

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POR BACTÉRIAS PROVENIENTES DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE EFLUENTE DE REFINARIA DE PETRÓLEO**Fernanda R. Pinhati^{a,*}, Eduardo M. Del Aguila^b, Ana Paula R. Tôrres^c, Máira P. de Sousa^c, Vânia Maria J. Santiago^c, Joab T. Silva^{b,†} e Vânia Margaret F. Paschoalin^b**^aDepartamento de Química e Ambiental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Tecnologia, Avenida Presidente Dutra, km 298, Resende – RJ, Brasil^bDepartamento de Bioquímica, Centro de Tecnologia, Bloco A, sala 545, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro – RJ, Brasil^cCentro de Pesquisa e Desenvolvimento Leopoldo Américo M. de Mello, CENPES/PETROBRÁS, Ilha do Fundão – RJ, Brasil

Recebido em 06/11/2013; aceito em 17/06/2014; publicado na web em 01/08/2014

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF DETERIORATION OF AROMATIC HYDROCARBONS BY BACTERIA FROM WASTEWATER TREATMENT PLANT OF OIL REFINERY. Three bacterial strains were isolated from the activated sludge system of petroleum refinery wastewater, identified by partial sequencing of 16S rDNA, and classified as *Acinetobacter genomospecies 3*, *Bacillus pumilus*, and *Bacillus flexus*. The degradation efficiency of aromatic hydrocarbons was evaluated by gas chromatography with a flame ionization detector. In a mineral medium containing anthracene and phenanthrene and the consortium of microorganisms, the removal efficiency was 96% and 99%, respectively, after 30 days. The good rate of hydrocarbon degradation proves the operational efficiency of the microbial consortium in treating effluents containing these compounds.

Keywords: bacterial indigenous; sequencing; gas chromatography.

INTRODUÇÃO

A água é reconhecida como um dos bens naturais mais importantes do planeta. Devido à crescente degradação dos corpos d'água, as preocupações com o seu uso e destino têm mobilizado pessoas de várias áreas do conhecimento visando sua preservação.¹

A água, muitas vezes, considerada como recurso natural renovável e infinito, é um recurso ambiental limitador do desenvolvimento sustentável. Os grandes problemas de escassez são relacionados, muitas vezes, a utilização em quantidades superiores ao volume disponível, seja na utilização por indústrias, agricultura ou até mesmo devido ao aumento populacional.²

Houve avanços em relação à conservação da qualidade das águas superficiais e subterrâneas. O interesse dos setores público e privado por assuntos ambientais resultou na criação de várias organizações governamentais e não governamentais que hoje debatem, estabelecem normas e discutem práticas de minimização e remediação de substâncias químicas potencialmente poluentes.³

O interesse da comunidade acadêmica e a criação de órgãos de proteção ambiental, como a *Environmental Protection Agency* (EPA), nos Estados Unidos, e o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), no Brasil, promoveram um crescimento de pesquisas envolvendo monitoramento de contaminantes orgânicos em diversas áreas ambientais.⁴

Muitos produtos orgânicos são descartados diariamente nos corpos hídricos, provenientes de esgotos domésticos e da atividade industrial (como, siderúrgicas, indústrias farmacêuticas e automobilísticas e refinarias de petróleo). As atividades industriais são as que mais contribuem para a contaminação ambiental, uma vez que empregam grandes volumes de água e, conseqüentemente, geram grandes quantidades de efluentes líquidos contendo espécies tóxicas ou de degradação lenta e/ou difícil. Estes efluentes são descartados, principalmente, em rios e mananciais de uso múltiplo, que tem como

principal e mais nobre uso o consumo humano.⁵

O petróleo representa a principal fonte de combustível da humanidade e as operações de exploração, transporte, refino e distribuição representam potenciais fontes de poluição ambiental.⁶ Sendo um dos setores industriais para o qual o enquadramento às normas ambientais se torna mais urgente. A indústria do petróleo tem nos seus sistemas produtivos vários processos nos quais as correntes de efluentes hídricos contêm altas quantidades de compostos tóxicos, que provocam danos ao meio ambiente. Assim, é necessário buscar formas de diminuir a presença destas substâncias nos efluentes da indústria de petróleo ou desenvolver processos que permitam a remoção destas moléculas nos efluentes.

