram que muitos carcinogênicos, incluindo os HPAs, são de fato, inativos *per se* e devem ser metabolicamente ativados pelas enzimas dos microssomos de mamíferos, para então exibirem suas propriedades mutagênicas, genotóxicas e carcinogênicas (CERNIGLIA, 1984).

Estudos envolvendo o metabolismo dos HPAs por bactérias e outros microrganismos foram desenvolvidos paralelamente aos estudos feitos em mamíferos. A habilidade de alguns microrganismos em degradar HPAs foi reconhecida por SISLER & ZOBELL (1947) e desde então foram examinadas as vias bioquímicas pelas quais os microrganismos metabolizavam os compostos aromáticos, tendo sido para isso, isoladas diversas linhagens.

LIJINSKI & QUASTEL (1956), descreveram métodos empregados para o isolamento e estudo do metabolismo de hidrocarbonetos cancerígenos por microrganismos do solo. Foi encontrada uma bactéria (não identificada) que utilizava metilcolantreno como fonte de carbono.

Em 1968, GIBSON *et alli* estudando uma linhagem de *Pseudomonas putida*, demonstraram que este microrganismo tinha capacidade de crescer em tolueno como única fonte de carbono e de oxidar benzeno, tolueno e etilbenzeno em taxas iguais, e ainda propuseram uma sequência para a formação enzimática do catecol a partir do benzeno.

Em 1973, GIBSON *et alli* estudaram uma espécie de *Beijerinckia* sp. que utilizava bifênil como única fonte de carbono. Já uma linhagem mutante, denominada *Beijerinckia* sp. B8/36, possuía capacidade de oxidar o bifênil a cis-2,3-di-hidroxi-1 fenil ciclo-hexa-4,6-dieno. Os metabólitos produzidos foram analisados por espectrofotometria (UV e IV) e ressonância nuclear magnética de prótons.

Compostos aromáticos como fenantreno, 1-etilnaftaleno, 1,2- e 2,3-benzoantraceno foram testados quanto à sua biodegradabilidade por bactérias marinhas, sendo os seus metabólitos analisados por técnicas de cromatografia gasosa e de camada delgada, espectrofotometria de IV e espectroscopia de massa. Todas as bactérias isoladas da água de estuários contaminados com óleo cresceram em naftaleno como única fonte de carbono (DEAN-RAYMOND & BARTHA, 1975).

KIYOHARA & NAGAO (1978), isolaram bactérias do solo capazes de crescer em fenantreno, e após estudar as possíveis vias bioquímicas, sugeriram que o catabolismo do fenantreno ocorria via protocatechuato em todas as bactérias e que as vias para a degradação do fenantreno e do naftaleno eram separadas e diferentes.

Ainda envolvidos com a oxidação dos HPAs por *Beijerinckia* sp e *Beijerinckia* sp. B8/36, SCHOCKEN & GIBSON (1984) estudaram o metabolismo do acenaftaleno e do

acenaftileno através de experimentos de biotransformação em pequena escala. Como métodos analíticos na detecção dos metabólitos foram empregadas as técnicas de cromatografia de camada delgada e líquida de alta eficiência e espectroscopia de massa. Foram propostos caminhos de oxidação dos HPAs pela linhagem de *Beijerinckia* sp. Os autores também estabeleceram as enzimas utilizadas para as transformações.

Um estudo completo envolvendo o metabolismo microbiano dos HPAs foi apresentado por CERNIGLIA (1984). Neste estudo CERNIGLIA compilou todos os HPAs de maior importância e delineou para cada um deles as rotas de seu metabolismo por mamíferos, fungos, bactérias e algas. Utilizando o termo biodegradação no seu sentido mais amplo, o autor já previa que no futuro próximo, uma das formas de controle da poluição no meio ambiente seria a utilização de microrganismos no seu *habitat* natural.

Uma vez estabelecida a capacidade dos microrganismos em decompor os HPAs e a necessidade de eliminar tais compostos do meio ambiente, as pesquisas focaram-se na determinação de fatores que afetavam a biodegradação dos HPAs. Suas propriedades físico-químicas como solubilidade em água, lipofilicidade, volatilidade, a concentração e a presença de grupos substituintes e funcionais foram inicialmente elucidadas e relacionadas com a biodegradação.

O estudo dos fatores relacionados ao meio ambiente também tornou-se importante, incluindo temperatura, pH, concentração de oxigênio, salinidade, estação do ano, intensidade de luz, tipo de sedimento, presença de co-substratos e nutrientes. Quanto aos microrganismos, tornou-se relevante o seu tipo, população e distribuição, bem como os seus predadores e outras microbiotas e a biodisponibilidade dos HPAs.

Em 1987, STUCKI & ALEXANDER apresentaram um estudo envolvendo a cinética do crescimento bacteriano em vários HPAs poucos solúveis, relacionada com as suas taxas de dissolução e solubilidade em água. As bactérias estudadas foram *Moraxella* sp., *Pseudomonas* sp. e *Flavobacterium* sp., capazes de crescer em bifenil e isoladas de resíduos de esgoto. Os autores também relacionaram a taxa de crescimento de cada

bactéria com a taxa de mineralização do bifenil. Os cálculos baseados na taxa de crescimento destas bactérias e nas taxas de dissolução do fenantreno sugeriram que a taxa de dissolução dos hidrocarbonetos limitava a sua taxa de biodegradação.

Os HPAs se espalham pelos ecossistemas aquáticos por numerosas rotas, e devido à sua hidrofobicidade, usualmente se ligam a partículas sólidas finas e são transportados até sua sedimentação (HITES *et alli*, 1980; MEANS *et alli*, 1980 e MOREHEAD *et alli*, 1986). Apesar dos HPAs poderem sofrer volatilização, oxidação química, fotodecomposição e degradação por microrganismos enquanto se encontram em águas superficiais, na maioria das vezes o seu destino é a deposição na forma de sedimentos abaixo da zona fotolítica, e o principal fator que irá afetar a persistência dos HPAs depositados é a degradação microbiana (GIBSON *et alli*, 1975). Por esta razão, os sedimentos servem como repositores de HPAs nos ecossistemas aquáticos (BEAN e PERRY, 1974), onde eles devem permanecer, sofrer ressuspensão ou ser biodegradados por comunidades complexas de bactérias e fungos nativos, (CERNIGLIA, 1984; CERNIGLIA, 1984b e GIBSON & SUBRAMANIAN, 1984). O estímulo, através da adição de nutrientes, dos microrganismos nativos capazes de metabolizar os HPAs, tornou-se a opção de biorremediação das águas marinhas mais promissora, contrastando com a aplicação de microrganismos de forma isolada ou geneticamente alterados (U.S. CONGRESS, 1991).

CULLEN *et alli*, (1994) realizaram estudos em sítios ambientais próximos a uma indústria metalúrgica de alumínio produtora de cerca de 120 toneladas de HPAs por ano, devido ao uso de grandes quantidades de carvão e piche utilizados durante o processo. A partir de amostras de água do mar e sedimentos contaminados, foram isoladas quatro linhagens de bactérias, posteriormente identificadas como *Moraxella atlantae* e *Alteromonas haloplanktis*, que foram utilizadas no estudo de degradação de fenantreno e pireno (os HPAs mais abundantes encontrados na área). Para determinar a taxa de biodegradação dos HPAs pelas bactérias, os autores utilizaram técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (detectores UV e fluorescência) e estabeleceram fatores importantes que influenciaram tais taxas, como a concentração de HPAs, isoladamente ou em conjunto, presença de nutrientes, temperatura e tempo de incubação e concluíram que

estudos futuros, onde as condições ambientais fossem completamente reproduzidas, seriam necessários para a adaptação da biorremediação no sítio ambiental estudado.

A biodegradação dos compostos aromáticos tende a se desenvolver e a se tornar cada vez mais aprimorada. O uso de reatores tipo biofilme (ARCANGELI & ARVIN, 1995 e ZHANG *et alli*, 1995) torna possível o estudo do mecanismo da cinética da biodegradação realizada pelos microrganismos. ZHANG *et alli*, (1995) afirmaram que a biorremediação é geralmente favorecida pelo emprego da bioestimulação, ou seja, um processo no qual as condições para o crescimento dos microrganismos são otimizadas pelo suprimento de quantidades adequadas de receptores de elétrons, nitrogênio, fósforo e traços de metais no ecossistema a ser tratado. As taxas de biodegradação dos HPAs são maiores em condições aeróbicas e a manutenção de um nível adequado de oxigênio *in situ* tem sido o objetivo primário de muitas remediações. Para ambientes com altos níveis de poluição, a biorremediação é frequentemente limitada devido à baixa solubilidade do oxigênio e à baixa transferência de massa. Existem possibilidades de se favorecer a taxa de biorremediação, seja pela utilização de técnicas de ventilação do ar com equipamentos específicos (HINCHEE, 1994), seja pela adição de receptores de elétrons alternativos, sendo esta última técnica muito favorável devido ao baixo custo e alta solubilidade de tais compostos (WILSON *et alli*, 1993).

2.3.1. Biodegradação de misturas de HPAs

A degradação de HPAs individuais realizada por bactérias tem sido amplamente estudada e muitas rotas metabólicas já foram estabelecidas, (DAVIES & EVANS, 1964; HEITKAMP & CERNIGLIA, 1988; HEITKAMP & CERNIGLIA, 1989; MUELLER *et alli*, 19889; WALKER & WILTSHIRE, 1953 e WALTER *et alli*, 1991). Recentemente, houve um aumento de interesse na determinação de como ocorre o processo de biodegradação bacteriana de misturas de HPAs, presentes no meio ambiente na forma de misturas complexas.

Sabe-se que uma mistura de contaminantes em um sistema de biorremediação pode apresentar os efeitos de inibição, cometabolismo ou augmentação no processo de degradação dos compostos. Os estudos de laboratório que utilizaram misturas definidas de HPAs já detectaram os problemas ou benefícios resultantes da presença de mais de um contaminante (BAUER & CAPONI, 1988; BOUCHEZ *et alli*, 1995; STRINGFELLOW & AITKEN, 1995 e TIEHM & FRITZSCHE, 1995). Nesses estudos, a combinação dos efeitos individuais foi observada. Por exemplo, na degradação de uma mistura simples contendo fenantreno e fluoreno pela bactéria *Pseudomonas* sp, foram observados os efeitos de cometabolismo e de inibição (BOUCHEZ *et alli*, 1995). Em adição aos estudos laboratoriais, os estudos realizados com sedimentos contaminados coletados no ambiente também proporcionam informações relevantes sobre a biodegradação de misturas (FLTG, 1988 e LEWIS, 1993).

A inibição pode ser definida como a redução na taxa de degradação ou no valor final de degradação de um composto provocada pela presença de outro composto, sendo este um efeito muito comumente encontrado na biodegradação das misturas de HPAs. Por exemplo, TIEHM & FRITZSCHE (1995) observaram a inibição na degradação do pireno pela presença do fluoreno em uma cultura pura de *Mycobacterium* sp. A inibição tem sido notada em casos em que somente um ou ambos os HPAs são fonte de carbono e energia, e sugere que múltiplos HPAs são degradados através da utilização de um mesmo sistema enzimático, resultando na competição pelos sítios ativos das enzimas (BOUCHEZ *et alli*, 1995 e STRINGFELLOW & AITKEN, 1995). Muitos estudos reportaram que a presença de HPAs mais solúveis resulta na inibição da degradação de HPAs menos solúveis. A utilização de culturas mistas no lugar de culturas puras, na degradação de misturas de HPAs tem o potencial de diminuir os efeitos de inibição observados, já que culturas mistas podem resultar em uma ação degradativa complementar, tendo uma maior tolerância à toxicidade, já que os metabólitos intermediários podem ser utilizados como substratos para a atividade de outras bactérias (BOUCHEZ *et alli*, 1995).

O cometabolismo, como definido por DALTON & STIRLING (1982) é a degradação de um substrato que não atua como fonte de energia, na presença obrigatória

de um substrato energético ou de outro composto que não seja degradado pelo microrganismo. Alguns HPAs são degradados por cometabolismo, como por exemplo, o fluoreno (BOUCHEZ *et alli*, 1995; STRINGFELLOW & AITKEN, 1995 e TIEHM & FRITZSCHE, 1995). O cometabolismo pode ser um processo importante, quando HPAs maiores e mais nocivos estão presentes em um processo onde HPAs menores e mais facilmente biodegradáveis estão sendo degradados. Este efeito foi observado por BOUCHEZ *et alli* (1995), quando uma cultura pura de *Pseudomonas* foi incapaz de utilizar fluoranteno como única fonte de carbono e energia, mas foi capaz de cometabolizá-lo na presença de fenantreno.

A augumentação descreve os casos em que a degradação de um composto é acelerada na presença de outro. BOUCHEZ *et alli* (1995) verificaram que a presença do fluoreno aumentou a degradação do fenantreno realizada por uma cultura pura de *Rhodococcus* sp. TIEHM & FRITZSCHE (1995) observaram um aumento na degradação do pireno na presença de fenantreno por uma cultura pura de *Mycobacterium* sp, enriquecida com surfactantes. Sem o aumento da solubilidade promovido pela adição do surfactante, a augumentação não aconteceu.

No entanto, nem sempre a biodegradação de misturas de HPAs apresenta estes efeitos, como é o caso da biodegradação do fenantreno, presente em altas concentrações, que não é afetada pela presença de fluoreno, fluoranteno ou pireno (TIEHM & FRITZSCHE, 1995). Em um estudo realizado por YE *et alli* (1996), a presença dos HPAs benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno e fluoranteno, não afetou a degradação do benzo(a)pireno pela bactéria *Sphingomonas paucimobilis*. Somente o benzo(b)fluoranteno causou uma notável redução na degradação do benzo(a)pireno. Os autores sugeriram duas explicações para suas observações: a primeira suposição seria que os compostos presentes não competiram pelos sítios ativos das enzimas responsáveis pela degradação do benzo(a)pireno, ou então, que existem diferentes enzimas responsáveis pela degradação de diferentes HPAs.

Devido à variedade de compostos HPAs, de condições experimentais, materiais e medidas de atividade comumente usadas, é muito difícil obter informações específicas sobre as interações que acontecem com as misturas de compostos, e até mesmo da extensão real da biodegradação. Em geral, para HPAs formados por 2 e 3 anéis, são observados altos níveis de biodegradação, (taxas/valores finais). Já para HPAs com 4 a 6 anéis, é possível verificar a biodegradação, mas sempre em valores inferiores aos HPAs de 2 e 3 anéis (ANDERSON, 1995). A degradação completa de HPAs superiores é mais dificilmente observada.

2.3.2. Rotas metabólicas de degradação microbiológica dos HPAs

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

A degradação de HPAs realizada por células de mamíferos e por fungos leva à formação inicial de compostos denominados *trans*-di-hidrodióis (JERINA *et alli*, 1978). Até pouco tempo, acreditava-se que as bactérias também oxidavam inicialmente os HPAs até *trans*-di-hidrodióis, já que havia muita semelhança entre os intermediários metabólicos detectados em estudos de degradação de HPAs por células de mamíferos e fungos em relação aos metabólitos liberados pela degradação realizada por bactérias.

Em 1968, GIBSON e colaboradores reportaram o isolamento de uma linhagem de *Pseudomonas putida* capaz de utilizar etilbenzeno como única fonte de carbono e energia, podendo também crescer na presença de tolueno e benzeno.

Experimentos subsequentes realizados por GIBSON *et alli* (1970a) mostraram que a *P. putida* 39/D, uma mutante da linhagem inicial, quando crescia em glicose na presença de benzeno era capaz de acumular o metabólito *cis*-1,2-di-hidroxi-1,2-di-hidrobzeno. Através de experimentos utilizando O^{18} , foi possível verificar que ambos os átomos de oxigênio presentes na molécula do metabólito eram derivados do oxigênio molecular. A determinação precisa da estrutura em conformação *cis* do di-hidrodiol e medidas precisas da incorporação de oxigênio molecular levaram à formação de alguns princípios gerais sobre o metabolismo oxidativo dos HPAs por bactérias, que podem ser descritos como:

- 1- A primeira reação de degradação de compostos HPAs é uma reação de oxidação que produz *cis*-di-hidrodióis, independentemente da estrutura do substrato inicial, que pode ser tanto um benzeno como um benzo(a)pireno. Na TABELA 2 são mostrados alguns metabólitos obtidos durante a degradação de HPAs por vários microrganismos.
- 2- Os *cis*-di-hidrodióis são formados pela incorporação de dois átomos de oxigênio molecular no núcleo aromático. A dioxigenase que catalisa essas reações iniciais faz parte de um sistema multienzimático.
- 3- Os *cis*-di-hidrodióis sofrem uma reação de rearomatização pela ação de uma *cis*-di-hidrodiol desidrogenase, levando à formação de um derivado di-hidroxilado.
- 4- As subsequentes oxidações dos *cis*-di-hidrodióis levam à formação de catecóis que são substratos de outras oxigenases, que vão tornar possível a clivagem do anel aromático, FIGURA 1.

O catecol pode ser oxidado via *orto*, envolvendo a clivagem da ligação dos dois átomos de carbono que contém os dois grupos hidroxilas, levando à formação do ácido *cis-cis*-mucônico. O catecol também pode ser oxidado via *meta*, envolvendo a clivagem das ligações entre um átomo de carbono com um grupo hidroxila e de um átomo de carbono adjacente, que possua um grupo hidroxila, com a formação de um aldeído (CERNIGLIA, 1984).

TABELA 2 – Alguns metabólitos de HPAs após oxidação por microrganismos, reportados na literatura (CERNIGLIA, 1984).

Substrato	Di-hidrodiol	Organismo	Estereoquímica	Referência
Naftaleno	1,2-di-hidróxi-1,2-di-hidronaftaleno	<i>Pseudomonas putida</i>	cis (1R,2S)	JERINA et alli (1971); JEFREY et alli (1975)
		<i>Pseudomonas sp. (NCIB 9816)</i>	cis	CATTERAL et alli (1975); JEFREY et alli (1975)
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	cis	JEFREY et alli (1975)
		<i>Pseudomonas putida, tipo b</i>	cis	JEFREY et alli (1975)
		<i>Cunninghamella bainieri</i>	trans	FERRIS et alli (1976)
		<i>Cunninghamella elegans</i>	trans (1S,2S)	CERNIGLIA e GIBSON (1977); CERNIGLIA et alli (1983*)
		<i>Agmenellum quadruplicatum (PR6)</i>	cis	CERNIGLIA et alli (1979)
		<i>Oscillatoria sp. (JCM)</i>	cis	CERNIGLIA et alli (1980c)
Fenantreno	3,4-di-hidróxi-3,4-di-hidrofenantreno	<i>Flavobacterium</i>	NR	COLLA et alli (1959)
		<i>Pseudomonas putida</i>	cis	JERINA et alli (1976)
		<i>Beijerinckia sp.</i>	cis (3S,4R)	JERINA et alli (1976)
		<i>Cunninghamella elegans</i>	trans (3S,4S)	CERNIGLIA e YANG (1984)
	1,2-di-hidróxi-1,2-di-hidrofenantreno	<i>Beijerinckia sp.</i>	cis (1R,2S)	JERINA et alli (1976)
		<i>Cunninghamella elegans</i>	trans (3S,4S)	CERNIGLIA e YANG (1984)
Antraceno	1,2-di-hidróxi-1,2-di-hidroantraceno	<i>Flavobacterium</i>	NR	COLLA et alli (1959)
		<i>Beijerinckia sp.</i>	cis (1R,2S)	JERINA et alli (1976)
		<i>Cunninghamella elegans</i>	trans (1S,2S)	CERNIGLIA (1982); CERNIGLIA e YANG (1984)
Benzo(a)antraceno	1,2-di-hidróxi-1,2-di-hidrobenzo(a)antraceno	<i>Beijerinckia sp.</i>	cis	GIBSON et alli (1975)
		<i>Beijerinckia sp.</i>	cis	DODGE e GIBSON (1980); CERNIGLIA et alli (1980*); FU et alli (1983)
		<i>Cunninghamella elegans</i>	trans (8S,9S)	GIBSON et alli (1975)
	8,9-di-hidróxi-8,9-di-hidrobenzo(a)antraceno	<i>Beijerinckia sp.</i>	cis	DODGE e GIBSON (1980); CERNIGLIA et alli (1980*); FU et alli (1983)
		<i>Cunninghamella elegans</i>	trans (10S,11S)	GIBSON et alli (1975)
	10,11-di-hidróxi-10,11-di-hidrobenzo(a)antraceno	<i>Beijerinckia sp.</i>	cis	DODGE e GIBSON (1980); CERNIGLIA et alli (1980*); FU et alli (1983)
		<i>Cunninghamella elegans</i>	trans (10S,11S)	GIBSON et alli (1975)
	5,6-di-hidróxi-5,6-di-hidrobenzo(a)antraceno	<i>Beijerinckia sp.</i>	cis	DODGE e GIBSON (1980); CERNIGLIA et alli (1980*)
7-Metilbenzo(a)antraceno	8,9-di-hidróxi-8,9-di-hidro-7-hidroximetilbenzo(a)antraceno	<i>Cunninghamella elegans</i>	trans (8S,9S)	CERNIGLIA et alli (1982d); FU et alli (1983)
		<i>Cunninghamella elegans</i>	trans (3R,4R)	CERNIGLIA et alli (1982d); FU et alli (1983)
	3,4-di-hidróxi-3,4-di-hidro-7-hidroximetilbenzo(a)antraceno	<i>Cunninghamella elegans</i>	trans	CERNIGLIA et alli (1983b)
4-Metilbenzo(a)antraceno	8,9-di-hidróxi-8,9-di-hidro-4-hidroximetilbenzo(a)antraceno	<i>Cunninghamella elegans</i>	trans (8S,9S)	CERNIGLIA et alli (1983b)
	10,11-di-hidróxi-10,11-di-hidro-4-hidroximetilbenzo(a)antraceno	<i>Cunninghamella elegans</i>	trans (10S,11S)	CERNIGLIA et alli (1983b)
3-Metilcolantreno	7,8-di-hidróxi-7,8-di-hidro-3-metilcolantreno	<i>Beijerinckia sp.</i>	cis	KILBOURN (1980)
Benzo(a)pireno	7,8-di-hidróxi-7,8-di-hidrobenzo(a)pireno	<i>Beijerinckia sp.</i>	cis	GIBSON et alli (1975)
	9,10-di-hidróxi-9,10-di-hidrobenzo(a)pireno	<i>Cunninghamella elegans</i>	trans	CERNIGLIA e GIBSON (1979)
		<i>Beijerinckia sp.</i>	cis	GIBSON et alli (1975)
		<i>Cunninghamella elegans</i>	trans	CERNIGLIA e GIBSON (1979)

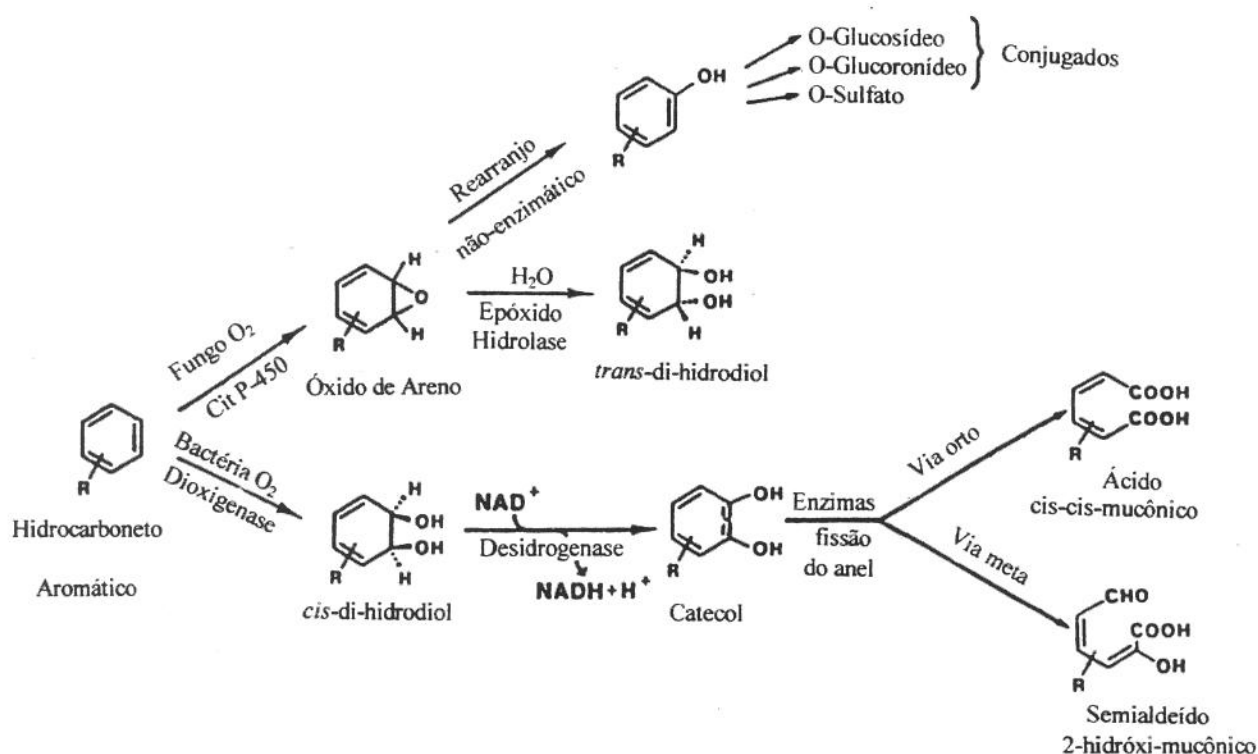


FIGURA 1 – Mecanismos de oxidação de HPAs por organismos procarióticos e eucarióticos (CERNIGLIA, 1984).

Após a comprovação da rota metabólica seguida na degradação de compostos HPAs pelas bactérias, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de definir quais são as possíveis alterações dessa via de metabolismo quando estão em estudo diferentes bactérias e diferentes compostos HPAs. O interesse na determinação dos produtos de biodegradação deve-se ao fato dos produtos intermediários e finais serem muitos mais tóxicos que os próprios HPAs utilizados como substratos iniciais. Uma vez determinados tais produtos, torna-se possível delinear um estudo relacionando a presença de diferentes linhagens de bactérias e diferentes substratos produzidos durante a biodegradação, e por fim, qual os efeitos que a biorremediação poderá trazer ao sítio contaminado.

Em conclusão, muito é conhecido em relação ao metabolismo dos HPAs por microrganismos, usando culturas puras ou enzimas purificadas. Estes estudos forneceram informações importantes sobre o potencial metabólico dos microrganismos e o mecanismo pelo qual eles metabolizam estes compostos. No entanto, existe uma carência de pesquisas envolvendo a decomposição dos HPAs sob condições ambientais, que são muito mais

complexas. Muitas pesquisas serão necessárias para estabelecer as taxas de biodegradação dos HPAs em *habitats* naturais e para determinar qual a contribuição que os microrganismos procarióticos e eucarióticos trazem para a biodegradação dos HPAs como um todo.

3. METODOLOGIAS

3.1. Levantamento de informações sobre áreas industriais do Estado de São Paulo possivelmente contaminadas com HPAs

Através de contatos estabelecidos com engenheiros químicos e sanitaristas, microbiólogos e outras pessoas envolvidas na área de Saneamento Ambiental, na CETESB de Campinas e na CETESB de São Paulo, foi possível a obtenção de informações para tal levantamento.

Também foram realizadas visitas a laboratórios de pesquisa e bibliotecas, na CETESB e em Universidades onde são feitas pesquisas sobre meio ambiente.

As empresas RHODIACO e PETROBRÁS foram visitadas e permitiram a coleta de amostras de água das suas lagoas finais de tratamento de água.

3.2. Caracterização dos sítios ambientais aquáticos contaminados com HPAs

Para os 12 rios do estado de São Paulo, que foram selecionados através do levantamento de informações sobre as condições de qualidade de suas águas, foram coletadas amostras de água para procedimentos microbiológicos, visando o isolamento de linhagens de bactérias degradadoras de HPAs. As amostras de água também foram submetidas às análises químicas, para obtenção de informações sobre a presença de HPAs.

3.3. Monitoramento dos sítios ambientais aquáticos

Todos os sítios ambientais aquáticos selecionados foram monitorados mensalmente, através de medições da temperatura da água, temperatura do ambiente externo e pela observação do pH, odor e coloração da água. Essas medições foram realizadas com o objetivo de obter um padrão da alteração dessas características de acordo com a estação do ano.

3.4. Análises Microbiológicas

3.4.1. Obtenção de linhagens de bactérias degradadoras de HPAs

As bactérias que apresentam a capacidade de utilizar HPAs como fonte de carbono em condições de aerobiose foram isoladas através de método de enriquecimento seletivo. Para isto, amostras de água coletadas em 12 rios do estado de São Paulo (TABELA 3) foram utilizadas como inóculos nos experimentos de enriquecimento. As amostras de água foram coletadas com o auxílio de um balde de 10 L, amarrado a uma corda, que foi mergulhado à uma profundidade de 0,5 m da superfície do rio. Após serem coletadas, as amostras foram transferidas para frascos âmbar (1 L), previamente esterilizados e então foram acondicionadas em recipientes de isopor refrigerados durante o transporte até o laboratório.

TABELA 3 - Rios do estado de São Paulo de onde foram obtidas as amostras de água para isolamento de bactérias degradadoras de HPAs.

AMOSTRAS	RIO	LOCALIDADE
1 - 6	Jaguari	Campinas-Jaguariúna
7 - 10	Atibaia	Campinas - Paulínia
11 - 15	Piracicaba	Piracicaba
16 - 21	Capivari	Capivari
22 - 23	Sorocaba	Sorocaba
24 - 28	Paraíba do Sul	Caçapava
29 - 34	Tietê	Grande São Paulo ¹
35 - 37	Pinheiros	Grande São Paulo ²
38	Tamanduateí	Grande São Paulo
39 - 42	Cubatão	Cubatão
43 - 44	das Pedras	Cubatão
45 - 48	Quilombo	Santos

1 - Tietê: Ponte dos Remédios e Ponte de Guarulhos;

2 - Pinheiros: Barragem de Pedreira.

O meio líquido mineral JE (g/L água destilada): K_2HPO_4 (2,0), NH_4NO_3 (0,5), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,2), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,1), $NaCl$ (0,1) e $FeCl_3$ (0,01), (JONES & EDINGTON, 1968) contendo 0,01, 0,05 e 0,1% de uma mistura de HPAs (TABELA 4), como fonte de carbono, foi utilizado para o cultivo das bactérias. Os substratos (HPAs diluídos em acetonitrila) foram adicionados após a autoclavagem do meio mineral devido à presença de substâncias voláteis nos mesmos. Esta adição deu-se com o meio mineral ainda quente (60°C), para ocorrer a evaporação da acetonitrila.

TABELA 4 - Concentrações dos padrões de HPAs utilizados nos meios de cultivo.

Composto	$C_1(\mu g/mL)$
Fluoranteno (FLU)	95
Pireno (PIR)	4,8
B(a)antraceno(BaA)	252
Criseno (CRI)	231
Benzo(e)pireno (BeP)	36
Benzo(b)fluoranteno (BbF)	259
Benzo(k)fluoranteno (BkF)	256
Benzo(a)pireno (BaP)	5,684
Dibenzo(a,h)antraceno(BahA)	360
Benzo(g,h,i)perileno (BghiP)	10

As culturas foram estabelecidas inoculando-se 5 mL de água contaminada em 20 mL de meio mineral contendo diferentes concentrações do substrato, em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Todos os frascos foram fechados com tampas rosqueadas, revestidas com teflon, para se evitar a perda dos compostos por evaporação ou adsorção a um outro tipo de material presente na tampa.

Os frascos foram incubados em shaker a 30°C sob agitação constante de 100 rpm, por um período de 5 dias. Após o período de incubação, foram transferidas alíquotas de 1 mL da cultura para um novo meio mineral (20 mL), que foi incubado novamente sob as mesmas condições. Tal processo foi repetido por mais 3 vezes.

Após a última transferência, 0,1 mL de meio de cultura foi plaqueado em placas de Petri contendo meio mineral JE sólido (2% ágar) e 0,05% de fonte de carbono (HPAs). As placas de Petri foram incubadas à temperatura ambiente pelo período de 48 horas. Após este período, as pequenas colônias formadas foram repicadas em placas de Petri contendo o meio LB sólido (g/L de meio JE): peptona bacteriológica (10,0), extrato de levedura (5,0), NaCl (2,5), glucose (2,00) e ágar (15,0), e incubadas à temperatura ambiente por 48 horas, para uma melhor visualização e purificação das mesmas.

As diferentes linhagens isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio mineral JE sólido inclinado (mais HPAs), e estocadas sob refrigeração de 4°C. Todos os procedimentos microbiológicos foram realizados em câmara de fluxo laminar.

3.4.2. Isolamento e purificação das linhagens de bactérias degradadoras de HPAs

As diferentes linhagens isoladas foram replaqueadas por várias vezes em placas de Petri contendo o meio LB sólido e incubadas a 25°C até crescimento. Após crescerem, foi feita coloração de Gram para verificação da pureza de cada linhagem e foram consideradas puras as linhagens que não apresentavam contaminantes, quando observadas em microscópio óptico.

Após este procedimento de purificação, as linhagens foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio mineral JE sólido inclinado (mais HPAs), e estocadas sob refrigeração de 4°C.

3.4.3. Testes de identificação das linhagens de bactérias degradadoras de HPAs

A identificação das 25 linhagens de bactérias que apresentaram maior crescimento, foi feita através dos seguintes testes: coloração de Gram, catalase, oxidase, gelatinase, motilidade, BGA, (Brilliant Green Agar), TSI (Triplice Sugar Iron), crescimento em meio McConkey e utilização de açúcares (Oxidativo/Fermentativo), segundo o manual de BERGEY (1984).

3.5. Análises Químicas

3.5.1. Extração dos HPAs das amostras de água dos rios

Para a extração dos HPAs das amostras de água obtidas dos rios, foi utilizada a metodologia, estabelecida pelo EPA (U.S. EPA, 1995).

Um litro de amostra de água foi despejado em um funil de separação (2 L). Foram então adicionados 60 mL de diclorometano ao recipiente da amostra, que foi fechado e agitado por 30 segundos, para dissolver os HPAs presentes na superfície interna do frasco. O solvente foi então transferido para o funil de separação e a amostra foi extraída com a agitação vigorosa do funil por 2 minutos, com ventilações periódicas.

Aguardou-se por um período de 10 minutos para a completa separação da fase orgânica, que foi transferida para um frasco Erlenmeyer protegido da luz. Foi adicionado um segundo volume de 60 mL de diclorometano ao recipiente da amostra, e o procedimento de extração foi repetido pela segunda vez. A fase orgânica resultante foi adicionada ao primeiro extrato. Foi feita então uma terceira extração, e a umidade presente no extrato final foi retirada através de adição de sulfato de sódio anidro.

A evaporação do diclorometano foi feita em evaporador rotativo à temperatura de 25°C. O extrato obtido foi colocado em frasco escuro vedado e estocado em refrigerador para ser analisado por CLAE.

3.5.2. Quantificação e identificação dos HPAs presentes nas amostras de água

3.5.2.1. Construção da Curva de Padronização Externa dos HPAs

Os padrões de HPAs, na forma de pó, foram diluídos em acetonitrila, em balões volumétricos, nas concentrações de 0,001, 0,005, 0,01, 0,05 e 0,1 µg/mL. Para tais diluições, todo material de vidraria utilizado foi lavado com sabão alcalino e enxaguado

duas vezes com acetona. A acetonitrila utilizada, apesar de possuir grau cromatográfico, foi filtrada em membrana hidrofóbica, Millipore, antes de sua aplicação.

Cada padrão foi injetado isoladamente, para verificação do tempo de retenção e depois as misturas de 6 padrões foram injetados em cada uma das concentrações citadas acima. Para a construção da curva de padronização foi utilizado o método dos mínimos quadrados, ajustado para 5 pontos. O volume de injeção utilizado foi de 40 μ L. As curvas de calibração podem ser vistas na FIGURA 2.

3.5.2.2. Condições de análises das amostras de água por CLAE

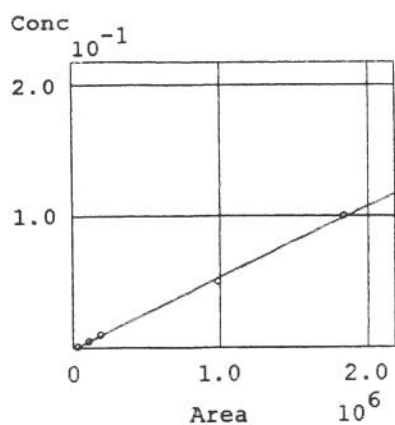
Foi utilizado para as análises o cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, Co., equipado com injetor automático de amostras, degaseificador de fase móvel, 2 bombas, forno para coluna, microcomputador para aquisição e análise dos dados. Foi empregada a coluna Vydac 201 TP 5 μ m, 4,6 mm x 25 cm, de fase reversa polimérica com a coluna de guarda, Vydac 201 TP, 8 mm x 4 cm. Para detecção dos HPAs foi utilizado o detector de fluorescência, modelo RF-10A da marca Shimadzu, Co.

A composição da fase móvel foi acetonitrila/água, 75:25, isocrática, com um fluxo de 1 mL/min, a uma temperatura da coluna de 30°C. A programação de comprimento de onda (λ) utilizada para cada HPA está mostrada na TABELA 5 .

TABELA 5 - Programação de comprimento de onda utilizada para Análise dos HPAs por CLAE.

HPA	λ excitação (nm)	λ emissão (nm)
Fluoranteno	285	450
Benzo(b)fluoranteno	295	425
Benzo(k)fluoranteno	296	405
Benzo(a)pireno	296	405
Benzo(ghi)perileno	296	405
Indeno(1,2,3 cd)pireno	300	500

As amostras de água foram injetadas nas mesmas condições utilizadas para os padrões, sendo o volume de injeção de 40 μL . A origem de cada amostra pode ser observada na TABELA 3.

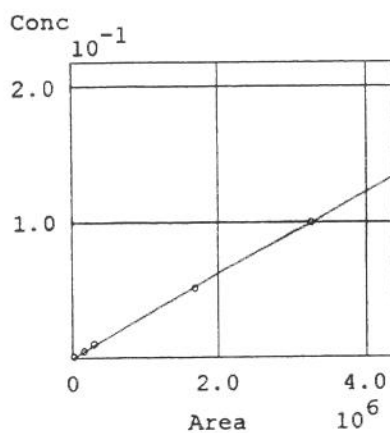


IDNO: 1
NAME: fluoranteno
TIME: 7.12

	CONC	AREA
(1)	0.1	1833951
(2)	0.05	984027
(3)	0.01	186176
(4)	0.005	104456
(5)	0.001	33627

	RF1	RF2
(1)	5.43721e-008	-0.000969973

r2 = 0.998761

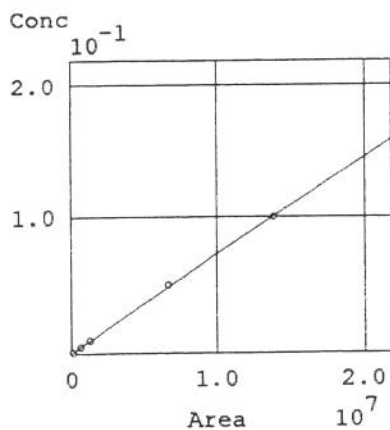


IDNO: 2
NAME: b(b) fluorant
TIME: 16.56

	CONC	AREA
(1)	0.1	3252171
(2)	0.05	1680784
(3)	0.01	296502
(4)	0.005	163309
(5)	0.001	31060

	RF1	RF2
(1)	3.05226e-008	9.0161e-005

r2 = 0.999564



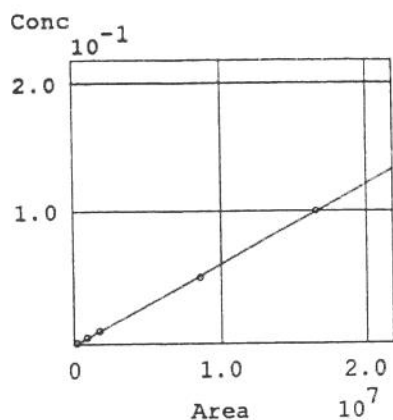
IDNO: 3
NAME: b(k) fluorant
TIME: 19.47

	CONC	AREA
(1)	0.1	13783489
(2)	0.05	6614089
(3)	0.01	1291847
(4)	0.005	656895
(5)	0.001	159834

	RF1	RF2
(1)	7.27018e-009	0.000475252

r2 = 0.999575

FIGURA 2 – Curvas de padronização externa utilizadas para a identificação e quantificação de HPAs nas amostras de água e nos experimentos de biodegradação em meio líquido.

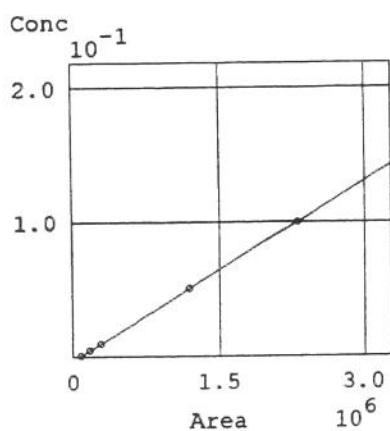


IDNO: 4
NAME: b(a)pireno
TIME: 22.3

	CONC	AREA
(1)	0.1	16524036
(2)	0.05	8556086
(3)	0.01	1722518
(4)	0.005	918347
(5)	0.001	228791

	RF1	RF2
(1)	6.0571e-009	-0.000658923

r2 = 0.999744

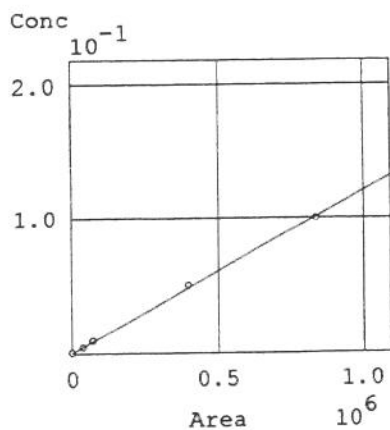


IDNO: 5
NAME: b(ghi)perile
TIME: 33.13

	CONC	AREA
(1)	0.1	2305354
(2)	0.05	1183013
(3)	0.01	286204
(4)	0.005	175099
(5)	0.001	86601

	RF1	RF2
(1)	4.46052e-008	-0.00280773

r2 = 0.999999



IDNO: 6
NAME: inden(cd)pir
TIME: 37.55

	CONC	AREA
(1)	0.1	833190
(2)	0.05	395546
(3)	0.01	70304
(4)	0.005	38714
(5)	0.001	0

	RF1	RF2
(1)	1.19353e-007	0.00126696

r2 = 0.999466

FIGURA 2 – Continuação.

3.6. Experimentos de Biodegradação

3.6.1. Testes de biodegradação de HPAs em placas de Petri

Com o objetivo de verificar a capacidade de crescimento e/ou resistência na presença de HPAs, as 25 linhagens de bactérias nativas que apresentaram maior crescimento foram submetidas ao teste em placa de Petri contendo meio mineral mínimo MM sólido (g/L água destilada): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0), K_2HPO_4 (0,8), KH_2PO_4 (0,2), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,005), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_4\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,001) e ágar (15,0) mais HPAs na superfície das placas, como única fonte de carbono. Os HPAs testados estão listados na TABELA 6.

TABELA 6 - Soluções de HPAs em éter etílico utilizadas para spray nas placas de Petri.

HPA
Fluoranteno (FLU)
Pireno (PIR)
B(a)antraceno (BaA)
Criseno (CRI)
Benzo(e)pireno (BeP)
Benzo(b)fluoranteno (BbF)
Benzo(k)fluoranteno (BkF)
Benzo(a)pireno (BaP)
Dibenzo(a,h)antraceno (Dib(ah)A)
Indeno(1,2,3cd)pireno (Indeno)

Para este experimento foram utilizadas placas de Petri de poliestireno estéreis descartáveis da marca VWR. As placas foram distribuídas na câmara de fluxo laminar e preenchidas com 25 mL de meio MM mais 1,5% de ágar puro, previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos. As placas depois de prontas foram acondicionadas em filme de PVC (tipo Magipack) e estocadas à temperatura ambiente.

Todos os procedimentos microbiológicos de inoculação das linhagens nas placas foram realizados em câmara de fluxo laminar contínuo previamente esterilizada por radiação UV por 10 minutos. Uma alçada da cultura pura em meio LB sólido foi transferida para a placa de teste através da técnica de esgotamento. Após serem inoculadas, as placas receberam um spray da solução 1% de HPA em éter etílico, isento de etanol. As soluções de HPA em éter foram previamente preparadas 24 horas antes de sua utilização. Para fazer o spray nas placas foi utilizado um recipiente de vidro âmbar construído especialmente para este fim. As placas receberam a camada de HPA no interior da capela, devido à rápida volatilização do éter etílico.

Após receber a camada de HPA, as placas foram cuidadosamente fechadas com filme protetor "Parafilm", para evitar contaminação durante o período de crescimento. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica Fanem, ao abrigo da luz, à temperatura de 25°C. Foram feitos dois tipos de controle: placas contendo somente o meio MM sólido inoculado com a linhagem de bactéria e placas contendo o meio MM sólido mais o spray de HPA.

3.6.2. Testes de biodegradação de HPAs em meio líquido

3.6.2.1. Avaliação da ação de diferentes surfactantes na solubilidade de HPAs

Os testes foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral MM, em shaker vertical com ambiente controlado, sob agitação constante de 200 rpm a 25°C. Em cada frasco, contendo uma quantidade conhecida de HPAs (0,01%), foram adicionadas diferentes concentrações (0,2, 0,4, 0,6 %) dos surfactantes dimetil sulfoxido (DMSO), dodecil sulfato de sódio (SDS) e Tween 80. Os HPAs utilizados foram fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno, todos com solubilidade em água menor que 1 mg/mL a 20°C (KEITH & DOUGLAS, 1992). Ao final de 72 h de incubação, os HPAs foram extraídos do meio de cultivo através da adição de acetato de etila (1:3, v/v). A quantificação dos HPAs nos extratos foi medida por CLAE.

3.6.2.2. Avaliação de DMSO, SDS e Tween 80 como agentes inibidores do crescimento celular

Para tal experimento, foram realizadas as incubações como descrito no item anterior, e em seguida adicionou-se em cada frasco células da bactéria 6B, na forma de inóculo contendo aproximadamente 10^6 UFC/mL. Em diferentes intervalos de tempo de incubação foram retiradas alíquotas para contagem de UFC/mL em placa.