A contaminação da água por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e os métodos para sua eliminação têm sido estudados em todo mundo pelo fato destas substâncias serem contaminantes onipresentes, originados, principalmente, nos processos de refino de petróleo.⁷ Para a remoção de hidrocarbonetos aromáticos de águas e efluentes têm sido usados processos físico-químicos, como auto e fototoxicação, ozonização, adsorção e processos biológicos.⁸ Entretanto, a remediação natural é a forma mais barata de atenuação e vem sendo desenvolvida como tecnologia de recuperação de áreas impactadas. Esta técnica baseia-se em mecanismos envolvendo processos físicos, químicos e biológicos sem a intervenção humana, de tal maneira a reduzir a concentração dos contaminantes.⁹

Entre as técnicas de remediação natural, a biorremediação vem sendo bastante usada na recuperação de ambientes impactados por hidrocarbonetos de petróleo por utilizar o potencial metabólico de microrganismos e diminuir o caráter tóxico dos compostos contaminantes.¹⁰

A maioria dos microrganismos não possui a capacidade de degradar hidrocarbonetos ou hidrocarbonetos aromáticos como fonte de carbono e energia, justificando a necessidade de se isolar e selecionar microrganismos degradadores de HPAs.¹¹ O isolamento de linhagens puras de bactérias e fungos capazes de metabolizar hidrocarbonetos policíclicos aromáticos vem sendo realizado desde a década de 1950,

*e-mail: fernandaromanholi@yahoo.com.br

mas somente nos últimos anos tem sido dada atenção ao estudo de consórcios microbianos como agentes degradadores de HPAs, que têm se mostrado mais efetivo na degradação destes compostos do que as linhagens puras. A maior capacidade de degradação dos consórcios microbianos aumenta a possibilidade de elaboração de processos de biorremediação mais efetivos, com a eliminação total dos contaminantes do ambiente.

A alta dependência humana em relação à água e sua relativa disponibilidade fazem com que seja necessário evitar tanto o seu gasto excessivo quanto a contaminação dos corpos hídricos. Assim, é necessário desenvolver ferramentas e tecnologias que possibilitem uma melhor compreensão dos mecanismos de degradação dos principais compostos tóxicos e a redução da contaminação da água, minimizando os impactos ambientais, com uso racional e reutilização de água residual, sempre que possível.

Neste estudo, três cepas de bactérias isoladas de lodo biológico coletado a partir de uma estação de tratamento de efluentes de uma refinaria de petróleo foram identificadas. Após o sequenciamento parcial do gene rDNA 16S, avaliou-se a eficiência de degradação de antraceno, fenantreno e naftaleno como uma fonte única de carbono por meio de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC).

PARTE EXPERIMENTAL

Isolamento de bactérias

O lodo biológico da refinaria de petróleo foi coletado do fundo do decantador. Uma amostra de 10 g deste lodo biológico foi centrifugada a 10.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e esterilizado por autoclavagem a 121 °C por 1,5 atm por 15 minutos para ser usado como meio de crescimento. Foram reservados 10 g de sedimento para serem usados como inóculo. O sobrenadante esterilizado (100 mL) foi enriquecido com naftaleno, fenantreno ou antraceno na concentração final de 250 mg L⁻¹. Os frascos foram inoculados com o sedimento e incubados a 37 °C com agitação de 250 rpm por 4 semanas. As culturas foram, então, plaqueadas em meio mineral (MM) contendo (g L⁻¹) 0,04 CaCl₂ 2.H₂O; 0,1 KH₂PO₄; 0,8 NaCl; 1,0 NH₄Cl; 0,2 MgSO₄ 7.H₂O; 0,1 KCl, e (mg L⁻¹) 0,1 CoCl₂ 6.H₂O; 0,425 MnCl₂ 4.H₂O; 0,05 ZnCl₂; 0,015 CuSO₄ 5.H₂O; 0,01 NiCl₂ 6.H₂O; 0,01 Na₂MoO₄ 2.H₂O; 0,01 Na₂SeO₄ 2.H₂O, pH 7,0 ajustado com HCl e enriquecido com naftaleno, fenantreno ou antraceno na concentração (250 mg L⁻¹), para isolamento de colônias. Foram isoladas três colônias, uma de cada meio seletivo contendo antraceno, fenantreno ou naftaleno, selecionadas apenas por diferenças morfológicas.

Amplificação do gene 16S rDNA e análise filogenética

Os microrganismos isolados foram cultivados em 10 mL de meio LB líquido (triptona 1%, NaCl 1% e extrato de levedura 0,5%) a 37 °C, 250 rpm por 18h, como descrito em Sambrook *et al.*¹² A extração do DNA realizada foi como descrita por Leão *et al.*¹³ O DNA total dos microrganismos isolados do lodo biológico foram amplificados por PCR utilizando o kit MicroSeq® 16S rDNA Full Gene (Applied Biosystem). A reação foi realizada em termociclador Veriti 60-well Thermal Cycler (Applied Biosystem), com volume final de 30 µL, contendo 10 ng de DNA e 15 µL da mistura de *primers* do kit MicroSeq® 16S rDNA Full Gene (Applied Biosystem). A reação foi realizada sob as seguintes condições: 95 °C por 10 min, 25 ciclos de amplificação a 95 °C/30 s, 60 °C/30 s e 72 °C/45 s e um ciclo de extensão final de 10 min a 72 °C. Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose 1,2% em tampão TAE 1X (40 mM Tris; 1mM EDTA, 20 mM ácido acético) a 100 V por 1 h. Após eletroforese,

o gel foi corado em solução de Gelred (Biotium) por 30 min e as bandas foram visualizadas em fotodocumentador MiniLumi (DNS Bio Imaging Systems).

Os fragmentos amplificados foram purificados e utilizados na reação de sequenciamento. A reação de sequenciamento foi conduzida no mesmo termociclador utilizando 7 µL do produto de PCR purificado e 13 µL do BigDye Terminator v1. 1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). A mistura foi submetida a 25 ciclos de temperatura a 96 °C/10 s, 50 °C/5 s e 60 °C/4 min. Finalizada a reação, o produto foi purificado utilizando o Kit BigDye X Terminator (Applied Biosystem), conforme as recomendações do fabricante.

Os produtos fluorescentes foram separados em capilar de 50 cm (3130/3100-Avant™ Genetic Analyzer Capillary Array, 50 cm) preenchido com polímero POP 7 (POP-7™ Polymer for 3130/3130xl Genetic Analyzers). Os dados foram coletados pelo software Data Collection v1. 0.1 (Applied Biosystems) e as sequências *forward* e *reverse* obtidas foram alinhadas para reconstrução da sequência completa da região V3 do gene 16S rDNA de cada bactéria utilizando o programa Sequence Analysis v.5.2 (Applied Biosystem). As sequências obtidas foram comparadas com uma biblioteca de sequências microbianas pelo software MicroSEQ System® (Applied Biosystem) que forneceu como resultado uma lista de espécies geneticamente relacionadas e uma árvore filogenética apresentando as relações entre as espécies.

Remoção de HPAs do meio mineral (MM)

A remoção de HPAs pelas cepas isoladas, individualmente ou em consórcio, foi medida por CG-DIC. Porções de 50,0 mL de MM contendo 250 mg L⁻¹ de cada HPA foram inoculados com 3 x 10⁷ células mL⁻¹ e incubou-se a 30 °C por 30 dias em agitador rotativo (150 rpm). A perda por volatilização dos HPAs também foi avaliada por CG-DIC. Frascos contendo apenas 250 mg L⁻¹ de cada HPA em MM (50 mL) foram incubados nas mesmas condições experimentais citadas acima. Nos tempos 0, 15 e 30 dias foram recolhidas amostras de 10 mL dos frascos testes e controle por centrifugação a 5.000 g durante 10 min e filtrada através de filtros de membrana (poros de 0,22 µm – Millipore). Os filtrados obtidos foram então concentrados em corrente de gás hélio (grau analítico), em temperatura ambiente, até o volume de aproximadamente 2,0 mL. Os HPAs foram extraídos destas amostras com igual volume de diclorometano (grau HPLC). Após vigorosa agitação em vórtex, a fase orgânica foi recolhida e a fase aquosa foi extraída uma segunda vez com diclorometano. As fases orgânicas foram reunidas e armazenadas em frasco de vidro âmbar com tampa de teflon a -80 °C, até utilização. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Análise CG-DIC

Análise de HPA foi realizada em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC-2010 (Shimadzu Corporation, Japão), com detector de ionização de chama, equipado com coluna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), sendo usado hélio como gás de arraste (fluxo de 40 mL min⁻¹). Após a injeção da amostra (1 µL), a coluna foi aquecida durante 3 min a 160 °C, em seguida aumentada para 160 °C e 300 °C com uma rampa de 6 °C min⁻¹, e mantida durante 10 min. As temperaturas da porta de injeção e detector de ionização de chama foram de 300 °C e 325 °C, respectivamente. A solução estoque padrão certificado (Ultra Scientific) contendo HPAs (acenafteno, acenaftileno, antraceno, benzo [a] antraceno, benzo [a] pireno, benzo [b] fluoranteno, benzo [g, h, i] perileno, benzo [k] fluoranteno, criseno, dibenzo [a, h] antraceno, fluoranteno, fluoreno, indeno [1,2,3 -cd] pireno, naftaleno, fenantreno e pireno) na concentração individual de 2.000 µg mL⁻¹

foi diluída em hexano, para se alcançar as concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e injetadas no cromatógrafo a gás. As curvas de calibração com coeficientes de determinação (r^2) de 0,9979, 0,9985 e 0,9988 foram obtidas para antraceno, fenantreno e naftaleno, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação das bactérias isoladas