3.6.2.3. Extração de HPAs do meio de cultivo utilizando diferentes solventes

Em cada erlenmeyer de 125 mL foram colocados 20 mL de meio MM e estes foram esterilizados a 121°C por 15 minutos. Após serem retirados da autoclave, os erlenmeyers foram mantidos a 60°C. Em cada frasco foi adicionado, assepticamente, 0,2% de DMSO, para facilitar a dissolução dos HPAs no meio aquoso. Foram então adicionados os HPAs (0,01%) em cada frasco. Os frascos contendo os HPAs foram incubados em shaker com temperatura controlada de 25°C, a 200 rpm, protegidos da luz pelo período de 24 horas, para garantir a homogeneização dos HPAs no meio, ou seja, sua biodisponibilidade.

Após este período, foram inoculados 500 µL da suspensão de células em cada frasco, que foram novamente incubados sob as mesmas condições. As amostras foram feitas em triplicatas. Antes da incubação, foram retiradas assepticamente alíquotas de meio MM mais HPA dos frascos testes e também dos controles. Após sete dias de incubação, as células foram eliminadas através de centrifugação e o sobrenadante foi extraído em funil de separação, utilizando os solventes testes para cada extração (acetato de etila, acetonitrila e diclorometano), na proporção de 1:3, v/v.

Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo, a temperatura ambiente, para evitar a degradação de compostos instáveis ao calor e à luz. Após a obtenção dos extratos, estes foram mantidos em câmara fria (-5°C) até as análises por CLAE.

3.6.3. Testes de biodegradação

Após definido o agente surfactante e a forma de extração dos HPAs do meio de cultivo, foram realizados os estudos de biodegradação dos HPAs em meio líquido.

Com o objetivo de definir como a presença de linhagens na forma de cultivos puros e mistos poderia atuar na degradação de HPAs isolados e em misturas de HPAs, foram testadas quatro diferentes linhagens de bactérias 2B, 6B, 7F e 9D (que foram pré-selecionadas de acordo com a sua capacidade de crescimento e resistência aos HPAs, com os testes em placas contendo spray de HPAs) e quatro diferentes HPAs, fluoranteno (FLU), benzo(b)fluoranteno (BBF), benzo(k)fluoranteno (BKF) e benzo(a)pireno (BAP), que foram selecionados a partir de sua presença constante nas amostras de água e por apresentarem maiores taxas de biodegradação em relação aos outros HPAs previamente testados.

Foram inicialmente realizados os testes com as linhagens puras na presença de diferentes HPAs como única fonte de carbono. Como é possível visualizar na TABELA 7, foram feitos 16 experimentos.

TABELA 7 – Testes de biodegradação realizados com diferentes linhagens de bactérias e diferentes HPAs.

LINHAGEM	FLUORANTENO	B(B)FLUORANTENO	B(K)FLUORANTENO	B(A)PIRENO
2B	EXP 1	EXP 2	EXP 3	EXP 4
6B	EXP 5	EXP 6	EXP 7	EXP 8
7F	EXP 9	EXP 10	EXP 11	EXP 12
9D	EXP 13	EXP 14	EXP 15	EXP 16

Foram realizados em seguida, os testes de biodegradação envolvendo culturas mistas de bactérias (MISTA 1 = 2B+6B+7F+9D e MISTA 2 = 6B+7F) e misturas de

HPAs (MIX 1 = FLU+BBF+BKF+BAP e MIX 2 = BBF+BAP), que podem ser visualizados na TABELA 8.

TABELA 8 – Testes de biodegradação realizados com bactérias isoladas e na forma de culturas mistas, na presença de misturas de HPAs.

LINHAGENS	MIX 1	MIX 2
MISTA 1	EXP 17	EXP 18
MISTA 2	EXP 19	EXP 20
2B	EXP 21	-
6B	EXP 22	-
7F	EXP 23	-
9D	EXP 24	-

3.6.3.1. Preparo dos inóculos

Para a realização de tais testes, uma alçada da linhagem da bactéria a ser testada foi retirada da placa de Petri contendo meio de cultivo LB sólido e inoculada em um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio LB líquido previamente esterilizado a 121°C, por 15 minutos. O tubo foi agitado em agitador eletrônico para completa distribuição da cultura no meio, sendo em seguida incubado a 25°C por 20 horas. Após tal período, foi retirado 1 mL do caldo da cultura através de micropipeta automática com ponteira descartável previamente esterilizada. As alíquotas de 1 mL foram colocadas em tubos Eppendorf (esterilizados) e centrifugadas por 10 minutos em microcentrífuga. Após a separação das células, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com tampão sódio-potássio estéril 50 mM, pH 7,2,. Este procedimento de lavagem das células foi realizado por três vezes, para retirar restos do meio de crescimento. Os "pellets" de células lavadas foram resuspendidos em 1 mL de tampão e distribuídos nos frascos erlenmeyers previamente preparados.

3.6.3.2. Preparo dos frascos contendo meio líquido

Em cada erlenmeyer de 125 mL foram colocados 20 mL de meio MM e estes foram esterilizados a 121°C por 15 minutos. Após serem retirados da autoclave, os erlenmeyers foram mantidos a 60°C. Em cada frasco foi adicionado, assepticamente, 0,2% de DMSO, para facilitar a dissolução dos HPAs no meio aquoso. Foram então adicionados os HPAs (0,01%). Os frascos contendo os HPAs foram incubados em shaker com temperatura controlada de 25°C, a 200 rpm, protegidos da luz pelo período de 24 horas.

Após este período, foi inoculado 1 mL da suspensão de células em cada frasco, e estes foram novamente incubados sob as mesmas condições. Nos experimentos em que foram utilizados os cultivos mistos de 4 bactérias, foram utilizados 250 µL de cada inóculo. Foram feitos controles contendo meio MM mais HPAs estéril e meio MM mais inóculo sem HPAs.

3.6.3.3. Avaliação da biodegradação dos HPAs por CLAE

Foram retiradas assepticamente alíquotas dos meios, no início da incubação e em intervalos de 7 a 10 dias. Todas as alíquotas foram centrifugadas em microcentrífuga, extraídas com acetato de etila, concentradas em evaporador rotativo a 30°C e armazenadas a -5°C para posterior análise por CLAE, segundo as condições descritas no item 3.5.2.2.

3.6.3.4. Determinação de biomassa bacteriana

A biomassa bacteriana produzida durante o consumo de HPAs foi quantificada através da determinação da massa de proteína presente no cultivo, seguindo a metodologia de LOWRY *et alli* (1951). Como foram feitas cinco medidas de biomassa de cada experimento, as células presentes no meio de cultivo foram separadas através de centrifugação (5000 rpm, 15 min) e congeladas, para que todas as amostras pudessem ser quantificadas simultaneamente no final do experimento.

Uma vez reunidas todas as amostras, as células foram re-suspendidas em um volume conhecido de NaOH 1N e aquecidas a 90°C durante 10 min. Em seguida, alíquotas de 0,2 mL foram transferidas para tubos Eppendorf e adicionou-se 1 mL da solução C, descrita abaixo. Após deixar a mistura em repouso por 10 min a temperatura ambiente, adicionou-se 0,1 mL da solução D. Após 30 min, foi feita a leitura da absorbância a 750 nm. A concentração de proteína foi calculada através da comparação com a curva de absorbância do padrão de albumina de soro bovino.

Solução A: 1g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água.

Solução B: Tartarato de sódio (2%) em água.

Solução C: 0,5 mL da Solução A e 0,5 mL da Solução B em 50 mL de uma solução de NaCO_3 (2%) em água deionizada.

Solução D: Reagente de Follin-Ciocalceau (50%) em água bidestilada.

3.7. Determinação dos metabólitos produzidos durante a biodegradação

3.7.1. Extração dos metabólitos

Durante o período de incubação dos meios contendo HPAs em biodegradação, foram retiradas amostras (20 mL) dos mesmos para a detecção de possíveis metabólitos indicadores da biodegradação dos HPAs. As células foram eliminadas do meio de cultivo através de centrifugação. O sobrenadante foi extraído em funil de separação, primeiramente com 3 x 5 mL de acetato de etila, em pH neutro e em seguida acidificado com HCl 6N, e extraído novamente com mais 3 x 5 mL de acetato de etila. Os extratos foram evaporados em evaporador rotativo a temperatura ambiente, para evitar a degradação de compostos instáveis ao calor e à luz. Após a obtenção dos extratos, estes foram mantidos em câmara fria (-5°C) até as análises por CG-EM.

3.7.2. Análise dos extratos neutros e ácidos por CG-EM

Os extratos neutros foram injetados diretamente no cromatógrafo gasoso, já os extratos ácidos foram derivatizados por metilação com trifluoreto de boro em metanol, a temperatura ambiente, pelo período 14 horas. Para tais análises foi usado o cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa (Shimadzu, Co.), equipado com injetor automático e estação de tratamento de dados. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida DB5 (30 m x 0,22 mm, 0,45 μ m), usando hélio como gás de arraste (vel. linear de 32,3 cm s⁻¹). A temperatura da coluna foi mantida a 120°C por 2 min e então programada para elevação até 280°C, a uma taxa de 5°C/min, permanecendo por 26 min nesta temperatura. As temperaturas do injetor e da interface foram ajustadas para 280°C. O espectrômetro de massa operou com energia de ionização eletrônica de 70 eV.

3.8. Monitoramento do sítio aquático para implantação da biorremediação

A região do rio Jaguari localizada nas proximidades das instalações da refinaria de petróleo (REPLAN) e de muitas indústrias químicas, foi selecionada para o monitoramento pois apresentou os níveis mais elevados de presença de HPAs em suas águas. Também, foi a partir das amostras de água e sedimentos coletados nas proximidades do rio Jaguari que foi possível o isolamento do maior número de linhagens de bactérias, capazes de crescer na presença de HPAs, nos testes classificatórios realizados em laboratório.

A lagoa final de tratamento da REPLAN foi escolhida como ponto fixo de coleta de amostras, e foram feitas medidas mensais de temperatura da água, temperatura do ambiente externo, pH da água, concentração de HPAs, número de bactérias heterotróficas totais (BHT) e número de bactérias degradadoras de HPAs (BDH) presentes na água.

3.8.1. Determinação da concentração de HPAs nas amostras de água da lagoa

Para a extração dos HPAs das amostras de água, foi utilizada a metodologia, estabelecida pelo EPA (1995), descrita anteriormente.

3.8.2. Determinação do número de bactérias presentes nas amostras de água da lagoa

Para determinação do número de bactérias heterotróficas totais (BHT) e degradadoras de HPAs (BDH), foi utilizada a metodologia do Número Mais Provável (NMP) de 3 tubos estabelecida por GRIFOLL (1998).

Para a contagem do número de bactérias heterotróficas totais, amostras de 1 mL de água foram inoculadas em 5 diluições seriadas em tubos contendo 10 mL de meio LB+BHB (g/L água destilada): NH_4NO_3 (1,0), K_2HPO_4 (1,0), KH_2PO_4 (1,0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,05), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02), pH=7,0 com NaOH 1N mais 2% de glucose. Os tubos foram incubados a 23°C e a leitura foi feita após 8 dias.

Já para a contagem do número de bactérias degradadoras de HPAs, amostras de 1 mL de água foram usadas para inocular diluições seriadas em tubos contendo 10 ml de meio BHB mais HPAs (0,5 mg/ml) adicionados ao meio na forma de cristais. Os tubos foram incubados a 23°C, e mantidos no escuro com agitação de 120 rpm, até não ocorrerem mais alterações da coloração do meio (aproximadamente 4 semanas). Os tubos foram considerados positivos ou negativos de acordo com as alterações de coloração e/ou turbidez do meio, em comparação com tubos inoculados sem a presença de HPAs. O número de bactérias por mililitro de água foi calculado pelos procedimentos padrões (DE MAN, 1975).

3.9. Testes de biodegradação em microambiente

Os testes de biodegradação em microambiente foram feitos em laboratório, com o objetivo de imitar ao máximo as condições ambientais que as bactérias iriam enfrentar quando colocadas na lagoa de tratamento. Amostras de água e sedimento (1 Kg cada) foram colocadas em recipientes de vidro e foram retiradas pequenas amostras para medidas da concentração de HPAs presentes e contagem do número de bactérias heterotróficas e degradadoras de HPAs, como já descrito anteriormente. Foram desenvolvidos 5 experimentos, descritos a seguir:

- 1- MA1-Microambiente natural, sem adição de nutrientes, bactérias ou HPAs.
- 2- MA2-Microambiente com adição de cultura mista de bactérias.
- 3- MA3-Microambiente com adição de cultura mista de bactérias e nutrientes.
- 4- MA4-Microambiente com adição de cultura mista de bactérias, nutrientes e HPAs.
- 5- MA5-Microambiente com adição da bactéria 2B e nutrientes.

As alterações de concentração de HPAs e populações de bactérias foram monitoradas mensalmente, visando obter informações sobre a biodegradação dos HPAs presentes nas amostras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Levantamento de informações sobre as áreas industriais no Estado de São Paulo possivelmente contaminadas com HPAs

O contato com as pessoas envolvidas na área de saneamento ambiental e poluição das águas foi de grande relevância para o desenvolvimento desse trabalho. Através das várias fontes de informações fornecidas, foi possível a obtenção de dados sobre as regiões hídricas interiores do estado de São Paulo, que provavelmente estariam contaminadas com HPAs.

A partir de dados oficiais obtidos junto à CETESB da cidade de São Paulo, foi possível a seleção dos sítios ambientais aquáticos possivelmente contaminados com HPAs pesquisados neste trabalho. A CETESB utiliza a metodologia resumidamente descrita abaixo, para determinar a qualidade das águas do Estado.

A partir de um estudo realizado em 1970 pela “National Sanitation Foundation” dos Estados Unidos, a CETESB adaptou e desenvolveu o Índice de Qualidade das Águas - IQA, que incorpora 9 parâmetros considerados relevantes para a avaliação da qualidade das águas, tendo como determinante principal a utilização das mesmas para abastecimento público.

A criação do IQA baseou-se numa pesquisa de opinião feita junto a especialistas em qualidade das águas, que indicaram os parâmetros a serem medidos, o peso relativo dos mesmos e a condição com que se apresenta cada parâmetro, segundo uma escala de valores “rating”. Dos 35 parâmetros indicadores de qualidade de água inicialmente propostos, foram selecionados 9. Para estes, a critério de cada profissional, foram estabelecidas curvas de variação da qualidade das águas de acordo com o estado ou a condição de cada parâmetro.

O IQA é determinado pelo produto ponderado das qualidades de água correspondentes aos parâmetros: Temperatura da Amostra, pH, Oxigênio Dissolvido, Demanda Bioquímica de Oxigênio (5 dias, 20°C), Coliformes Fecais, Nitrogênio Total, Fosfato Total, Resíduo Total e Turbidez.

A seguinte fórmula é utilizada pela CETESB para o cálculo do IQA:

$$IQA = \prod_{i=1}^n q_i^{w_i}$$

onde: IQA = Índice de Qualidade das Águas, (entre 0 e 100);

q_i = qualidade do i-ésimo parâmetro, um número entre 0 e 100, obtido da respectiva “curva média de variação de qualidade” (CETESB, 1995), em função de sua concentração ou medida;

w_i = peso correspondente ao i-ésimo parâmetro, um número entre 0 e 1, atribuído em função da sua importância para a conformação global de qualidade.

No caso de não se dispor do valor de algum dos parâmetros, o cálculo do IQA é inviabilizado. A partir do cálculo efetuado, foi determinada a qualidade das águas brutas que, indicada pelo IQA numa escala de 0 a 100, é classificada para abastecimento público, segundo a graduação abaixo:

80 - 100 → qualidade ótima

52 - 79 → qualidade boa

37 - 51 → qualidade aceitável

20 - 36 → qualidade ruim

0 - 19 → qualidade péssima

Para facilitar a avaliação do grau de contaminação das águas interiores, a CETESB dividiu o Estado de São Paulo em onze **Grupos de Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos**, que são:

- 1º Grupo:** Aguapeí, Peixe e Pontal do Paranapanema
- 2º Grupo:** Alto e Médio Paranapanema
- 3º Grupo:** Alto Tietê
- 4º Grupo:** Piracicaba, Capivari e Jundiaí
- 5º Grupo:** Sorocaba/Médio Tietê
- 6º Grupo:** Tietê/Jacaré, Tietê/Batalha e Baixo Tietê
- 7º Grupo:** Turvo/Grande e São José dos Dourados
- 8º Grupo:** Pardo, Sapucaí/Grande, Mogi-Guaçu e Baixo Pardo/Grande
- 9º Grupo:** Mantiqueira, Paraíba do Sul e Litoral Norte
- 10º Grupo:** Ribeira de Iguape/Litoral Sul
- 11º Grupo:** Baixada Santista.

Os valores do IQA foram utilizados para a elaboração do mapa **Níveis Atuais e Tendências da Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo - 1994**, (FIGURA 3). As tendências **melhorar**, **piorar** e **indefinida**, representadas pelos círculos que também localizam os pontos de amostragem, foram avaliadas estatisticamente a partir dos dados de IQA's médios dos últimos 10 anos.

Através das informações obtidas pelos relatórios fornecidos pela CETESB, por comunicações pessoais, foi possível determinar 5 regiões e 12 rios de onde foram feitas as coletas de amostras para o desenvolvimento deste trabalho. As regiões selecionadas foram:

- 1 - Grande São Paulo:** Rio Tietê, Rio Pinheiros e Rio Tamanduateí (FIGURA 4).
- 2 - Cubatão:** Rio Cubatão, Rio das Pedras e Rio Quilombo (FIGURA 5)
- 3 - Campinas / Polo Petrolífero de Paulínia:** Rio Atibaia, Rio Jaguari, Rio Piracicaba, Rio Capivari (FIGURA 6).
- 4 - Sorocaba:** Rio Sorocaba (FIGURA 7).
- 5 - Vale do Rio Paraíba do Sul:** Rio Paraíba do Sul (FIGURA 8).

NÍVEIS ATUAIS E TENDÊNCIAS DA QUALIDADE DAS ÁGUAS INTERIORES DO ESTADO DE SÃO PAULO 1994



Governo do Estado de São Paulo



CETESB

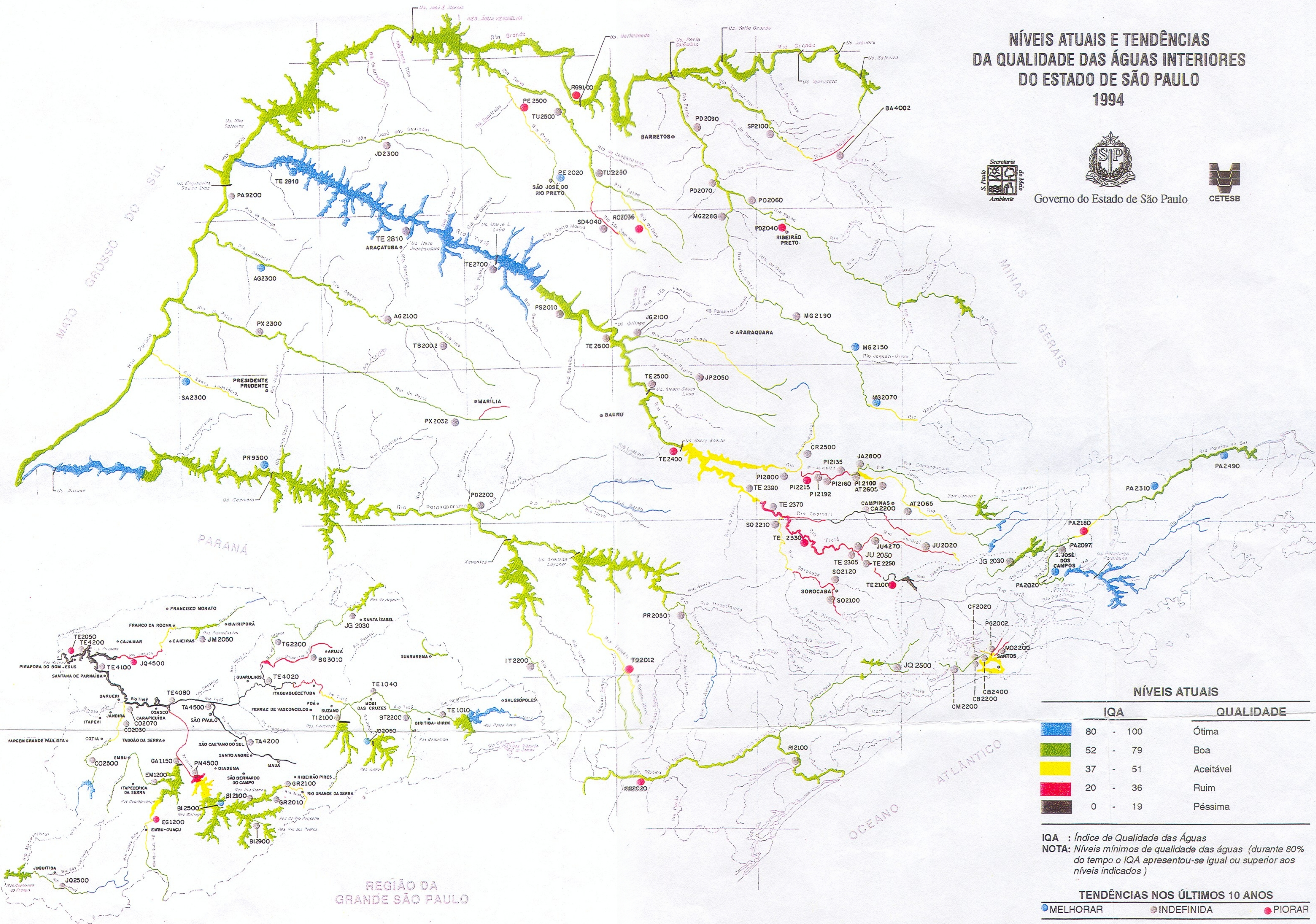


FIGURA 3 – Mapa “Níveis Atuais e Tendências da Qualidade das Águas Interiores do Estado de São Paulo – 1994”, fornecido pela CETESB (CETESB, 1995).

[illegible]

53

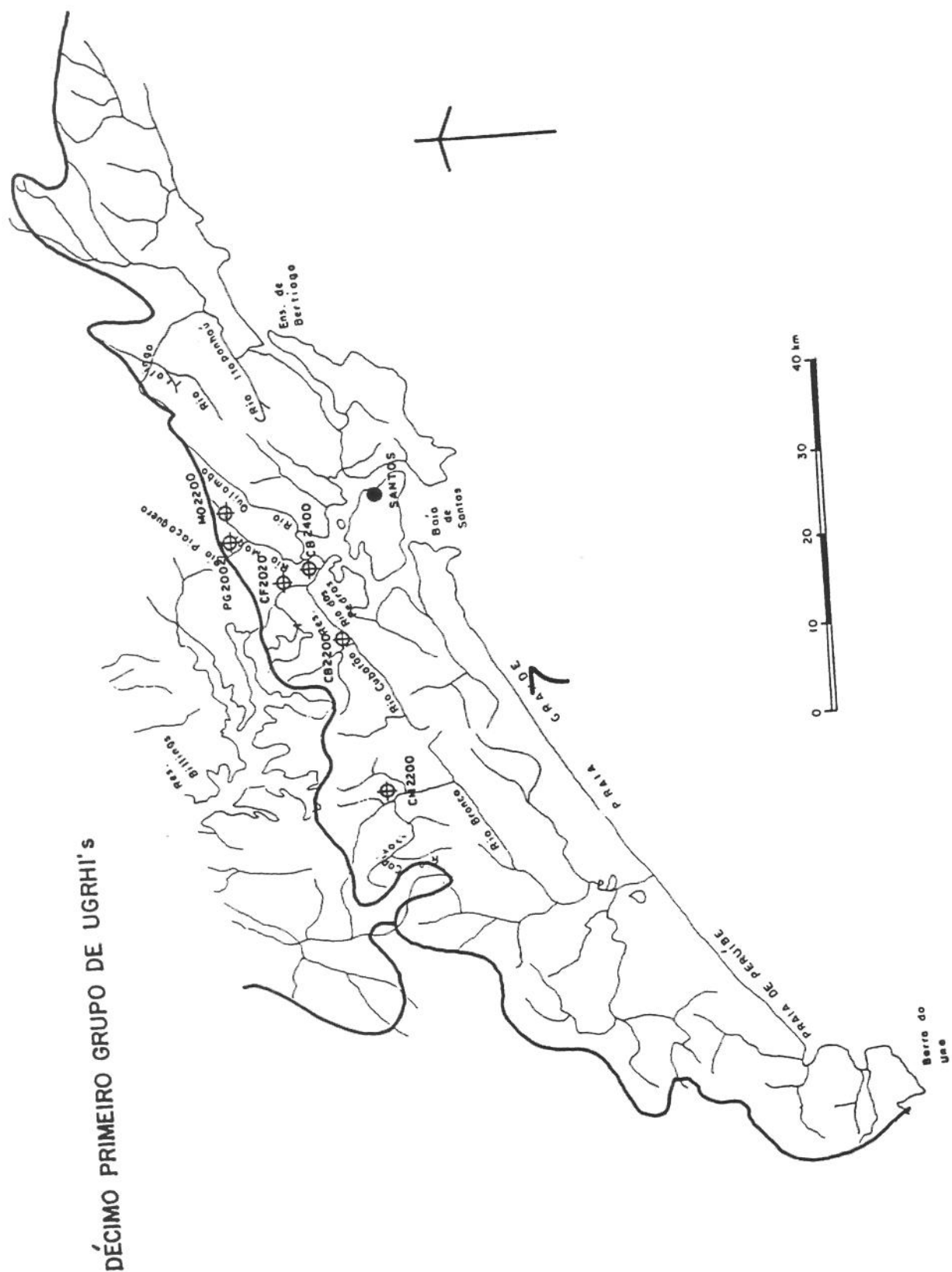


FIGURA 5 – Mapa representativo do 11º Grupo de Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos, que inclui os rios Cubatão, das Pedras e Quilombo, de onde foram retiradas amostras de água para esse trabalho.

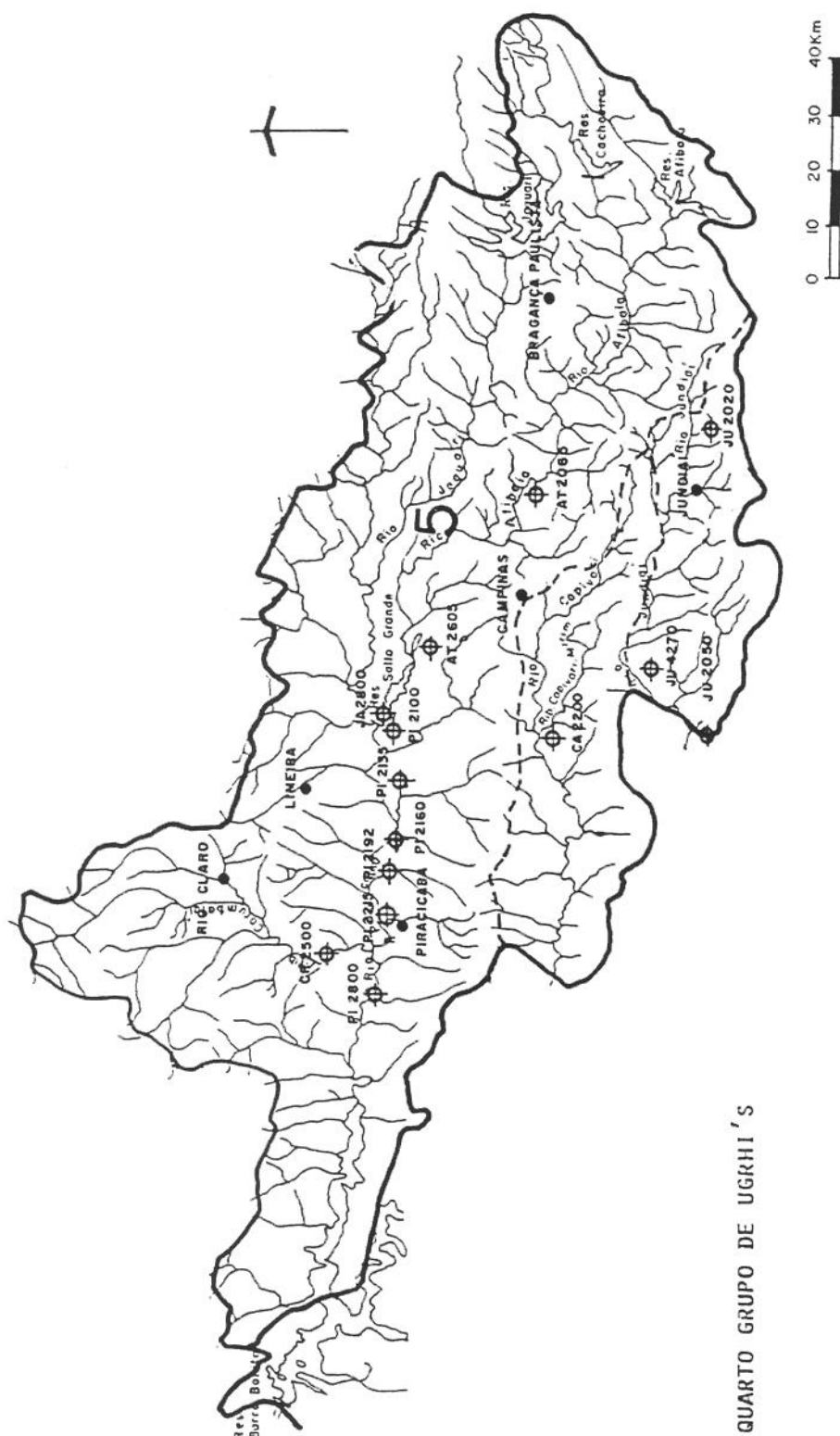


FIGURA 6 – Mapa representativo do 4º Grupo de Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos, que inclui os rios Atibaia, Jaguari, Piracicaba e Capivari, de onde foram retiradas amostras de água para esse trabalho.

4.2. Caracterização dos sítios ambientais aquáticos contaminados com HPAs

A caracterização dos locais onde pretende-se avaliar a ocorrência de microrganismos capazes de biodegradar HPAs e o processo de biorremediação, fornece informações de extrema importância para o delineamento e posterior implantação de tecnologias apropriadas de biorremediação.

Inicialmente, foi feito um levantamento sobre a presença de microrganismos degradadores de HPAs (4.2.1) e sobre a concentração de HPAs presentes nas amostras de água dos 12 rios selecionados (4.2.3).

Através dos dados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho, foi possível selecionar a região da REPLAN para ser monitorada com um maior nível de detalhamento (4.5).

4.2.1. Isolamento das linhagens degradadoras de HPAs

Através da metodologia de crescimento aeróbio, foram isoladas 136 linhagens bacterianas com capacidade de crescer na presença dos HPAs. O número de linhagens obtidas em cada local de coleta está mostrado na TABELA 9.

As colônias obtidas apresentaram sempre o mesmo aspecto: em meio seletivo JE sólido, formaram-se colônias muito miúdas, transparentes, quase invisíveis a olho nu. Quando estas colônias foram repicadas em placas contendo meio LB, foi possível observá-las de uma forma bem definida. A partir do isolamento, as colônias foram repicadas várias vezes, para garantir a sua purificação. Nas FIGURAS 9 a 13 é possível a visualização do aspecto morfológico de algumas colônias isoladas.

TABELA 9 - Número de amostras e de linhagens de bactérias obtidas a partir da metodologia de enriquecimento aeróbio na presença de HPAs como única fonte de carbono.

Código Linhagens	Nº de Linhagens	RIO
1A até 1D, 2A até 2D, 3A até 3C, 4A e 4B, 5A e 5B, 6A até 6C	18	Jaguari
10A até 10D	4	Atibaia
11A até 11F	6	Piracicaba
12A até 12D	4	Capivari
8A até 8J	10	Sorocaba
7A até 7H	9	Paraíba do Sul
13A até 13P	15	Tietê
9A até 9N	13	Pinheiros
14A até 14N	13	Tamanduateí
15A até 15O	14	Cubatão
16A até 16P	15	das Pedras
17A até 17P	15	Quilombo



FIGURA 9 - Colônias de bactérias isoladas a partir de amostra de água coletada no rio Atibaia. Meio LB sólido.



FIGURA 10 - Colônias de bactérias isoladas a partir de amostra de água coletada no rio Sorocaba. Meio LB sólido.



FIGURA 11 - Colônias de bactérias isoladas a partir de amostra de água coletada no rio Tietê. Meio LB sólido.



FIGURA 12 - Colônias de bactérias isoladas a partir de amostra de água coletada no rio Paraíba do Sul. Meio LB sólido.



FIGURA 13 - Colônias de bactérias isoladas a partir de amostra de água coletada no rio Cubatão. Meio LB sólido.

Durante o período (20 dias) em que as amostras de água foram incubadas em meio seletivo líquido, com agitação, não foi possível visualizar o crescimento das colônias e nem a presença de odor. Quando este mesmo meio seletivo líquido foi repassado nas placas, após 24 horas, havia um forte odor de fermentação no ambiente. Após 96 horas de crescimento, foi possível a visualização das colônias.

As amostras de água coletadas na região do rio Jaguari apresentaram o maior número de linhagens capazes de crescer no meio seletivo utilizado, sendo este um dos fatores que levou à escolha desta região para monitoramento detalhado.

4.2.2. Testes de Identificação das Linhagens

As 25 linhagens que apresentaram crescimento mais intenso foram selecionadas para a caracterização bioquímica e morfológica, segundo o manual de BERGEY (1984). As linhagens e os resultados dos testes realizados encontram-se nas TABELAS 10 a 15. Todas as linhagens são bastonetes Gram negativos; podendo, portanto, fazer parte de uma das famílias das bactérias Gram negativas aeróbias ou anaeróbias facultativas.

TABELA 10 – Resultado dos testes bioquímicos e morfológicos realizados com as linhagens de bactérias possíveis degradadoras de HPAs, isoladas a partir de amostras de água dos rios do estado de São Paulo.

Testes/ Amostras	1A	2A	3A	4A
Gram	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-
Oxidase	+	+	+	+
Catalase	+	+	-	+
Gelatinase	+	-	-	+
Motilidade	+	+	-	+
TSI Gás	-	-	-	-
TSI Açúcar	Alcalino/ Alcalino	Alcalino/ Alcalino	Alcalino/ Alcalino	Alcalino/
TSI H ₂ S	-	-	-	-
BGA	Meio vermelho Col.	Meio vermelho Col.	Meio vermelho Col. Branca	Meio
McConkey	Colônia pequena incolor	Colônia incolor/ Centro	Colônia pequena incolor	-----
O/F Gli-Resultado	Oxidativo	Oxidativo	Não ferment./ Não Oxid.	Oxidativo
O/F Sac-Resultado	Oxidativo	Oxidativo	Não ferment./ Não Oxid.	Oxidativo
O/F Lac-Resultado	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./

TABELA 11 – Resultado dos testes bioquímicos e morfológicos realizados com as linhagens de bactérias possíveis degradadoras de HPAs, isoladas a partir de amostras de água dos rios do estado de São Paulo.

Testes/ Amostras	5A	6A	1B	2B
Gram	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-
Oxidase	+	+	+	+
Catalase	+fraco	+fraco	+	+
Gelatinase	+	-	+	+
Motilidade	+	-	+	-
TSI Gás	-	-	-	-
TSI Açúcar	Ácido/ Ácido	Ácido/ Ácido	Alcalino/ Alcalino	Alcalino/ Alcalino
TSI H ₂ S	-	-	-	-
BGA	Não houve crescimento	Meio vermelho Col. Branca	-----	Meio vermelho Col.
McConkey	Colônia pequena incolor	Colônia pequena	Colônia pequena incolor	Col. incolor/ Centro
O/F Gli-Resultado	Oxidativo	Oxidativo	Oxidativo	Não ferment./ Não
O/F Sac-Resultado	Oxidativo	Oxidativo	Oxidativo	Não ferment./ Não
O/F Lac-Resultado	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./ Não

TABELA 12 – Resultado dos testes bioquímicos e morfológicos realizados com as linhagens de bactérias possíveis degradadoras de HPAs, isoladas a partir de amostras de água dos rios do estado de São Paulo.

Testes/ Amostras	3B	4B	5B	6B
Gram	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-
Oxidase	+	+	+	+
Catalase	+fraco	+	+fraco	+
Gelatinase	+	+	-	+
Motilidade	-	+	-	+
TSI Gás	-	-	-	-
TSI Açúcar	Ácido/ Ácido/ Gás	Alcalino/ Alcalino	Ácido/ Ácido	Alcalino/ Alcalino
TSI H ₂ S	-	-	-	-
BGA	Meio amarelo Col. branca	Meio vermelho Col. peq.	Não houve crescimento	Meio vermelho Col. peq.
McConkey	Colônia pequena incolor	Colônia pequena incolor	-----	Colônia pequena incolor
O/F Gli-Resultado	Ferm/Oxi	Oxidativo	Não ferment./ Não Oxid.	Oxidativo
O/F Sac-Resultado	Ferm/Oxi	Oxidativo	Não ferment./ Não Oxid.	Oxidativo
O/F Lac-Resultado	Fermentativo	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./ Não Oxid.

TABELA 13 – Resultado dos testes bioquímicos e morfológicos realizados com as linhagens de bactérias possíveis degradadoras de HPAs, isoladas a partir de amostras de água dos rios do estado de São Paulo.

Testes/ Amostras	6C	7C	7D	7F
Gram	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-
Oxidase	+	+	+	+
Catalase	-	+	-	+
Gelatinase	-	+	-	+
Motilidade	-	-	+	-
TSI Gás	-	-	-	-
TSI Açúcar	Ácido/ Ácido	Alcalino/ Alcalino	Ácido/ Ácido	Alcalino/ Alcalino
TSI H ₂ S	-	-	-	-
BGA	Meio vermelho Col. peq.	Meio vermelho Col. Branca	Meio vermelho Col. peq.	Meio vermelho
McConkey	Colônia pequena incolor	Colônia pequena incolor	Colônia pequena incolor	Colônia pequena
O/F Gli-Resultado	Oxidativo	Oxidativo	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./ Não
O/F Sac-Resultado	Oxidativo	Oxidativo	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./ Não
O/F Lac-Resultado	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./ Não

TABELA 14 – Resultado dos testes bioquímicos e morfológicos realizados com as linhagens de bactérias possíveis degradadoras de HPAs, isoladas a partir de amostras de água dos rios do estado de São Paulo.

Testes/ Amostras	7G	8C	8D	8E
Gram	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-
Oxidase	+	+	-	-
Catalase	+	+	+	+
Gelatinase	+	-	-	+
Motilidade	-	+	+	-
TSI Gás	-	-	-	-
TSI Açúcar	Alcalino/ Alcalino	Alcalino/ Alcalino	Alcalino/ Alcalino	Alcalino/
TSI H ₂ S	-	-	-	-
BGA	Meio vermelho Col. peq.	Meio vermelho Col. Branca	Colônia pequena incolor	Colônia pequena
McConkey	Colônia pequena incolor	Colônia pequena incolor	Colônia pequena incolor	Colônia pequena
O/F Gli-Resultado	Não ferment./ Não Oxid.	Oxidativo	Oxidativo	Oxidativo
O/F Sac-Resultado	Não ferment./ Não Oxid.	Oxidativo	Oxidativo	Oxidativo
O/F Lac-Resultado	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./ Não Oxid.	Não ferment./

TABELA 15 – Resultado dos testes bioquímicos e morfológicos realizados com as linhagens de bactérias possíveis degradadoras de HPAs, isoladas a partir de amostras de água dos rios do estado de São Paulo.

Testes/ Amostras	8F	9C	9D	9E	9F
Gram	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-
Oxidase	-	-	-	-	-
Catalase	-	+	+	+	+
Gelatinase	-	-	-	-	-
Motilidade	-	-	-	+	+
TSI Gás	-	-	-	-	-
TSI Açúcar	Alcalino/ Ácido	Alcalino/ Ácido	Alcalino/ Ácido	Ácido/ Ácido	Ácido/ Ácido
TSI H ₂ S	-	-	-	-	-
BGA	Meio vermelho Col.	Meio vermelho Col.	Meio vermelho Col.	Meio vermelho Col.	Meio vermelho Col.
McConkey	Col. pequena incolor	Col. pequena incolor	Col. pequena incolor	Col. pequena incolor	Col. pequena incolor
O/F Gli-Resultado	Oxidativo	Oxidativo	Oxidativo	Não ferment./ Não	Não ferment./ Não
O/F Sac-Resultado	Oxidativo	Oxidativo	Oxidativo	Não ferment/Não	Não ferment/Não
O/F Lac-Resultado	Não ferment/Não	Não ferment/Não	Não ferment/Não Oxid	Não ferment/Não	Não ferment/Não

As linhagens estudadas foram classificadas como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Neisseria* e *Aemophilus*, como pode ser visto na TABELA 16.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. são as bactérias mais frequentemente isoladas com capacidade de degradar diferentes HPAs, como pode ser visto nas pesquisas realizadas por TRZESICKA-MLYNARZ & WARD, 1995; JUHASZ *et alli*, 1996; WEISSENFELLS, *et alli*, 1995; DAGHER *et alli*, 1996.

As bactérias pertencentes aos gêneros *Moraxella* sp. *Flavobacterium* sp e *Beijerinckia* sp. também são extensamente estudadas quanto à sua capacidade de degradação de HPAs (STUCKI & ALEXANDER, 1987; CULLEN *et alli*, 1994).

TABELA 16 - Classificação das linhagens de bactérias possíveis degradadoras de HPAs isoladas a partir dos rios do estado de São Paulo.

Linhagem	Origem	Família	Gênero	Possível Espécie
1A / 1B	Jaguari ¹	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i> , <i>mallei</i> ,
4A/4B/ 6B	Atibaia ²			<i>aureofaciens</i> , <i>pseudomallei</i> , <i>cepacea</i> , <i>gradioli</i>
2A	Jaguari ¹	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i> , <i>cichorii</i> , <i>stutzeri</i> ,
8C	Sorocaba			<i>mendocina</i> , <i>solanacearum</i> , <i>flava</i> , <i>pseudoflava</i> , <i>caryophilli</i>
2B	Jaguari ¹	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Moraxella</i>	
7F/7G	Paraíba			
3A	Jaguari ¹	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Neisseria</i>	<i>elongata</i>
3B	Jaguari ¹	<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Haemophilus</i>	
8D	Sorocaba	<i>Pseudomonaceae</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>populi</i> , <i>axonopodis</i>
8E	Sorocaba	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	
9C/9D	Pinheiros	<i>Neisseriaceae</i>	<i>Acinetobacter</i>	
9E/9F	Pinheiros	<i>Pseudomonaceae</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>populi</i> , <i>ampelina</i>

¹Proximidades da REPLAN, Paulínia. ²Proximidades da Rhodia, Paulínia.

Para algumas linhagens de bactérias (5 A, 5B, 6A, 6C, 7C, 7D, 8C e 8F) os testes realizados não foram conclusivos, não sendo possível a sua classificação.

As linhagens encontradas na região do rio Jaguari foram classificadas como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Neisseria* e *Haemophilus*, sendo esta região a que apresentou maior variedade de gêneros de bactérias degradadoras de HPAs.

4.2.3. Quantificação e identificação de HPAs nas amostras de água

A segunda etapa de caracterização dos sítios foi feita através da quantificação e identificação dos HPAs presentes nas amostras de água coletadas dos 12 rios.

A presença dos HPAs nas águas coletadas se origina de uma poluição crônica e não de grandes vazamentos, e por este motivo, o principal problema que surge ao se escolher uma metodologia adequada são as baixas concentrações de HPAs presentes no meio aquático. As técnicas instrumentais utilizadas devem operar com a máxima seletividade e sensibilidade, e evitando sempre a contaminação da amostras.

Dentro dos métodos analíticos de identificação e quantificação dos HPAs, a espectroscopia de fluorescência permite dispor de duas variáveis que são os comprimentos de onda de excitação e de emissão, encontrando assim combinações adequadas para obter uma maior seletividade. Ao mesmo tempo, a sensibilidade é outra vantagem já que supera ao menos em uma ordem de grandeza ao UV, estando somente superada pela espectroscopia de massas. Todas estas características convertem a espectroscopia de fluorescência em um dos métodos clássicos de análise de HPAs ambientais e biológicos. Outra vantagem do método reside na linearidade da relação intensidade-concentração, em uma ampla margem de concentrações. No entanto, a técnica apresenta a desvantagem de detectar qualquer material que apresente fluorescência e que não necessariamente é um hidrocarboneto.

A metodologia utilizada mostrou ser eficiente na separação, identificação e quantificação dos HPAs nas amostras de água estudadas. A metodologia de extração (EPA, 1995) mostrou índices de recuperação de 85 a 96% para os HPAs totais.

Como pode ser observado na FIGURA 14, o cromatograma contendo os seis padrões de HPAs apresentou valores de k' muito satisfatórios, $1,50 < k' < 12,35$, e um tempo total de análise em torno de 39 minutos. Também foram testadas condições de análises utilizando gradiente de solventes, com o objetivo de reduzir o tempo de análise, mas foi

observado que houve uma redução nos valores de k' . Como para a análise de traços é ideal a corrida sem gradiente, pois há uma alteração mínima da linha de base, ficaram estabelecidas as condições de análise sem gradiente.

No Brasil, conforme informação da CETESB, a legislação para a presença de HPAs na água para consumo humano foi adaptada a partir das orientações da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1984), sendo estabelecida como 0,01 $\mu\text{g/L}$ em benzo(a)pireno (CNMA, 1996). Não existem metodologias oficiais no Brasil para a detecção dos HPAs nas águas, fator este que dificulta a monitoração dos níveis de contaminação das águas por estes compostos, por parte dos órgãos responsáveis.

Os valores e os tipos de HPAs encontrados em cada amostra de água estão resumidos na TABELA 17 e os cromatogramas correspondentes às análises podem ser vistos nas FIGURAS 15 a 26.

Nos rios Sorocaba, Cubatão, Capivari e Tietê a concentração de HPAs totais nas amostras de água ficou abaixo de 0,0130 $\mu\text{g/L}$, sendo este valor considerado dentro do limite citado acima.

As amostras de água coletadas nos rios Tamanduateí, Piracicaba, Pedras, Quilombo e Paraíba do Sul apresentaram concentrações de HPAs totais na faixa de 0,0174 até 0,0284 $\mu\text{g/L}$.