Três microrganismos foram isolados a partir de lodo biológico coletado na estação de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo por meio da técnica de enriquecimento usando antraceno, fenantreno ou naftaleno como única fonte de carbono e energia.

Após a extração e amplificação parcial do gene 16S rDNA, as sequências foram reunidas e editadas usando o programa MicroSeq v.1.0 para a identificação dos isolados. Os resultados mostram que a sequência de 16S rDNA do isolado em antraceno apresentou alta homologia com a espécie *Acinetobacter genomospecies 3* ATCC 17922 (99,97%), enquanto os isolados em fenantreno e naftaleno apresentaram 99,99% e 100% de similaridade com *Bacillus pumilus* ATCC 7061 e *Bacillus flexus* ATCC 49095, respectivamente. Com base nas sequências parciais do 16S rDNA foi construída a árvore filogenética (Figura 1).

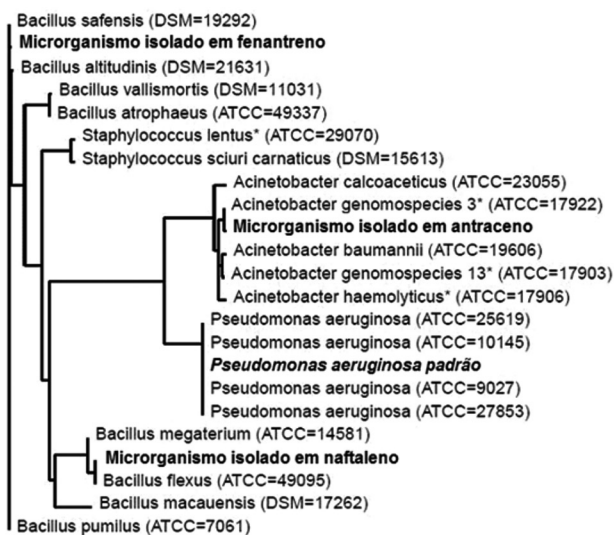


Figura 1. Árvore filogenética (UPGMA) mostrando as relações entre as sequências dos genes 16S rDNA dos isolados de lodo biológico e das estirpes. Os fragmentos de DNA foram analisados em sequenciador automático ABI-3130 (Applied Biosystem), o alinhamento entre as sequências foi realizado pelo programa Sequence Analysis e alinhadas as bibliotecas microbianas do MicroSeq System (Applied Biosystem)

O dendrograma mostra as relações entre as cepas isoladas em HPAs e as espécies mais proximamente relacionadas por comparação com a sequência da região hiper-variável V3 do 16S rDNA. Estas bactérias já foram isoladas e identificadas por outros pesquisadores em outras regiões impactadas com algum tipo de hidrocarboneto. Bactérias do gênero *Acinetobacter* parecem ser ubíquas em ecossistemas de lodo biológico^{14,15} e várias espécies de *Acinetobacter* que são capazes de degradar ftalato de dibutila, foram isoladas a partir de lodo biológico de duas estações de tratamento de esgoto no Japão.¹⁶ Estas determinam um importante papel no aumento da remoção biológica de fósforo no tratamento de águas residuais,¹⁷ biorremediação de solo contaminado com n-alcenos,¹⁸ ambientes contaminados com

combustíveis derivados de petróleo^{19,20} e são descritas como capazes de utilizar HPA como única fonte de carbono.²¹⁻²⁴

O gênero *Bacillus* compreende bactérias gram-positivas, em forma de bastonete, e formadoras de esporos sendo comumente encontradas no solo, em águas residuais e sedimentos de mangue.^{25,26} *B. pumilus*, juntamente com *B. cereus* e *B. subtilis*, constituem o principal grupo de comunidades bacterianas marinhas.²⁷⁻²⁹

B. flexus e *B. pumilus* são bactérias halotolerantes,³⁰ têm sido isoladas de lodo biológico utilizado para a produção de hidrogênio,³¹ como bactérias endofíticas em raízes de banana³² e foram caracterizadas como microrganismos metabolizadores de pireno,^{33,34} tal como *Bacillus subtilis*.³⁵

Assim, conforme mostrado pelos trabalhos, devido ao comprovado potencial de degradação de HPAs de tais bactérias, estas são possíveis candidatas para o aprimoramento de sistemas de tratamento de efluentes de refinaria de petróleo.

Eficiência de remoção dos HPAs

A perda dos HPAs do meio por volatilização foi avaliada por CG-DIC. Os resultados mostraram uma diminuição na concentração de antraceno, fenantreno e naftaleno de 8,2%, 8,4% e 87,1% em 15 dias e 9,2%, 9,1% e 88,6%, respectivamente, em 30 dias. A estrutura química do naftaleno é a grande responsável por estes resultados. A pressão de vapor do naftaleno é $4,92 \times 10^{-2}$ mmHg, enquanto que a do antraceno e fenantreno são $2,00 \times 10^{-4}$ e $6,80 \times 10^{-4}$ mmHg, respectivamente. Visto que, a pressão de vapor diminui com o aumento da massa molecular do HPA, antraceno e fenantreno são menos voláteis que o naftaleno.³⁶ Devido à alta volatilidade do naftaleno, a avaliação do consumo deste composto ao longo do crescimento bacteriano tornou-se difícil de ser determinada com exatidão. Resultados similares foram observados por Valdman³⁷ que estudou a cinética de biodegradação do naftaleno por *Pseudomonas fluorescens* HK44 em meio mineral. Os resultados de biodegradação após 100 min de teste revelaram uma perda por volatilização do naftaleno de 16,3%, em teste controle. Enquanto Loibner,³⁸ ao investigar a taxa de biodegradação de HPAs em solo, com e sem bactérias, concluiu que a redução do naftaleno ocorreu por volatilização, uma vez que as amostras de solo com microrganismos nativos e exógenos foram iguais aos obtidos para as amostras com solo esterilizado.

Entretanto, o antraceno e fenantreno, que apresentam a mesma massa molecular e pressões de vapor muito similares, apresentaram uma pequena taxa de volatilização, e por isso puderam ter seu consumo estimado.

No meio contendo um único tipo de HPA e um microrganismo, *Acinetobacter genomospecies 3* apresentou eficiência de degradação de antraceno de 9,9% e 38,7% em 15 e 30 dias, respectivamente. A eficiência de degradação por este mesmo microrganismo foi maior para o fenantreno, 35,2% e 53% em 15 e 30 dias, respectivamente. A menor taxa de biodegradação de antraceno foi obtida pelo isolado *B. pumilus*, que degradou apenas 3,7% e 9,4%, em 15 e 30 dias, respectivamente. Este isolado apresentou em média eficiência de remoção de fenantreno de 36,7% ao longo de todo o experimento. Entretanto, o isolado *B. flexus* foi o que apresentou maior eficiência de biodegradação de antraceno em 30 dias, 69,5%. A biodegradação de fenantreno para este isolado foi de 34,3% em 30 dias (Figura 2).

Os resultados obtidos estão de acordo com aqueles apresentados por outro trabalho que também avaliou a eficiência de remoção de HPAs por microrganismos isolados de diferentes ambientes contaminados com antraceno e fenantreno no Egito.³⁹ As taxas de degradação de antraceno por *Escherichia coli* (EF105548), *bactéria do solo* (EF105549), *Alcaligenes* sp. (EF105546) e *Thiobacter subterraneus* (EF105547) foram 29%, 31%, 27% e 32%, enquanto a degradação do

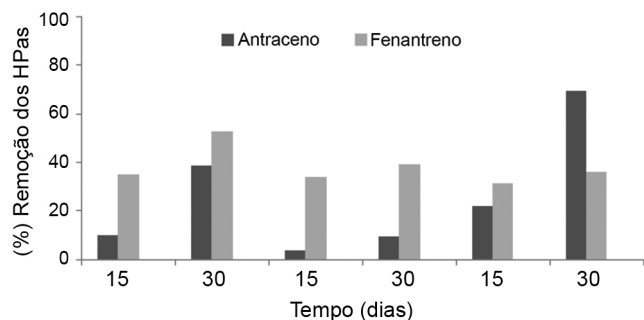


Figura 2. Biodegradação dos HPAs por cada isolado em meio mineral contendo apenas um tipo de HPA. A. *genomospecies 3*, B. *pumilus* e B. *flexus* foram cultivados em meio mineral contendo 250 mg L⁻¹ de antraceno ou fenantreno. HPA residual foi determinado após 15 e 30 dias por CG-DIC. Percentagem de remoção foi calculada considerando a quantidade do composto perdido por evaporação. Os HPAs foram estimados utilizando uma curva de calibração construída para cada HPA com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9979 e 0,9985 para o antraceno e fenantreno, respectivamente

fenantreno foi de 43%, 48%, 34% e 40%, respectivamente, durante um período de 22 dias.