Já os rios Pinheiros, Atibaia e Jaguari apresentaram os níveis mais elevados de HPAs totais em suas amostras de água, chegando a 0,1712 $\mu\text{g/L}$ para o rio Jaguari.

Essas variações nas concentrações de HPAs totais nas amostras de água podem ter ocorrido por vários motivos, dentre eles, alterações climáticas, descargas de poluentes, fotodecomposição, volatilização e sedimentação dos HPAs, além da própria biodegradação.

TABELA 17 – Rios pesquisados, tipos de HPAs e concentração total de HPAs encontrados nas amostras de água.

RIO	HPAs	HPAs Totais (µg/L)
Jaguari	flu, b(b)f, b(k)f, b(a)pir b(ghi)per, ind(cd)pir	0,1712
Atibaia	b(b)f, b(a)pir, b(ghi)per,	0,1538
Piracicaba	flu, b(b)f, b(k)f, b(a)pir b(ghi)per	0,0185
Capivari	flu, b(b)f, b(k)f, b(a)pir b(ghi)per	0,0083
Sorocaba	b(b)f, b(k)f, b(a)pir b(ghi)per, ind(cd)pir	0,0014
Paraíba do Sul	b(b)f, b(a)pir, b(ghi)per	0,0284
Tietê	flu, b(b)f, b(k)f, b(a)pir b(ghi)per	0,0130
Pinheiros	flu, b(b)f, b(k)f, b(a)pir b(ghi)per, ind(cd)pir	0,0648
Tamanduateí	flu, b(b)f, b(k)f, b(a)pir b(ghi)per, ind(cd)pir	0,0174
Cubatão	b(b)f, b(ghi)per, ind(cd)pir	0,0043
das Pedras	flu, b(b)f, b(k)f, b(a)pir b(ghi)per, ind(cd)pir	0,0228
Quilombo	b(b)f, b(a)pir, b(ghi)per	0,0258

A concentração de HPAs presentes nas águas de rios varia profundamente, dependendo da extensão e do tipo de poluição presente. As concentrações de HPAs encontrados em rios de diferentes partes do mundo podem ser vistas na TABELA 18 (BJORSETH, 1983). Os valores apresentados na primeira coluna, não são comparáveis entre si, já que o número e o tipo de compostos analisados não é idêntico. No entanto, é possível uma comparação da magnitude da presença dos compostos. Os valores referentes ao BaP são mostrados na segunda coluna, pois existem muitos estudos que levam em consideração somente a presença desse composto.

TABELA 18 – Concentrações de HPAs encontrados em rios de várias regiões do mundo (BJORSETH, 1983).

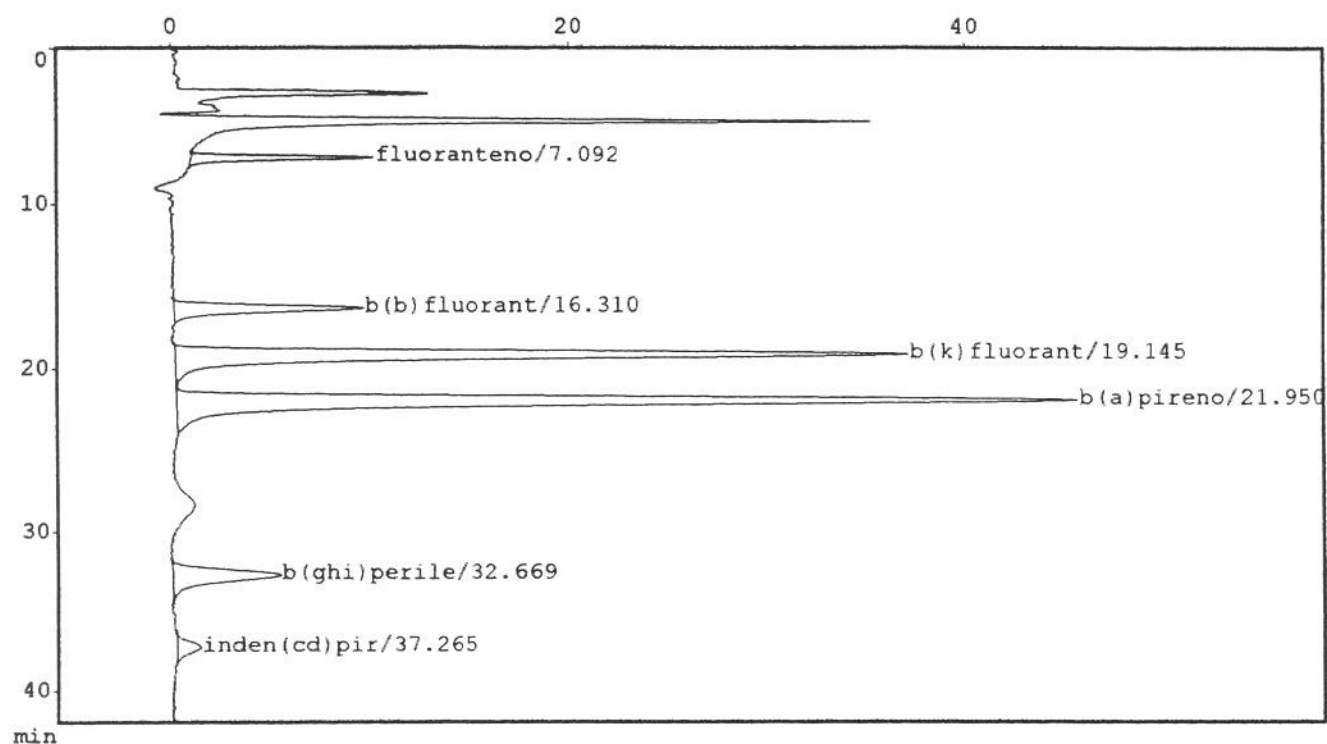
Fonte	Concentração Total de HPAs ^a (ng/L)	Concentração de BaP (ng/L)	Referência
República Federal da Alemanha:			
Rio Gersprenz	93-96	9,6	11
Rio Schussen	533	10	44
Rio Stockacher Aach	777-1530	4-43	44
Rio Reno (Km 30)	9-40	-	24
Rio Reno (Km 853)	132-5680	-	24
Rio Meno	197-560	12-68	24
Rio Meno (após enchente)	1090-1740	58-157	24
Rio Danúbio	58-1371	0,4-347	24
Holanda:			
Rio Reno (Lek)	400-910	50-90	45
Rio Reno (Waal)	140-2240	<10-580	27-30
Reino Unido:			
Rio Tâmis	380-1000 ^b	100-26	32
Rio Severn	15-160 ^c	1,5-20	31
Rio Stour	266-1430 ^c	48-132	31
Rio Trent	213-2596 ^c	35-504	31
Ribeirões do Rio Trent	26-3789 ^c	5-435	31
Rio Gt. Ouse	5-500	-	33
Rio Ancholme	5-70	-	33
França:			
Rio Sena (Paris)	89-233	-	34
Canal em Lille	294-404 ^d	35-300	35
Canal em Marquete	215-273 ^d	50-55	35
Canal em Violaines	259 ^d	32	
Estados Unidos:			
Rio Monongahela	600-663	42-77	43
Rio Ohio	58	5,6	43
Rio Delaware	352	41	43
Polônia:			
Rio Warta	124	2	37
Rio Wisla	165	30	37
Rio Warta	-	1-20	38
Rio Wreccica	-	1-18	38
Rio Olawa	-	2-350	36
Rio Nysa Klodzka	-	3-482	36
Rio Odra	-	18-823	36
Antiga União Soviética:			
Rio Plyussa	-	12000	39
(descarga de efluentes)			
Rio Moskwa (Moscou)	-	0,3-0,5	42
Rio acima da cidade grande	-	1	42
Rio abaixo da cidade grande	-	40	42

^aSeis HPAs: fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo (ghi)perileno e indeno(1,2,3-cd)pireno.

^bOs mesmos HPAs citados acima, mas perileno no lugar do benzo(b)fluoranteno.

^cSomente cinco HPAs, o benzo(b)fluoranteno não foi determinado.

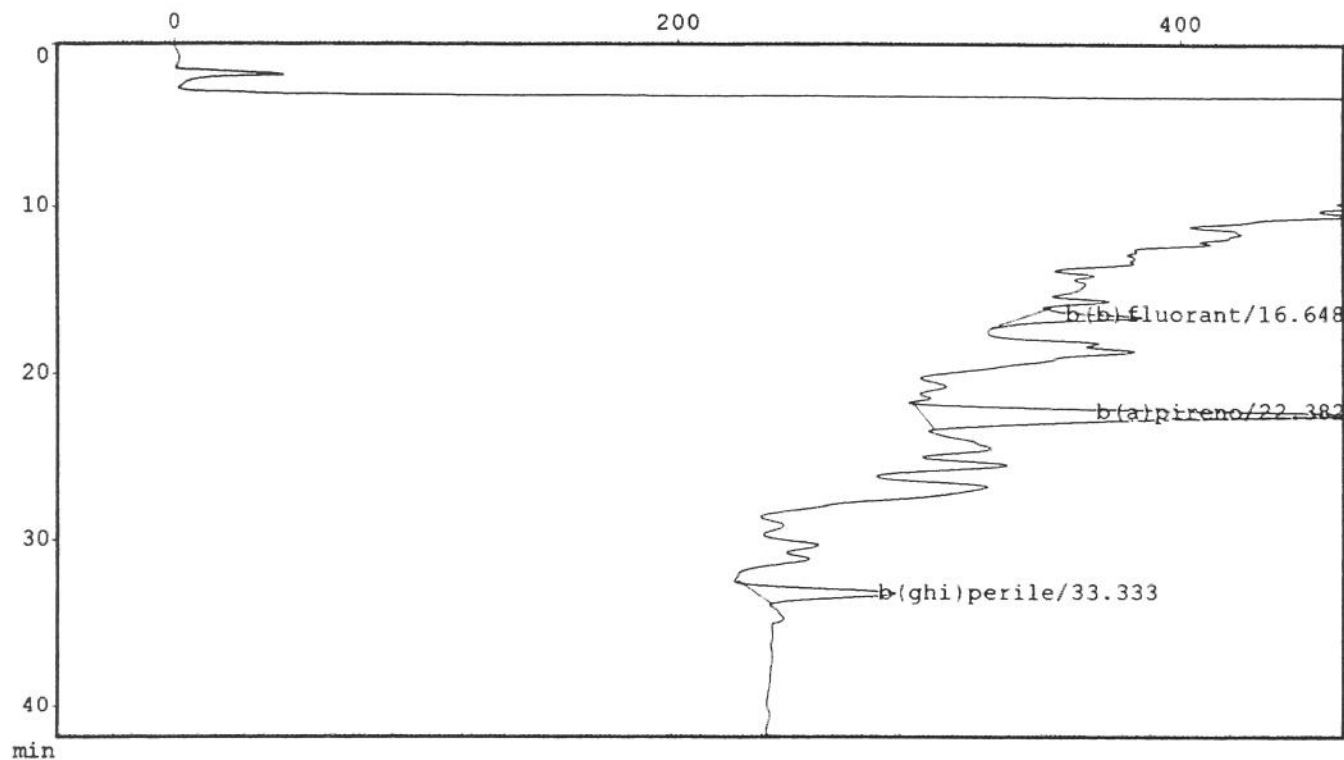
^dCinco HPAs: fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(k)fluoranteno, perileno e benzo(b)fluoreno.



Peak Report ***

NO	TIME	AREA	HEIGHT	IDNO	CONC [ug/mL]	NAME
1	7.092	186176	9149	1		fluoranteno
2	16.310	296502	9406	2		b(b)fluorant
3	19.145	1291847	36957	3		b(k)fluorant
4	21.950	1722518	45404	4		b(a)pireno
5	32.669	286204	5455	5		b(ghi)perile
6	37.265	70304	1271	6		inden(cd)pir
		3853551	107642			

FIGURA 14 - Cromatograma obtido por CLAE para a mistura de padrões de 6 HPAs. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda.



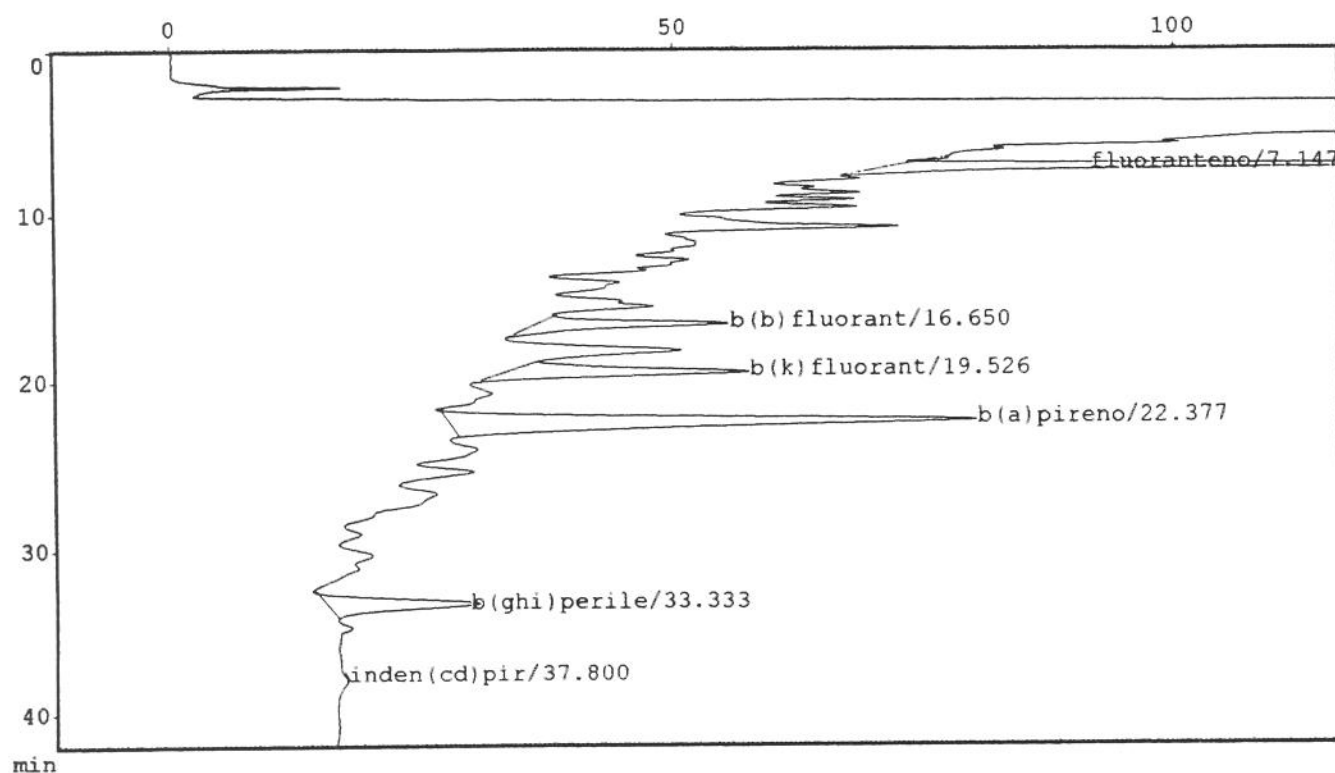
*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	IDNO	CONC [ug/mL]	NAME
1	16.648	1204961	45806	2	0.0369	b(b)fluorant
2	22.382	7042107	174325	4	0.0420	b(a)pireno
3	33.333	2131961	50161	5	0.0923	b(ghi)perile
		10379029	270292	0.1712		

*** Column Performance Report ***

PKNO	R.TIME	k'	NAME	Plate #	Plate Ht.	Tailing	Resolution	Sep.Factor
1	16.648	4.84	b(b)fluorant	9710	25.75	1.14		
2	22.382	6.85	b(a)pireno	7361	33.96	1.21	6.67	1.42
3	33.333	10.70	b(ghi)perile	17289	14.46	0.83	10.64	1.56

FIGURA 15 - Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Jaguari.
Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de
fluorescência, com programação de comprimento de onda.



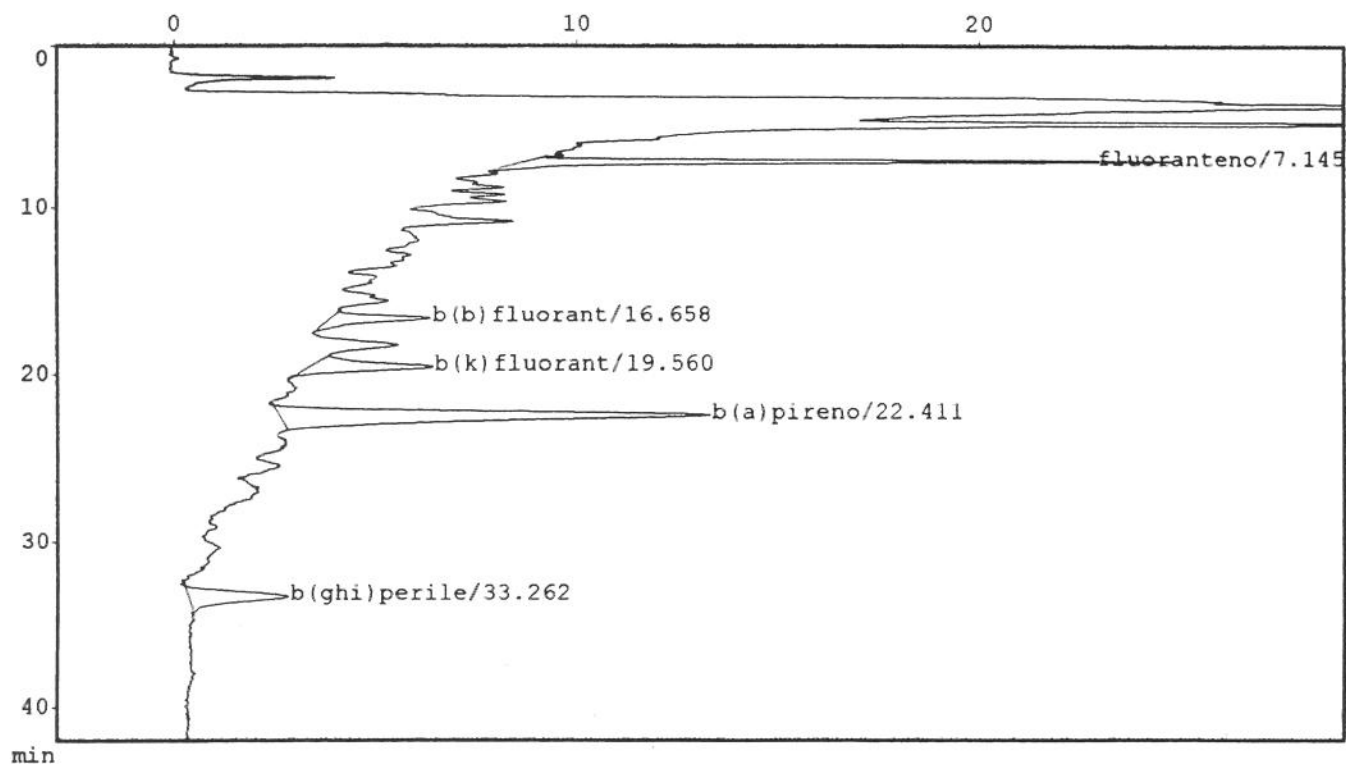
*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	IDNO	CONC [ug/mL]	NAME
1	7.147	1702161	112081	1	0.0916	fluoranteno
2	16.650	539907	18897	2	0.0166	b(b) fluorant
3	19.526	747483	23808	3	0.0059	b(k) fluorant
4	22.377	2057384	52716	4	0.0118	b(a)pireno
5	33.333	647977	14680	5	0.0261	b(ghi)perile
6	37.800	5062	256	6	0.0019	inden(cd)pir
		5699974	222439	0.1538		

*** Column Performance Report ***

PKNO	R.TIME	k'	NAME	Plate #	Plate Ht.	Tailing	Resolution	Sep.Factor
1	7.147	1.51	fluoranteno	7008	35.67	1.93		
2	16.650	4.84	b(b) fluorant	8801	28.40	1.39	18.08	3.21
3	19.526	5.85	b(k) fluorant	9292	26.91	0.97	3.78	1.21
4	22.377	6.85	b(a)pireno	7725	32.36	1.24	3.12	1.17
5	33.333	10.70	b(ghi)perile	---	---	0.98	---	1.56
6	37.800	12.26	inden(cd)pir	---	---	---	---	1.15

FIGURA 16 - Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Atibaia.
 Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda.



*** Peak Report ***

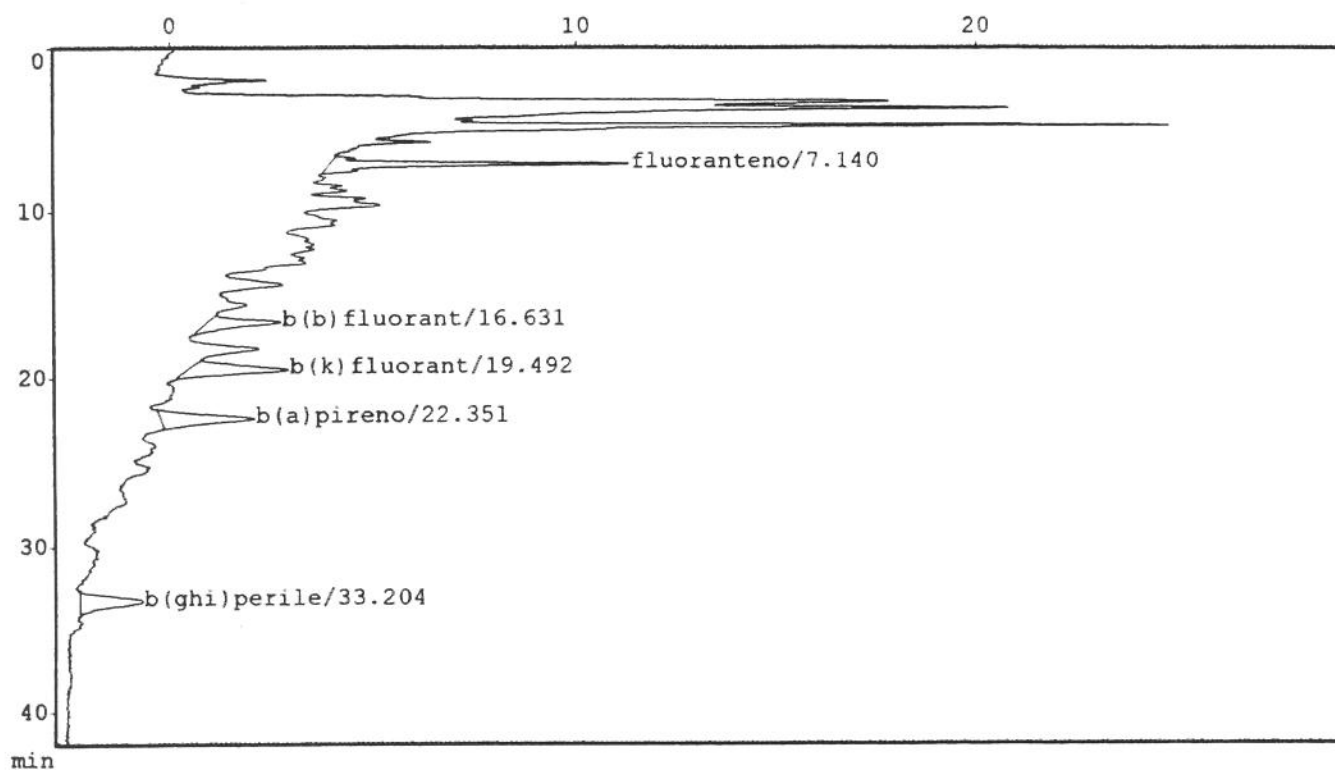
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	IDNO	CONC [ug/mL]	NAME
1	7.145	226988	14996	1	0.0114	fluoranteno
2	16.658	69899	2417	2	0.0022	b(b)fluorant
3	19.560	93486	3010	3	0.0012	b(k)fluorant
4	22.411	391307	10698	4	0.0017	b(a)pireno
5	33.262	109749	2522	5	0.0021	b(ghi)perile

891430 33643 0.0185

*** Column Performance Report ***

PKNO	R.TIME	k'	NAME	Plate #	Plate Ht.	Tailing	Resolution	Sep.Factor
1	7.145	1.51	fluoranteno	6596	37.90	1.68		
2	16.658	4.84	b(b)fluorant	5130	48.73	1.51	14.84	3.21
3	19.560	5.86	b(k)fluorant	---	---	0.94	---	1.21
4	22.411	6.86	b(a)pireno	9755	25.63	1.24	---	1.17
5	33.262	10.67	b(ghi)perile	6903	36.21	1.24	8.65	1.55

FIGURA 17 - Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Piracicaba. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda.



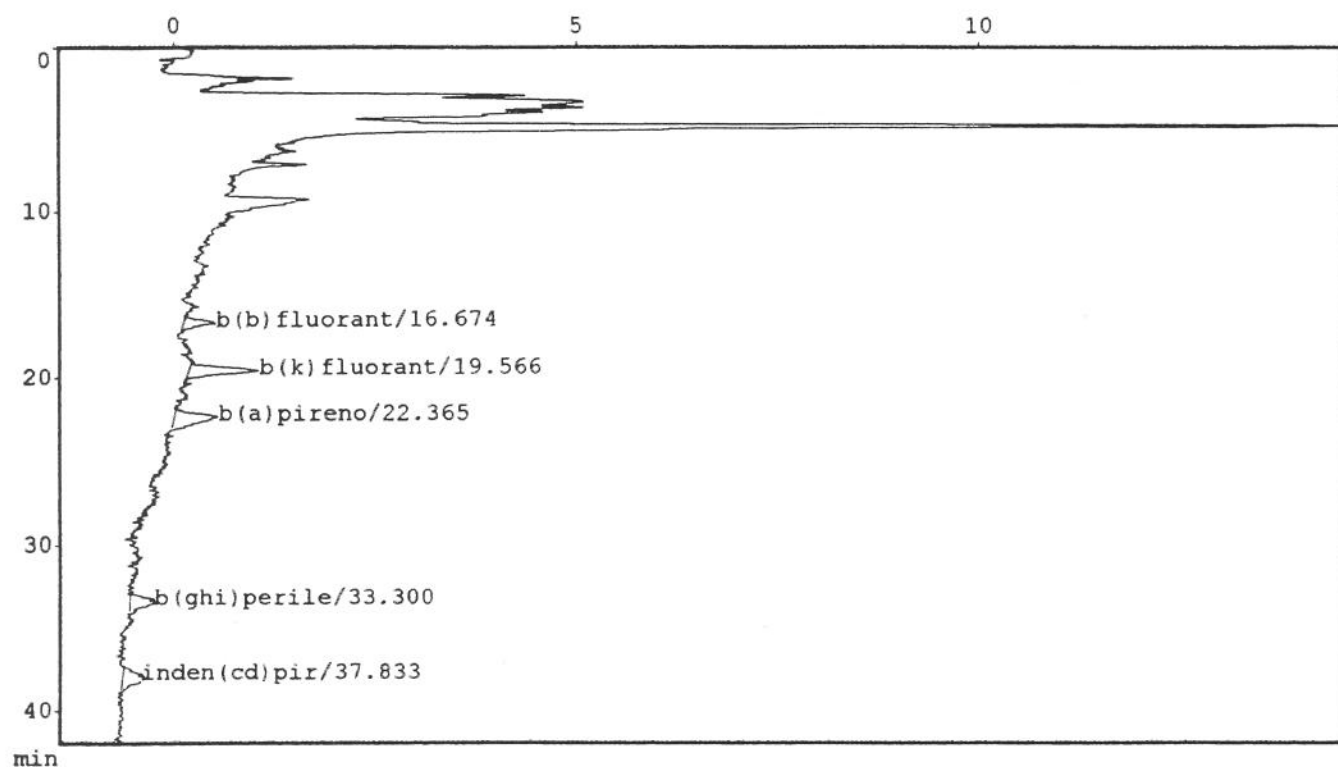
*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	IDNO	CONC [ug/mL]	NAME
1	7.140	116386	6748	1	0.0054	fluoranteno
2	16.631	54845	1801	2	0.0018	b(b) fluorant
3	19.492	80365	2475	3	0.0011	b(k) fluorant
4	22.351	83406	2361	4	-0.0002	b(a)pireno
5	33.204	67952	1579	5	0.0002	b(ghi)perile
		402955	14963	0.0083		

*** Column Performance Report ***

PKNO	R.TIME	k'	NAME	Plate #	Plate Ht.	Tailing	Resolution	Sep.Factor
1	7.140	1.51	fluoranteno	6417	38.96	1.60		
2	16.631	4.84	b(b) fluorant	5042	49.58	1.47	14.68	3.21
3	19.492	5.84	b(k) fluorant	8503	29.40	0.97	3.21	1.21
4	22.351	6.84	b(a)pireno	5442	45.94	1.04	2.78	1.17
5	33.204	10.65	b(ghi)perile	809	308.99	1.24	3.69	1.56

FIGURA 18 - Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Capivari. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda.



*** Peak Report ***

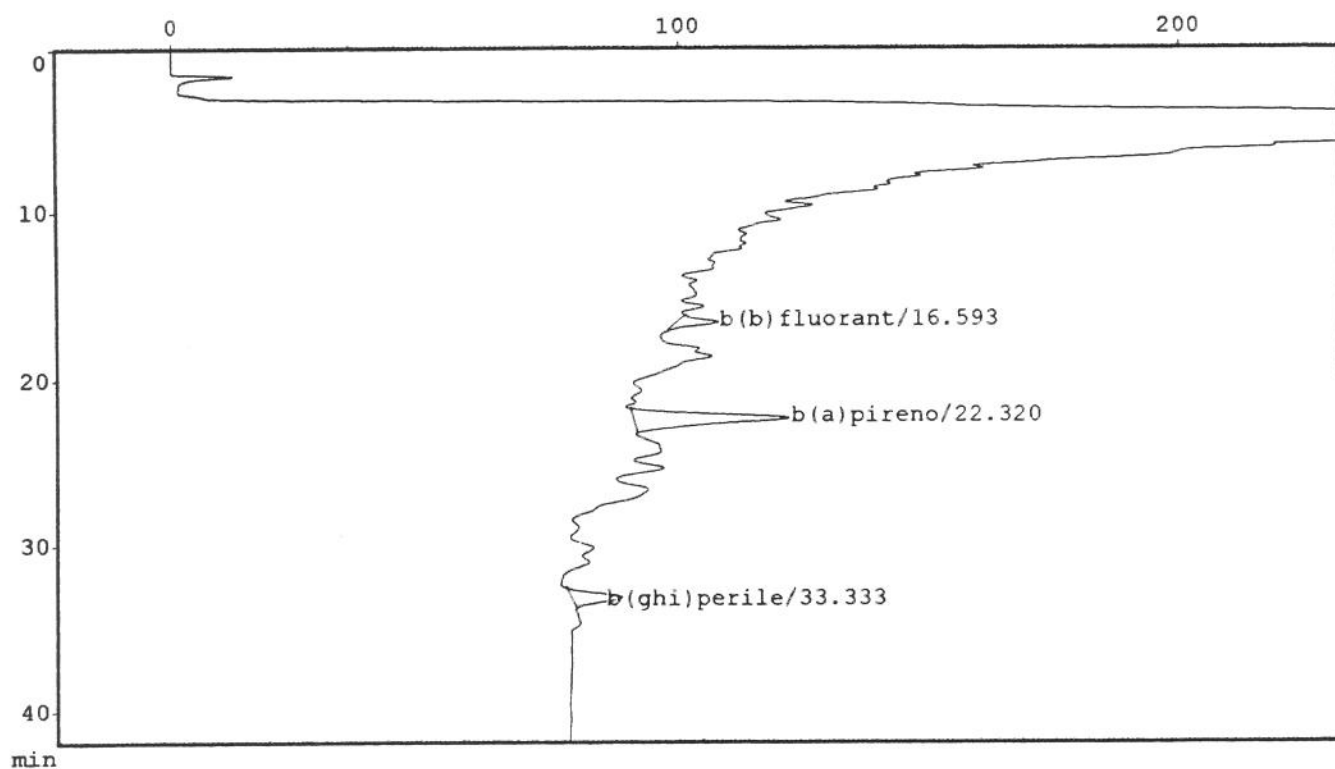
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	IDNO	CONC [ug/mL]	NAME
1	16.674	10037	398	2	0.0004	b(b) fluorant
2	19.566	24883	875	3	0.0007	b(k) fluorant
3	22.365	20908	546	4	-0.0005	b(a)pireno
4	33.300	14142	308	5	-0.0022	b(ghi)perile
5	37.833	15219	240	6	0.0031	inden(cd)pir

 85188 2366 0.0014

*** Column Performance Report ***

PKNO	R.TIME	k'	NAME	Plate #	Plate Ht.	Tailing	Resolution	Sep.Factor
1	16.674	4.85	b(b) fluorant	1334	187.42	---		
2	19.566	5.87	b(k) fluorant	1123	222.66	1.11	1.39	1.21
3	22.365	6.85	b(a)pireno	7099	35.21	1.38	1.65	1.17
4	33.300	10.68	b(ghi)perile	---	---	---	---	1.56
5	37.833	12.27	inden(cd)pir	---	---	1.37	---	1.15

FIGURA 19 - Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Sorocaba. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda.



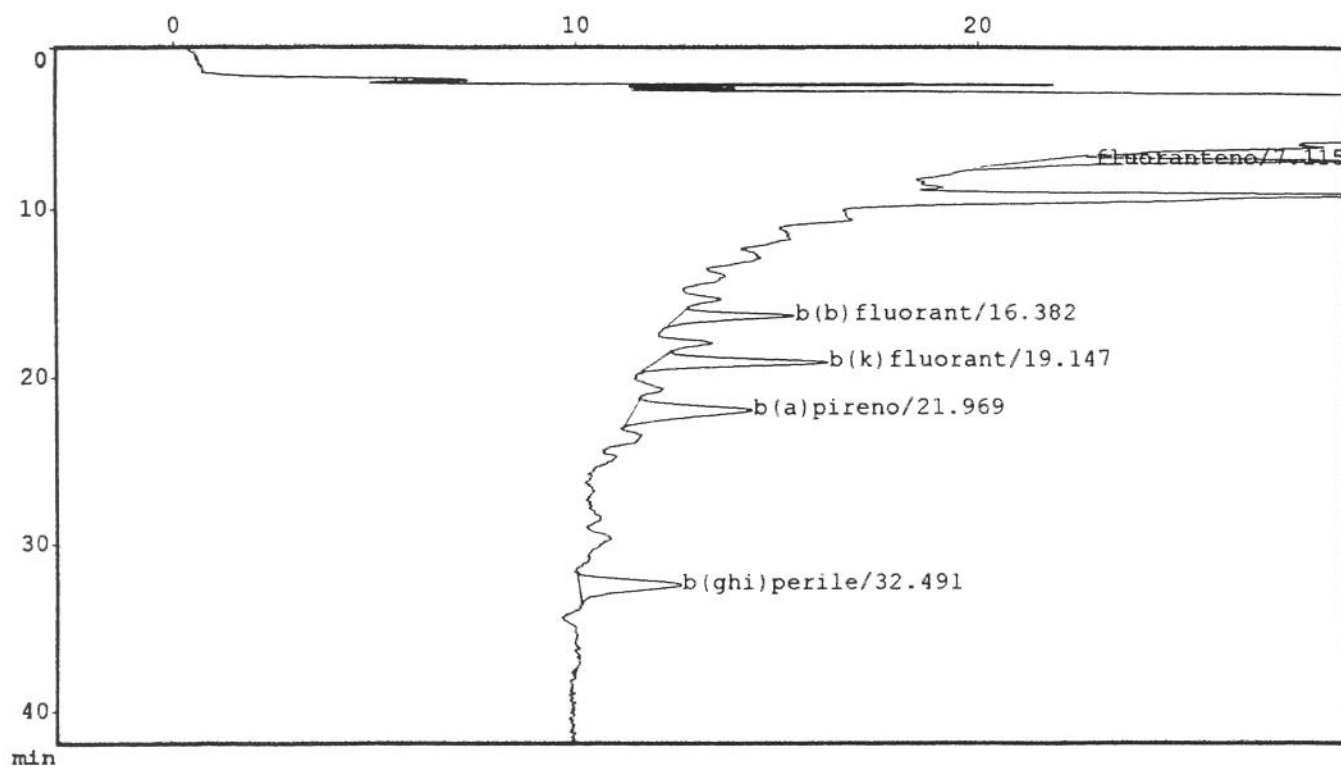
*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	IDNO	CONC [ug/mL]	NAME
1	16.593	206024	8208	2	0.0064	b(b)fluorant
2	22.320	1265202	31529	4	0.0070	b(a)pireno
3	33.333	398878	7419	5	0.0150	b(ghi)perile
		1870103	47157	0.0284		

*** Column Performance Report ***

PKNO	R.TIME	k'	NAME	Plate #	Plate Ht.	Tailing	Resolution	Sep.Factor
1	16.593	4.82	b(b)fluorant	10437	23.95	1.13		
2	22.320	6.83	b(a)pireno	7505	33.31	1.24	6.82	1.42
3	33.333	10.70	b(ghi)perile	---	---	0.75	---	1.57

FIGURA 20 - Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Paraíba do Sul. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda.



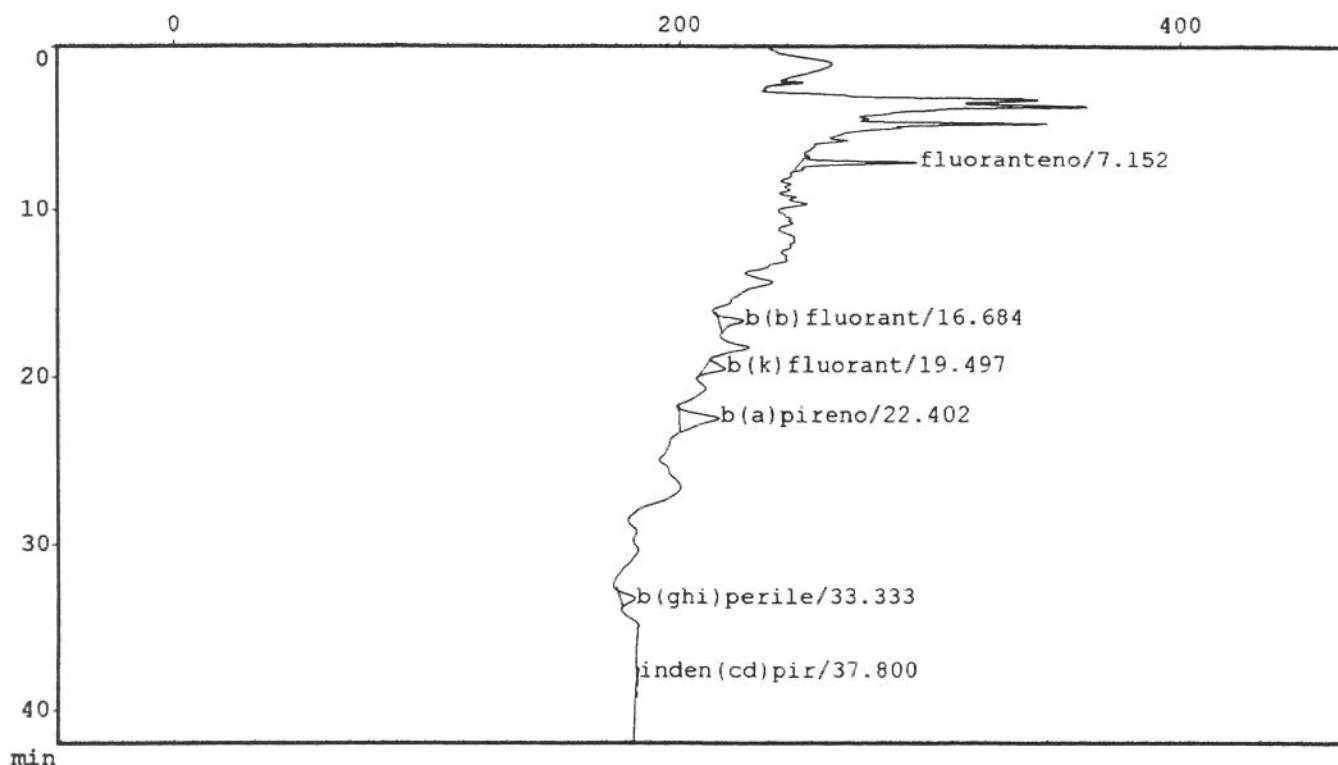
*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	IDNO	CONC [ug/mL]	NAME
1	7.115	134175	7697	1	0.0063	fluoranteno
2	16.382	79729	2802	2	0.0025	b(b)fluorant
3	19.147	128061	4289	3	0.0014	b(k)fluorant
4	21.969	133305	2958	4	0.0001	b(a)pireno
5	32.491	121882	2605	5	0.0026	b(ghi)perile
		597152	20350	0.0130		

*** Column Performance Report ***

PKNO	R.TIME	k'	NAME	Plate #	Plate Ht.	Tailing	Resolution	Sep.Factor
1	7.115	1.50	fluoranteno	4491	55.66	1.76		
2	16.382	4.75	b(b)fluorant	8455	29.57	1.38	16.30	3.17
3	19.147	5.72	b(k)fluorant	68	3652.62	1.05	0.55	1.20
4	21.969	6.71	b(a)pireno	416	600.61	1.23	0.42	1.17
5	32.491	10.40	b(ghi)perile	---	---	1.27	---	1.55

FIGURA 21 - Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Tietê. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda.



*** Peak Report ***

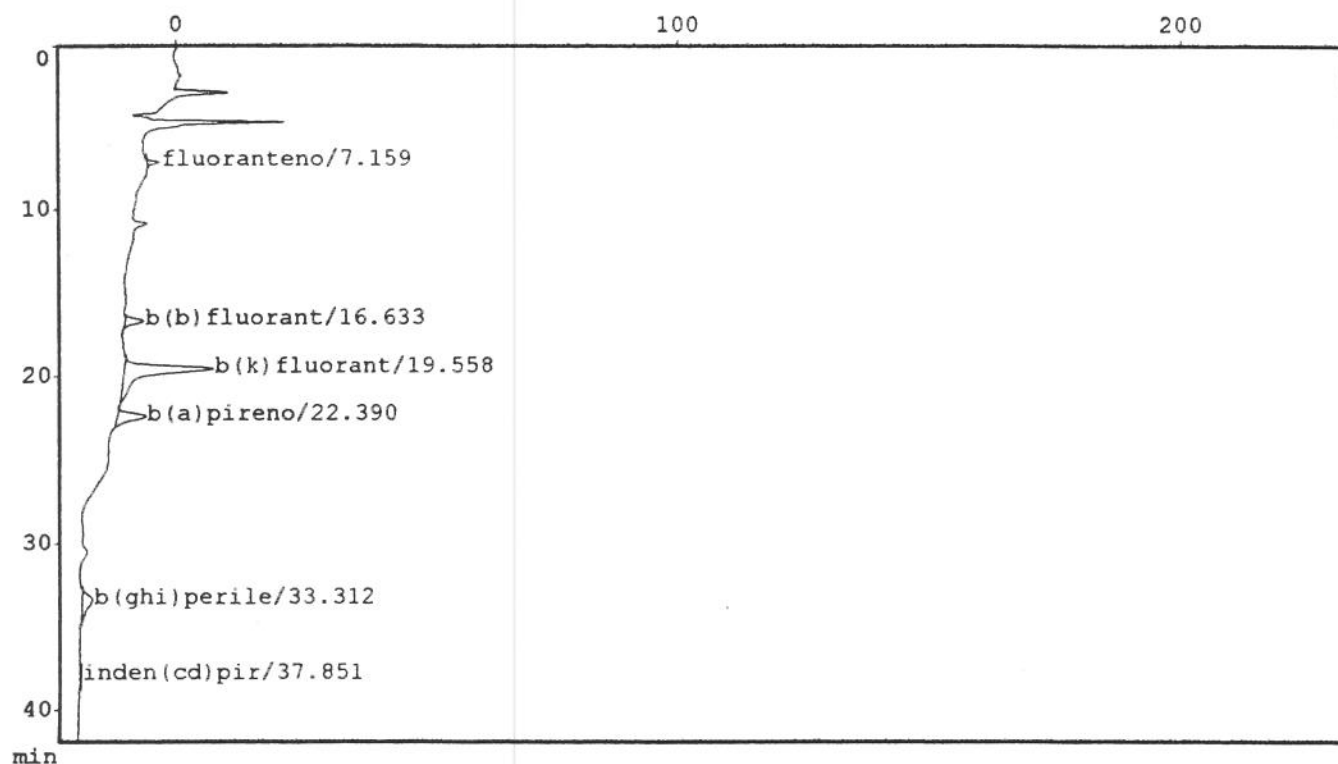
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	IDNO	CONC [ug/mL]	NAME
1	7.152	672334	44437	1	0.0356	fluoranteno
2	16.684	332021	10673	2	0.0102	b(b)fluorant
3	19.497	262776	8471	3	0.0024	b(k)fluorant
4	22.402	737716	16579	4	0.0038	b(a)pireno
5	33.333	257631	6462	5	0.0087	b(ghi)perile
6	37.800	23849	363	6	0.0041	inden(cd)pir

 2286327 86985 0.0648

*** Column Performance Report ***

PKNO	R.TIME	k'	NAME	Plate #	Plate Ht.	Tailing	Resolution	Sep.Factor
1	7.152	1.51	fluoranteno	6985	35.79	1.83		
2	16.684	4.85	b(b)fluorant	8026	31.15	1.47	17.54	3.22
3	19.497	5.84	b(k)fluorant	7922	31.56	0.98	3.47	1.20
4	22.402	6.86	b(a)pireno	5951	42.01	1.27	2.85	1.17
5	33.333	10.70	b(ghi)perile	11860	21.08	0.89	9.16	1.56
6	37.800	12.26	inden(cd)pir	---	---	1.79	---	1.15

FIGURA 22 - Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Pinheiros.
 Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda.



*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	IDNO	CONC [ug/mL]	NAME
1	7.159	43778	2734	1	0.0014	fluoranteno
2	16.633	97409	3995	2	0.0031	b(b)fluorant
3	19.558	695465	17768	3	0.0055	b(k)fluorant
4	22.390	186489	5771	4	0.0005	b(a)pireno
5	33.312	156484	2341	5	0.0042	b(ghi)perile
6	37.851	12826	211	6	0.0028	inden(cd)pir

1192451

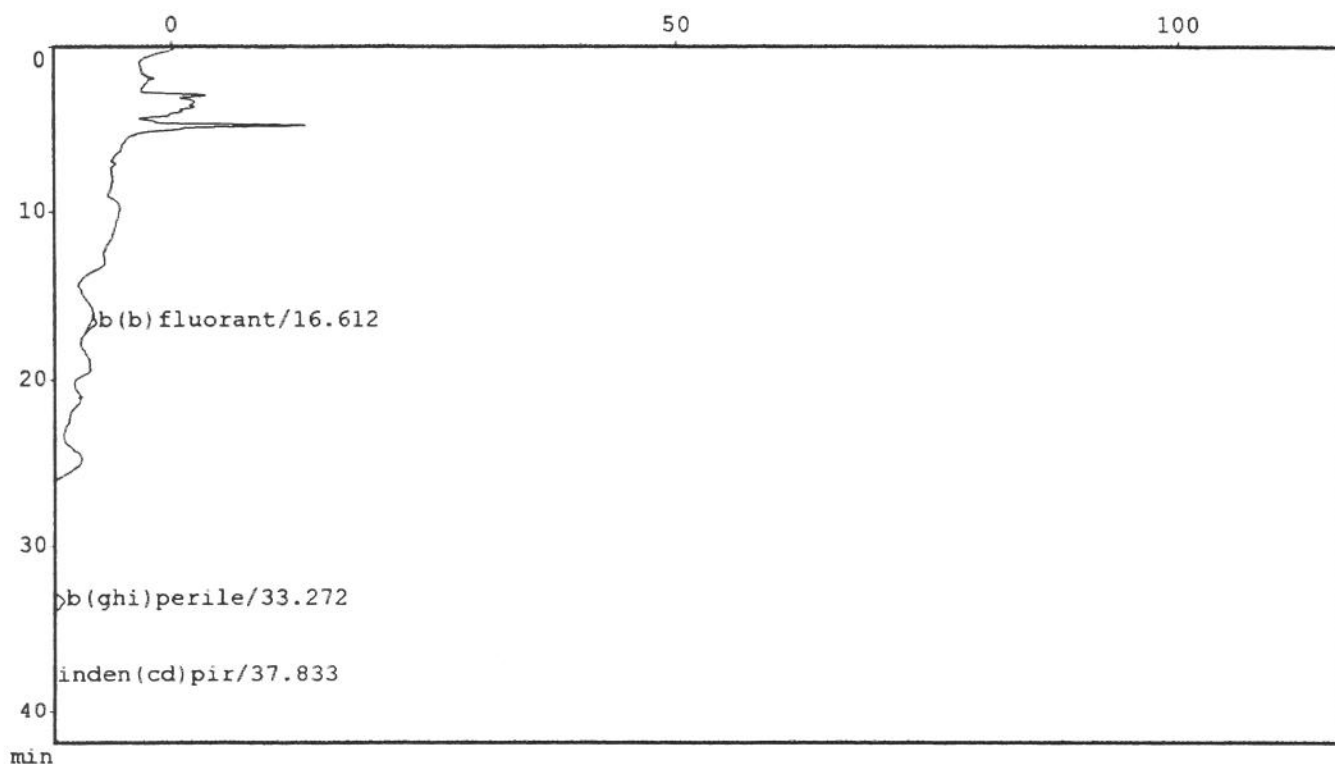
32819

0.0174

*** Column Performance Report ***

PKNO	R.TIME	k'	NAME	Plate #	Plate Ht.	Tailing	Resolution	Sep.Factor
1	7.159	1.51	fluoranteno	6277	39.83	1.53		
2	16.633	4.84	b(b)fluorant	8717	28.68	1.30	17.64	3.20
3	19.558	5.86	b(k)fluorant	9253	27.02	2.33	3.83	1.21
4	22.390	6.86	b(a)pireno	11693	21.38	1.38	3.45	1.17
5	33.312	10.69	b(ghi)perile	2757	90.69	1.62	6.49	1.56
6	37.851	12.28	inden(cd)pir	9916	25.21	---	2.24	1.15

FIGURA 23 - Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Tamanduateí. Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda.



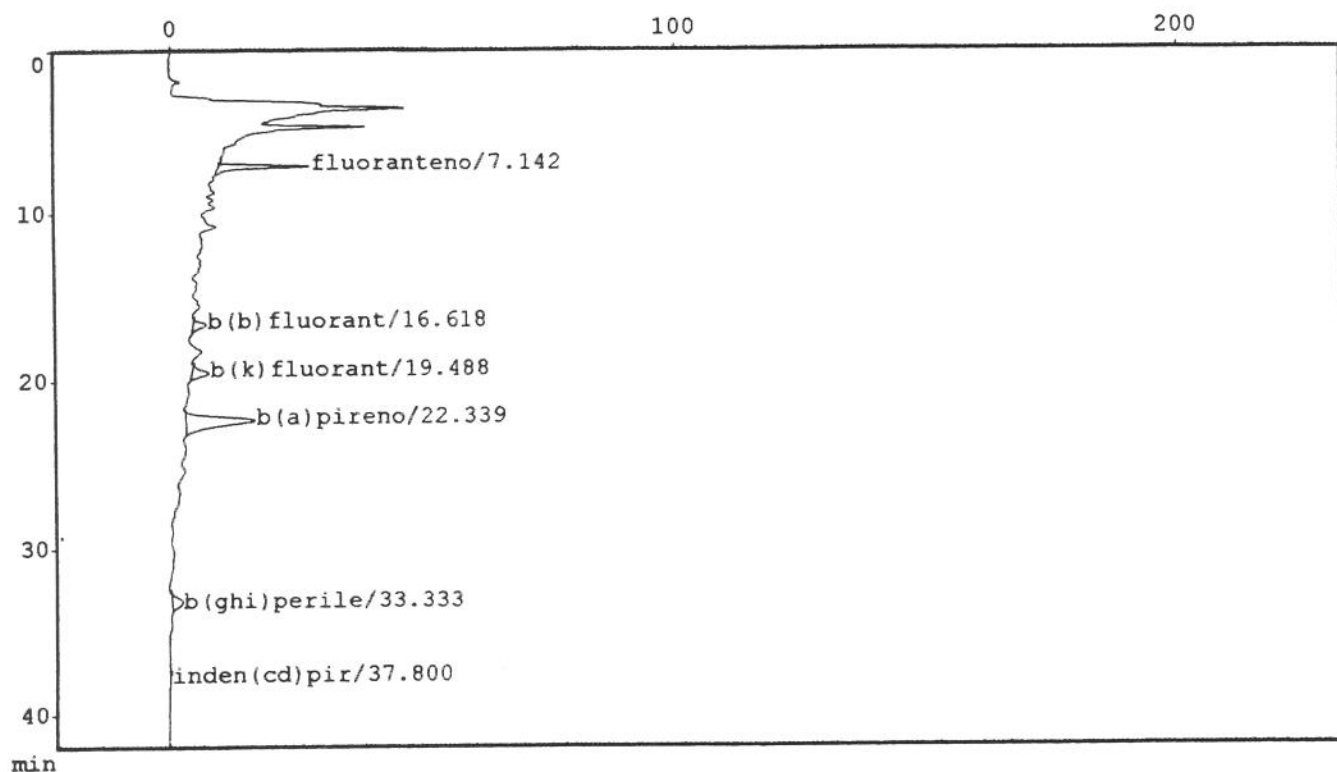
*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	IDNO	CONC [ug/mL]	NAME
1	16.612	22339	674	2	0.0008	b(b) fluorant
2	33.272	106813	1630	5	0.0020	b(ghi)perile
3	37.833	2495	-24	6	0.0016	inden(cd)pir
		131647	2278	0.0043		

*** Column Performance Report ***

PKNO	R.TIME	k'	NAME	Plate #	Plate Ht.	Tailing	Resolution	Sep.Factor
1	16.612	4.83	b(b) fluorant	3611	69.23	1.63		
2	33.272	10.67	b(ghi)perile	3161	79.08	1.33	9.59	2.21
3	37.833	12.27	inden(cd)pir	---	---	---	---	1.15

FIGURA 24 - Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Cubatão.
 Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda.



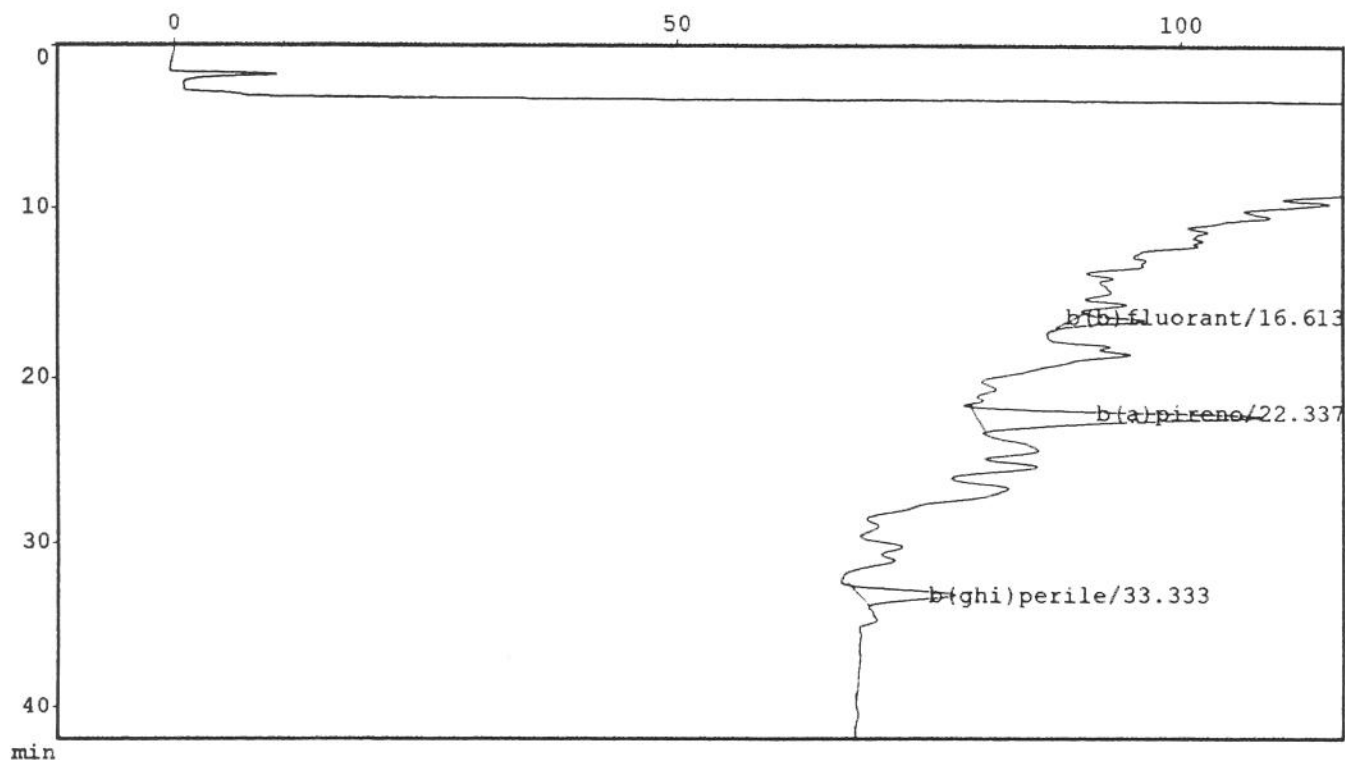
*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	IDNO	CONC [ug/mL]	NAME
1	7.142	260967	16757	1	0.0132	fluoranteno
2	16.618	79362	2836	2	0.0025	b(b)fluorant
3	19.488	109812	3549	3	0.0013	b(k)fluorant
4	22.339	501485	13808	4	0.0024	b(a)pireno
5	33.333	105950	2249	5	0.0019	b(ghi)perile
6	37.800	2035	64	6	0.0015	inden(cd)pir
		1059610	39263		0.0228	

*** Column Performance Report ***

PKNO	R.TIME	k'	NAME	Plate #	Plate Ht.	Tailing	Resolution	Sep.Factor
1	7.142	1.51	fluoranteno	6199	40.33	1.86		
2	16.618	4.83	b(b)fluorant	9604	26.03	1.37	18.20	3.21
3	19.488	5.84	b(k)fluorant	9670	25.85	0.99	3.90	1.21
4	22.339	6.84	b(a)pireno	9177	27.24	1.30	3.31	1.17
5	33.333	10.70	b(ghi)perile	---	---	0.93	---	1.56
6	37.800	12.26	inden(cd)pir	---	---	0.86	---	1.15

FIGURA 25 - Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio das Pedras.
Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T = 30°C, detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda.



*** Peak Report ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	IDNO	CONC [ug/mL]	NAME
1	16.613	178109	7191	2	0.0055	b(b)fluorant
2	22.337	1161471	28465	4	0.0064	b(a)pireno
3	33.333	373974	7260	5	0.0139	b(ghi)perile
		1713553	42916	0.0258		

*** Column Performance Report ***

PKNO	R.TIME	k'	NAME	Plate #	Plate Ht.	Tailing	Resolution	Sep.Factor
1	16.613	4.83	b(b)fluorant	10805	23.14	1.09		
2	22.337	6.84	b(a)pireno	7221	34.62	1.24	6.77	1.42
3	33.333	10.70	b(ghi)perile	---	---	0.77	---	1.56

FIGURA 26 - Cromatograma obtido por CLAE para a amostra de água proveniente do rio Quilombo.
 Cond. Crom.: fase móvel isocrática, 75% acetonitrila em água, 1 mL/min, T=30°C,
 detector de fluorescência, com programação de comprimento de onda.

4.2.4. Monitoramento dos rios

A terceira etapa de caracterização dos sítios aquáticos foi feita através do monitoramento das condições de temperatura, pH, odor e coloração da água, relacionados com a época do ano. Essa caracterização foi feita com o objetivo de se obter informações sobre a variação dessas características com a estação climática do ano, para posterior utilização no desenvolvimento de experimentos de biodegradação no laboratório. O pH normal, que era de se esperar se os rios não estivessem poluídos é em torno de 8,0 a 8,4, mas pode-se observar que somente os rios Piracicaba e Capivari apresentaram pH em torno da normalidade.

Outro fator que pode ser notado é o odor característico de cada rio. Enquanto os alguns rios na região Campinas - interior do estado - apresentam odor característico de rios não poluídos, os rios na região da cidade de São Paulo possuem um odor muito ruim de dejetos domésticos e industriais.

O rio Sorocaba sempre mostrou um forte odor de óleo, provavelmente devido à presença de muitas indústrias nesta região. O rio Atibaia, o mais poluído da região de Campinas, apresentou um odor muito forte de “peixe-morto”, característico da presença em excesso de algas. Inclusive, em um período do mês de julho de 97, o abastecimento de água potável de cidade de Campinas ficou comprometido devido à presença destas algas.

TABELA 19 - Condições dos rios no mês de julho de 97.

RIO	Temperatura da água (°C)	Temperatura do amb. (°C)	pH da água	Coloração da água	Odor da água	Horário/ Estação
Atibaia	24	26	7,0	esverdeada	algas/ovo	12:00/inv
Jaguari	23,5	26,5	8,0	marrom	normal	13:00/inv
Piracicaba	23	27	8,1	marrom	normal	14:00/inv
Capivari	24	25	8,1	marrom	normal	12:00/inv
Sorocaba	24,5	25,5	7,2	escura	óleo	10:30/inv
Paraíba Sul	21	23	7,0	escura	normal	11:00/inv
Tietê	22	23	7,0	preta	péssimo	16:00/inv
Pinheiros	21	23	6,5	preta	péssimo	10:00/inv
Tamanduatei	21	22	7,0	escura	péssimo	16:00/inv
Cubatão	23	25	6,5	escura	óleo	14:00/inv
Pedras	23	25,5	7,0	escura	óleo	15:00/inv
Quilombo	23,5	26	7,0	escura	óleo	15:30/inv

TABELA 20 - Condições dos rios no mês de agosto de 97

RIO	Temperatura da água (°C)	Temperatura do amb. (°C)	pH da água	Coloração da água	Odor da água	Horário/ Estação
Atibaia	23	24	7,0	esverdeada	algas/ovo	10:00/inv
Jaguari	22,5	24	8,1	marrom	normal	10:00/inv
Piracicaba	21	24	8,2	marrom	normal	12:00/inv
Capivari	22	24	8,1	marrom	normal	13:00/inv
Sorocaba	23	25	7,0	escura	óleo	10:00/inv
Paraíba Sul	20	23	7,0	escura	normal	12:00/inv
Tietê	21	22	7,0	preta	péssimo	15:00/inv
Pinheiros	21	22	6,5	preta	péssimo	9:00/inv
Tamanduatei	21	22	7,0	escura	péssimo	11:00/inv
Cubatão	22,5	24	6,5	escura	óleo	12:00/inv
Pedras	23	24,5	7,0	escura	óleo	14:00/inv
Quilombo	22,5	24	7,0	escura	óleo	15:00/inv

TABELA 21 - Condições dos rios no mês de setembro de 97

RIO	Temperatura da água (°C)	Temperatura do amb. (°C)	pH da água	Coloração da água	Odor da água	Horário/ Estação
Atibaia	23	25	7,0	verde	algas	10:00/pri
Jaguari	22	25	8,0	marrom	normal	15:00/pri
Piracicaba	24	27	8,0	marrom	normal	15:00/pri
Capivari	22	24	8,0	marrom	normal	12:00/pri
Sorocaba	23	23	7,5	escura	óleo	17:00/pri
Paraíba Sul	21	22	7,0	escura	normal	12:00/pri
Tietê	22	22	7,0	preta	péssimo	14:00/pri
Pinheiros	22	22	6,5	preta	péssimo	9:00/pri
Tamanduatei	22	22	7,0	escura	péssimo	11:00/pri
Cubatão	22	24	6,5	escura	óleo	15:00/pri
Pedras	23	25	7,0	escura	óleo	15:00/pri
Quilombo	23	24	7,0	escura	óleo	17:00/pri

TABELA 22 - Condições dos rios no mês de outubro de 97

RIO	Temperatura da água (°C)	Temperatura do amb. (°C)	pH da água	Coloração da água	Odor da água	Horário/ Estação
Atibaia	23	25	7,0	verde	algas	9:00/pri
Jaguari	23	23	8,0	marrom	normal	11:00/pri
Piracicaba	23	25	8,3	marrom	normal	11:00/pri
Capivari	23	24	8,0	marrom	normal	12:00/pri
Sorocaba	23	25	7,0	escura	óleo	14:00/pri
Paraíba Sul	21	23	6,5	escura	normal	16:00/pri
Tietê	21	22	7,0	preta	péssimo	17:00/pri
Pinheiros	21	22	6,5	preta	péssimo	10:00/pri
Tamanduatei	22	22	7,0	escura	péssimo	15:00/pri
Cubatão	22	25	6,5	escura	óleo	17:00/pri
Pedras	22	25	7,0	escura	óleo	18:00/pri
Quilombo	22	25	7,0	escura	óleo	16:00/pri

TABELA 23 - Condições dos rios no mês de novembro de 97

RIO	Temperatura da água (°C)	Temperatura do amb. (°C)	pH da água	Coloração da água	Odor da água	Horário/ Estação
Atibaia	23	25	7,0	verde	algas	11:00/pri
Jaguari	22	25	8,1	marrom	normal	11:00/pri
Piracicaba	23	26	8,2	marrom	normal	13:00/pri
Capivari	22	27	8,2	marrom	normal	13:00/pri
Sorocaba	23	26	7,0	escura	óleo	12:00/pri
Paraíba Sul	22	24	7,2	escura	normal	13:00/pri
Tietê	21	24	7,0	preta	péssimo	14:00/pri
Pinheiros	22	24	7,0	preta	péssimo	10:00/pri
Tamanduatei	23	24	7,0	escura	péssimo	16:00/pri
Cubatão	24	26	6,5	escura	óleo	17:00/pri
Pedras	23	25	7,5	escura	óleo	15:00/pri
Quilombo	23	25	7,0	escura	óleo	116:00/pri

TABELA 24 - Condições dos rios no mês de dezembro de 97

RIO	Temperatura da água (°C)	Temperatura do amb. (°C)	pH da água	Coloração da água	Odor da água	Horário/ Estação
Atibaia	24	27	7,0	verde	algas	10:00/ver
Jaguari	23	26	7,9	marrom	normal	10:00/ver
Piracicaba	24	28	8,2	marrom	normal	12:00/ver
Capivari	22	27	8,2	marrom	normal	13:00/ver
Sorocaba	22	26	7,0	escura	óleo	10:00/ver
Paraíba Sul	22	24	7,1	escura	normal	121:00/ver
Tietê	22	24	7,0	preta	péssimo	15:00/ver
Pinheiros	22	25	7,0	preta	péssimo	9:00/ver
Tamanduatei	22	25	7,0	escura	péssimo	11:00/ver
Cubatão	24	28	6,5	escura	óleo	12:00/ver
Pedras	23	27	7,0	escura	óleo	14:00/ver
Quilombo	23	27	7,0	escura	óleo	15:00/ver

TABELA 25 - Condições dos rios no mês de abril de 98

RIO	Temperatura água (°C)	Temperatura amb. (°C)	pH água	Coloração água	Odor água	Horário/ Estação
Atibaia	22	23	7,0	verde	algas	9:00/out
Jaguari	22	24	8,1	marrom	normal	13:00/ out
Piracicaba	21	25	8,2	marrom	normal	13:00/ out
Capivari	22	22	8,0	marrom	normal	10:00/ out
Sorocaba	22	22	7,0	escura	óleo	14:00/ out
Paraíba Sul	21	22	7,2	escura	normal	14:00/ out
Tietê	21	22	7,2	preta	péssimo	15:00/ out
Pinheiros	21	21	7,0	preta	péssimo	16:00/ out
Tamanduatei	21	21	7,2	escura	péssimo	10:00/ out
Cubatão	21	23	6,8	escura	óleo	10:00/ out
Pedras	22	23	7,2	escura	óleo	12:00/ out
Quilombo	22	23	7,1	escura	óleo	14:00/ out

TABELA 26 - Condições dos rios no mês de maio de 98

RIO	Temperatura água (°C)	Temperatura amb. (°C)	pH água	Coloração água	Odor água	Horário/ Estação
Atibaia	21	23	6,8	verde	algas	10:00/ out
Jaguari	21	22	8,0	marrom	normal	12:00/ out
Piracicaba	21	23	8,3	marrom	normal	13:00/ out
Capivari	21	22	8,0	marrom	normal	10:00/ out
Sorocaba	22	23	7,0	escura	óleo	11:00/ out
Paraíba Sul	20	23	6,7	escura	normal	15:00/ out
Tietê	20	21	7,0	preta	péssimo	13:00/ out
Pinheiros	20	21	7,0	preta	péssimo	9:00/ out
Tamanduatei	20	21	7,0	escura	péssimo	12:00/ out
Cubatão	21	23	6,8	escura	óleo	15:00/ out
Pedras	21	23	7,0	escura	óleo	16:00/ out
Quilombo	21	23	7,0	escura	óleo	17:00/ out

TABELA 27- Condições dos rios no mês de junho de 98

RIO	Temperatura água (°C)	Temperatura amb. (°C)	pH água	Coloração água	Odor água	Horário/ Estação
Atibaia	21	22	7,1	verde	algas	10:00/ out
Jaguari	21	22	8,0	marrom	normal	15:00/ out
Piracicaba	22	23	8,1	marrom	normal	13:00/ out
Capivari	21	23	8,0	marrom	normal	12:00/ out
Sorocaba	22	22	7,5	escura	óleo	11:00/ out
Paraíba Sul	21	21	7,3	escura	normal	13:00/ out
Tietê	20	21	7,0	preta	péssimo	12:00/ out
Pinheiros	20	22	7,0	preta	péssimo	13:00/ out
Tamanduatei	20	22	7,1	escura	péssimo	14:00/ out
Cubatão	22	23	6,8	escura	óleo	11:00/ out
Pedras	21	23	7,0	escura	óleo	13:00/ out
Quilombo	22	23	7,2	escura	óleo	16:00/ out

TABELA 28 - Condições dos rios no mês de julho de 98

RIO	Temperatura água (°C)	Temperatura amb. (°C)	pH água	Coloração água	Odor água	Horário/ Estação
Atibaia	20	22	7,0	verde	algas	11:00/inv
Jaguari	20	23	8,0	marrom	normal	12:00/ inv
Piracicaba	20	22	8,0	marrom	normal	12:00/ inv
Capivari	20	22	8,1	marrom	normal	14:00/ inv
Sorocaba	19	23	7,0	escura	óleo	11:00/ inv
Paraíba Sul	20	22	7,0	escura	normal	12:00/ inv
Tietê	20	21	6,7	preta	péssimo	14:00/ inv
Pinheiros	19	21	6,8	preta	péssimo	10:00/ inv
Tamanduatei	19	22	6,8	escura	péssimo	12:00/ inv
Cubatão	22	23	6,8	escura	óleo	12:00/ inv
Pedras	21	22	7,0	escura	óleo	13:00/ inv
Quilombo	21	22	7,0	escura	óleo	15:00/ inv

4.3. Experimentos de biodegradação

4.3.1. Avaliação do crescimento das bactérias em placas contendo HPAs na superfície

As bactérias foram avaliadas quanto à sua capacidade de crescer na superfície das placas em contato direto com os HPAs. Para tal avaliação foram utilizados conceitos de 1 até 5, representando menor e maior crescimentos, respectivamente. Nas TABELAS 29 a 31 é possível observar os resultados que foram obtidos para cada linhagem estudada.

TABELA 29- Avaliação do crescimento de bactérias em contato com diferentes HPAs em placas de Petri. Os conceitos de 1 a 5, representam menor e maior crescimentos, respectivamente. O sinal – representa ausência de crescimento.

HPA	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B
Fluoranteno	3	3	4	4	-	-	2	2
B(a)P	3	3	3	4	-	-	2	2
Pireno	1	1	2	2	-	-	2	1
B(k)F	1	1	2	-	-	-	2	2
B(b)F	2	2	4	4	-	-	2	2
Indeno	1	2	4	1	-	-	1	3
B(e)P	2	2	2	2	-	-	1	1
Criseno	3	3	3	3	-	-	-	3
Dib(ah)	3	3	4	3	-	-	3	2
B(a)A	2	2	3	1	-	-	2	2

TABELA 30 - Avaliação do crescimento de bactérias em contato com diferentes HPAs em placas de Petri. Os conceitos de 1 a 5, representam menor e maior crescimentos, respectivamente. O sinal – representa ausência de crescimento.

HPA	5A	6A	6B	6C	7C	7D	7F
Fluoranteno	3	4	3	4	1	1	3
B(a)P	2	2	1	3	2	2	3
Pireno	3	3	3	4	3	3	3
B(k)F	1	3	2	3	-	4	4
B(b)F	-	3	2	3	2	4	3
Indeno	1	1	1	1	3	2	2
B(e)P	3	3	1	1	3	4	3
Criseno	3	3	4	4	3	3	4
Dib(ah)	3	3	2	2	4	3	3
B(a)A	3	3	3	3	4	3	3

TABELA 31 - Avaliação do crescimento de bactérias em contato com diferentes HPAs em placas de Petri. Os conceitos de 1 a 5, representam menor e maior crescimentos, respectivamente. O sinal – representa ausência de crescimento.

HPA	7G	8C	8D	8F	9C	9D	9E	9F
Fluoranteno	2	3	3	3	3	3	3	3
B(a)P	4	2	2	3	3	3	3	3
Pireno	4	2	2	3	4	3	2	2
B(k)F	2	4	4	3	3	4	4	4
B(b)F	-	3	3	3	3	4	2	2
Indeno	1	3	2	2	5	5	3	3
B(e)P	3	4	3	2	3	3	2	2
Criseno	2	3	3	3	3	4	-	-
Dib(ah)	3	4	4	3	5	4	1	-
B(a)A	4	3	3	3	3	3	2	2

Foi possível notar que a maioria das linhagens apresentou alta resistência e um excelente nível de crescimento na presença dos HPAs testados. As únicas exceções foram as linhagens 3A e 3B que não cresceram na presença dos HPAs. As linhagens 2A, 7D, 7F, 8C, 8E, 9C e 9D mostraram as maiores pontuações quanto ao crescimento nas placas.

Quando inoculadas em meio LB as linhagens apresentaram crescimento muito rápido (em menos de 24 horas) e as colônias puderam ser muito bem visualizadas quanto ao formato e à coloração. Já no meio MM com HPA, o período de crescimento das colônias aumentou para aproximadamente 96 horas. As alterações predominantes na maioria das colônias foram a mudança de coloração e do formato. Algumas linhagens apresentaram escurecimento, enquanto outras se tornaram muito transparentes.

Os resultados para as placas controle contendo somente meio MM mais a linhagem inoculada, mostraram que as linhagens não foram capazes de crescer no meio sem fonte de carbono. Algumas linhagens apresentaram um ligeiro crescimento que parou após alguns dias.

Nas FIGURAS 27 a 38 é possível observar o aspecto das colônias das linhagens 2A, 2B, 7D, 7F, 8E e 9D, respectivamente, na presença do hidrocarboneto benzo(b)fluoranteno, das linhagens 7D, 8C e 8E, respectivamente, na presença de benzo(k)fluoranteno e das colônias das linhagens 7D, 9C e 9D quando colocadas em contato com pireno.

Através destes testes foi possível selecionar as linhagens mais resistentes aos HPAs e definir quais destes compostos são mais tóxicos para cada linhagem. A partir destes resultados foram feitos os testes de biodegradação em meio líquido com as linhagens 2B, 6B, 7F e 9D que apresentaram maior capacidade de crescimento em HPAs específicos.

Muitos autores (KIYOHARA et ali, 1982; HEITKAMP & CERNIGLIA, 1988; HEITKAMP et ali, 1988) utilizam os testes com spray de HPAs em placas, com o objetivo de isolamento e pré-seleção das linhagens, capazes de crescer na presença desses compostos tóxicos.

Neste trabalho o teste também mostrou ser eliminatório para algumas linhagens (3A e 3B) e classificatório para as demais.

Devido à maior resistência das bactérias aos compostos fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno, estes foram selecionados para os estudos posteriores de biodegradação em meio líquido.

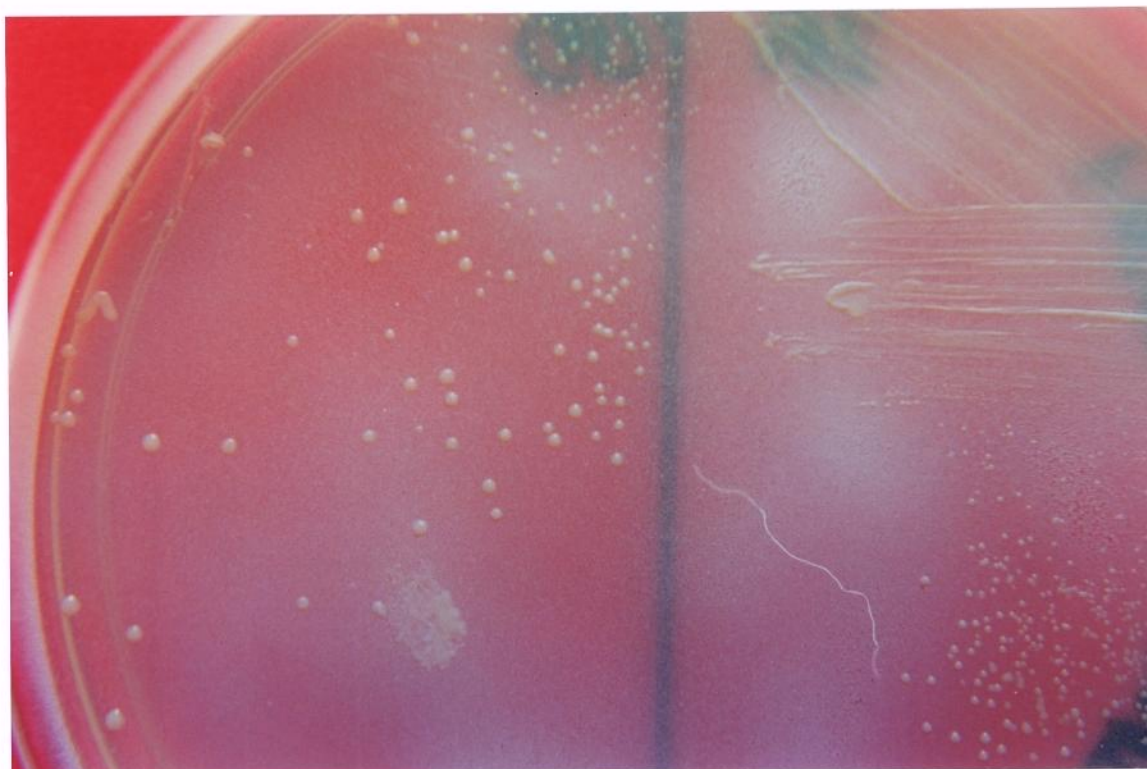


FIGURA 27 - Aspecto das colônias da linhagem 2A quando inoculadas em contato com benzo(b)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C.

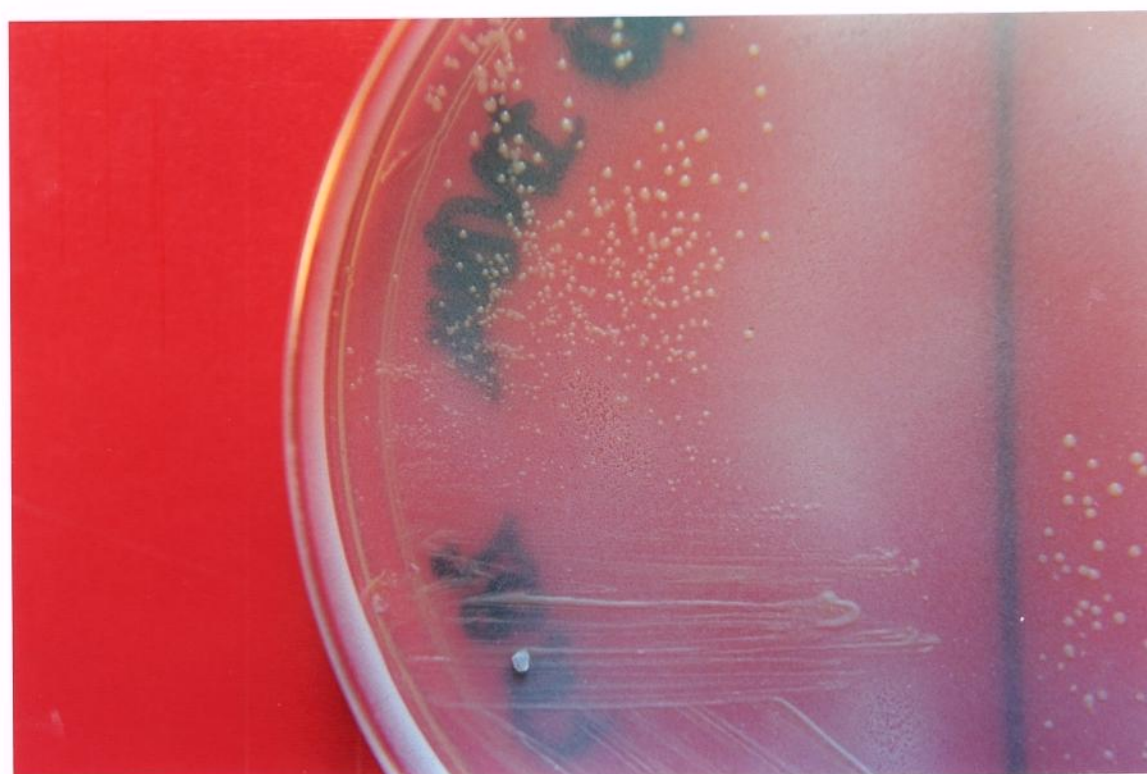


FIGURA 28 - Aspecto das colônias da linhagem 2B quando inoculadas em contato com benzo(b)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C.

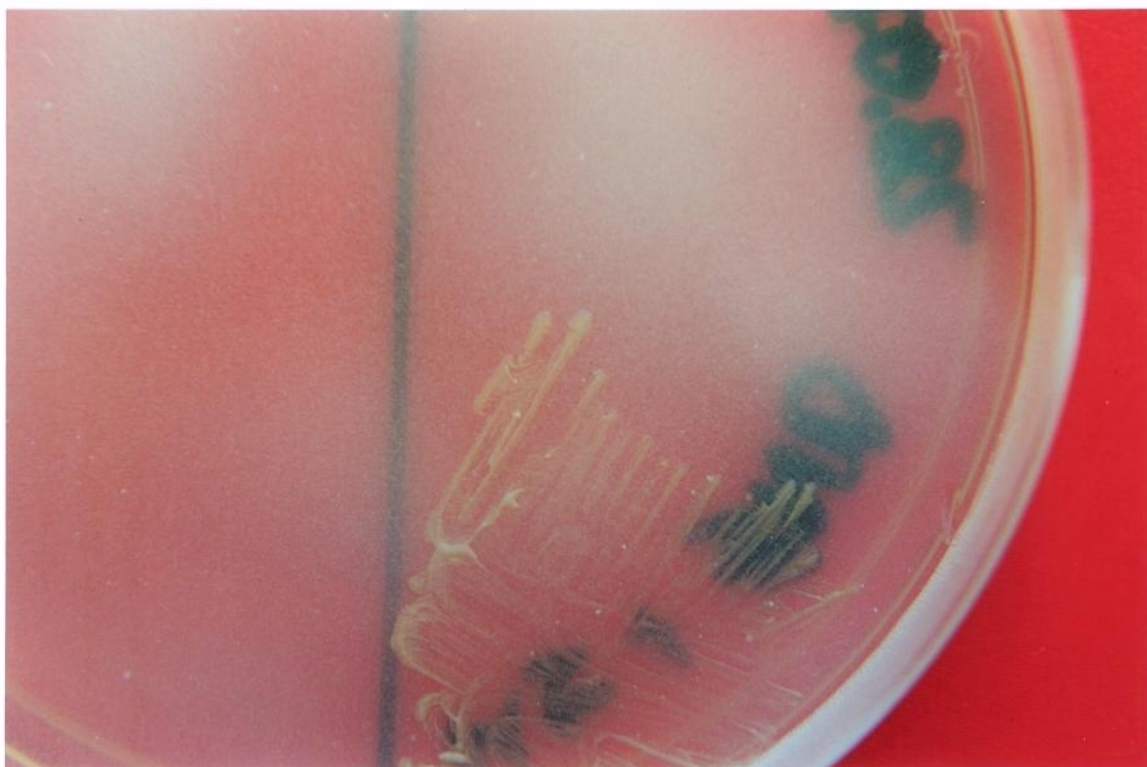


FIGURA 29 - Aspecto das colônias da linhagem 7D quando inoculadas em contato com benzo(b)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C.



FIGURA 30 - Aspecto das colônias da linhagem 7F quando inoculadas em contato com benzo(b)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C.

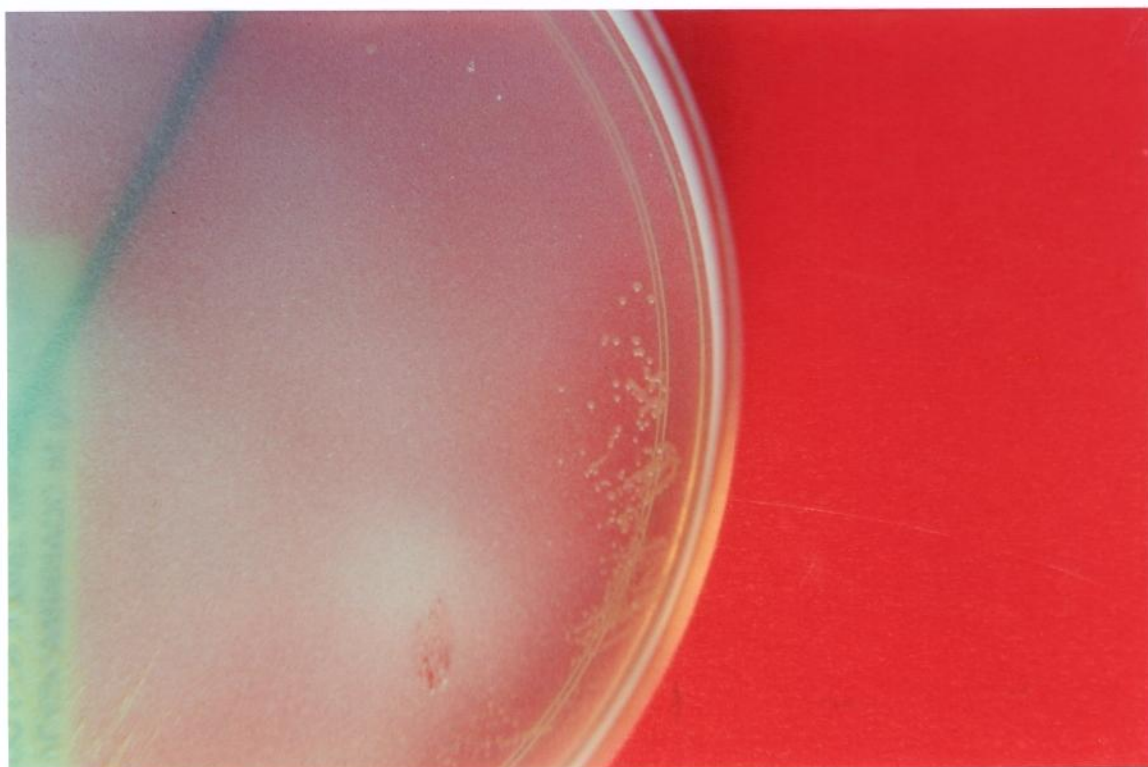


FIGURA 31 - Aspecto das colônias da linhagem 8E quando inoculadas em contato com benzo(b)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C.

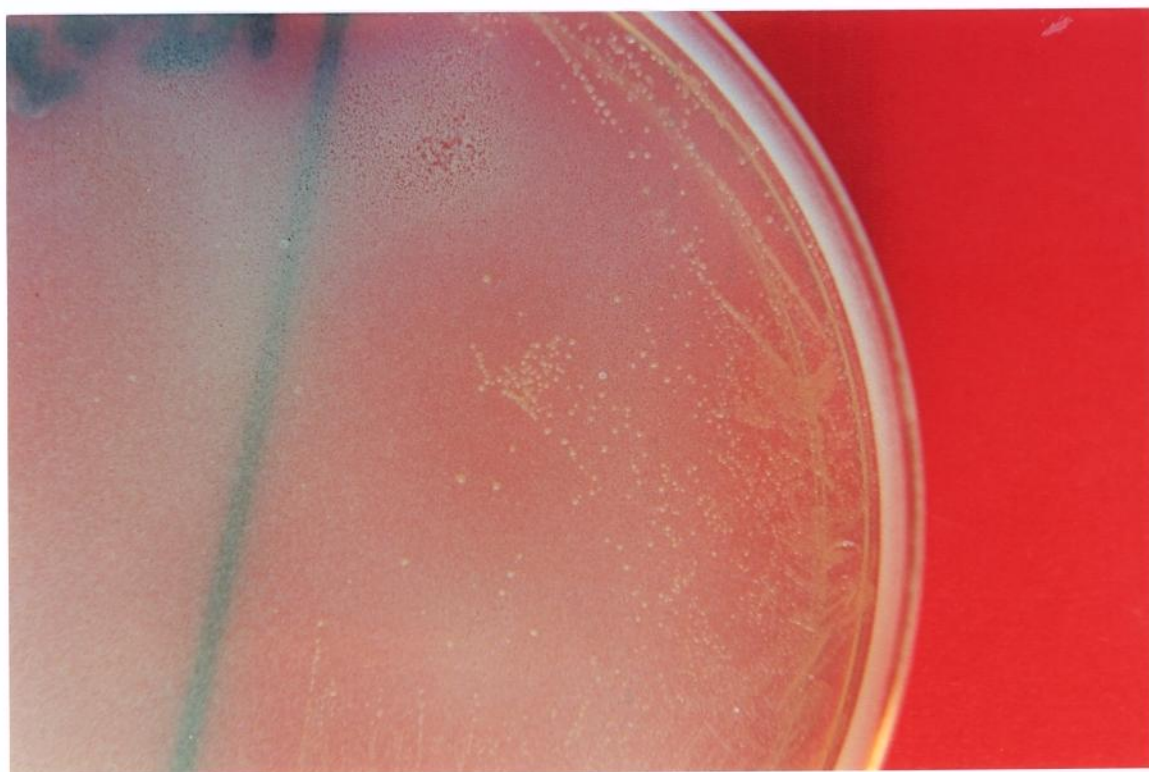


FIGURA 32 - Aspecto das colônias da linhagem 9D quando inoculadas em contato com benzo(b)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C.

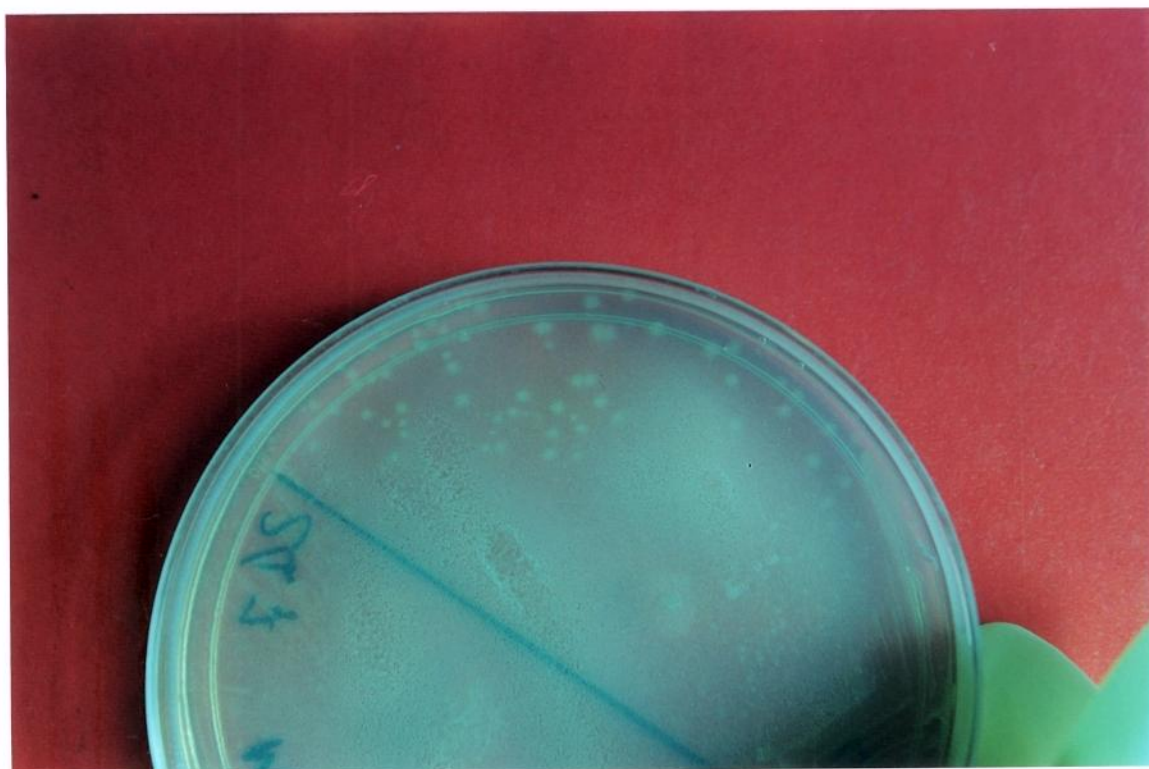


FIGURA 33 - Aspecto das colônias da linhagem 7D quando inoculadas em contato com benzo(k)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C.