Quando a mistura de HPA está na presença de apenas uma das bactérias, *Acinetobacter genomospecies 3* apresentou diminuição na taxa de biodegradação de antraceno e fenantreno (7,5% e 14% de degradação de antraceno, e 5% e 7% de degradação de fenantreno, em 15 e 30 dias, respectivamente) em relação ao teste anterior (Figura 3). Entretanto, observou-se um aumento na taxa de biodegradação de antraceno por *B. pumilus* (44,4% e 47,2% em 15 e 30 dias, respectivamente). A taxa de biodegradação de fenantreno para este isolado foi um pouco maior em relação ao experimento anterior (44%) em 15 dias, porém, a taxa de degradação diminuiu com 30 dias (26,7%).

O isolado *B. flexus* apresentou uma redução na taxa de biodegradação de antraceno, sendo neste experimento de 39,6% em 30 dias e praticamente o mesmo valor de biodegradação de fenantreno em relação ao experimento anterior (33% em 30 dias) (Figura 3).

Os melhores resultados de degradação de HPAs por *B. pumilus* obtidos no presente trabalho são corroborados pelos resultados de Das et al.³⁵ Estes investigaram e compararam a eficiência de utilização de pireno pelas seguintes bactérias: *B. subtilis* DM-04, *Pseudomonas aeruginosa* mucoide (M) e não-mucoide (NM). Estas foram isoladas a partir de uma amostra de solo contaminado com petróleo do nordeste

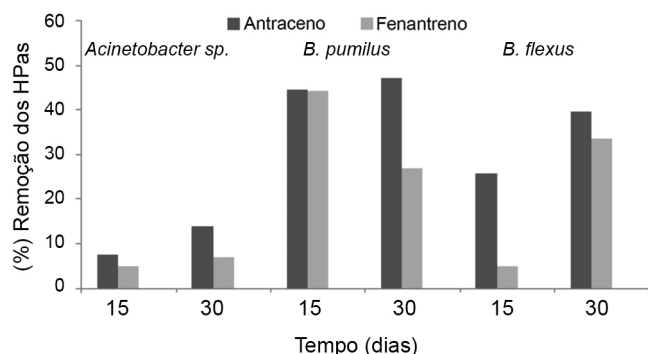


Figura 3. Biodegradação dos HPAs por cada isolado em meio mineral contendo os três HPAs. A. *genomospecies 3*, B. *pumilus* e B. *flexus* foram cultivados em meio mineral contendo 250 mg L⁻¹ de antraceno ou fenantreno. HPA residual foi determinado após 15 e 30 dias por CG-DIC. Percentagem de remoção foi calculada considerando a quantidade do composto perdido por evaporação. Os HPAs foram estimados utilizando uma curva de calibração construída para cada HPA com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9979 e 0,9985 para o antraceno e fenantreno, respectivamente

da Índia. Tais microrganismos são capazes de utilizar hidrocarbonetos como única fonte de carbono. O *B. subtilis* DM-04 exibiu maior utilização e assimilação celular de pireno em comparação com *P. aeruginosa* M e NM, na presença de 100 mg L⁻¹ de pireno por 96 h, com eficiências de remoção de 48% e 32%, respectivamente.

A eficiência de degradação dos HPAs nestes dois experimentos (um único microrganismo e um HPA em um único microrganismo em uma mistura dos três HPAs) foi muito semelhante. Esta similaridade na eficiência indica que estes microrganismos poderiam remover tais compostos policíclicos aromáticos mesmo em misturas complexas. Uma das hipóteses que pode explicar essa eficiência de remoção de diferentes HPAs por uma mesma bactéria é a capacidade de utilizarem vias metabólicas comuns. As enzimas envolvidas na conversão do naftaleno a salicilato, por exemplo, podem degradar fenantreno e antraceno a 1-hidroxi-2-naftoato e 2-hidroxi-3-naftoato, respectivamente.⁴⁰

Considerando que uma via metabólica pode estar envolvida na metabolização de diferentes HPAs, Radwan e Sorkhoh⁴¹ isolaram duas cepas de *Bacillus* capazes de degradar 80-90% de petróleo bruto (5 g L⁻¹) no prazo de cinco dias.