FIGURA 34 - Aspecto das colônias da linhagem 8C quando inoculadas em contato com benzo(k)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C.

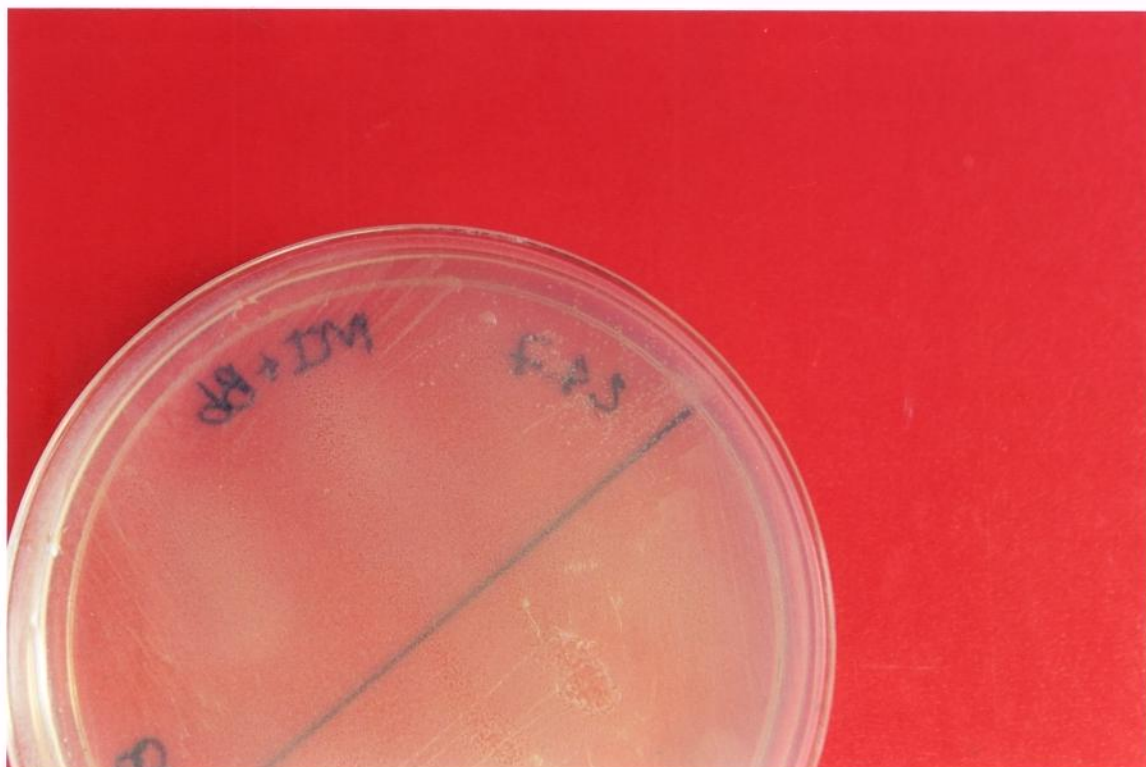


FIGURA 35 - Aspecto das colônias da linhagem 8E quando inoculadas em contato com benzo(k)fluoranteno, após 96 horas de crescimento a 25°C.

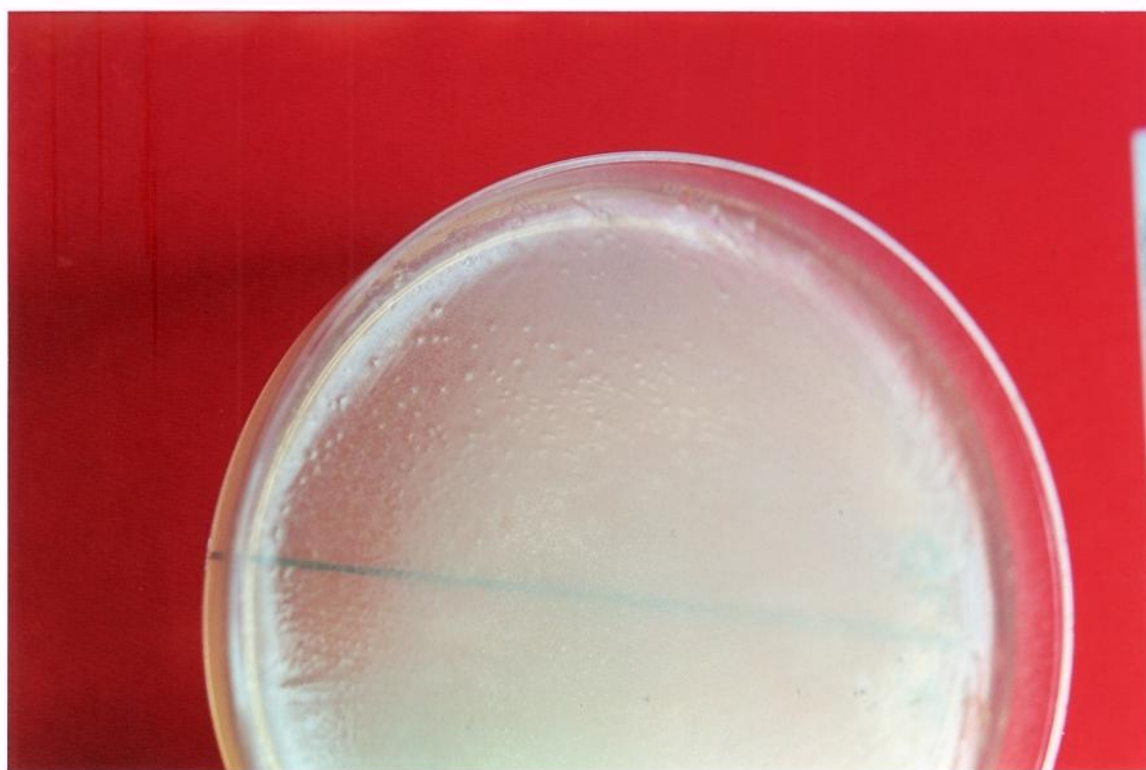


FIGURA 36 - Aspecto das colônias da linhagem 7D quando inoculadas em contato com pireno, após 96 horas de crescimento a 25°C.

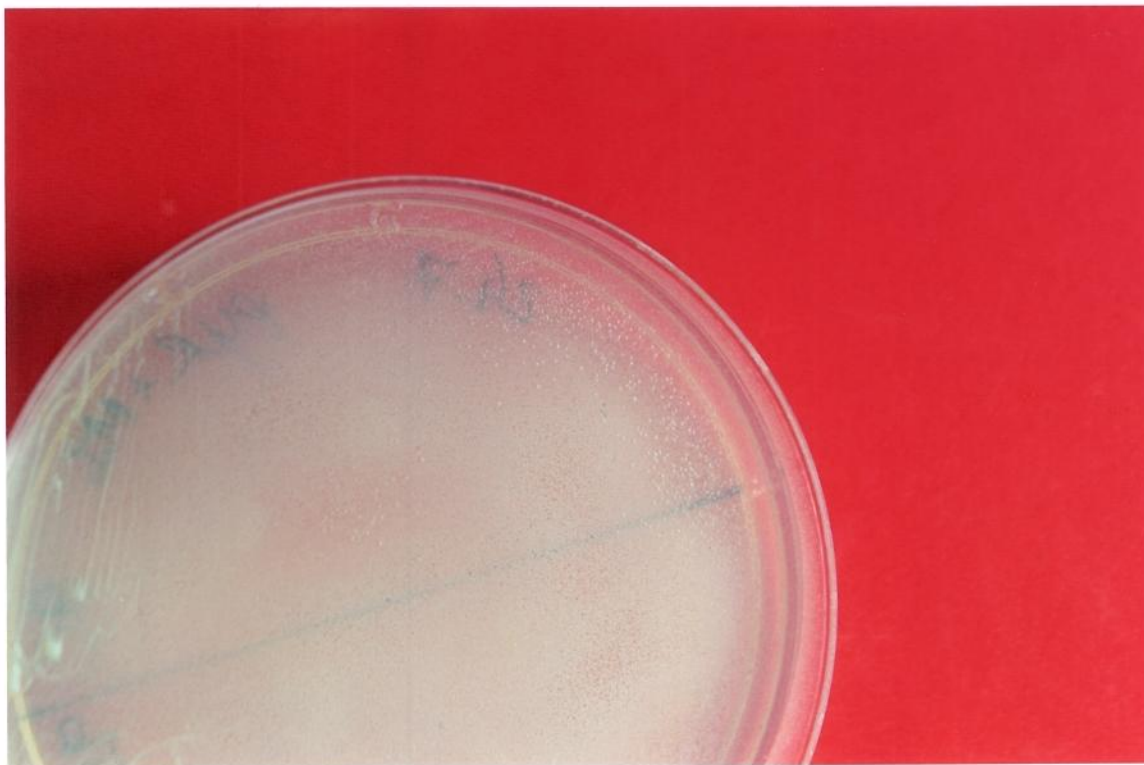


FIGURA 37 - Aspecto das colônias da linhagem 9C quando inoculadas em contato com pireno, após 96 horas de crescimento a 25°C.

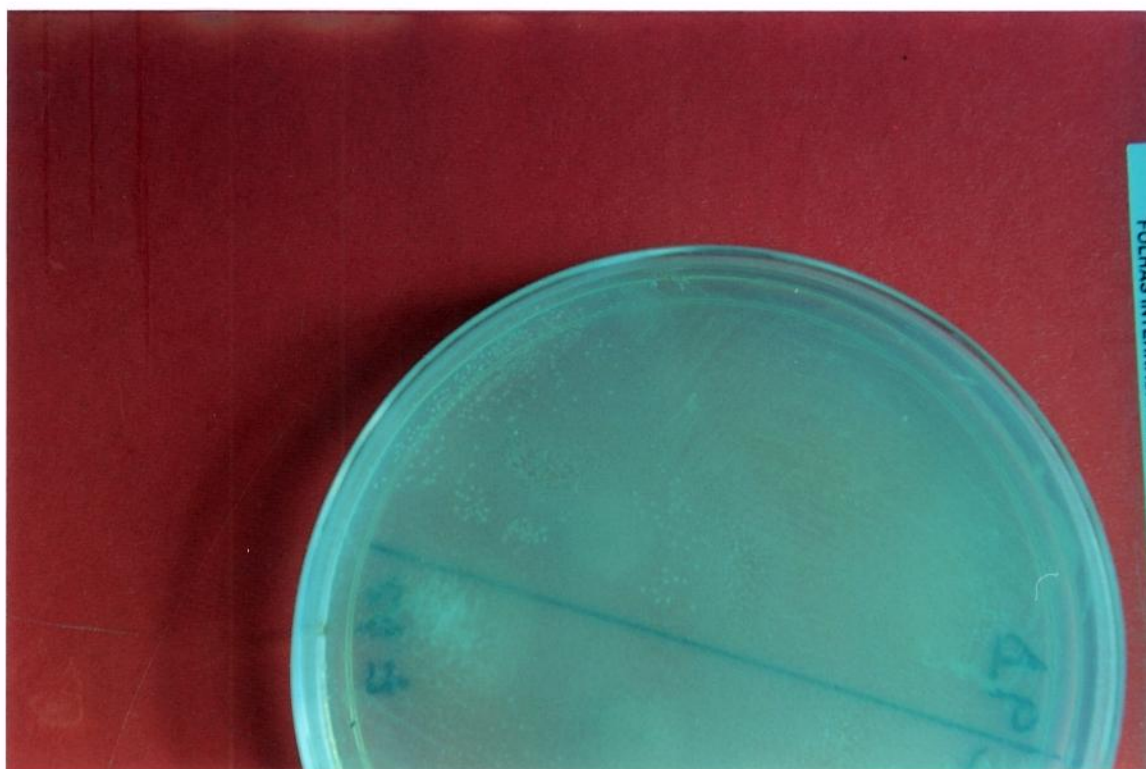


FIGURA 38 - Aspecto das colônias da linhagem 9D quando inoculadas em contato com pireno, após 96 horas de crescimento a 25°C.

4.3.2. Utilização dos diferentes agentes surfactantes

A biodegradação dos HPAs é frequentemente limitada pela sua baixa solubilidade em água, pois sendo compostos hidrofóbicos as suas taxas de dissolução são muito baixas (BOLDRIN *et alli*, 1993; STUCKI & ALEXANDER, 1987 e THOMAS *et alli*, 1986).

Muitos estudos já foram desenvolvidos com o objetivo de determinar a relação entre as taxas de biodegradação e as taxas de transferência de massa dos HPAs para a fase aquosa. Dentre as soluções propostas, existem aquelas que sugerem que um aumento na transferência de massa pode ser alcançado com o uso de partículas pequenas, que irão aumentar a área superficial de contato, resultando em uma maior taxa de dissolução (VOLKERING *et alli*, 1992).

Outros estudos sugerem a adição de surfactantes que atuam entre as fases imiscíveis, pois possuem uma fração hidrofóbica e uma hidrofílica, podendo aumentar a concentração dos compostos hidrofóbicos na fase aquosa através de sua solubilização ou emulsificação. A solubilização dos HPAs e outros poluentes hidrofóbicos através de surfactantes não iônicos tem sido questionada, mas muitos estudos correlacionam o potencial dos surfactantes em aumentar a concentração dos compostos hidrofóbicos na fase aquosa, com a aceleração da degradação dos hidrocarbonetos (EDWARDS *et alli*, 1991 e KILE & CHIOU, 1989).

Tentativas de aumentar as taxas de degradação dos substratos não polares com o uso de surfactantes têm apresentado resultados contraditórios; assim como a utilização de surfactantes em sistemas água-solo complexos também já foi estudada, mas seus efeitos ainda não são bem entendidos (BURY & MILLER, 1993 e LAHA & LUTHY, 1991).

Para a determinação de adição de um surfactante ideal para os experimentos de biodegradação deste trabalho, foram analisados os efeitos de três compostos, sulfóxido de dimetila (DMSO), dodecilsulfato de sódio (SDS) e Tween 80, quanto à sua capacidade de potencializar a solubilidade dos HPAs e quanto à sua toxicidade para as células bacterianas.

Os resultados referentes à presença de HPAs no meio de cultivo mostraram que o DMSO é um bom agente solubilizador dos quatro HPAs testados, (FIGURA 39). Com o aumento de concentração de DMSO no meio de cultivo, aconteceu um aumento da presença de HPAs solubilizados no meio.

Também foi possível verificar que o SDS é um excelente agente surfactante para os HPAs (FIGURA 40), mas como pode ser visto nas FIGURAS 42 até 44, o SDS apresenta um efeito tóxico para as células bacterianas.

Já o Tween 80, apresentou taxas de dissolução dos HPAs moderadas (FIGURA 41) e também provocou um efeito de redução de UFC/mL nos meios de cultivo testados.

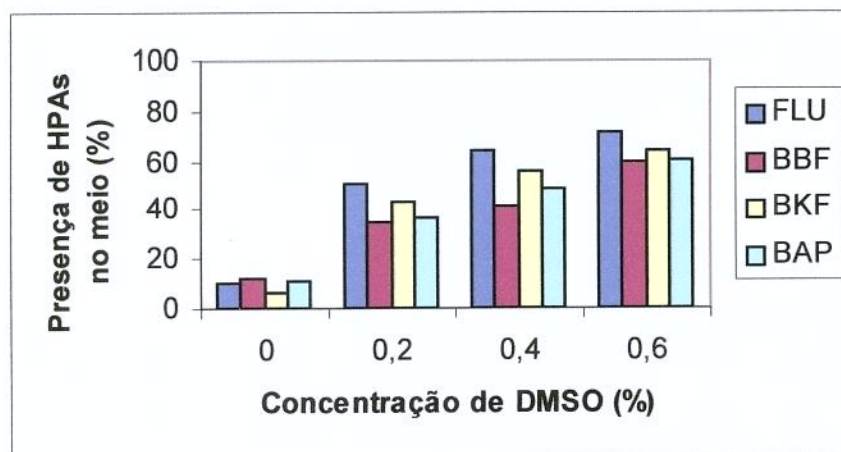


FIGURA 39 – Solubilização dos HPAs no meio de cultivo usando diferentes concentrações de DMSO. FLU - fluoranteno; BBF - benzo(b)fluoranteno; BKF - benzo(k)fluoranteno; BAP – benzo(a)pireno.

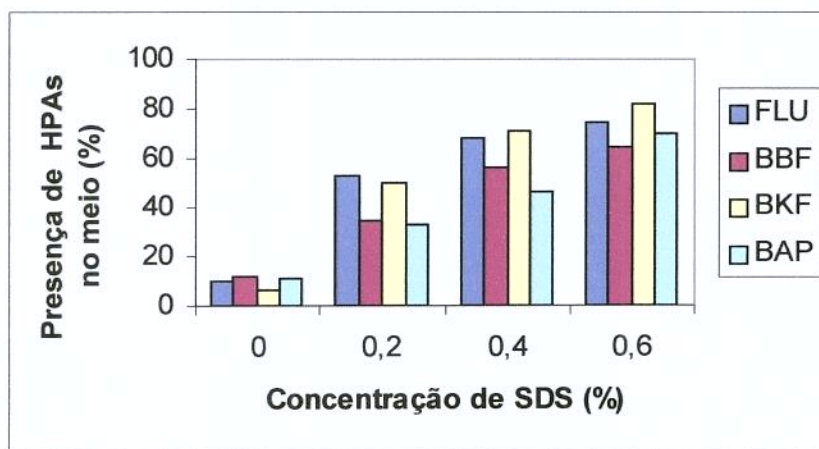


FIGURA 40 – Solubilização dos HPAs no meio de cultivo usando diferentes concentrações de SDS. FLU - fluoranteno; BBF - benzo(b)fluoranteno; BKF - benzo(k)fluoranteno; BAP – benzo(a)pireno.

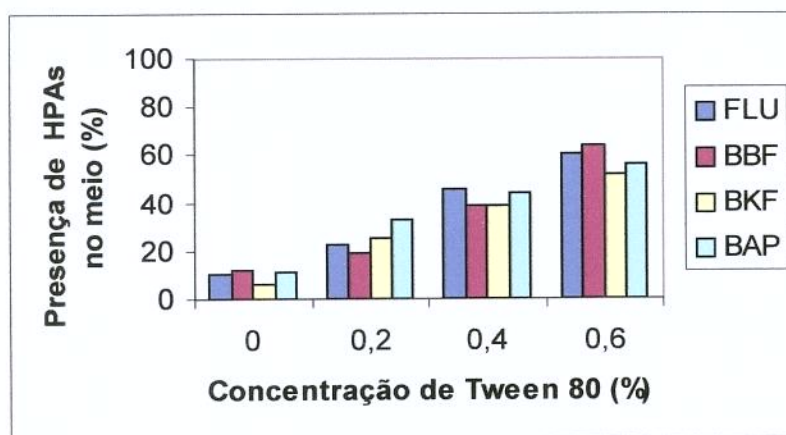


FIGURA 41 – Solubilização dos HPAs no meio de cultivo usando diferentes concentrações de Tween 80. FLU - fluoranteno; BBF - benzo(b)fluoranteno; BKF - benzo(k)fluoranteno; BAP – benzo(a)pireno.

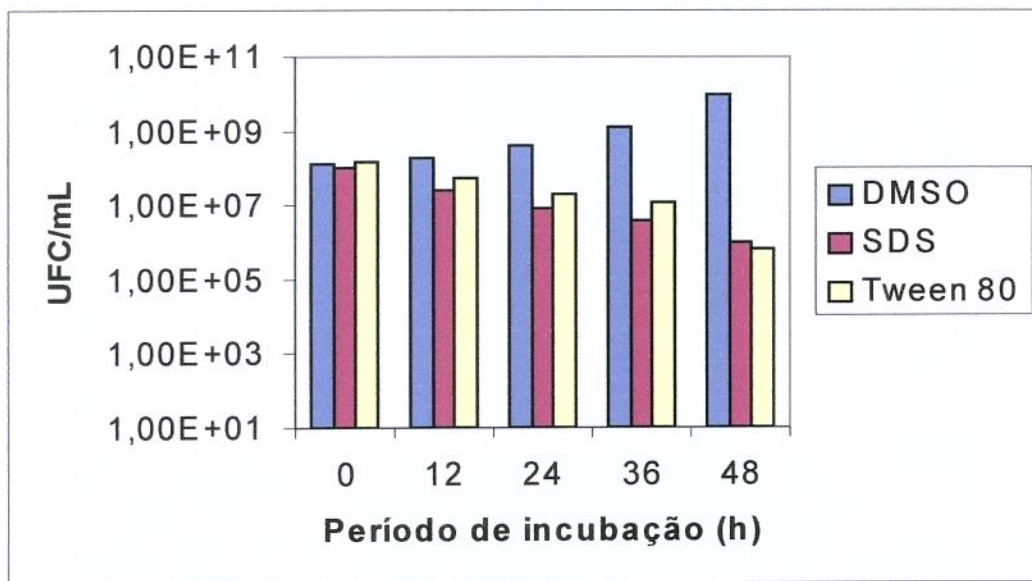


FIGURA 42 – Efeito de diferentes surfactantes (0,2%, v/v) no crescimento celular. DMSO – dimetil sulfóxido; SDS – dodecil sulfato de sódio

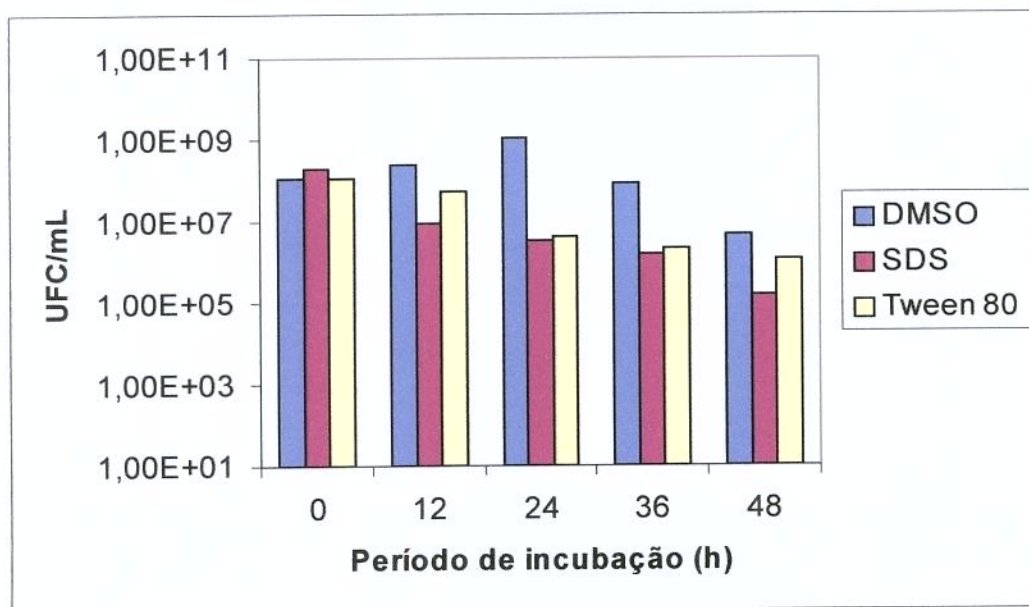


FIGURA 43 – Efeito de diferentes surfactantes (0,4%, v/v) no crescimento celular. DMSO – dimetil sulfóxido; SDS – dodecil sulfato de sódio

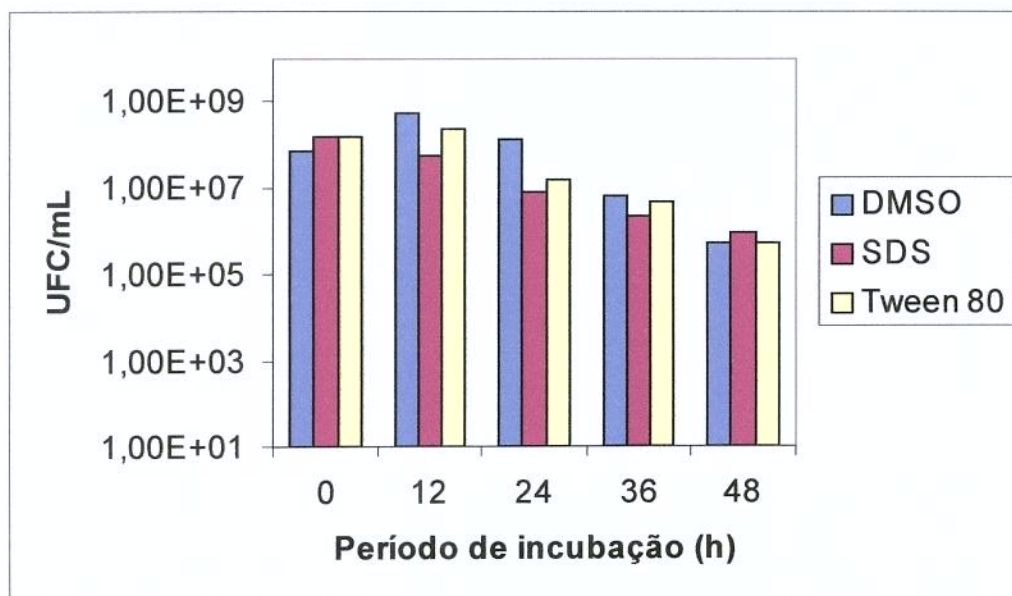


FIGURA 44 – Efeito de diferentes surfactantes (0,6%, v/v) no crescimento celular DMSO – dimetil sulfóxido; SDS – dodecil sulfato de sódio

Devido às características de solubilização dos HPAs no meio de cultivo e por ter demonstrado um baixo potencial como agente inibidor do crescimento celular em relação aos outros surfactantes testados, o DMSO na concentração de 0,2% (vol/vol) foi selecionado como agente surfactante para ser utilizado nos experimentos de biodegradação em meio líquido deste trabalho.

4.3.3. Extração de HPAs do meio de cultivo

Após o período de incubação dos testes de biodegradação, foi feita a extração dos HPAs restantes no meio de cultivo, para sua posterior quantificação por CLAE. Como nos experimentos iniciais houve uma certa irregularidade nos resultados obtidos, foram feitos testes de extração com três solventes, acetato de etila, acetonitrila e diclorometano, normalmente utilizados neste tipo de extração (GRIFOLL *et alli*, 1995).

Foi possível verificar que a extração feita com acetonitrila resultou em menores valores de recuperação dos quatro HPAs presentes no meio de cultivo (FIGURA 45), tendo

a recuperação do BkF ficou abaixo de 75%. Já o diclorometano apresentou valores acima de 80% para a recuperação de todos os HPAs presentes no meio de cultivo. A extração realizada com acetato de etila proporcionou os melhores valores de recuperação dos HPAs, sendo que o valor mínimo de recuperação ficou em torno de 86% para o BkF.

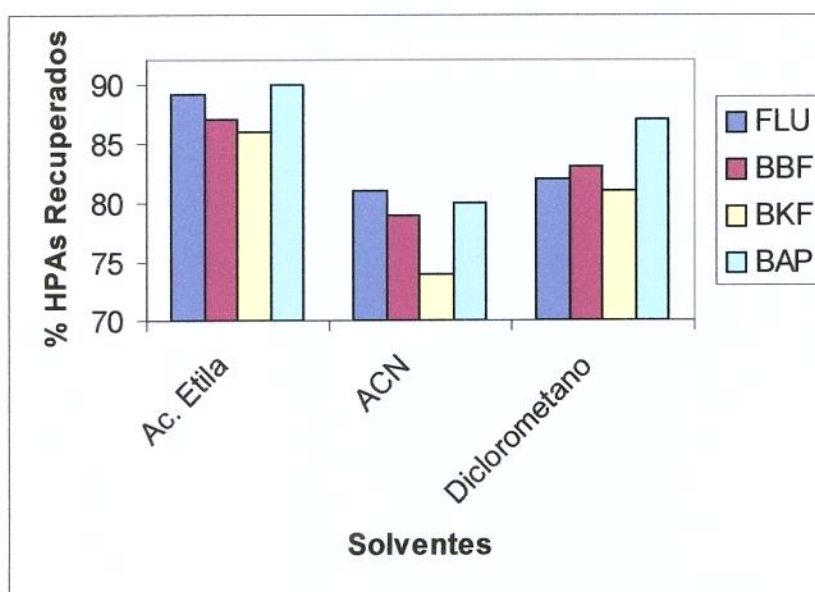


FIGURA 45 – Ação dos solventes, acetato de etila, acetonitrila e diclorometano, na extração de fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno presentes no meio de cultivo. FLU - fluoranteno; BBF - benzo(b)fluoranteno; BKF - benzo(k)fluoranteno; BAP – benzo(a)pireno.

Com base nesses resultados o acetato de etila foi utilizado para todas as extrações realizadas nos experimentos de biodegradação.

4.3.4. Avaliação da biodegradação dos HPAs em meio líquido

Na TABELA 32, a seguir, é possível observar qual foi a porcentagem de HPAs restantes no meio de cultivo, após 40 dias de incubação das linhagens de bactérias na forma de culturas puras e mistas na presença de HPAs como única fonte de carbono.

TABELA 32 - Porcentagens de HPAs presentes no meio de cultivo após período de 40 dias de incubação a 25°C e 200 rpm, com diferentes culturas de bactérias nativas isoladas de sítios ambientais contaminados com HPAs.

EXP	BACTÉRIAS	PORCENTAGEM DE HPAS RESTANTES NO MEIO MEIO DE CULTIVO
1	2B	2,76 FLU
2	2B	5,67 BbF
3	2B	8,54 BkF
4	2B	6,62 BaP
5	6B	3,85 FLU
6	6B	2,24 BbF
7	6B	23,45 BkF
8	6B	27,46 BaP
9	7F	1,81 FLU
10	7F	8,85 BbF
11	7F	0,78 BkF
12	7F	0,32 BaP
13	9D	0,49 FLU
14	9D	2,94 BbF
15	9D	5,81 BkF
16	9D	8,4 BaP
17	MISTA 1	0,29 HPAs (1,4 FLU, 0,25 BbF, 1,17 BkF e 0,13 BaP)
18	MISTA 1	1,24 HPAs (2,11 BbF e 1,2 BaP)
19	MISTA 2	4,5 HPAs (0,28 FLU, 0,23 BbF, 9,87 BkF e 11,86 BaP)
20	MISTA 2	3,13 HPAs (1,5 BbF e 0,59 BaP)
21	2B	2,49 HPAs (0,32 FLU, 0,34 BbF, 10,2 BkF e 0,4 BaP)
22	6B	4,41 HPAs (0,15 FLU, 0,18 BbF, 2,39 BkF e 15 BaP)
23	7F	5,95 HPAs (0,10 FLU, 9,9 BbF, 14,6 BkF e 0,13 BaP)
24	9D	1,42 HPAs (0,2 FLU, 4,1 BbF, 17,7 BkF e 0,21 BaP)

Nas FIGURAS 46 e 47 são mostrados os cromatogramas obtidos por CLAE para quantificação da presença de fluoranteno nos EXP 1 e EXP 24, respectivamente, exemplificando como foram obtidas as porcentagens de redução dos HPAs no meio de cultivo.

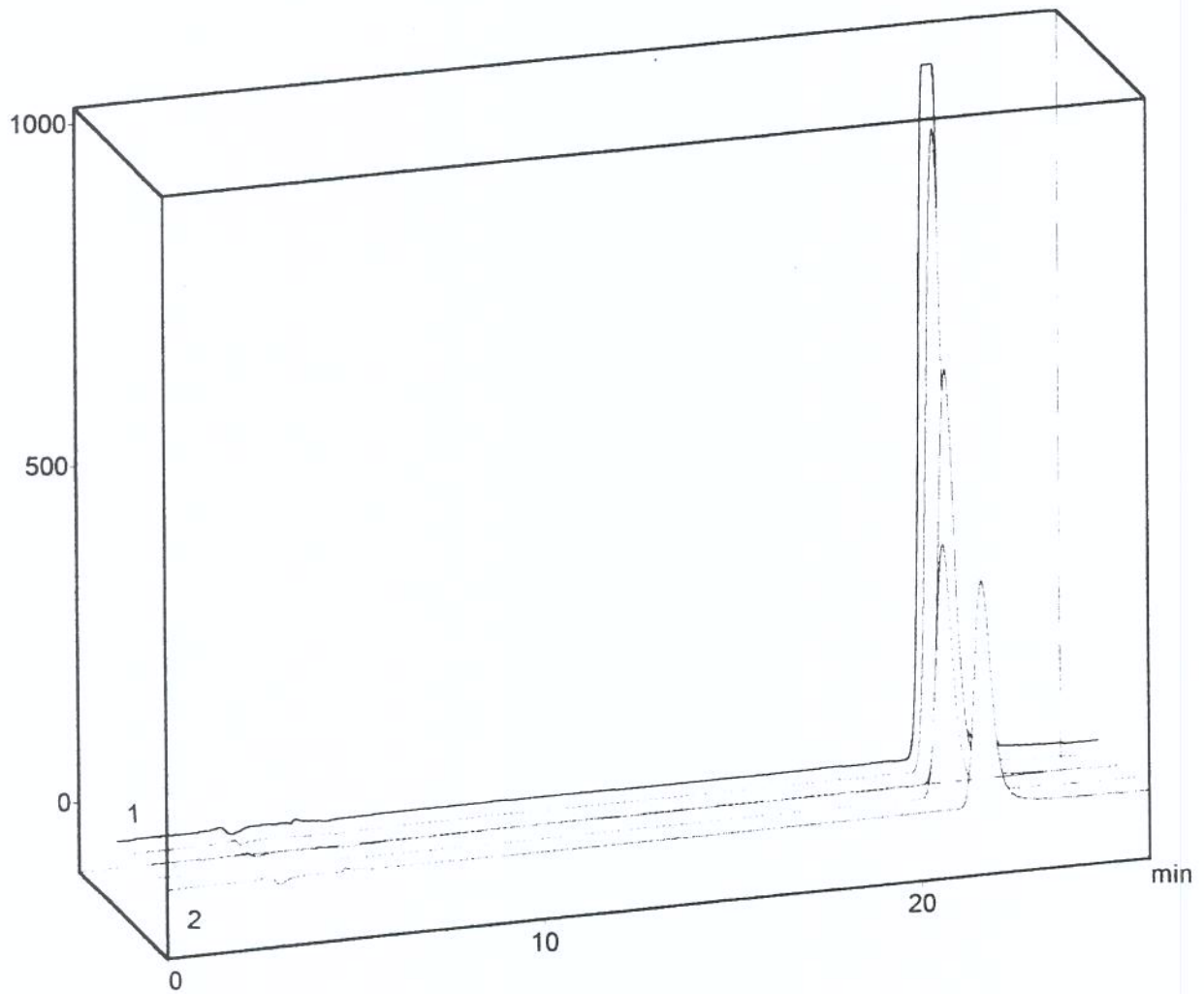


FIGURA 46 – Cromatogramas obtidos por CLAE utilizados para a quantificação do fluoranteno no meio de cultivo com a bactéria 2B, EXP 1.

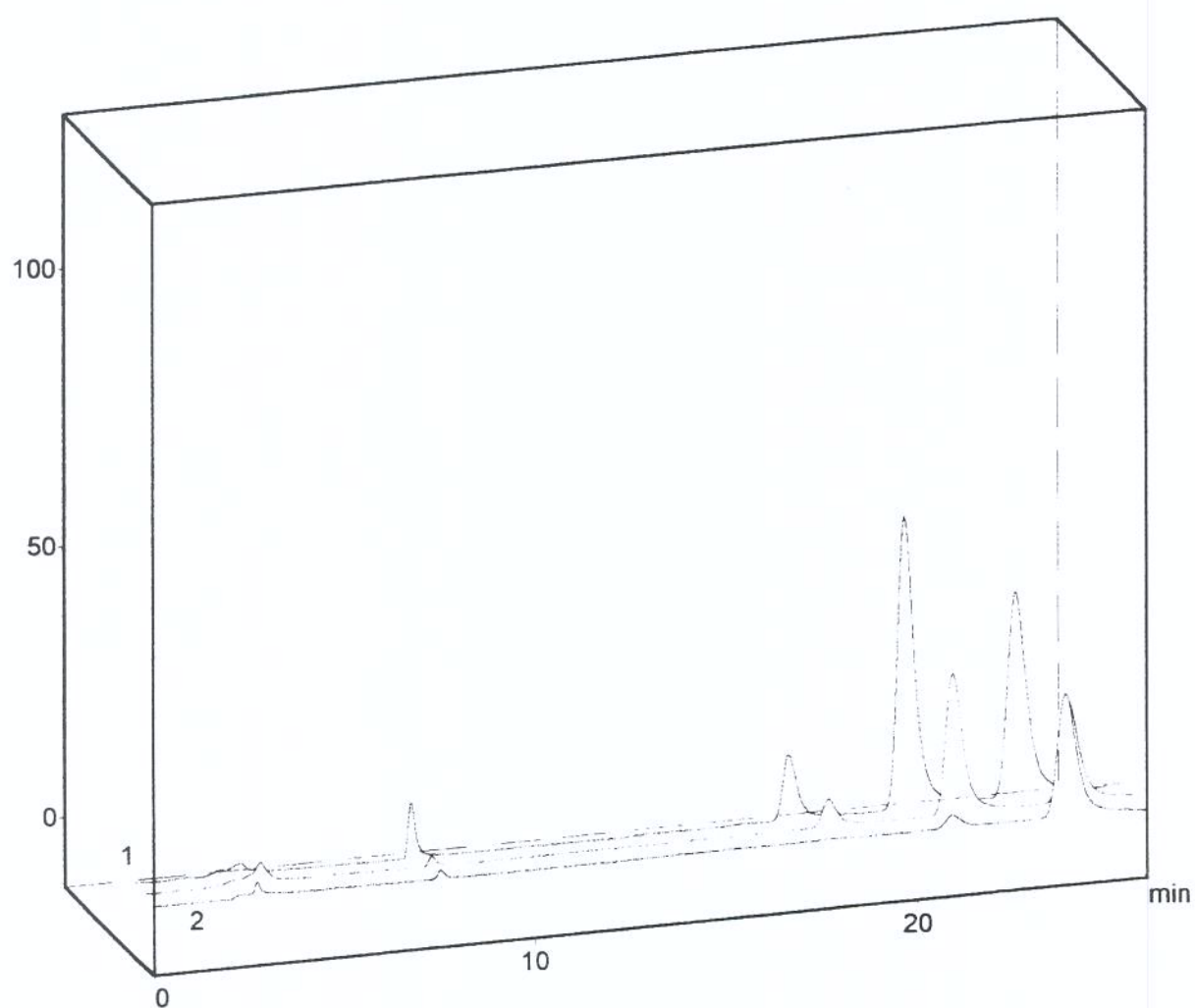


FIGURA 47 – Cromatogramas obtidos por CLAE utilizados para a quantificação de fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno no meio de cultivo com a bactéria 9D, EXP 24.

4.3.4.1. Capacidade de biodegradação de HPAs pela bactéria 2B

A bactéria 2B, classificada como pertencente ao gênero *Moraxella* sp (TABELA 16), apresentou diferentes taxas de biodegradação dos HPAs analisados. Como pode ser visualizado nas FIGURAS 48 a 52, e também de acordo com os resultados sumarizados na TABELA 32, a ordem de aproveitamento dos HPAs como subtratos pela bactéria 2B foi o seguinte: MIX 1>FLU>BbF>BaP>BkF. O aproveitamento dos HPAs pela bactéria 2B, quando fornecidos na forma de mistura, foi praticamente igual para FLU, BbF e BaP, sendo o BkF menos degradado em relação aos outros. Pode-se inicialmente concluir que a presença de HPAs em mistura favoreceu a biodegradação do FLU, BbF e BaP, ao passo que ocorreu uma inibição da degradação do BkF.

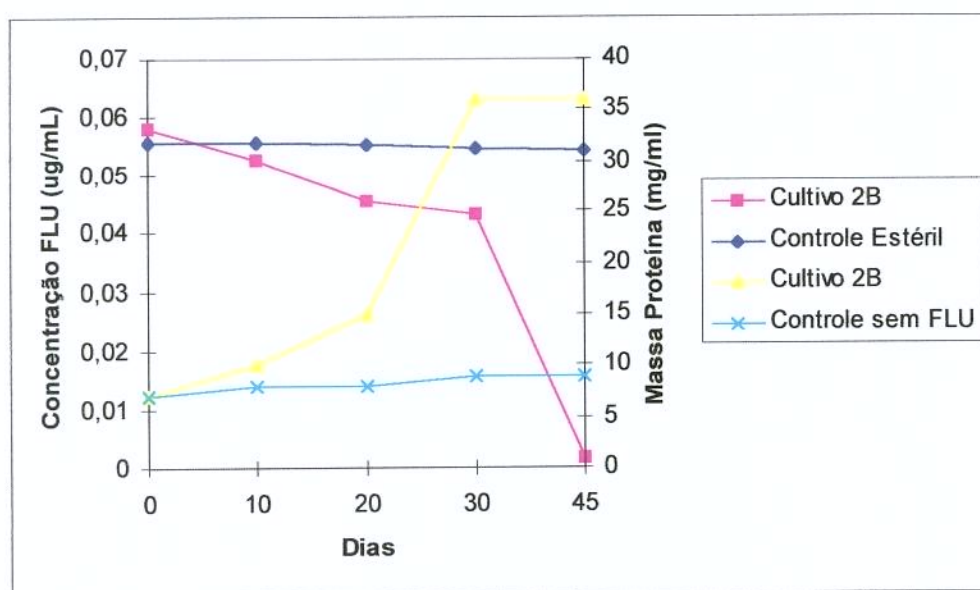


FIGURA 48 – Curvas de crescimento da bactéria 2B e consumo de fluoranteno.

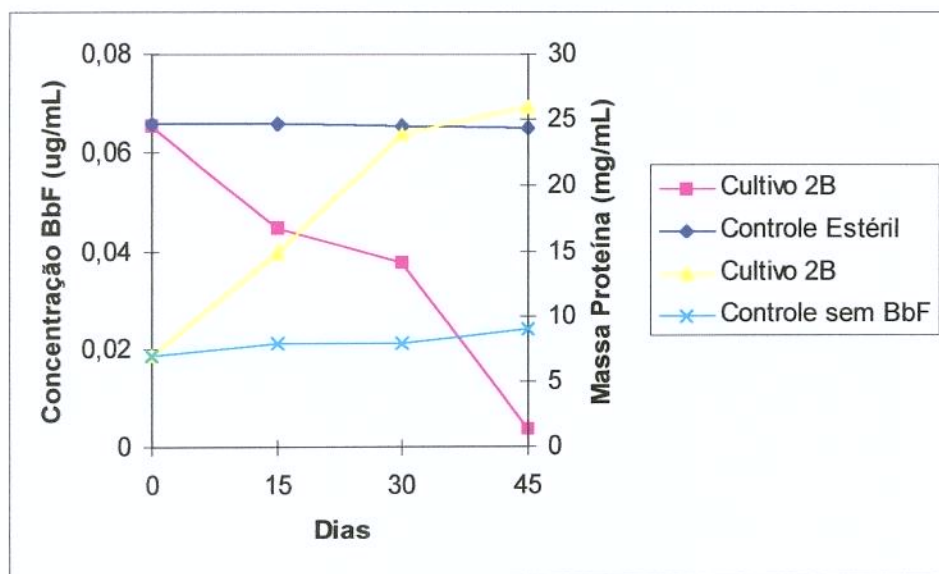


FIGURA 49 – Curvas de crescimento da bactéria 2B e consumo de b(b)fluoranteno.

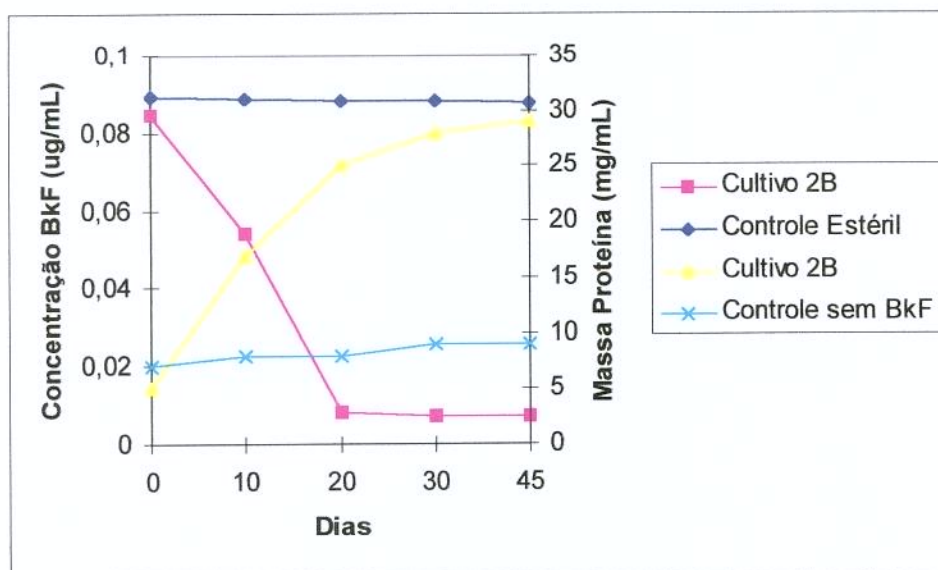


FIGURA 50 – Curvas de crescimento da bactéria 2B e consumo de b(k)fluoranteno.

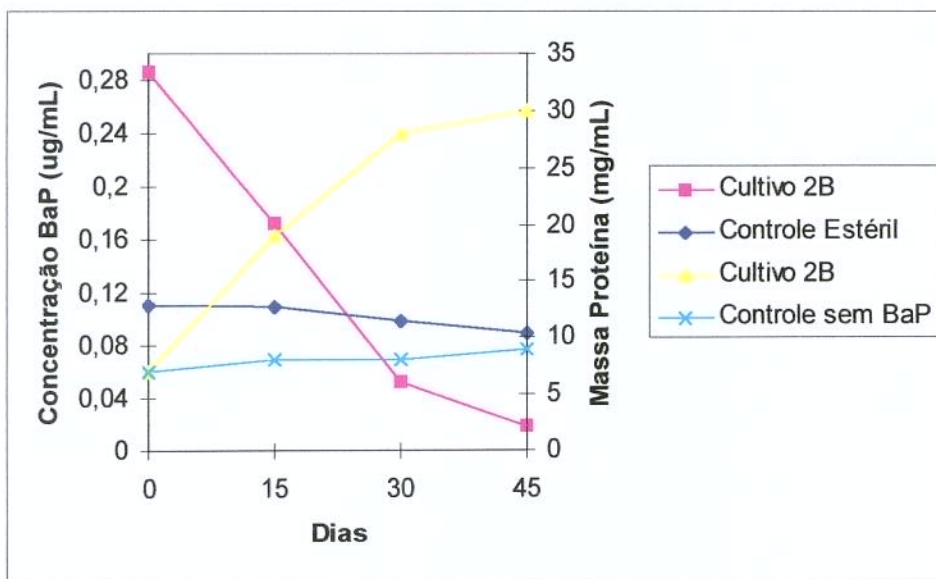


FIGURA 51– Curvas de crescimento da bactéria 2B e consumo de b(a)pireno.

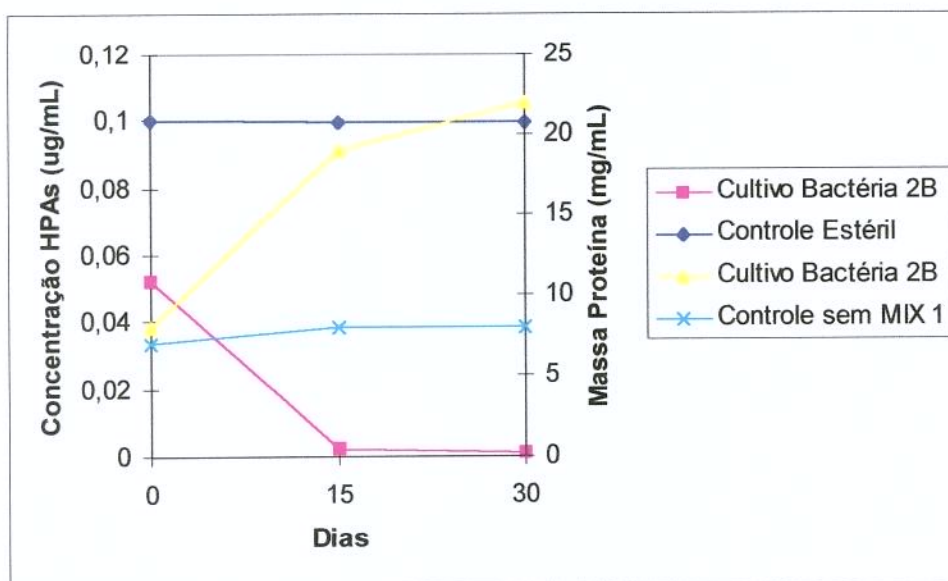


FIGURA 52 – Curvas de crescimento da bactéria 2B e consumo de mistura de HPAs.

4.3.4.2. Capacidade de biodegradação de HPAs pela bactéria 6B

A bactéria 6B, classificada como pertencente ao gênero *Pseudomonas* sp (TABELA 16), apresentou para os HPAs FLU e BbF uma excelente capacidade de degradação, como pode ser visualizado nas FIGURAS 53 e 54, já para o BkF e o BaP apresentou uma capacidade reduzida de degradação, em relação aos outros HPAs e em relação aos resultados apresentados pelas outras linhagens de bactérias. Nas FIGURAS 55 e 56 é possível observar como foi o consumo dos substratos BkF e BaP, respectivamente. Quando colocada na presença da mistura de HPAs (MIX 1), a capacidade de aproveitamento de FLU e BbF pela bactéria 6B aumentou, tendo sido praticamente todos consumidos do meio. O consumo de BkF e BaP também foi maior, fator este que leva a concluir que na presença de misturas dos HPAs testados, ocorre o efeito de augumentação, mostrando que também a bactéria 6B é capaz de crescer e se alimentar utilizando as misturas de HPAs.

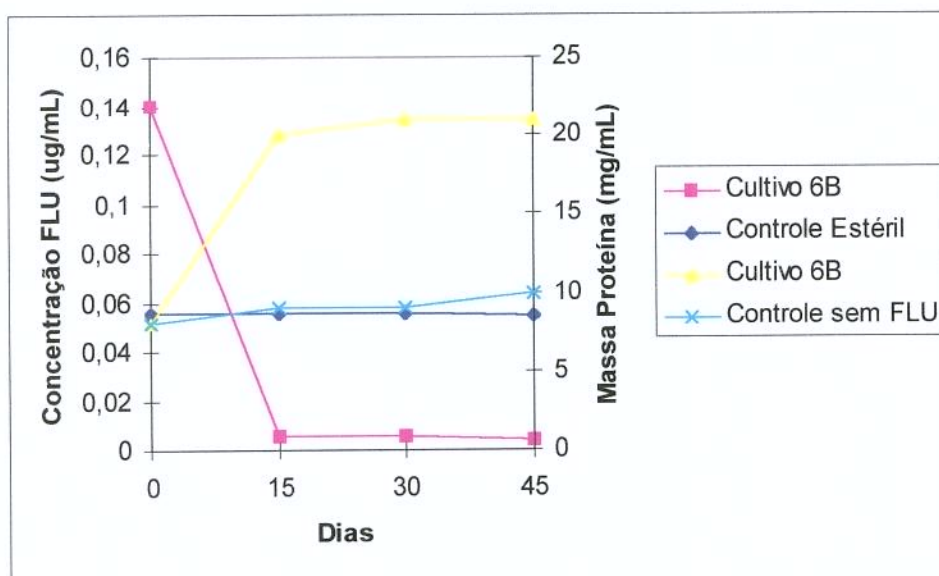


FIGURA 53– Curvas de crescimento da bactéria 6B e consumo de fluoranteno.

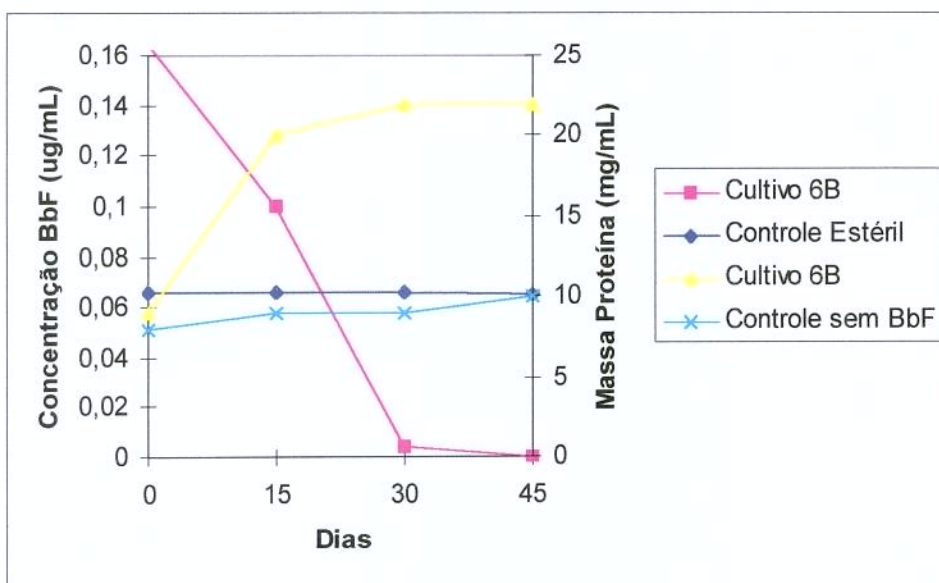


FIGURA 54— Curvas de crescimento da bactéria 6B e consumo de b(b)fluoranteno.

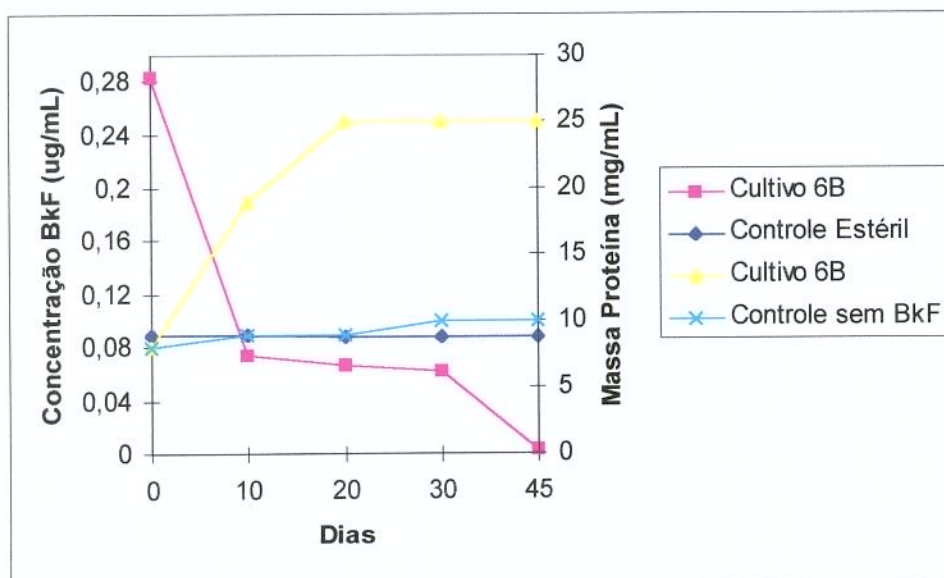


FIGURA 55— Curvas de crescimento da bactéria 6B e consumo de b(k)fluoranteno.

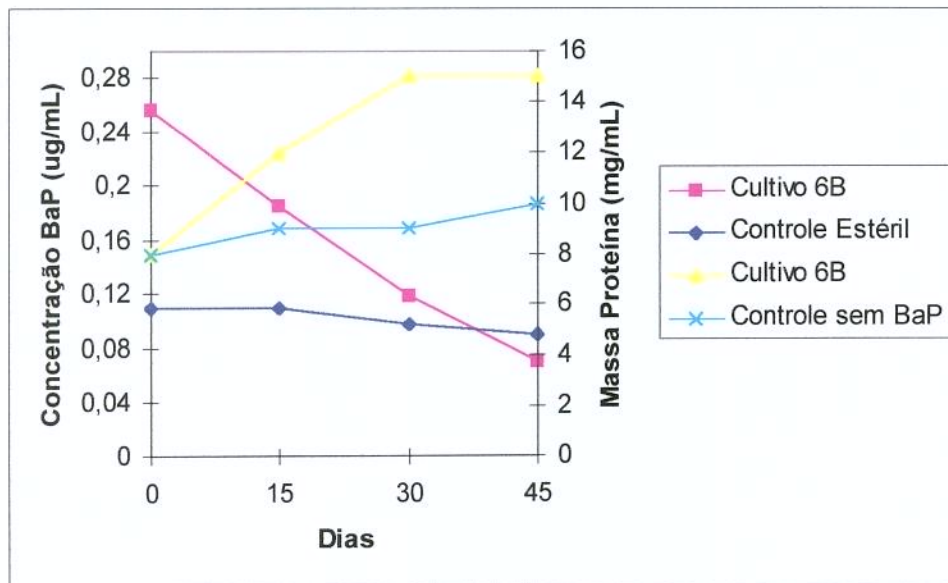


FIGURA 56– Curvas de crescimento da bactéria 6B e consumo de b(a)pireno.

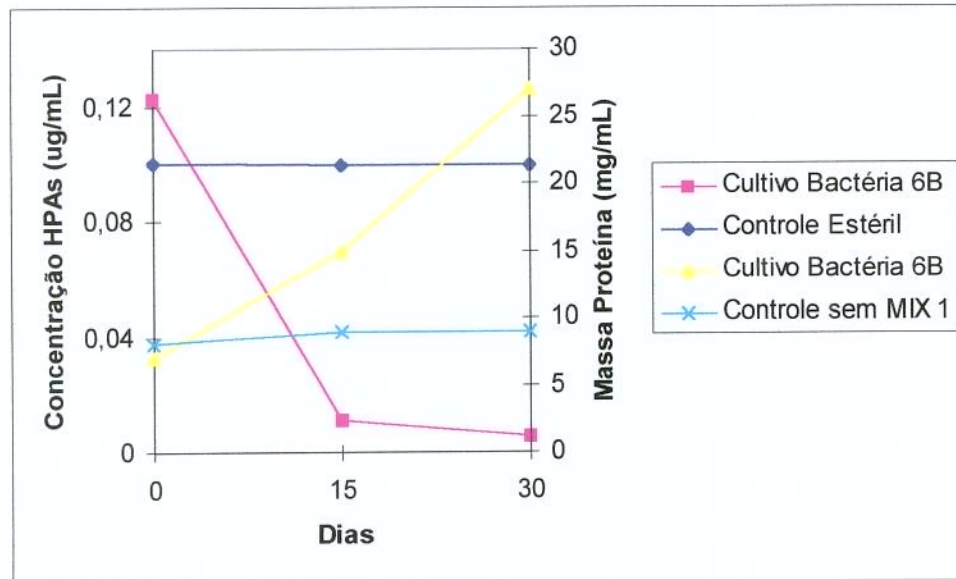


FIGURA 57– Curvas de crescimento da bactéria 6B e consumo de mistura de HPAs.

4.3.4.3. Capacidade de biodegradação de HPAs pela bactéria 7F

A bactéria 7F, assim como a bactéria 2B, também foi classificada como pertencente ao gênero *Moraxella* sp, apesar de serem provenientes de locais diferentes (TABELA 16). A ordem de degradação observada nos testes feitos com a bactéria 7F, mostrou que ela é capaz de consumir preferencialmente BaP>BkF>FLU>MIX 1>BbF, como pode ser visto nos FIGURAS 58 a 62. Na presença da mistura de HPAs (MIX 1) foi possível observar que o consumo de BaP e FLU foi elevado, tendo esses compostos sido praticamente eliminados do meio de cultivo. Pode-se dizer que a concentração do BbF permaneceu constante, não havendo efeitos positivos ou negativos na sua degradação devido à presença da mistura de HPAs. Pode-se dizer que ocorreu uma inibição da degradação do BkF, pois quando consumido isoladamente apresentou uma boa degradabilidade, sendo que na presença de outros HPAs esta diminuiu.

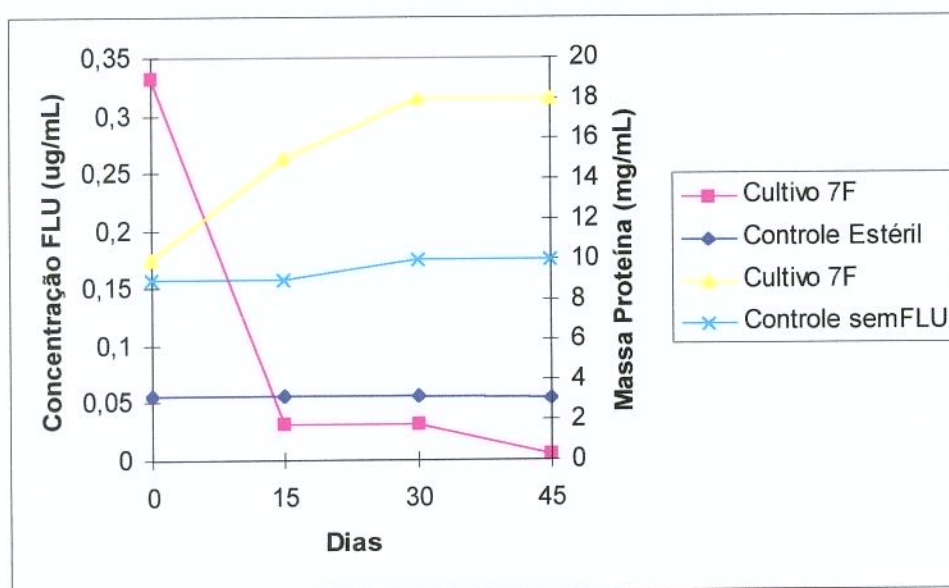


FIGURA 58– Curvas de crescimento da bactéria 7F e consumo de fluoranteno.

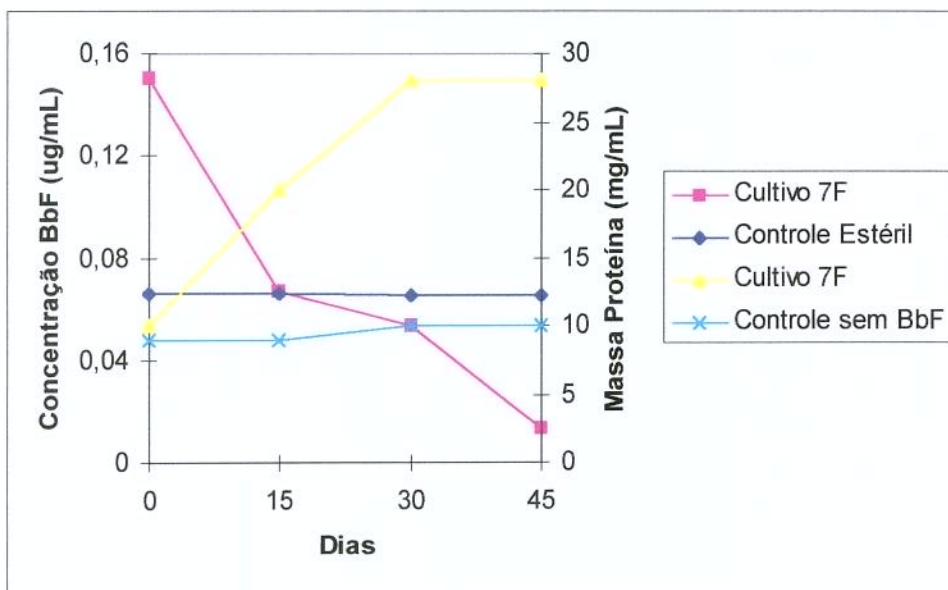


FIGURA 59– Curvas de crescimento da bactéria 7F e consumo de b(b)fluoranteno.

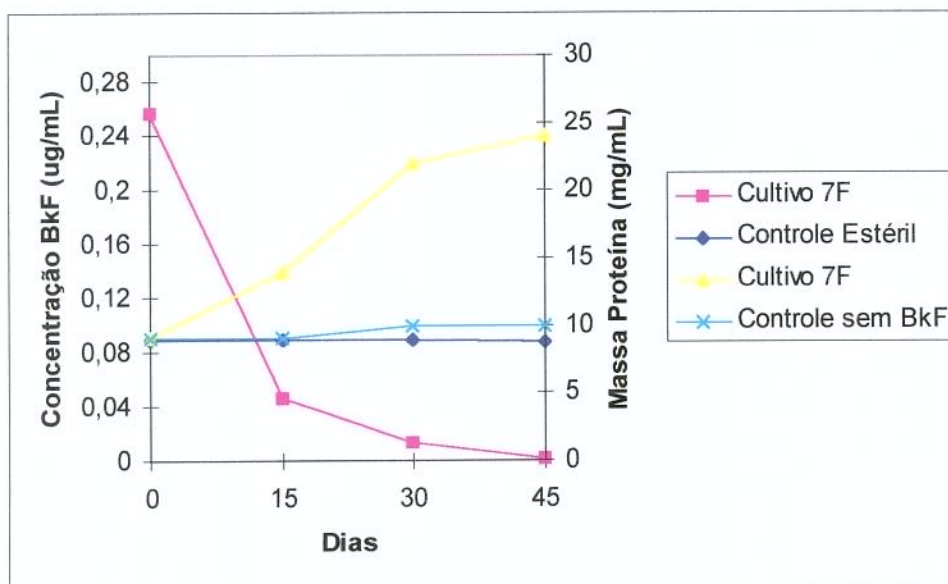


FIGURA 60 – Curvas de crescimento da bactéria 7F e consumo de b(k)fluoranteno.

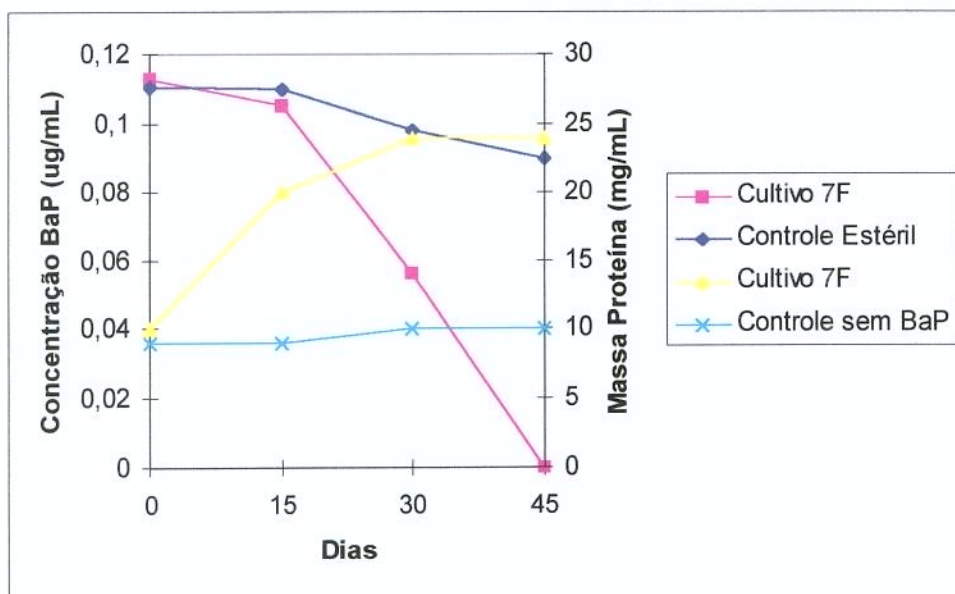


FIGURA 61– Curvas de crescimento da bactéria 7F e consumo de b(a)pireno.

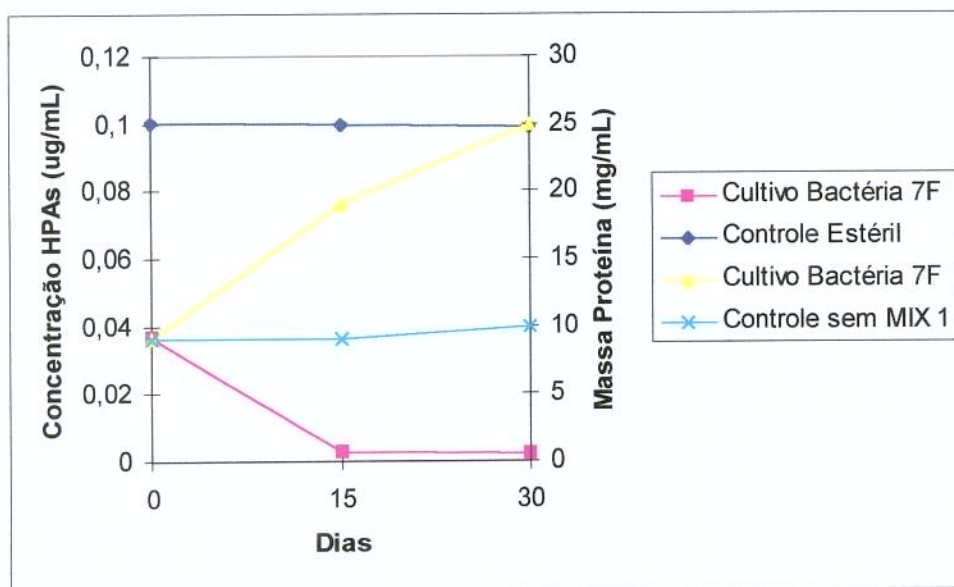


FIGURA 62– Curvas de crescimento da bactéria 7F e consumo de mistura de HPAs.

4.3.4.4. Capacidade de biodegradação de HPAs pela bactéria 9D

A bactéria 9D foi classificada como pertencente ao gênero *Acinetobacter* sp. (TABELA 16). O consumo de HPAs realizado por esta bactéria caracterizou-se por seguir a ordem: FLU>MIX 1>BbF>BkF>BaP, como pode ser visualizado nas FIGURAS 63 a 67, e também na TABELA 32. Quando na presença da mistura de HPAs (MIX 1), a bactéria conseguiu realizar uma excelente degradação do BaP, sugerindo que a presença dos outros compostos favoreceu a sua degradação. Já o BkF, que foi consumido em grande porcentagem quando presente isoladamente no meio de cultivo, apresentou uma redução de consumo no final, quando na presença da mistura de HPAs, mostrando um efeito de inibição causado pela presença dos outros compostos.

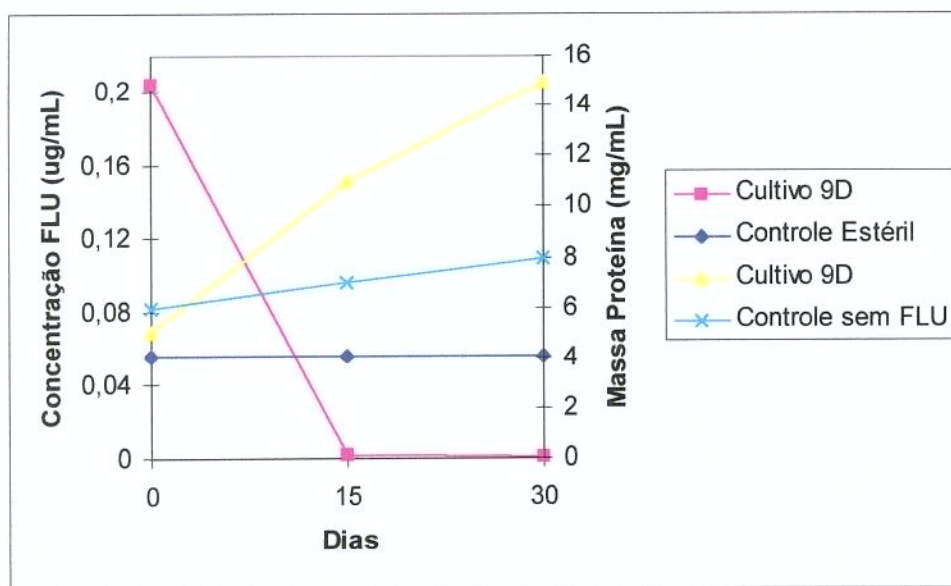


FIGURA 63– Curvas de crescimento da bactéria 9D e consumo de fluoranteno.

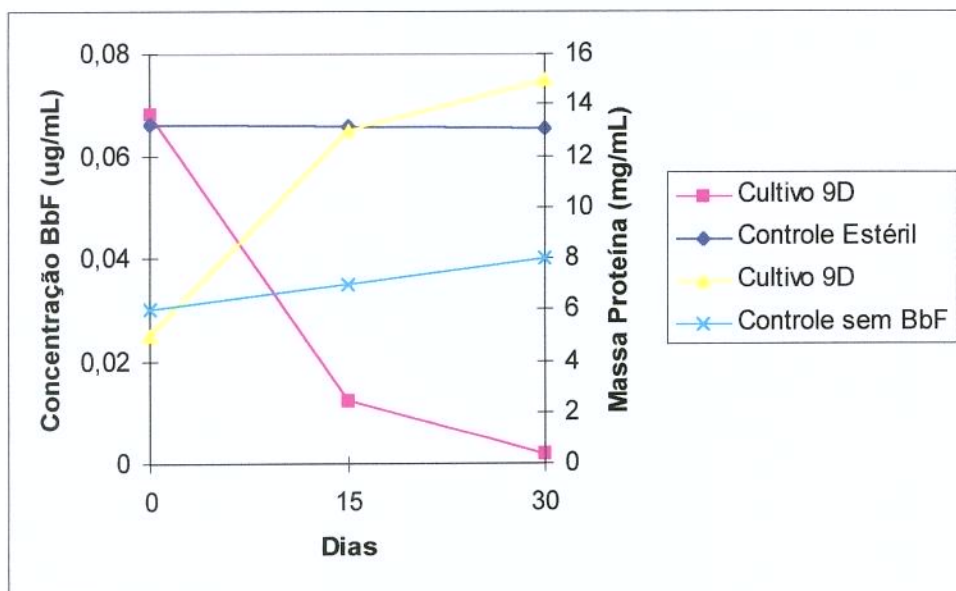


FIGURA 64– Curvas de crescimento da bactéria 9D e consumo de b(b)fluoranteno.

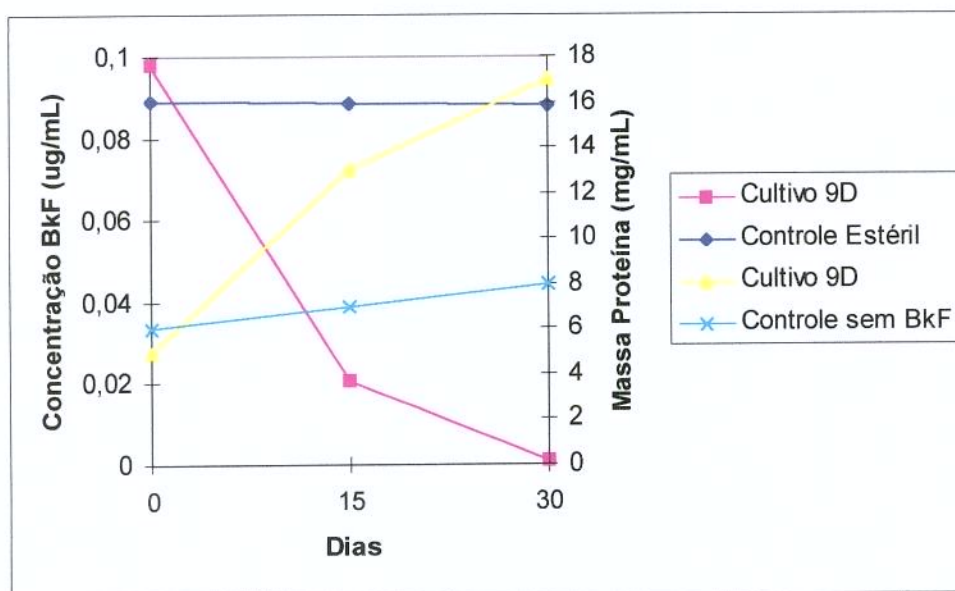


FIGURA 65– Curvas de crescimento da bactéria 9D e consumo de b(k)fluoranteno.

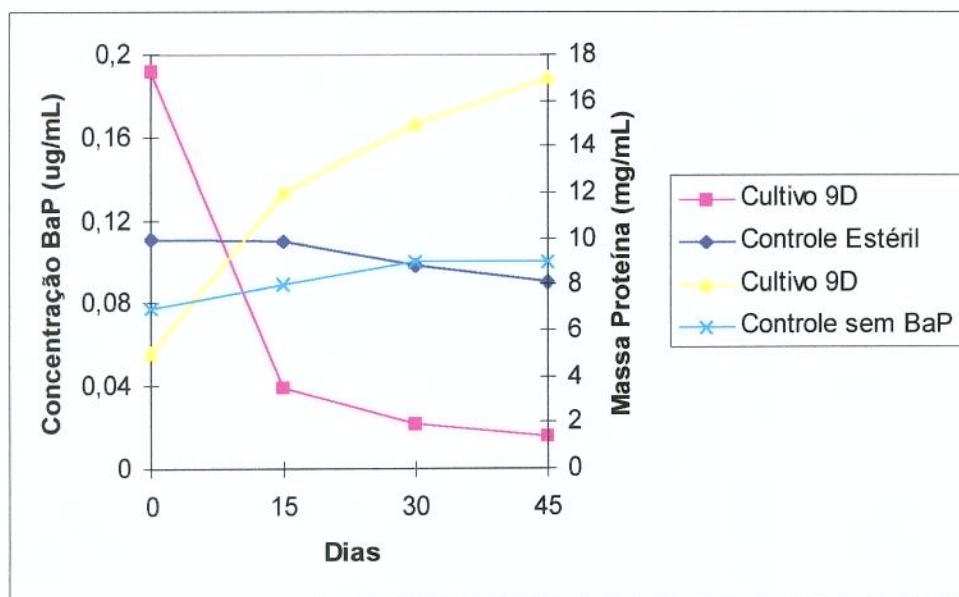


FIGURA 66– Curvas de crescimento da bactéria 9D e consumo de b(a)pireno.

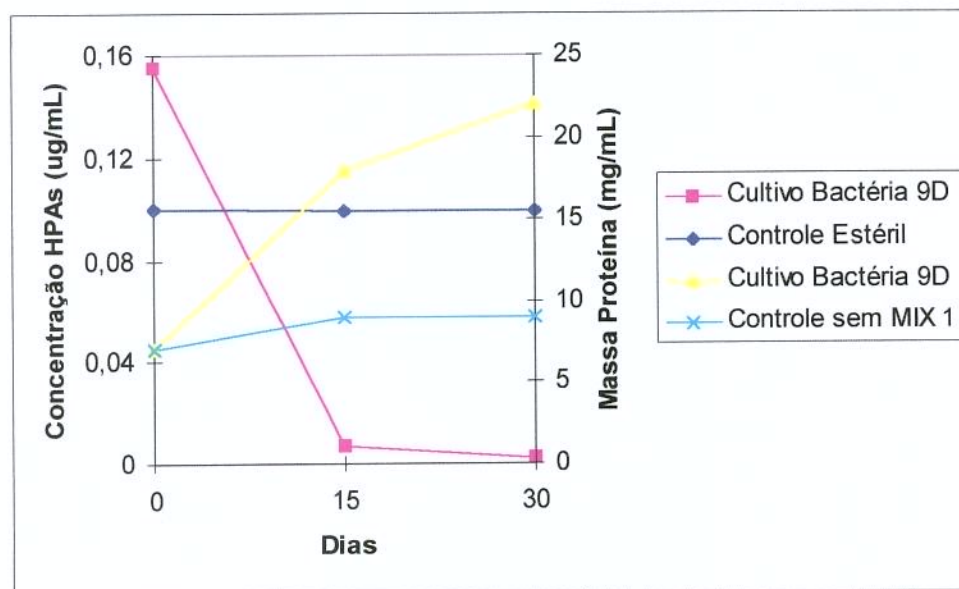


FIGURA 67– Curvas de crescimento da bactéria 9D e consumo de mistura de HPAs.

4.3.4.5. Capacidade de biodegradação de HPAs por cultivos mistos de bactérias

No CULTIVO MISTO 1 estavam presentes (com a mesma proporção de massa celular) as bactérias 2B, 6B, 7F e 9D, que foram inoculadas em duas misturas diferentes de HPAs: a mistura denominada MIX 1, contendo FLU, BbF, BkF e BaP e a mistura denominada MIX 2 contendo BbF e BaP. A partir desses inóculos, foi possível observar que na presença dos HPAs do MIX 1, a biodegradação total dos compostos foi a maior em comparação com todos os experimentos de misturas de HPAs realizados, como pode ser observado na FIGURA 68 e na TABELA 32. Já na presença dos HPAs BbF e BaP, a biodegradação total foi um pouco menor, FIGURA 69, mas também atingiu níveis muito elevados em comparação com os experimentos feitos com culturas isoladas na presença de misturas de HPAs. Foi possível concluir que quando na forma de cultivo misto, as bactérias selecionadas possuem uma maior capacidade de biodegradação dos compostos HPAs, sugerindo a presença de sistemas enzimáticos multifuncionais diferentes e também a possibilidade de utilização de metabólitos como substratos.

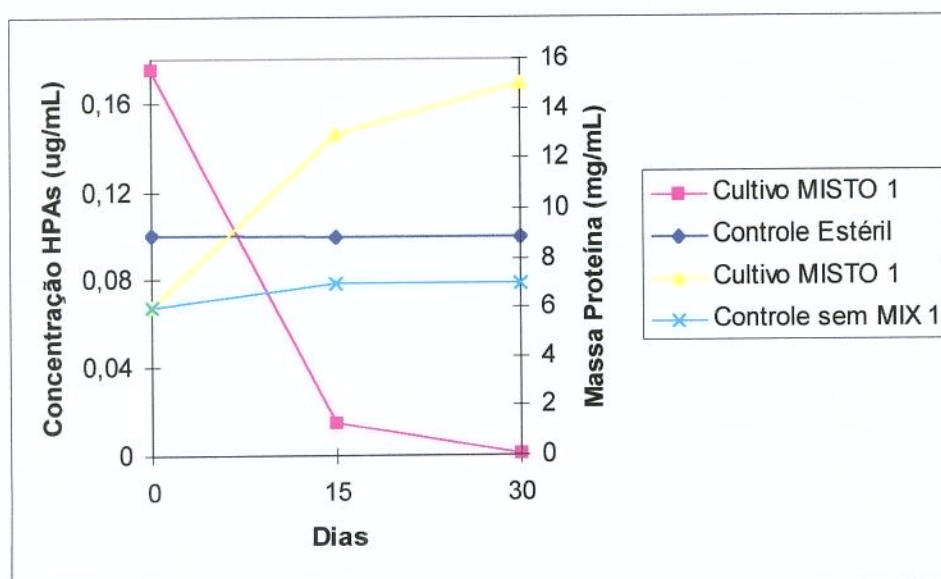


FIGURA 68— Curvas de crescimento da cultura mista de bactérias (2B, 6B, 7F e 9D) e consumo da mistura de HPAS.

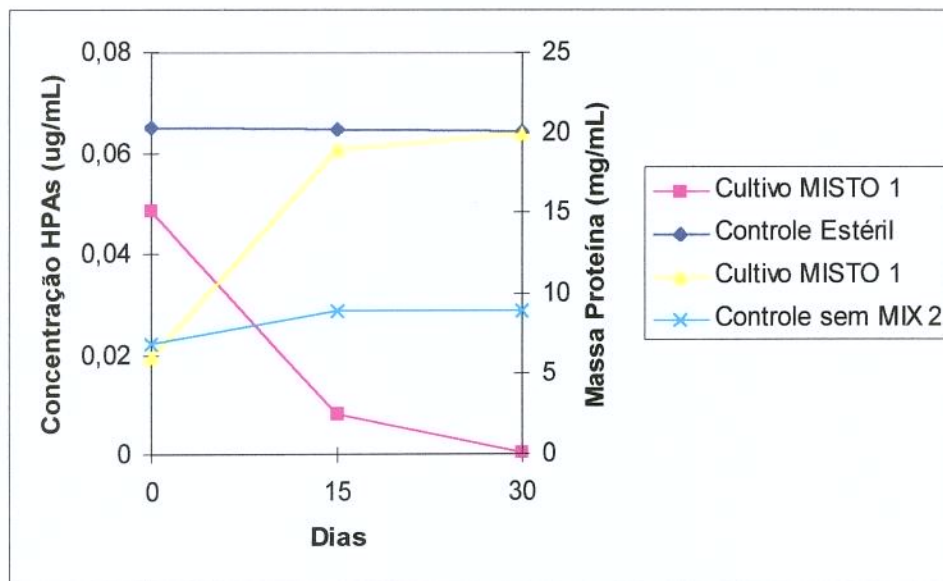


FIGURA 69– Curvas de crescimento da cultura mista de bactérias (2B, 6B, 7F e 9D) e consumo da mistura de HPAs.

Já o CULTIVO MISTO 2 foi preparado contendo a mesma proporção de massa celular das bactérias 6B e 7F. Foi possível verificar que na presença da mistura contendo os quatro HPAs (FIGURA 70) houve uma excelente degradação do FLU e o BbF, sugerindo uma atuação em conjunto dos sistemas enzimáticos dessas duas bactérias. A degradação dos compostos Bkf e BaP foi menor, podendo estar relacionada com o fato da bactéria 6B, que realizou uma baixa degradação desses compostos (EXP 7 e 8), ter afetado de alguma forma a capacidade degradativa da bactéria 7F em relação a esses compostos, por exemplo, a eliminação de metabólitos tóxicos. Analisando a atuação das bactérias 6B e 7F em conjunto na presença de BbF e BaP (FIGURA 71), é possível verificar que a degradação desses compostos foi muito satisfatória e pode-se sugerir que o BkF seja nocivo, de alguma forma, para o desenvolvimento dessas bactérias em conjunto.

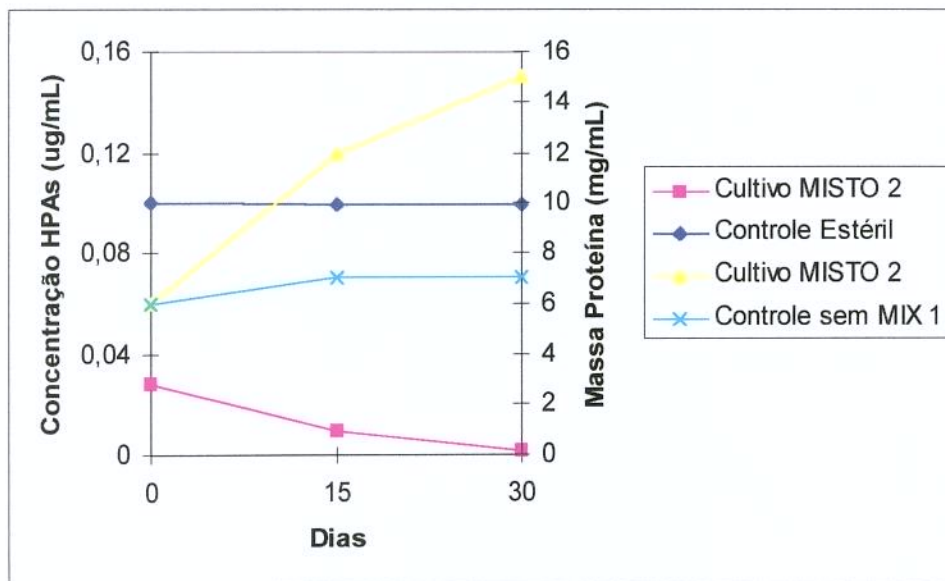


FIGURA 70– Curvas de crescimento da cultura mista de bactérias (2B e 6B) e consumo da mistura de HPAS.

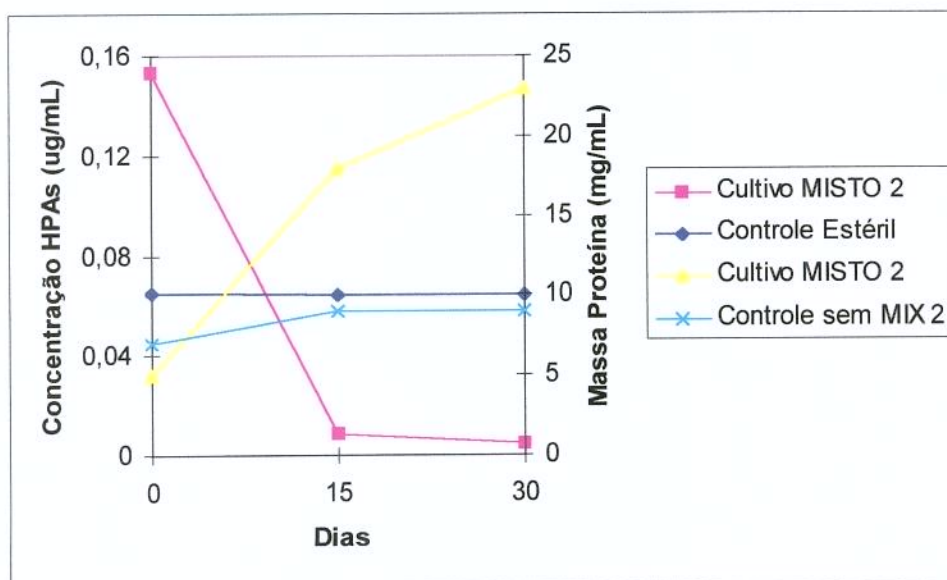


FIGURA 71– Curvas de crescimento da cultura mista de bactérias (2B e 6B) e Consumo da mistura de HPAS.

4.4. Estudo dos metabólitos da biodegradação

4.4.1. Análises por CG-EM dos metabólitos produzidos durante os experimentos de biodegradação

Os compostos obtidos durante e ao final do período de incubação foram analisados por CG-EM. Os cromatogramas obtidos para os extratos dos EXP 17 (cultivo misto) e 24 (cultivo com a bactéria 9D), respectivamente, podem ser visualizados nas FIGURAS 71 até 75, a seguir.

Os espectros de massa obtidos para os picos marcados nos cromatogramas, sugerem a presença dos compostos descritos na TABELA 33, FIGURAS 76 a 88.

TABELA 33 - Compostos neutros e ácidos obtidos pelo processo de biodegradação de misturas de HPAs pelas bactérias *Moraxella* sp, *Pseudomonas* sp e *Acinetobacter* sp, na forma de culturas mistas (EXP 17) e pela bactéria *Acinetobacter* sp como cultura pura (EXP 24).