A alta eficiência de degradação do consórcio de microrganismos no meio contendo os três tipos de HPAs em estudo, pode ser observada na Figura 4. Aproximadamente 55% do antraceno foram degradados em apenas 15 dias e 80%, em 30 dias. A melhor taxa de biodegradação foi de fenantreno, que em apenas 15 dias teve uma remoção de 96,8% e uma eficiência de degradação de 99,6% em 30 dias.

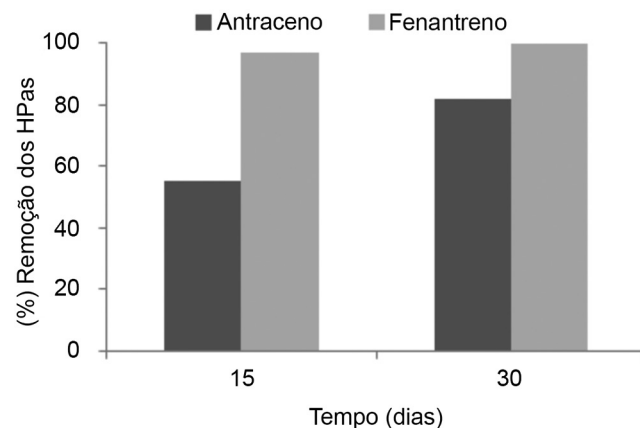


Figura 4. Biodegradação dos HPAs pelo consórcio microbiano em meio mineral contendo a mistura dos três HPAs. A. *genomospecies 3*, B. *pumilus* e B. *flexus* foram cultivados em meio mineral contendo 250 mg L⁻¹ de antraceno ou fenantreno. HPA residual foi determinado após 15 e 30 dias por CG-DIC. Percentagem de remoção foi calculada considerando a quantidade do composto perdido por evaporação. Os HPAs foram estimados utilizando uma curva de calibração construída para cada HPA com coeficiente de determinação (r^2) de 0,9979 e 0,9985 para o antraceno e fenantreno, respectivamente

Embora muitas bactérias sejam capazes de metabolizar diferentes poluentes orgânicos, uma única bactéria pode não possuir a capacidade enzimática para degradar todos, ou mesmo a maioria dos compostos orgânicos em um ambiente poluído.

Comunidades microbianas mistas apresentam maior potencial de degradação, porque a informação genética de mais de um organismo pode ser necessária para degradar o complexo de misturas de compostos orgânicos presentes em áreas contaminadas. O potencial genético e determinados fatores ambientais, como temperatura, pH e fontes disponíveis de fósforo e nitrogênio parecem determinar a taxa e a extensão da degradação dos compostos poluentes, tal como foi observado por Samanta et al.⁴² em estudo no qual espécies

foram capazes de utilizar até 100 diferentes compostos orgânicos como fonte de carbono. Para as *Pseudomonas*, por exemplo, o imenso potencial de degradação não depende exclusivamente das enzimas catabólicas, mas também da sua capacidade de regulação metabólica.

Em geral, os microrganismos preferem utilizar as fontes de carbono mais simples em relação aos compostos complexos quando ambos estão presentes no ambiente. Portanto, a presença de fontes de carbono simples pode reduzir significativamente a eficiência de um microrganismo em relação a compostos complexos. Se um microrganismo é impedido de utilizar fontes de carbono simples, torna-se totalmente dependente de compostos complexos, aumentando a especificidade e eficiência de degradação dos compostos mais complexos.⁴² Alguns trabalhos destacam esta alta eficiência de degradação de compostos complexos, em pequenos intervalos de tempo, por alguns microrganismos, quando estes são submetidos a altas concentrações de HPAs complexos e são desprovidos de fontes de carbono simples.⁴³⁻⁴⁵