EXP	COMPOSTOS NEUTROS	COMPOSTOS ÁCIDOS
17	7-oxo-7,8,9,10-tetra-hidrobenzo(a)pireno	ácido benzóico (ácido protocatechuico)
	1-oxo-1,2,3,3a-tetra-hidrobenzo(b)fluoranteno	4,5-di-hidrodiol-benzo(a)pireno
	9-oxo-9,10,11,12-tetra-hidrobenzo(b)fluoranteno	trans-7,8-di-hidro-7,8-di-hidroxibenzo(a)pireno
		trans-11,12-di-hidro-11,12-di-hidroxibenzo(b)fluoranteno
		trans-9,10-di-hidro-9,10-di-idroxibenzo(b)fluoranteno
		trans-1,2-di-hidro-1,2-di-hidroxibenzo(b)fluoranteno
24	7-oxo-7,8,9,10-tetra-hidrobenzo(a)pireno	ácido benzóico (ácido protocatechuico)
	9-oxo-9,10,11,12-tetra-hidrobenzo(b)fluoranteno	4,5-di-hidrodiol-benzo(a)pireno
	12-oxo-9,10,11,12-tetra-hidrobenzo(b)fluoranteno	trans-7,8-di-hidro-7,8-di-hidroxibenzo(a)pireno
	8-oxo-8,9,10,11-tetra-hidrobenzo(k)fluoranteno	3-hidroxibenzo(a)pireno trans-8,9-di-hidro-8,9-di-hidroxibenzo(k)fluoranteno

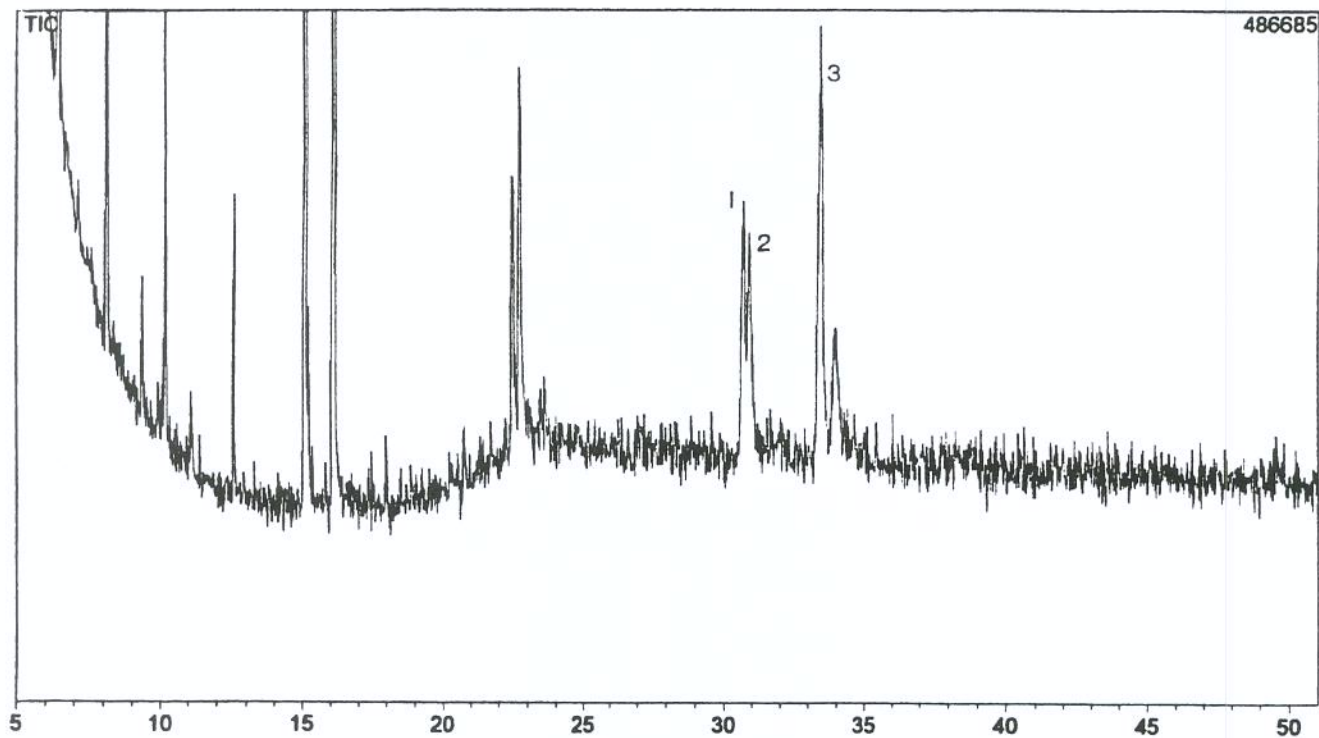


FIGURA 72 – Cromatograma obtido por CG dos metabólitos neutros produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17). Picos 1, 2 e 3 correspondem aos compostos das FIGURAS 78, 76 e 77, respectivamente.

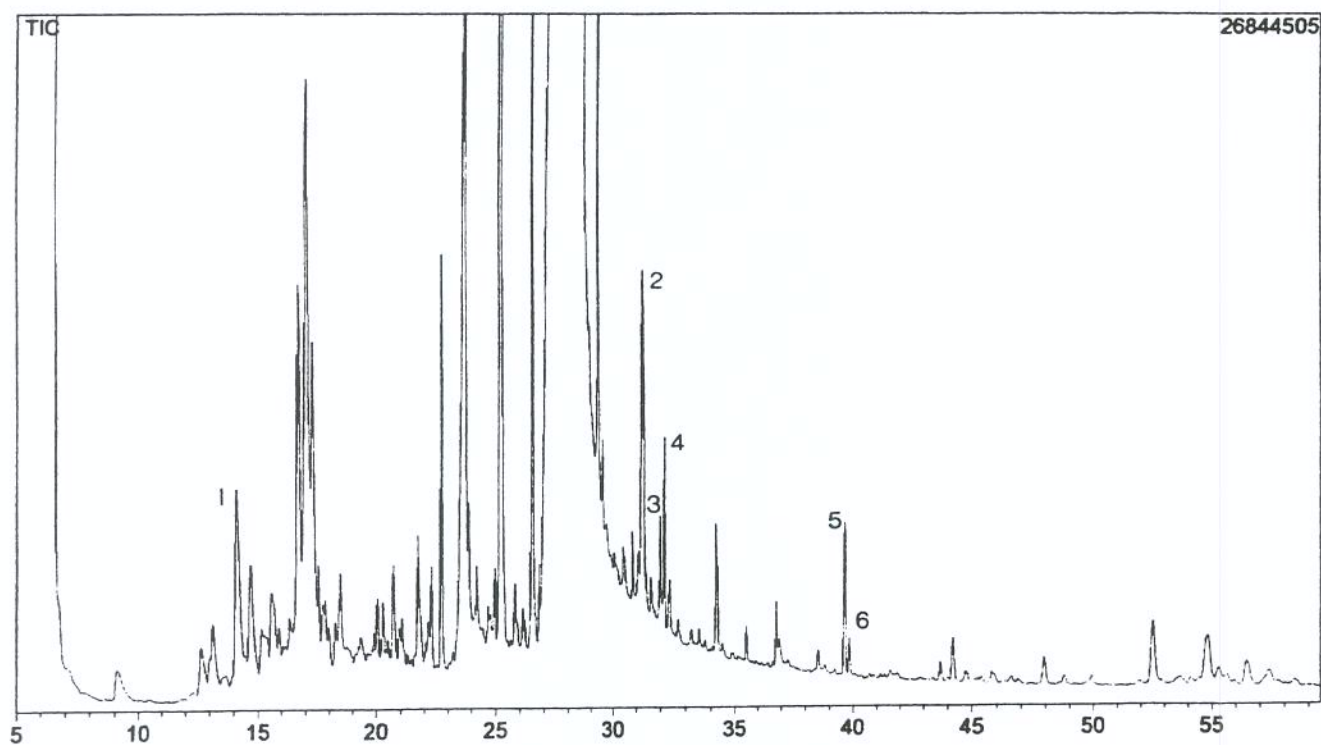


FIGURA 73 – Cromatograma obtido por CG dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17). Picos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 correspondem aos compostos das FIGURAS 81, 86, 87, 88, 85 e 84, respectivamente.

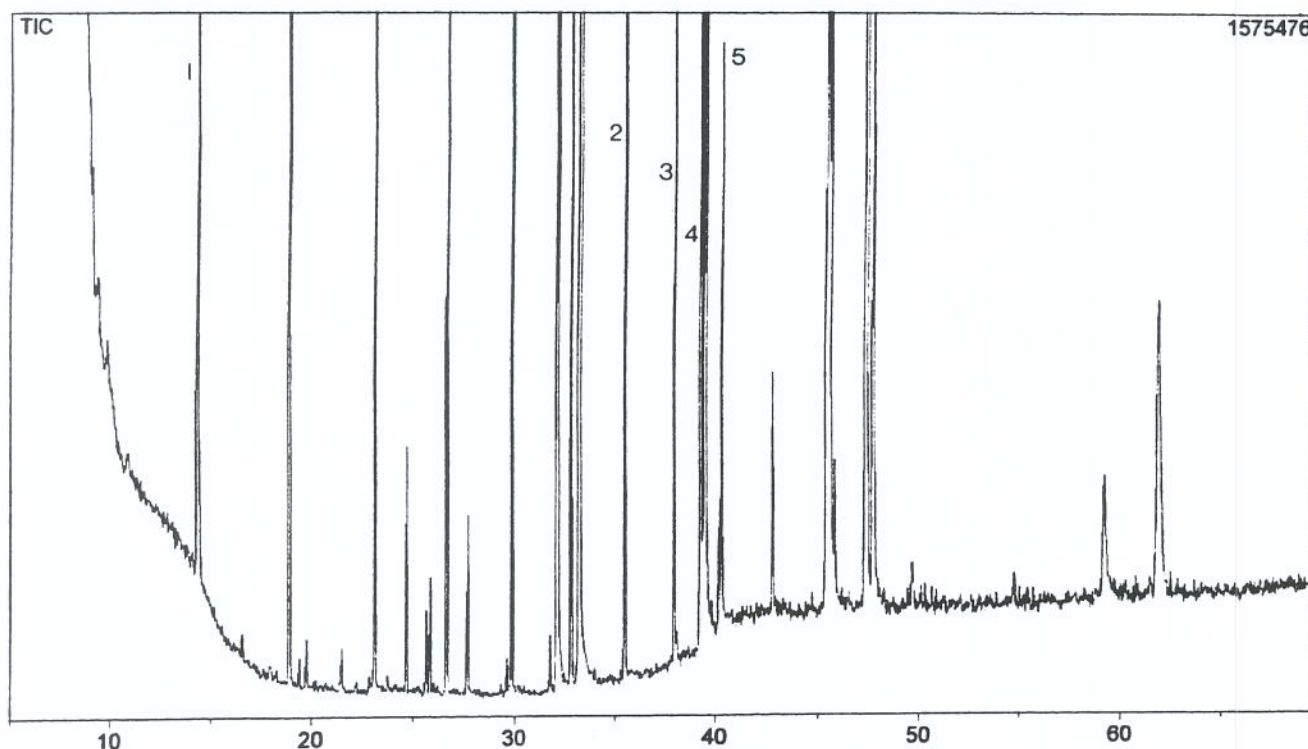


FIGURA 74 – Cromatograma obtido por CG dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Os picos 1, 2, 3, 4 e 5 correspondem aos compostos das FIGURAS 81, 83, 82, 85 e 84, respectivamente.

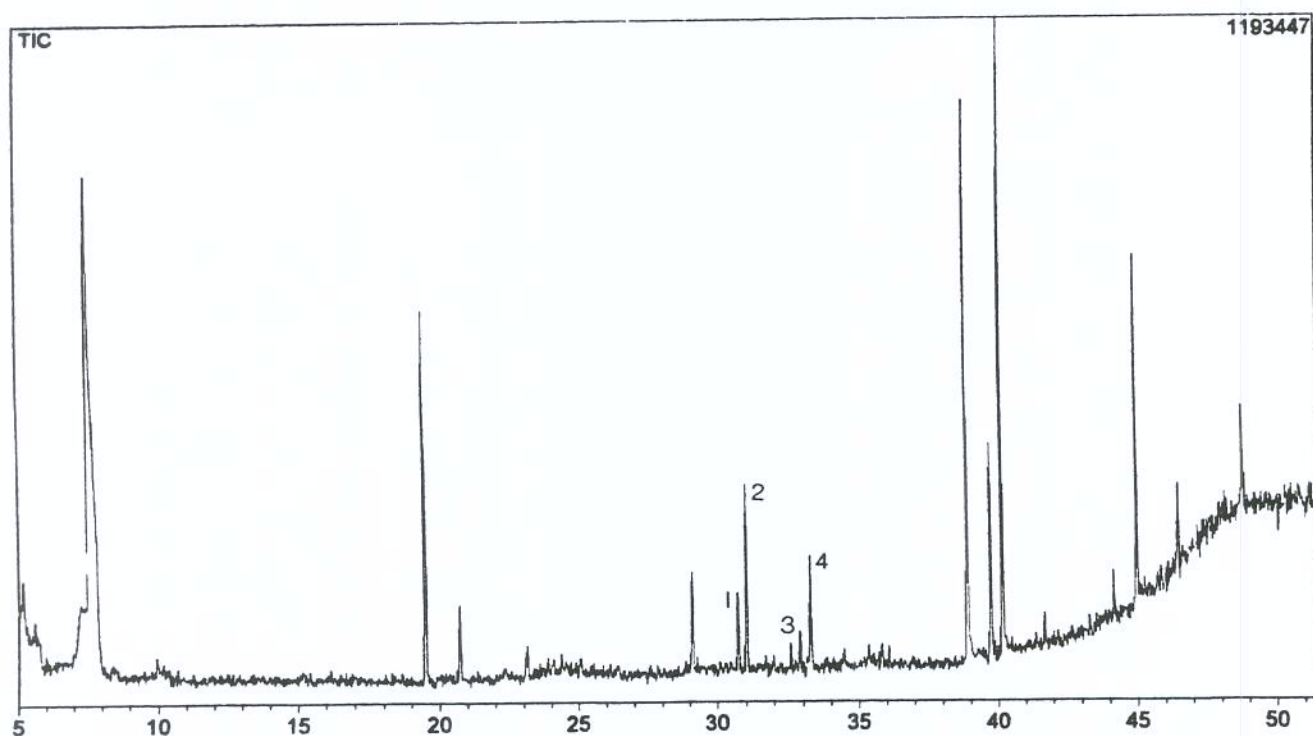


FIGURA 75 – Cromatograma obtido por CG dos metabólitos neutros produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Os picos 1, 2, 3 e 4 correspondem aos compostos das FIGURAS 76, 79, 80 e 77, respectivamente.

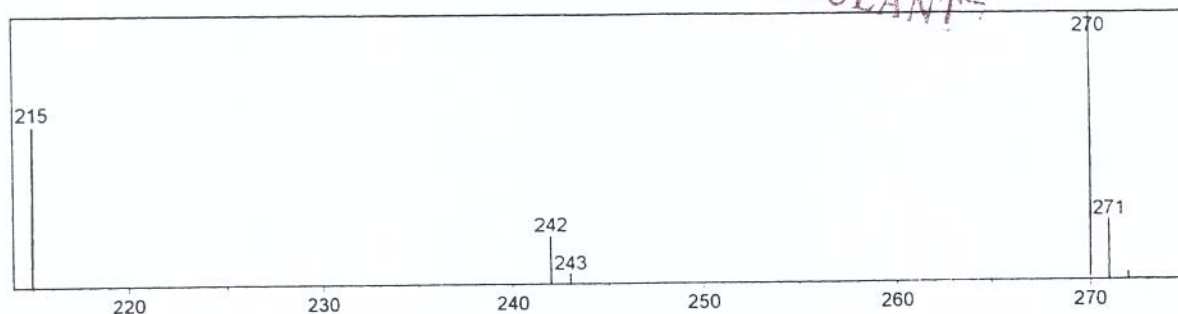


FIGURA 76 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos neutros produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17) e pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: 9-oxo-9,10,11,12-tetra-hidrobenzo(b)fluoranteno.

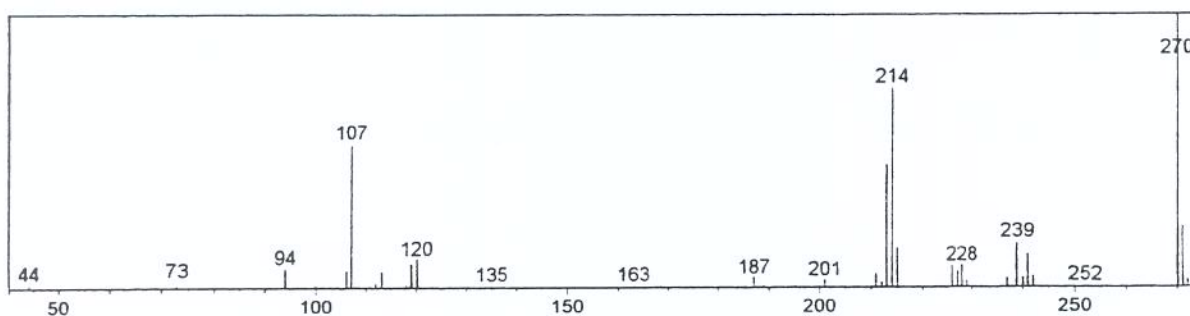


FIGURA 77 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos neutros produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17) e pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: 7-oxo-7,8,9,10-tetra-hidrobenzo(a)pireno.

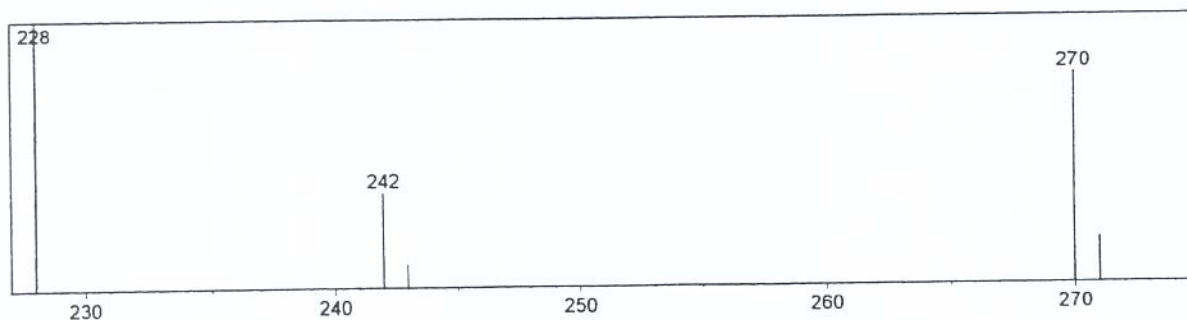


FIGURA 78 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos neutros produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17). Composto provável: 1-oxo-1,2,3,3a-tetra-hidrobenzo(b)fluoranteno.

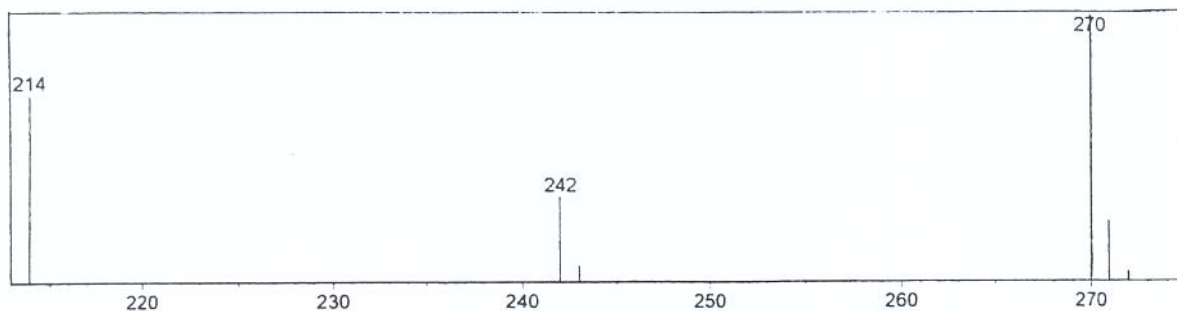


FIGURA 79 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos neutros produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: 12-oxo-9,10,11,12-tetra-hidrobenzo(b)fluoranteno.

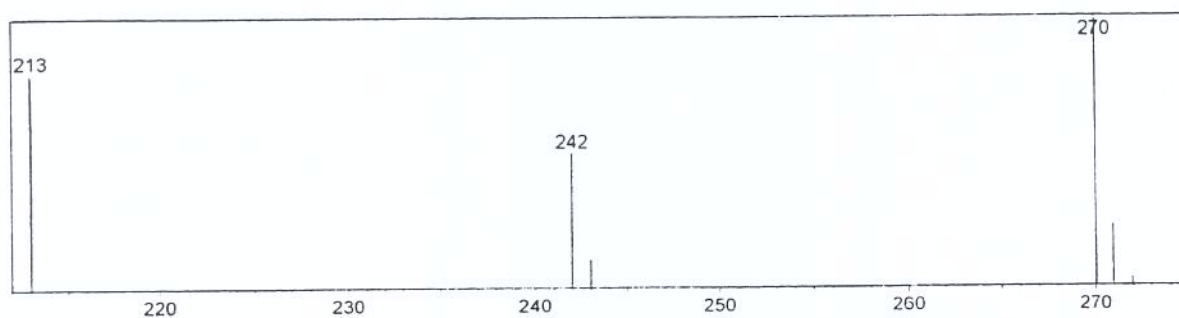


FIGURA 80 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos neutros produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: 8-oxo-8,9,10,11-tetra-hidrobenzo(k)fluoranteno.

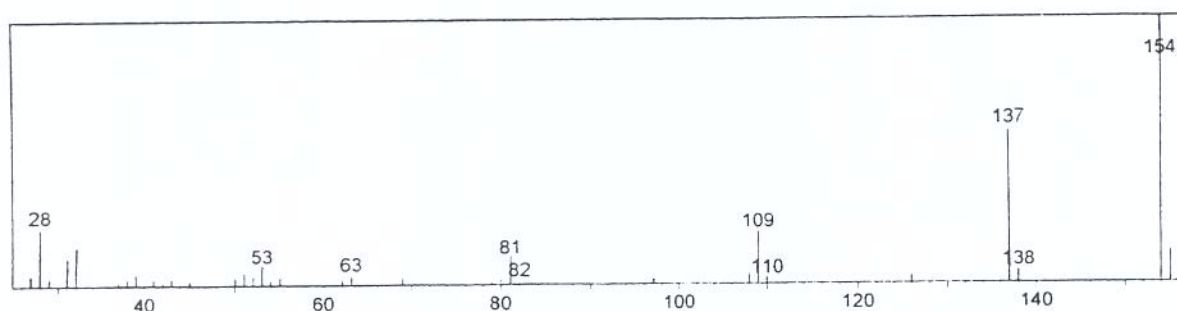


FIGURA 81 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17) e pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: ácido benzóico (ácido protocatechuico).

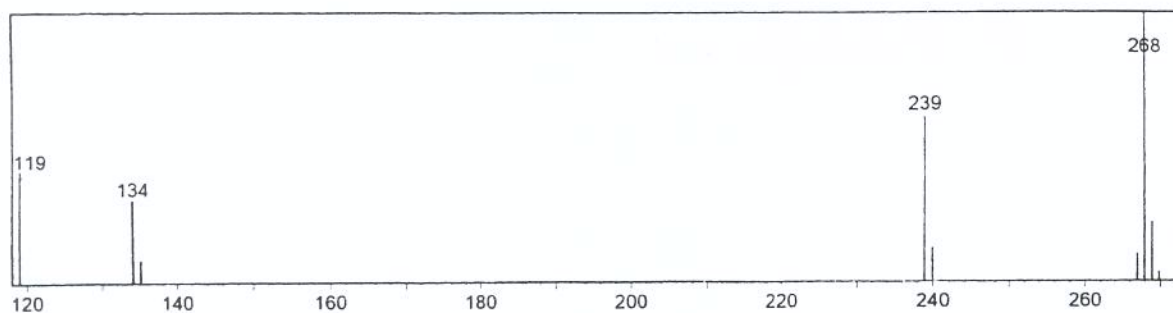


FIGURA 82 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: 3-hidroxibenzo(a)pireno.

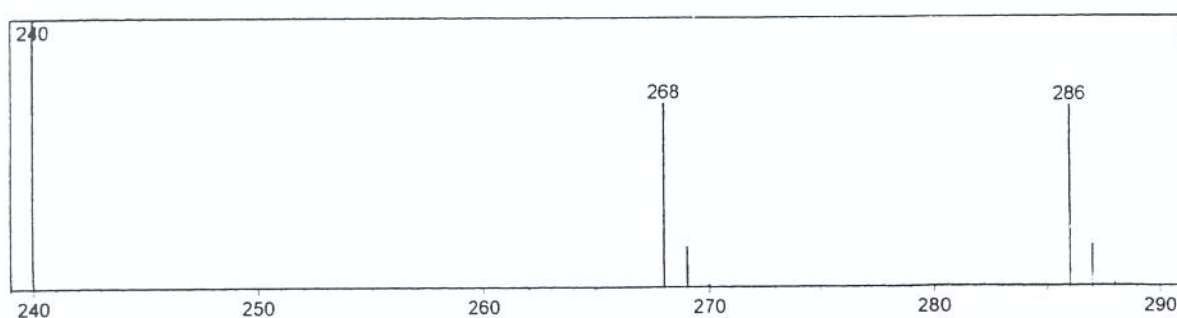


FIGURA 83 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: trans-8,9-di-hidro-8,9-di-hidroxibenzo(k)fluoranteno.

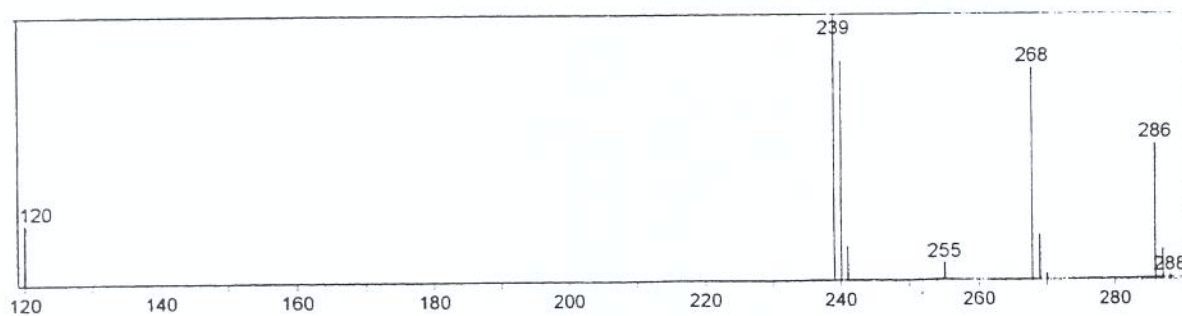


FIGURA 84 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17) e pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: trans-7,8-di-hidro-7,8-di- hidroxibenzo(a)pireno.

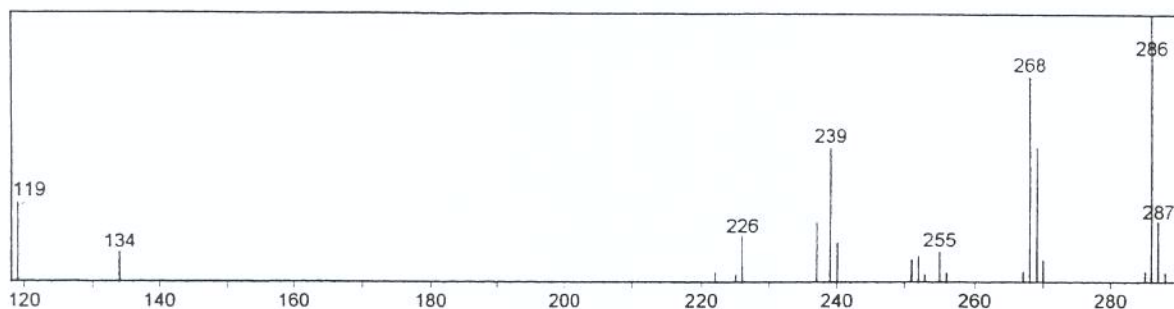


FIGURA 85 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17) e pelo cultivo com a bactéria 9D (EXP 24). Composto provável: 4,5-di-hidrodiol-benzo(a)pireno.

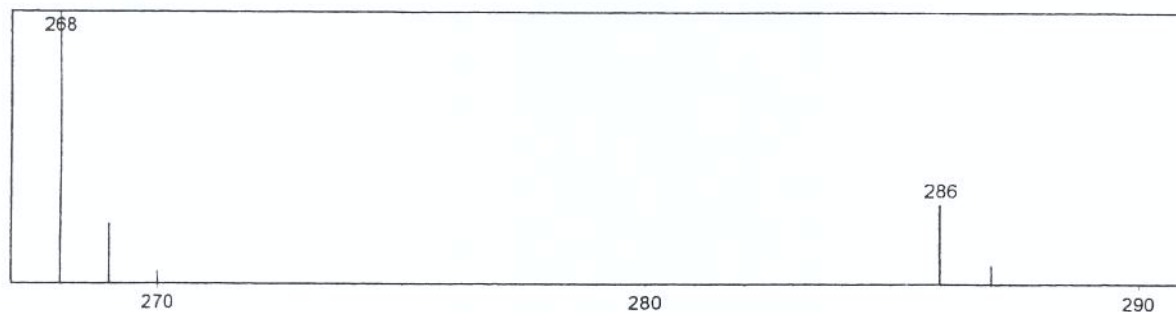


FIGURA 86 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17). Composto provável: trans-1,2-di-hidro-1,2-di-hidroxi-benzo(b)fluoranteno.

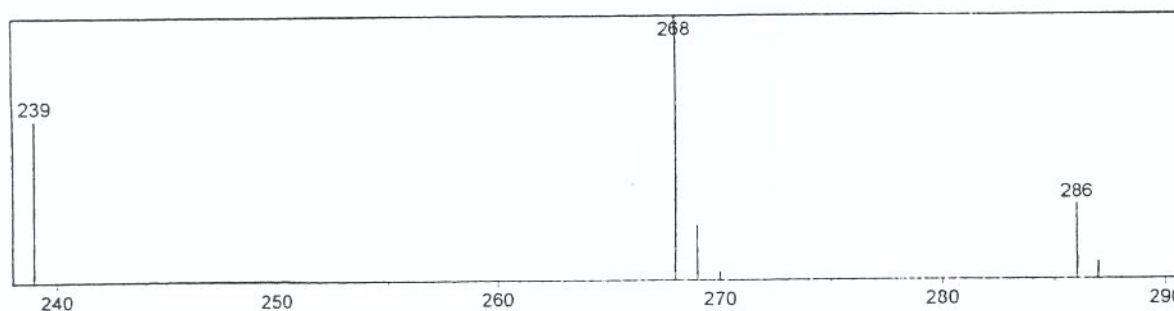


FIGURA 87 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17). Composto provável: trans-11,12-di-hidro-11,12-di-hidroxi-benzo(b)fluoranteno.

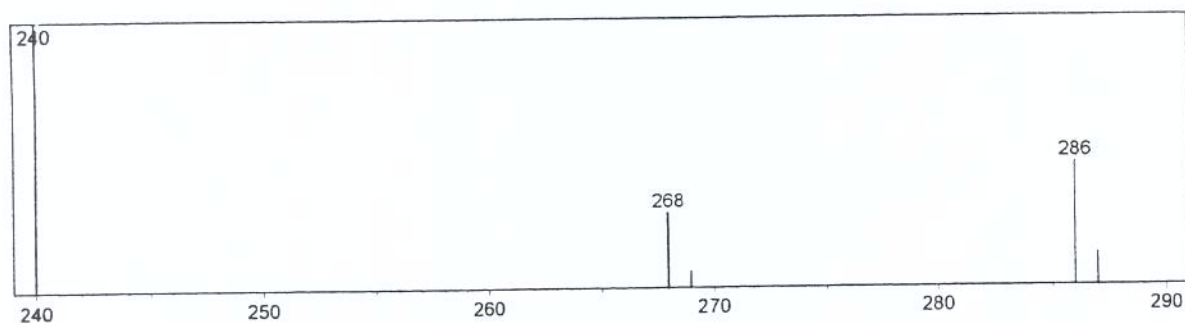


FIGURA 88 – Espectro de massas obtido por CG-EM dos metabólitos ácidos produzidos pela degradação da mistura de HPAs (MIX 1) pelo cultivo misto de bactérias (EXP 17). Composto provável: trans-9,10-di-hidro-9,10-di-hidroxibenzo(b)fluoranteno.

Os metabólitos encontrados fazem parte das reações iniciais de degradação dos HPAs. No caso do EXP 17, a presença dos derivados da degradação do fluoranteno foi predominante, seguida de alguns derivados de degradação do benzo(a)pireno. Já os metabólitos do EXP 24, na presença da mistura dos HPAs fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno e benzo(a)pireno, mostraram ser produtos da degradação do benzo(k)fluoranteno.

4.5. Características da região do rio Jaguari

O rio Jaguari faz parte da Bacia do Rio Piracicaba, que cobre uma área de drenagem de 11.151 km². Além desses dois rios principais, fazem parte da bacia, os rios Corumbataí e Atibaia.

Esta bacia se caracteriza por possuir 57% de sua área cobertos por pastagens (40% cultivadas) para rebanho de corte e leite; agricultura, principalmente cana-de-açúcar e café, seguidos da fruticultura (citrus) e milho, sendo o restante ocupado por áreas urbanas densamente ocupadas, abrigando um importante parque fabril do Estado.

As águas da Bacia do Rio Piracicaba fornecem o abastecimento público de 42 municípios, sendo que 33 deles utilizam-se de águas superficiais, 4 de mananciais e 3 de sistema misto. Esta bacia também é receptora do efluente doméstico gerado por 40 municípios, sendo que apenas 13 municípios possuem algum sistema de tratamento de esgotos. As águas da Bacia do Rio Piracicaba também são utilizadas para abastecimento das indústrias, para a recepção de cerca de 194 efluentes industriais e finalmente para a irrigação de plantações.

Dentre as principais atividades industriais pode-se citar papel e celulose, alimentícia, ramo sucro-alcooleiro, têxtil, curtumes, metalúrgicas, químicas e refinaria de petróleo (Paulínia).

O rio Jaguari, monitorado em dois pontos de seu percurso, na maioria das amostras coletadas pela CETESB no ano de 1994, apresentou concentrações de Colifórmes Fecais e Totais, Fósforo Total, Manganês e Fenóis acima dos padrões estabelecidos para a Classe 2 (CONAMA 20/86). Um dos pontos de coleta apresentou algumas amostras com concentrações de Nitrogênio Amomiacal e DBO (5,20) acima dos padrões. O Índice de Toxicidade, obtido para as amostras coletadas nos pontos de amostragem, em quase todos os resultados apresentou valor zero, significando que um ou mais elementos tóxicos

A FIGURA 89 mostra que a variação de temperatura da água da lagoa de tratamento da REPLAN ficou entre os limites de 19 a 27°C, sendo essa variação de temperatura esperada. O pH das amostras teve oscilações em torno do pH 7,0, sendo que essas variações por menor que sejam, possuem a capacidade de afetar diretamente o crescimento bacteriano.

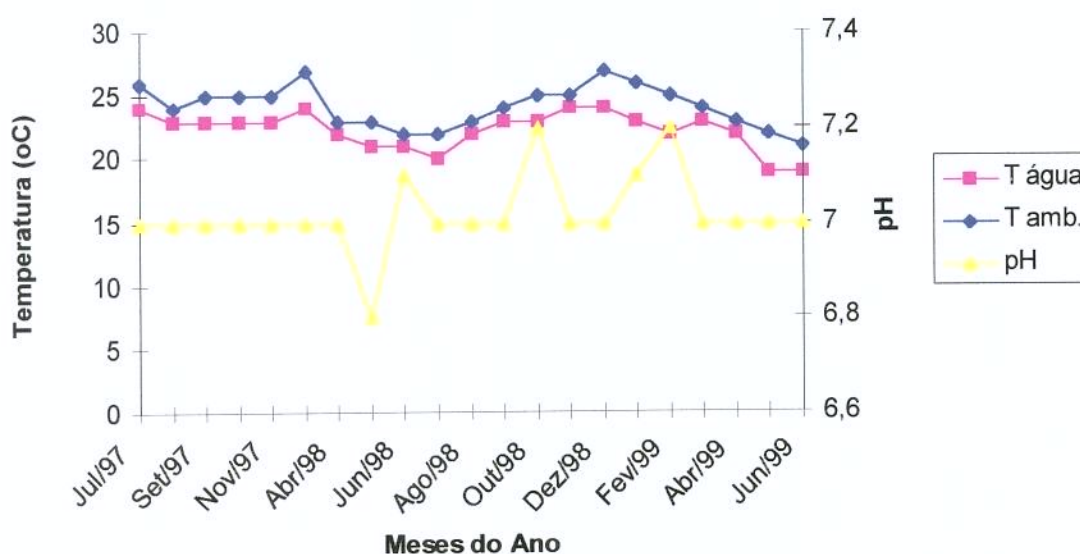


FIGURA 89 – Alterações de temperatura e pH do ponto de coleta de amostras na lagoa de tratamento da REPLAN em Paulínia, durante os meses de julho/97 até junho/99.

A degradação de HPAs pode ocorrer em uma ampla gama de temperaturas ambientais. BAUER & CAPONE (1985) encontraram um aumento significativo (mais de quatro vezes) nas taxas de degradação do naftaleno, fenantreno e antraceno quando a temperatura de incubação de sedimentos presentes em lodo aumentou de 10 para 30°C. HAINES & ATLAS (1982) atribuíram as lentas taxas de desaparecimento da fração de HPAs do petróleo em sedimentos do mar Ártico às baixas temperaturas (-1,8 a 4°C). Estudos sazonais também reportam um papel significativo para a temperatura. LEE & RYAN (1976) verificaram taxas de 10 a 15 vezes maiores para a mineralização do naftaleno em um rio, quando a temperatura aumentou.

4.5.2. Presença de HPAs nas amostras de água da lagoa

A presença de HPAs nas amostras obtidas no ponto de coleta foi relacionada com a estação do ano, e os dados obtidos podem ser visualizados nas FIGURAS 90 até 92, a seguir.

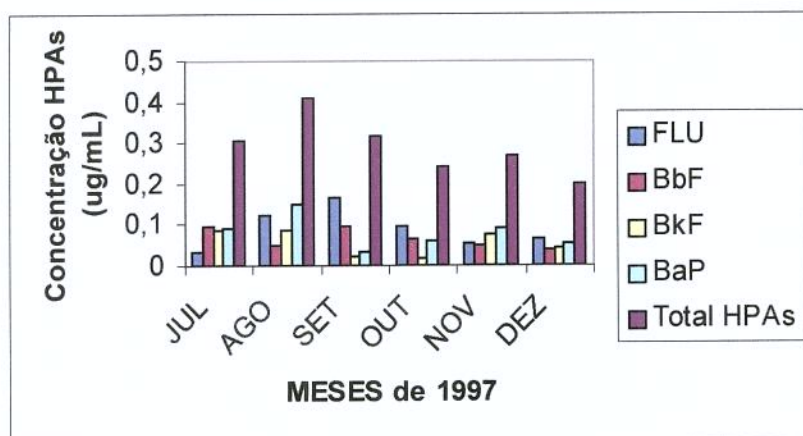


FIGURA 90 – Concentração de HPAs presentes nas amostras de água da lagoa de tratamento da REPLAN em Paulínia, durante os meses de julho/97 a dezembro/97. FLU - fluoranteno; BbF - benzo(b)fluoranteno; BkF - benzo(k)fluoranteno; BAP – benzo(a)pireno.

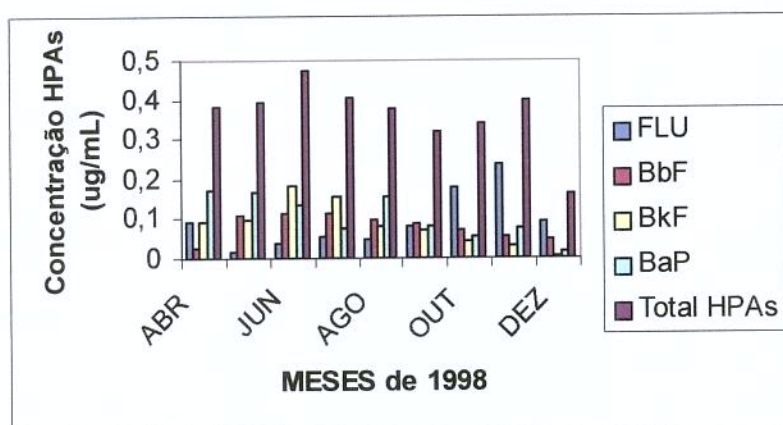


FIGURA 91 – Concentração de HPAs presentes nas amostras de água da lagoa de tratamento da REPLAN em Paulínia, durante os meses de abril/98 a dezembro/98. FLU - fluoranteno; BbF - benzo(b)fluoranteno; BkF - benzo(k)fluoranteno; BAP – benzo(a)pireno.

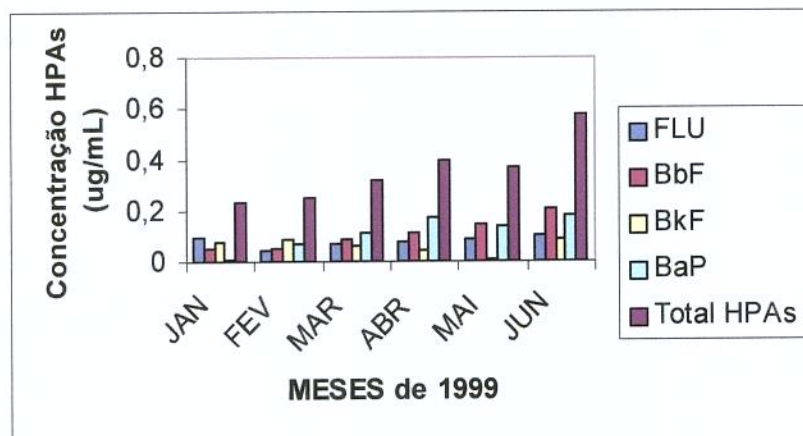


FIGURA 92 – Concentração de HPAs presentes nas amostras de água da lagoa de tratamento da REPLAN em Paulínia, durante os meses de janeiro/99 a junho/99. FLU - fluoranteno; BBF - benzo(b)fluoranteno; BKF - benzo(k)fluoranteno; BAP – benzo(a)pireno.

Os dados obtidos mostram que nos meses de abril até setembro ocorreu um aumento na concentração de HPAs totais nas amostras de água da lagoa de tratamento da REPLAN, o que provavelmente ocorreu devido ao período de outono/inverno, onde a estiagem na região é maior, devido à queimada de cana-de-açúcar, processo através do qual ocorre combustão incompleta de compostos orgânicos, havendo liberação de HPAs que irão se depositar no meio ambiente e devido à variações nos processos da refinaria de petróleo.

4.5.3. Avaliação da microflora bacteriana na água da lagoa

A variação encontrada na contagem de bactérias heterotróficas totais (BHT) e de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos (BDH), durante o período deste trabalho, mostrou que quando a concentração de HPAs presentes nas amostras de água da lagoa aumentou, ocorreu um aumento de BDH, sendo que o número de BHT permaneceu praticamente constante, como pode ser visto nas FIGURAS 93 até 95.

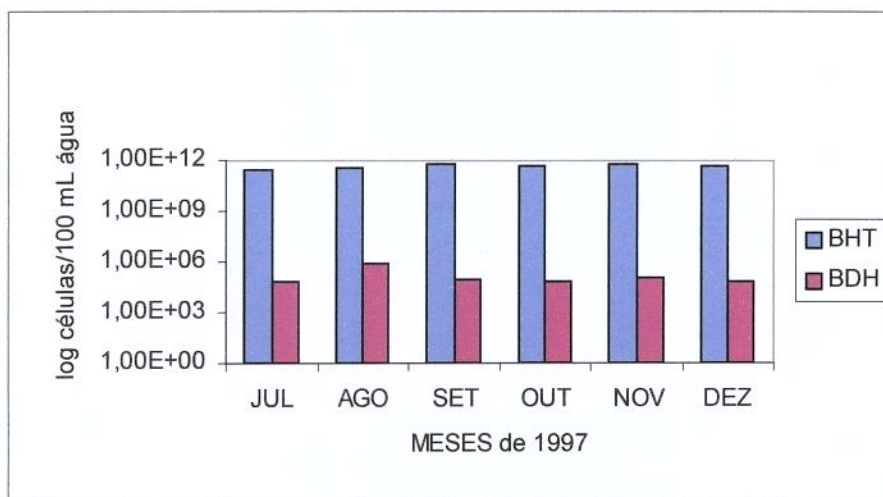


FIGURA 93 – População de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de HPAs presentes nas amostras de água da lagoa de tratamento da REPLAN em Paulínia, durante os meses de julho/97 a dez/97. BHT – bactérias heterotróficas totais; BDH – bactérias degradadoras de hidrocarbonetos.

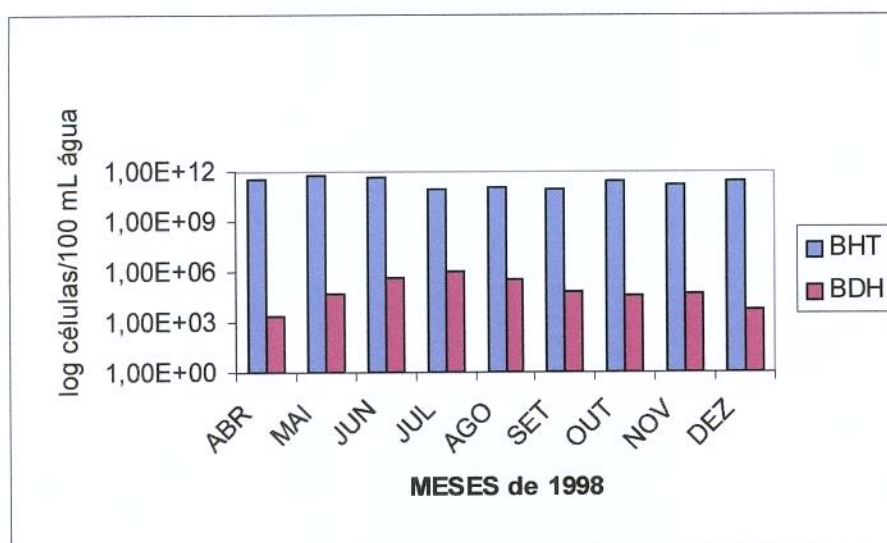


FIGURA 94 – População de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de HPAs presentes nas amostras de água da lagoa de tratamento da REPLAN em Paulínia, durante os meses de abril/98 a dezembro/98. BHT – bactérias heterotróficas totais; BDH – bactérias degradadoras de hidrocarbonetos.

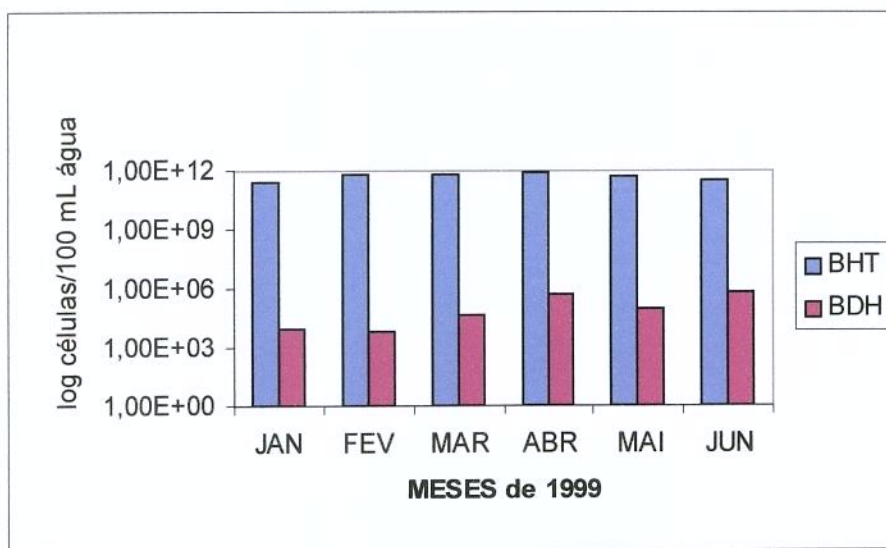


FIGURA 95 – População de bactérias heterotróficas totais e degradadoras de HPAs presentes nas amostras de água da lagoa de tratamento da REPLAN em Paulínia, durante os meses de janeiro/99 a junho/99. BHT – bactérias heterotróficas totais; BDH – bactérias degradadoras de hidrocarbonetos.

O aumento na população de BDH sugere que acontece um aumento natural da biorremediação na lagoa quando a concentração de HPAs é maior. Como a população de BHT permanece praticamente constante, pode-se supor que ocorre uma diminuição da população de bactérias heterotróficas não resistentes às concentrações mais elevadas de HPAs.

4.6. Biodegradação em microambiente

Como é possível observar na FIGURA 96, ocorreu um decréscimo na concentração de HPAs em todas as amostras dos cinco microambientes que foram estudados, o que foi devido à efeitos de volatilização, fotodegradação e à biodegradação.

O MA1, onde foram preservadas as características originais da amostra, mostrou um pequeno decréscimo da concentração de HPAs total, sendo possível verificar que nos outros microambientes, a queda na concentração dos HPAs totais foi maior.

Os testes MA4 e MA3 apresentaram as maiores reduções na concentração dos HPAS e também as maiores populações de bactérias degradadoras de HPAs (BDH), como é mostrado na FIGURA 98. A população de bactérias heterotróficas totais (BHT) permaneceu dentro de uma faixa pequena de alterações como é mostrado na FIGURA 97.

Foi possível notar diferença na população de BHT e BDH, quando se comparou os microambientes onde não foram adicionados nutrientes (MA1 e MA2) em relação ao microambientes onde foi feita a adição de nutrientes (MA3, MA4 e MA5).

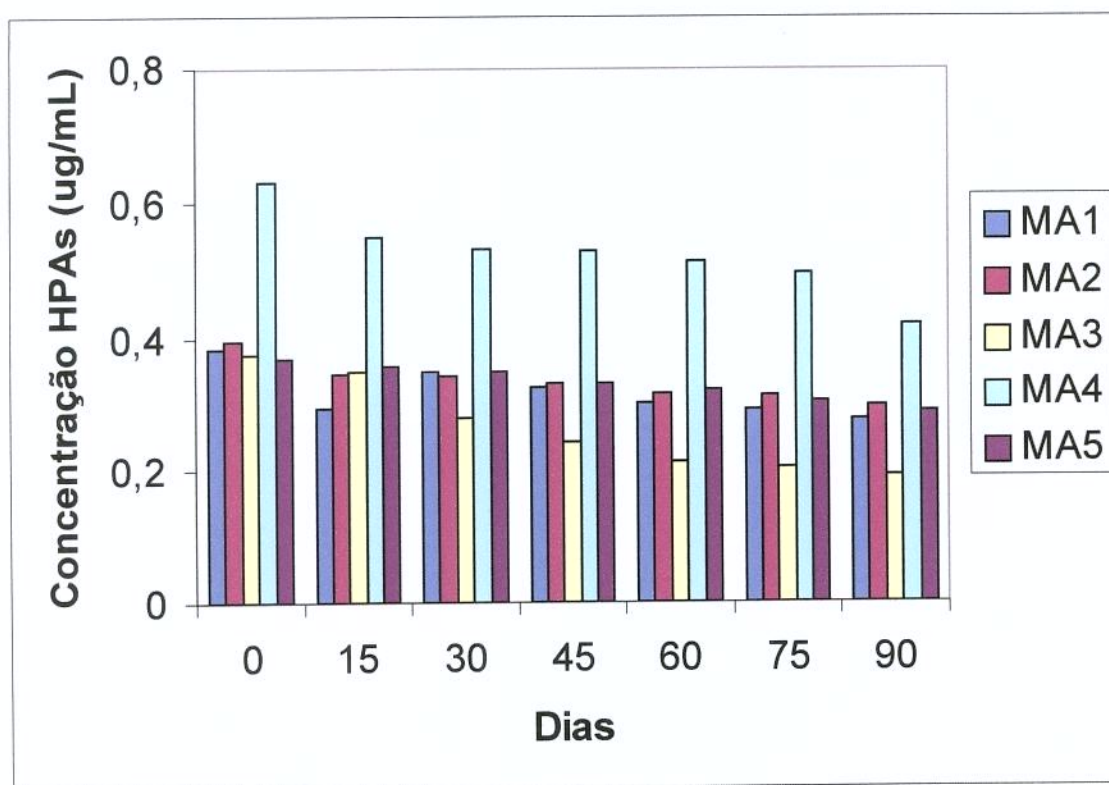


FIGURA 96 – Alterações na concentração dos HPAs presentes nas amostras de água em contato com sedimento, coletadas na lagoa de tratamento da REPLAN. As amostras foram submetidas ao tratamento de biorremediação em microambiente no laboratório. MA – microambiente.

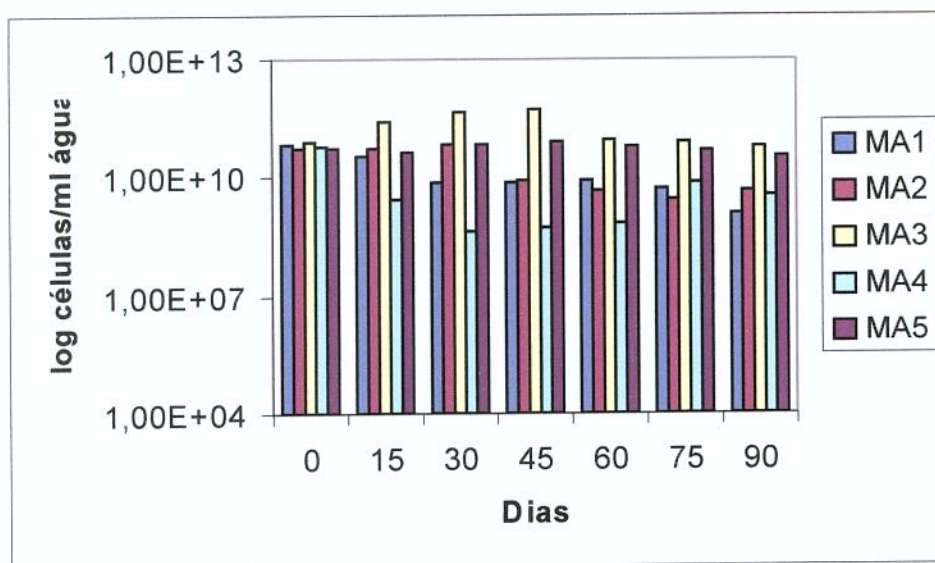


FIGURA 97 – Alterações na população de bactérias heterotróficas totais presentes nas amostras de água em contato com sedimento, coletadas na lagoa de tratamento da REPLAN. As amostras foram submetidas ao tratamento de biorremediação em microambiente no laboratório. MA – microambiente.

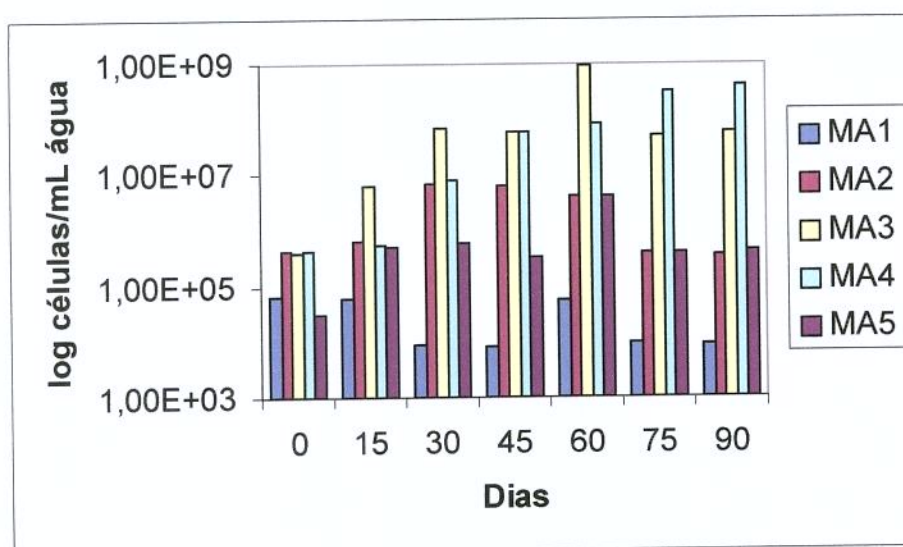


FIGURA 98 – Alterações na população de bactérias degradadoras de HPAs presentes nas amostras de água em contato com sedimento, coletadas na lagoa de tratamento da REPLAN. As amostras foram submetidas ao tratamento de biorremediação em microambiente no laboratório. MA – microambiente.

Existe uma certa discussão sobre os efeitos dos nutrientes, em particular nitrogênio e fósforo, nas taxas de degradação de HPAs de petróleo no ambiente. Como foi mostrado por ATLAS (1981) em uma revisão sobre degradação microbiana de hidrocarbonetos na natureza, hidrocarbonetos em elevadas concentrações, tiveram uma degradação limitada devido à limitação de nutrientes, enquanto a degradação dos hidrocarbonetos menos concentrados foi provavelmente não limitada pela ausência dos nutrientes o que parece ser o caso para os HPAs.

Parece que o efeito da limitação de nutrientes deve variar de um local para o outro, e de um HPA para outro, dentro de um mesmo ambiente. Por exemplo, ROUBAL & ATLAS (1978), encontraram que a adição de N e P estimulou a degradação do naftaleno, mas não do benzo(a)antraceno. FEDORAK & WESTLAKE (1981) também reportaram um estímulo na degradação do naftaleno na água do mar enriquecida com nutrientes. Por outro lado, para sedimentos estuarinos, a adição de N, P ou glucose teve um efeito estimulante mínimo na degradação do naftaleno, fenantreno, antraceno e benzo(a)pireno (BAUER & CAPONI, 1985 e SHIARIS, 1989).

A biodegradação dos HPAs é altamente variável e dependente não somente da estrutura dos HPAs, mas também dos parâmetros físico-químicos dos sítios de descontaminação, assim como do número de microrganismos presentes. A biodegradação também pode decrescer com o tempo, se os nutrientes tornam-se severamente limitados.

A degradação dos HPAs, assim como a sua distribuição, está sob o controle de complexos fatores biológicos e ambientais (ATLAS, 1981). O papel de algumas variáveis, como oxigênio dissolvido e temperatura, por exemplo, é melhor entendido do que outras, como a atividade infaunal ou a presença de protozoários. Ainda existe um longo caminho a ser percorrido até a incorporação desses fatores na previsão de um modelo de degradação dos HPAs.

Os testes de degradação em microambiente têm sido realizados para tentar estabelecer relação entre os estudos de biodegradação de HPAs em laboratório e a posterior aplicação da biorremediação de sítios ambientais reais, contaminados com HPAs.

Os estudos apresentados acima foram experimentos realizados no ambiente controlado do laboratório. Existem muitos estudos realizados em ambientes reais ou em testes piloto, e a interpretação dos efeitos potenciais de biodisponibilidade e biodegradação são mais complexos devido ao número de contaminantes presentes, diferenças nos sistemas experimentais, forma de apresentação dos resultados obtidos e fatores ambientais como temperatura, por exemplo.

Na pesquisa realizada por LEWIS (1993), foi testado um sistema piloto com reatores de lodo, utilizando solo contaminado com creosoto que foi tratado durante 12 semanas e tendo sido adicionados nutrientes e linhagens de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas stutzeri* e *Alcaligenes* sp. No final do estudo, a concentração total de HPAs diminuiu em torno de 93%, sendo que a degradação de compostos aromáticos com 2 e 3 anéis foi consideravelmente mais rápida que a degradação dos HPAs com 4 a 6 anéis. Estes resultados mostram o potencial da biorremediação sob condições ótimas de transferência de massa. No entanto, poucos experimentos em laboratório reproduziram este sucesso, devido talvez à variações dos inóculos, agitações insuficientes, conteúdo de água e outros fatores desconhecidos.

5. CONCLUSÕES

1. A partir das amostras de águas dos 12 rios estudados foi possível isolar 136 linhagens de bactérias capazes de crescer em meio seletivo contendo HPAs como única fonte de carbono.
2. As 25 linhagens estudadas, todas Gram negativas, foram classificadas como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Xanthomonas* e *Acinetobacter*, sendo a maioria das linhagens classificadas como *Pseudomonas* sp.
3. A partir das amostras de água coletadas no rio Jaguari e na lagoa de tratamento da REPLAN, foi possível o isolamento do maior número de linhagens de bactérias degradadoras de HPAs, sendo que estas linhagens apresentaram a maior diversidade de gêneros: *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Neisseria* e *Haemophilus*.
4. As amostras de água dos rios Jaguari e Atibaia apresentaram as maiores concentrações de HPAs totais, 0,1712 e 0,1538 µg/L, respectivamente.
5. O monitoramento dos rios forneceu dados de temperatura e pH que mostram que é possível acontecer a biorremediação natural nesses locais.
6. As 25 linhagens de bactérias estudadas apresentaram diferentes tolerâncias ao fluoranteno, benzo(a)pireno, pireno, benzo(k)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(e)pireno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(a)antraceno quando colocadas em contato direto com esses compostos, em concentrações elevadas.
7. Nos experimentos de biodegradação em meio líquido foi necessário o uso de DMSO como agente surfactante para tornar os HPAs fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(k)fluoranteno e benzo(b)fluoranteno, mais disponíveis para a biodegradação.

BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

8. As curvas de biomassa celular contra concentração de HPAs no meio de cultivo mostraram que as 4 bactérias estudadas foram capazes de utilizar fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(k)fluoranteno e benzo(b)fluoranteno como fonte de carbono.
9. Os estudos com cultivos mistos e cultivos puros de bactérias na presença de misturas de HPAs, mostraram que ocorrem diferentes efeitos na biodegradação desses compostos.
10. A análise dos metabólitos produzidos durante a degradação dos HPAs mostrou ser extremamente difícil, devido à pequena quantidade dos metabólitos no meio de cultivo e à perda desses compostos durante os processos de extração e derivação. A maioria dos metabólitos identificados por CG-EM fazem parte da degradação inicial dos HPAs pelas bactérias, sendo somente o ácido benzóico um metabólito da etapa final de degradação dos HPAs por bactérias.
11. O monitoramento detalhado da lagoa de tratamento da REPLAN, mostrou que ocorreu um aumento na concentração de HPAs totais e na população de bactérias degradadoras de HPAs entre os meses de abril até setembro, sugerindo a ocorrência de biorremediação natural no local.
12. Os testes em escala piloto no laboratório mostraram que ocorre uma queda natural na concentração de HPAs totais nos ambientes contaminados, devido a fatores de volatilização, fotodecomposição e biodegradação. A adição de nutrientes bem como a adição de cultivos mistos de bactérias degradadoras de HPAs, favoreceram a biodegradação dos HPAs.
13. A biorremediação é um processo que ocorre naturalmente nos locais contaminados. Para a implementação da biorremediação, como um processo artificial, é necessário o levantamento de vários tipos de dados sobre o local contaminado e um controle rigoroso do processo, sendo necessária a atuação em conjunto de profissionais de várias áreas específicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AL-BASHIR, B.; CSEH, T.; LEDUC, R.; SAMSON, R. Effect of soil/contaminant interactions on the biodegradation of naphthalene in flooded soil under denitrifying conditions. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 34:414-419, 1990.
2. ALEXANDER, M. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press Inc., Londres, Reino Unido. 303 p., 1994.
3. ANDERSON, B. C. Bioremediation. In: Innovative Site Remediation Technology. Academy of Environmental Engineers. Alexandria, VA, 1995.
4. ARCANGELI, J.-P.; ARVIN, E., Biodegradation rates of aromatic contaminants in biofilm reactors. **Wat. Sci. Technol.** 31(1), 117-128, 1995.
5. ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiol. Rev.** 45:180-209, 1981.
6. BADGER, G. M.; BUTTERY, R. G. ; KIMBER, R. W. L.; LEWIS, G. E.; MORITZ, A. G.; NAPIER, I. M. The formation of aromatic hydrocarbons at high temperatures. Part I. Introduction. **J. Chem. Soc.** 2449-2452, 1958.
7. BADGER, G. M.; KIMBER, R. W. L.; NOVOTNY, J. The formation of aromatic hydrocarbons at high temperatures. **Aust. J. Chem.** 17: 778-786, 1964
8. BANERJEE, S. Calculation of water solubility of organic compounds with UNIFAC-derived parameters. **Environ. Sci. Technol.** 19:369-370, 1985.
9. BAUER, J. E.; CAPONE, D. G. Degradation and mineralization of the polycyclic aromatic hydrocarbons anthracene and naphthalene in intertidal marine sediments. **Appl. Environ. Microbiol.** 50:81-90, 1985.

10. BAUER, J. E.; CAPONE, D.G. Effects of co-occurring aromatics hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments slurries. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 1649-1655, 1988.
11. BEAN, H.W.; PERRY, J.J., Microbial degradation and assimilation of n-alkyl-substituted cycloparaffins. **J. Bacteriol.** 118: 394-399, 1974.
12. BERGEY'S Manual of Sistematic Bacteriology. Vol. 1, (Ed.) Noel, R. Krieg. Willians & Wilkins, Baltimore/London, p. 964, 1984.
13. BIOGROUP. Bioremediation: a single-celled solution for reducing environmental contamination. Disponível na Internet: <http://biogroup.gzea.com>. 23 dez. 1998.
14. BJORSETH, A.; RAMDAHL, T., (Eds.) Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, vol. 2: Emission sources and recent progress in analytical chemistry. Marcel Dekker, Nova Iorque, 1985.
15. BOEHM, P. D.; QUINN, J. G. Solubilization of hydrocarbons by dissolved organic matter in seawater. **Geochem. Cosmochim. Acta** 37:2459-2466, 1973.
16. BOLDRIN, B.; TIHEM A.; FRITZSCHE, C. Degradation of phenantrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. **Appl. Environ. Microbiol.** 59:1927-1930, 1993.
17. BOUCHEZ, M.; BLANCHET, D.; VANDECASTEELE; J-P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43: 156-164, 1995.

18. BOUWER, E.J.; CHEN, C.T.; LI, Y.-H. Transformation of a petroleum mixture of biofilms. **Wat. Sci. Technol.** 26(3-4), 637-646, 1992.
19. BREDEHOEFT, J.D. Hazardous waste remediation: a 21st century problem. *Groundwater Monitoring and Remediation*, Winter, pp. 95-100, 1994.
20. BROWN, G.; MAHER, W. The occurrence, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the Georges River estuary, Australia. **Org. Geochem.** 18:657-668, 1992.
21. BROWNAVELL, B. J.; FARRINGTON, J. W. Biogeochemistry of PCBs in interstitial waters of a coastal marine sediment. **Geochim. Cosmochim. Acta** 50:157-169, 1986.
22. BURY, S. J.; MILLER, C. A. Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons. **Environ. Sci. Technol.** 27:104-110, 1993.
23. CERNIGLIA, C.E., Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Adv. Appl. Microbiol.** 30:31-71, 1984.
24. CERNIGLIA, C.E. Microbial transformation of aromatic hydrocarbons, p.100-128, In: R. Atlas (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Co., Nova Iorque, 1984b.
25. CETESB-Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. "Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo 1994". São Paulo: CETESB, 270 p., 1995.
26. CNMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. "Resolução nº 20, junho de 1986".

27. COLWELL, R.R. Scientific foundation of bioremediation and gaps remaining to be filled. No 10th Forum in microbiology, College Park, MD, EUA. **Res. Microbiol.** 145(1), 40-41, 1994.
28. COMMITTEE ON IN SITU BIOREMEDIATION, 1993.
29. CULLEN, W.R.; LI, X.-F.; REIMER, K.J. Degradation of phenanthrene and pyrene by microorganisms isolated from marine sediment and seawater. **Sci. Total Environ.** 156:27-37, 1994.
30. DAGHER, F.; DÉZIEL, E.; LIRETTE, P.; PAQUETTE, G.; BISAILLON, J.; VILLEMUR, R. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. **Can. J. Microbiol.** 43:368-377, 1997.
31. DALTON, H.; STIRLING, D. I. Co-metabolism. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B** 297:481-496, 1982.
32. DASU, B. N.; SUBLETTE, K. L. Reduction of sulfur dioxide by *Desulfovibrio desulfuricans* in co-culture with fermentative heterothrophs. **Biotechnol. Bioeng.** 34:405-409, 1989.
33. DAVIES, J.I.; EVANS, W.C. Oxidative metabolism of naphthalene by soil Pseudomonads-the ring fission mechanism. **Biochem. J.** 91:251-261, 1964.
34. DEAN-RAYMOND, D.; BARTHA, R. Biodegradation of some polynuclear aromatic petroleum components by marine bacteria. **Devel. Ind. Microbiol.** 16:97-110, 1975.

35. DELAUNE, R. D.; PATRICK, W. H.; CASSELMAN, M. E. Effect of sediment pH and redox conditions on degradation of benzo(a)pyrene. **Mar. Pollut. Bull.** 12:251-253, 1981.
36. DE MAN, J. C. The probability of most probable numbers. **Eur. J. Appl. Microbiol.** 1:67-78, 1975.
37. DEVINE, K. Bioremediation case studies: an analysis of vendor supplied data. Publ. EPA/600/R-92/043. Office of Engineering and Technology Demonstration, U. S. Environmental Protection Agency, Washington, D. C., 1992.
38. EDWARDS, D. A.; LUTHY, R. G.; LIU, E. Z. Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions. **Environ. Sci. Technol.** 25:127-133, 1991.
39. FARRINGTON, J. W. Biogeochemical process governing exposure and uptake of organic pollutants compound in aquatic organisms. **Environ. Health Perspect.** 90:75-84, 1991.
40. FEDORAK, P. M.; WESTLAKE, D. W. S. Microbial degradation of aromatics and saturates in Prudhoe Bay crude oil as determined by glass capillary gas chromatography. **Can. J. Microbiol.** 27:432-443, 1981.
41. FRENCH LIMITED TASK GROUP. In situ Biodegradation Demonstration Report. I,II. French Limited Site, Houston, Texas, 1988.
42. FUKUDA, K.; INAGAKI, Y.; MARUYAMA, T.; KOJIMA, H. I.; YOSHIDA, T. On the photolysis of alkylated naphthalenes in aquatic systems. **Chemosphere** 17: 651-659, 1988.

43. GIBSON, D. T.; KOCH, J. R.; KALLIO, R. E. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. **Biochemistry** 1:2653-2655, 1968.
44. GIBSON, D. T.; CARDINI, G. E.; MASELES, F. C.; KALLIO, R. E. Incorporation of oxygen-18 into benzene by *Pseudomonas putida*. **Biochemistry** 9: 1631-1637, 1970a.
45. GIBSON, D.T.; ROBERTS, R.L.; WELLS, M.C.; KOBAL, M. Oxidation of biphenyl by a *Beijerinckia* species. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 50:211-219, 1973.
46. GIBSON, D.T.; MAHADEVAN, V.; JERINA, D.M.; YAGI, H.; YEH, H.J.C. Oxidation of carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. **Science** 189:295-297, 1975.
47. GIBSON, D.T.; SUBRAMANIAN, V. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: D.T. Gibson (Ed.), Microbial degradation of organic compounds. Marcel Dekker, Nova Iorque, p.181-252, 1984.
48. GIBSON, D. T.; SAYLER, G. S. Scientific foundations of bioremediation: current status and future needs. American Academy of Microbiology, Washington, D. C., EUA, 1992.
49. GRIFOLL, M.; SELIFONOV, S. A.; GATLIN, C. V.; CHAPMAN, P. Actions of a versatile fluorene-degrading bacteria isolate on polycyclic aromatic compounds. **Appl. Environ. Microbiol.** 61:3711-3723, 1995.
50. GRIFOLL, M., Universidade de Barcelona, Espanha. Comunicação pessoal, 1998.
51. GUERIN, W. F.; JONES, G. E. Estuarine ecology of phenanthrene-degrading bacteria. **Estuar. Coast. Shelf Sci.** 29:115-130, 1989.

52. HAINES, J. R.; ATLAS, R. M. *In situ* microbial degradation of Prudhoe Bay crude oil in Beaufort Sea sediments. **Mar. Environ. Res.** 7:91-102, 1982.
53. HALLAS, L. E.; ADAMS, W. J.; HEITKAMP; M. A. Glycophosphate degradation by immobilized bacteria: field studies with industrial wastewater effluent. **Appl. Environ. Microbiol.** 58:1215-1219, 1992.
54. HAMBRICK, G. A.; DELAUNE, R. D.; PATRICK, W. H. Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. **Appl. Environ. Microbiol.** 40:365-369, 1980.
55. HEITKAMP, M.A.; FRANKLIN, W.; CERNIGLIA, C. E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of. pyrene-degrading bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.** 54:2549-2555, 1988.
56. HEITKAMP, M.A.; CERNIGLIA, C. E. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below a oil field. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 1612-1614, 1988.
57. HEITKAMP, M.A.; CERNIGLIA, C. E. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a *Mycobacterium* sp in microcosms containing sediment and water from a pristine ecosystem. **Appl. Environ. Microbiol.** 55:1968-1973, 1989.
58. HINCHEE, R.E. Bioventing of petroleum hydrocarbons. In: Handbook of Bioremediation, Lewis publishers, pp.39-59, 1994.
59. HINGA, K. R.; PILSON, M. E. Q.; LEE, R. F.; FARRINGTON, J. W.; TJESSEM, K.; DAVIS, A. C. Biogeochemistry of benzantracene in an enclosed marine ecosystem. **Environ. Sci. Technol.** 14:1136-1143, 1980.

60. HITES, R. A.; BIEMANN, K. Water pollution: organic compounds in the Charles River, Boston, **Science** 178:158-160, 1972.
61. HITES, R. A. Sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: Sources, Effects and Sinks of Hydrocarbons in the Aquatic Environment. American Institute of Biological Science, Washington DC, pp.325-332, 1976.
62. HITES, R. A.; LAFLAMME, R. E.; FARRINGTON, J. W. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments: the historical record. **Science** 198:829-831, 1977.
63. HITES, R.A.; LAFLAMME, R.E.; WINDSOR, J.G. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine/aquatic sediments; their ubiquity, In: L. Petrakis e F.T. Weiss (Eds.), Petroleum in the marine environment. Advances in Chemistry Series. American Chemical Society, Washington DC, pp.289-311, 1980.
64. JACOB, J.; KARCHER, W.; BELLIARDO, J.M.; WAGSTAFFE, P.J. Polycyclic aromatic hydrocarbons of environmental and occupational importance. **Frezenius Z. Anal. Chem.** 323:1-10, 1986.
65. JERINA, D. M.; YAGI, H.; LEHR, R. D.; THAKER, D. R.; SCHAEFER-RIDDER, M.; KARLE, J. M.; LVIN, W.; WOOD, A. W.; CHANG, R. L.; CONNEY, E A. H. In: Polycyclic Hydrocarbons and Cancer. (H. V. GELBOIN; TS' O, P. P. P.), vol. 1, pp.173, 1978.
66. JOHNSEN, S. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and natural aquatic humic substances. Contact time relationship. **Sci. Total Environ.** 67:269-278, 1987.

67. JOHNSON, A. C.; LARSON, P. F.; GADBOIS, D. F.; HUMASON, A. W. The distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the surficial sediments of Penobscot Bay (Maine, USA) in relation to possible sources and to other sites worldwide. **Mar. Environ. Res.** 15:1-16, 1985.
68. JONES, J. G.; EDINGTON, M. A. An ecological survey of hydrocarbon-oxidizing microorganisms. **J. Gen. Microbiol.** 52:381-390, 1968.
69. JUHASZ, A. L.; BRITZ, M. L.; STANLEY, G. A. Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*. **Biotechnol. Letters** 18(5):577-582, 1996.
70. KARICKHOFF, S. W.; BROWN, D. S.; SCOTT, T. A. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. **Water Res.** 13:241-248, 1979.
71. KEITH, L.H.; TELLIARD, W.A. Priority pollutants, I. A perspective view. **Environ. Sci. Technol.** 13:416-423, 1979.
72. KEITH, L. H.; WALTERS, D. B. National Toxicology Program's, Chemical Solubility Compendium, 1992.
73. KERR, R. S. Handbook of Bioremediation. Environmental Research Laboratory. CRC Press, Estados Unidos, pp. 24-30, 1994.
74. KILE, E. D.; CHIOU, C. T. Water solubility enhancements of DDT and trichlorobenzene by some surfactants below and above the critical micelle concentration. **Environ. Sci. Technol.** 23:832-838, 1989.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

75. KING, J. M. H.; DIGRAZIA, P. M.; APLEGATE, B.; BURLAGE, R.; SANSEVERINO, J.; DUMBAR, P.; LARIMER, F.; SAYLER, G. S. Rapid, sensitive bioluminescent reporter technology for naphthalene exposure and biodegradation. **Science** 249:778-781, 1990.
76. KIYOHARA, H.; NAGAO, K.; YANA, K. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. **Appl. Environ. Microbiol.** 43(2):454-457, 1982.
77. KIYOHARA, H.; NAGAO, K. The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria. **J. Gen. Microbiol.** 105:69-75, 1978.
78. LAFLAMME, R.E.; HITE, R.A. The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. **Geochim. Cosmochim. Acta** 42:289-303, 1978.
79. LAHA, S.; LUTHY, R. G. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. **Environ. Sci. Technol.** 25:1920-1930, 1991.
80. LAKE, J.L.; NORWOOD, C.; DIMOCK, C.; BOWEN, R. Origins of polycyclic aromatic hydrocarbons in estuarine sediments. **Geochim. Cosmochim. Acta** 43:1847-1854, 1979.
81. LANDRUM, P. F. Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. **Environ. Sci. Technol.** 23:588-595, 1989.
82. LANDRUN, P. F.; ROBBINS, J. A. Bioavailability of sediment-associated contaminants to benthic invertebrates. In: "Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants" (BAUDO, R.; GIESY, J. e MUNTAU, H., eds.), pp. 237-263, Lewis Publishers, Inc, Chelsea, MI, 1990.

83. LAUGHLIN, R. B.; LINDEN, O.; NEFF, J. M. A study of the effects of salinity and temperature on the disappearance of aromatic hydrocarbons from the water soluble fraction of nº 2 fuel oil. **Chemosphere** 10:741-749, 1979.
84. LEE, R. F.; RYAN, C. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by marine microbes. In: "Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium". (SHARPLEY, J. M. e KAPLAM, A. M., eds.), pp. 119-125, Applied Science Publishers, Londres, 1976.
85. LEWIS, R.F. Site demonstration of slurry-phase biodegradation of PAHs contaminated soil. **Air and Waste** 43: 503-508, 1993.
86. LIJINSKI, W.; QUASTEL, J.H. Metabolism of carcinogenic hydrocarbons by soil microorganisms. **Arch. Biochem. Biophys.** 63:160-164, 1956.
87. LITCHFIELD, C. D. In: "Environmental Biotechnology for Waste Treatment" (SAYLER, G. S.; FOX, R.; BLACKBURN, J. W. eds) pp. 147-157. Plenum, New York, 1991.
88. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem.** 193:265-175, 1951.
89. MACGARVIN, M.; JOHNSTON, P.A. On precaution, clean production and paradigm shifts. **Wat. Sci. Technol.** 27(5-6), 469-480, 1993.
90. MACINTYRE, W. G.; DEFUR, P. O. The effect of hydrocarbon mixtures on desorption of substituted naphthalenes by clay and sediment from water. **Chemosphere** 14:103-111, 1985.

91. MAGEE, B. R.; LION, L. W.; LEMLEY, A. T. Transport of dissolved organic macromolecules and their effect on the transport of phenanthrene in porous media. **Environ. Sci. Technol.** 25:323-331, 1991.
92. MAY, W. E. The solubility behavior of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous systems. In: "Petroleum in the Marine Environment" (PETRAKIS, L.; WEISS, F. T. eds.), pp. 143-192, American Chemical Society, Washington, EUA, 1980.
93. MCELROY, A. E.; FARRINGTON, J. W.; TEAL, J. M. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In: "Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Aquatic Environment" (VARANASSI, A., ed.), pp. 1-40, CRC Press, Boca Raton, FL, EUA, 1989.
94. MEANS, J. C.; HASSET, J. J.; WOOD, S. G.; BANWART, W. L. Sorption properties of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. **Environ. Sci. Technol.** 14:1524-1528, 1980.
95. MEANS, J. C.; WIJAYARATNE, R. Role of natural colloids in the transport of hydrophobic pollutants. **Science** 215:968-970, 1982.
96. MIHELICIC, J. R.; LUTHY, R. G. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. **Appl. Environ. Microbiol.** 54:1182-1187, 1988.
97. MILLER, R. M.; SINGER, G. M. , ROSEN, J. D.; BARTHA, R. Photolysis primes biodegradation of benzo(a)pyrene. **Appl. Environ. Microbiol.** 54:1724-1730, 1988.
98. MOREHEAD, N.R.; EADIE, B.J.; LAKE, B.; LANDRUM, P.D.; BERNER, D. The sorption of PAH onto dissolved organic matter in Lake Michigan waters. **Chemosphere** 15:403-412, 1986.

99. MUELLER, J.G.; CHAPMAN, P.J.; PRITCHARD, P.H. Action of a fluoranthene-utilizing bacterial community on polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote. **Appl. Environ Microbiol.** 55:3085-3090, 1989.
100. NAS (National Academy of Sciences). Polycyclic aromatic hydrocarbons: Evaluation of Sources and Effects. National Academy Press, Washington, D. C., EUA. 1983.
101. NAS (National Academy of Sciences). Oil in the sea: Inputs, Fates and Effects. National Academy Press, Washington, DC, 1985.
102. NEFF, J. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the Environmental. Sources, Fates and Biological Effects. Applied Science Publishers, Londres, 1979.
103. NORKRANS, B. On the occurrence of yeasts in an estuary off the Swedish Westcoast. **Svens Bot. Tidskr.** 60:462-482, 1966.
104. O'CONNOR, D. J.; CONNOLLY, J. P. The effect of concentration of adsorbing solids on the partition coefficient. **Water Res.** 14:1517-1523, 1980.
105. PAALME, L.; IRHA, N.; URBAS, E.; TSYBAN, A.; KIRSO, U. Model studies of photochemical oxidation of carcinogenic polyaromatic hydrocarbons. **Mar. Chem.** 30:105-111, 1990.
106. PAHLMANN, R.; PELKONEN, O. Mutagenicity studies of different polycyclic aromatic hydrocarbons: the significance of enzymatic factors and molecular structures. **Carcinogenesis** 8:773-778, 1987.

107. PRINCE, R. C. In: "Microbiol Control of Pollution" (FRY, J. C.; GADD, G. M.; HERBERT, R. A.; JONES, C. W.; WATSON-CRAIK, I. A., eds), pp. 19-34. Cambridge Univ. Press, Cambridge, Reino Unido, 1992.
108. READMAN, J. W.; MANTOURA, R. F. C.; RHEAD, M. M. ; BROWN, L. Aquatic distribution and heterothrophic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the Tamar Estuary. **Estuar. Coast. Shelf Sci.** 14:369-389, 1982.
109. ROBINSON, K. G.; FARMER, W. S.; NOVAK, J. T. Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria. **Water Res.** 24:345-350, 1990.
110. ROUBAL, G.; ATLAS, R. M. Distribution of hydrocarbon-utilizing microorganisms and hydrocarbon biodegradation potentials in Alaskan continental shelf areas. **Appl. Environ. Microbiol.** 35:897-905, 1978.
111. SHIARIS, M. P. Seasonal biotransformation of naphthalene, phenanthrene, and benzo(a)pyrene in surficial estuarine sediments. **Appl. Environ. Microbiol.** 55:1391-1399, 1989.
112. SHIARIS, M. P.; JAMBARD-SWEET, D. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surficial sediments of Boston Harbor, Massachusetts, USA. **Mar. Pollut. Bull.** 17:469-472, 1986.
113. SHOCKEN, M.J.; GIBSON, D.T. Bacterial oxidation of the PAHs acenaphthene and acenaphthylene. **Appl. Environ. Microbiol.** 48(1), 10-16, 1984.
114. SHODA, M. In: "Biological Degradation of Wastes" (MARTIN, A. M., ed.), pp. 31-46. Elsevier Applied Science, Londres, 1991.

115. SIMS, R. C.; SIMS, J. L.; SORENSEN, D. L.; HASTINGS, L. L. Waste/soil treatability studies for four complex industrial wastes: methodologies and results. U. S. Environmental Protection Agency, Robert S. Kerr Environmental Research Laboratory, vol. 1, pp. 154, EPA – 600/6-88-003a., 1988.
116. SISLER, F. D.; ZOBELL, C. E. Microbial utilization of carcinogenic hydrocarbons. **Science**, 1947.
117. STINSON, M. K.; HAHN, W.; SKOVRONEK, H. S. In: "Innovative Harzadous Waste Treatment Technology Series" (FREEMAN, H. M.; SFERRA, P. R., eds.), vol 3, pp. 163—167, Technomic Publ. Co., Lancaster, PA, EUA, 1991.
118. STRINGFELLOW, W. T.; AITKEN, M. D. Competitive metabolism of naphtalene, methylnaphtalenes, and fluorene by phenathrene-degrading Pseudomonads. **Appl. Environ. Microbiol.** 61:357-362, 1995.
119. STUCKI, G.; ALEXANDER, M. Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. **Appl. Environ. Microbiol.** 53(2), 292-297, 1987.
120. TABAK, H. H.; HAINES, J. R.; VENOSA, A. D.; GLASER, J. A.; DESAI S.; NISAMANEEPONG, W. In: "Gas, Oil, Coal and Environmental Biotechnology Series" (AKIN, C.; SMITH, J., eds.), pp.3-38. Institute of Gas Technology, Chicago, 1991.
121. THOMAS, J. M.; YORDY, J. R.; AMADOR, J. A.; ALEXANDER, E M. Rates of dissolution and biodegradation of water –insoluble organic compounds. **Appl. Environ. Microbiol.** 52:290-296, 1986.
122. THOMAS, J. M.; WARD, C. H. In situ bio restoration of. organic contaminants in the subsurface. **Environ. Sci. Technol.** 23:760-766, 1989.

123. TIEHM, A.; FRITZSCHE, C. Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* sp. **Appl. Microbiol. Technol.** 42:964-968, 1995.
124. TRZESICKA-MLYNARZ, D.; WARD, O. P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. **Can. J. Microbiol.** 41:470-476, 1995.
125. U.S. CONGRESS, Office of Technology Assessment, Bioremediation for marine oils spills, Background Pap. OTA-BP-O-70, U.S. Govt. Print. Off., Washington, D.C., Maio, 1991.
126. U.S. EPA, Environmental Protection Agency. Environmental Monitoring and Support Laboratory, EPA Test Method, Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Method 6440, p.6-103, 1995.
127. VARANASSI, U.; REICHERT, W. L.; STEIN, J. E.; BROWN, D. W.; SANBORN, H. R. Bioavailability and biotransformation of aromatic hydrocarbons in benthic organisms exposed to sediment from an urban estuary. **Environ. Sci. Technol.** 19:836-841, 1985.
128. VINCITORE, A. M.; MELTON, T. R.; SENKAN, S. M. The Effects of equivalence ratio on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons and soot in premixed methane flames. In: "27^o Symposium Internacional on Combustion", 1998.
129. VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; STERKENBURG, A.; VAN ANDEL, J. G. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. **Appl. Environ. Microbiol.** 36:548-552, 1992.

130. WALKER, N.; WILTSHIRE, G. H. The breakdown of naphthalene by a soil bacterium. **J. Gen. Microbiol.** 8:273-276, 1953.
131. WALTER, U.; BEYER, M.; KLEIN, J.; REHM, H-J. Degradation of pyrene by *Rhodococcus* sp UW1. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 34:671-676, 1991.
132. WANG, X.; YU, X.; BARTHA, R. **Environ. Sci. Technol.** 24:1086-1089, 1990.
133. WEISSENFELS, W. D.; BEYER, M.; KLEIN, J. Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 32:479-484, 1990.
134. WHITE, K.L. An overview of immunotoxicology and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environ. Carcinon. Rev.** C4, 163-202, 1986.
135. WHITEHOUSE, B. G. The effects of temperature and salinity on the aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons. **Mar. Chem.** 14:319-332, 1984.
136. WHITEHOUSE, B. G. The effects of dissolved organic matter on the aqueous partitioning of polynuclear aromatic hydrocarbons. **Estuar. Coast. Shelf Sci.** 20:393-402, 1985.
137. WHO, World Health Organization. "Guidelines for drinking water quality", vol.1 e 2, Genebra, 1984.
138. WILSON, L.; DURANT, N.; BOUWER, E. Relative effects of nitrogen, phosphorus, trace metals and temperature on biodegradation of coal tar constituents. Proceedings of the sixth International IGT Symposium on Gas, Oil and Environmental Biotechnology. Colorado Springs, Colorado, Nov.-Dez., 1993.

139. WOOD, J. L.; BAKER, C. L.; GRUBBS, C. J. Photooxidation products of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene. **Chem. Biol. Interactions** 26:339-347, 1979.
140. YE, D.; SIDDIQI, M. A.; MACCUBBIN, A. E.; KUMAR, S.; SIKKA, H. C. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. **Environ. Sci. Technol.** 30:136-142, 1996.
141. YOUNGBLOOD, M. W.; BLUMER, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: homologous series in soils and recent marine sediments. **Geochim. Cosmochim. Acta** 39:1303-1314, 1975.
142. ZEDEK, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons- a review. **J. Environ. Pathol. Toxicol.** 3: 537-567, 1980.
143. ZHANG, W.; BOUWER, E.; WILSON, L.; DURANT, N. Biotransformation of aromatic hydrocarbons in subsurface biofilms. **Wat. Sci. Technol.** 31(1), 1-14, 1995.

ERRATA

1. Página 68 – Acrescentar:

Devido à baixa concentração de HPAs na amostra, o aspecto gráfico do cromatograma foi prejudicado, como na FIGURA 24, onde não foi possível a visualização completa da linha de base, contudo, a quantificação dos compostos não foi afetada.

2. Página 105 – Alterar:

Nas FIGURAS 46 e 47 são mostrados os cromatogramas obtidos por CLAE para a quantificação da presença de benzo(a)pireno no EXP 4 e da mistura dos 4HPAs no EXP 24, respectivamente, exemplificando como foram obtidas as porcentagens de redução dos HPAs no meio de cultivo.

3. Página 106 e 107 – Alterar:

Considerar as páginas a seguir.

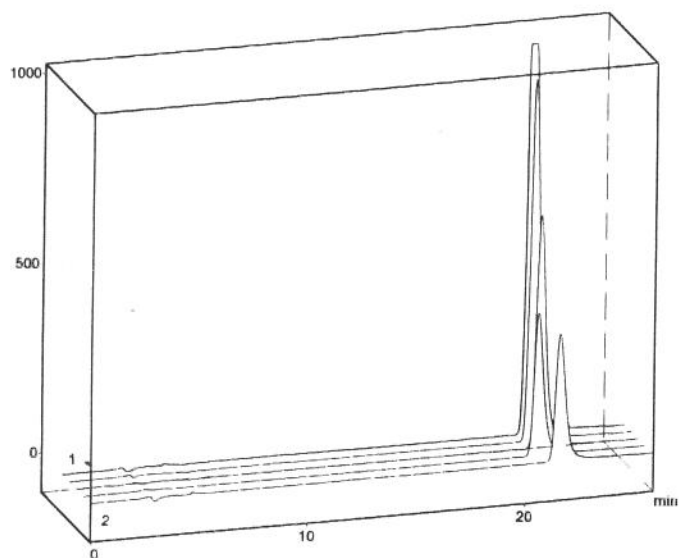


FIGURA 46 – Cromatogramas obtidos por CLAE utilizados para a quantificação do benzo(a)pireno ($t_r = 23$ min.) no meio de cultivo com a bactéria 2B, EXP 4. Cromatogramas: 1- Concentração inicial de benzo(a)pireno e 2 – Concentração final de benzo(a)pireno.

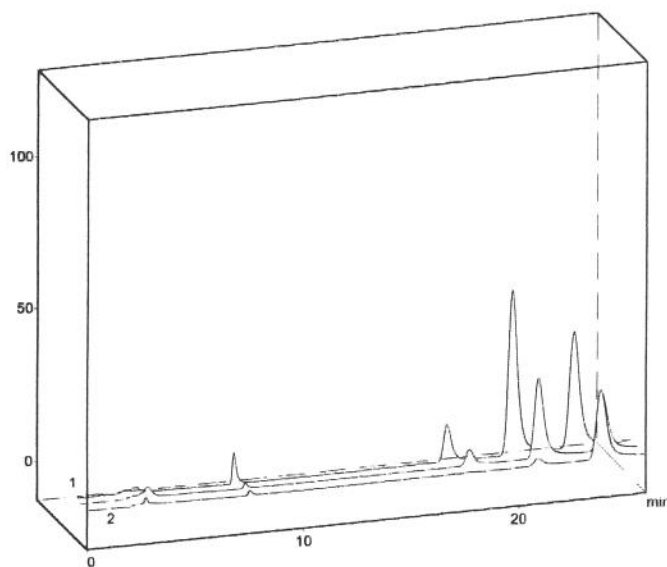


FIGURA 47 – Cromatogramas obtidos por CLAE utilizados para a quantificação de fluoranteno ($t_r = 8$ min.), benzo(b)fluoranteno ($t_r = 18$ min.), benzo(k)fluoranteno ($t_r = 21$ min.) e benzo(a)pireno ($t_r = 23$ min.) no meio de cultivo com a bactéria 9D, EXP 24. Cromatogramas: 1- Concentrações iniciais dos 4 HPAs e 2 – Concentrações finais dos 4 HPAs.