A variação dos resultados obtidos por diferentes estudos pode ser interpretada com base na variação de “background” genético das linhagens bacterianas utilizadas, tempo de adaptação e condições de incubação. Comparando-se os três experimentos realizados, observa-se que no experimento em que cada isolado foi inoculado em apenas um tipo de HPA, o isolado *B. flexus* foi o que apresentou melhor resultado de biodegradação de antraceno em 30 dias e *A. genomospecies 3*, a melhor eficiência para fenantreno em 30 dias (Figura 2). No segundo experimento, o isolado *B. pumilus* mostrou-se mais eficiente na degradação de antraceno e fenantreno, com médias muito próximas de degradação dos dois HPAs (Figura 3). Entretanto, a maior eficiência de biodegradação deve-se à presença do consórcio microbiano, que em apenas 15 dias degradou mais de 50% de cada HPA presente no meio mineral (Figura 4). Tal resultado foi similarmente demonstrado por Venkateswaran e Harayama,⁴⁶ que ao utilizarem o enriquecimento de culturas, isolaram uma população bacteriana capaz de degradar petróleo bruto. Verificaram que 28-51% da fração saturada e 0-18% da fração aromática presente foram biodegradadas por uma cultura mista (*Acinetobacter sp.*, *Aeromonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, *Klebsiella cepacia*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella phenylpiruvica*, *Nocardia sp.*, *Ochrobacterium anthorpi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas sp.*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Vibrio fisheri* e *Xanthomonas maltophilia*). Contudo, quando foi utilizada cultura pura, nenhuma delas apresentou degradação superior à do consórcio.

Uma melhor eficiência do consórcio microbiano para degradação de HPAs também foi relatada por Jacques *et al.*⁴⁷ Um consórcio formado por seis bactérias isoladas de solo “landfarming” (*Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium sp.*, *Gordonia polysio-prenivorans*, *Microbacteriaceae bacterium* e *Naphthalene-utilizing bacterium*, e um fungo identificado como *Fusarium oxysporum*) foi capaz de degradar 49% do antraceno e, 22% de fenantreno e pireno em meio mineral (250 mg L⁻¹ de cada HPA), no prazo de 48 dias. Entretanto, o consórcio isolado neste presente trabalho mostrou-se mais eficiente na remoção de antraceno e fenantreno em um menor período de dias (Figura 4).

A eficiência de degradação de HPAs pelo consórcio microbiano também tem sido atribuída à produção e liberação para o meio de biosurfactantes produzido por alguns microrganismos. Estes compostos aumentam a superfície hidrofóbica de substratos insolúveis em água, aumentando sua biodisponibilidade, facilitando assim o crescimento de bactérias e maior taxa de biorremediação.

Diversos trabalhos destacam que os biosurfactantes produzidos por diferentes espécies de *Acinetobacter*,⁴⁸ *A. calcoaceticus* BU03⁴⁹ e

*B. subtilis*⁵⁰ são mais biodegradáveis e menos tóxicos em comparação com surfactantes químicos.^{51,52} Inclusive são mais eficazes no aumento da solubilidade do fenantreno e benzo(a)pireno em comparação com surfactantes sintéticos, o que permitiu uma remoção de aproximadamente 43% dos HPAs no meio.⁵³

Uma vez que os resultados de eficiência de remoção de HPAs obtidos são consistentes com os trabalhos citados, tais espécies, sendo potenciais produtoras de biosurfactante, podem estar sob a ação destes compostos, o que resultaria na contribuição de remoção destes. Para melhor compreensão da eficiência de remoção de HPAs é de grande importância avaliar a presença e os efeitos de possível biosurfactante que esses organismos possam estar produzindo.

O metabolismo bacteriano dos HPAs tem sido estudado há algum tempo, porém, a identificação dos genes e das enzimas envolvidas na rota de metabolização necessita de maiores estudos. Alguns trabalhos destacam que estes genes podem estar localizados em plasmídeos.⁵⁴⁻⁵⁶

Pesquisadores identificaram espécies dos gêneros *Pseudomonas*,⁵⁶ *Bacillus*⁵⁷ e *Acinetobacters*,⁵⁸ cujos plasmídeos transportam a informação genética essencial para o início da degradação dos HPAs. A presença destes genes associados com estes plasmídeos é ainda, em grande parte, desconhecida para a maioria das bactérias capazes de degradar HPA.⁵⁹ A confirmação para a presença do plasmídeo em uma bactéria potencialmente capaz de degradar HPAs torna-se uma ferramenta biológica de grande importância.

Segundo Leahy e Colwell,⁵⁵ os plasmídeos tem um importante papel na adaptação genética de microrganismos, visto que estes representam uma forma de DNA altamente móvel que pode ser transferida via conjugação ou transformação.

Considerando que as bactérias isoladas tenham a informação genética em seus plasmídeos, e que os mesmos podem ser transferidos para outras bactérias, a inoculação destas bactérias selecionadas com uma cultura incapaz de degradar os HPAs, pode ser o passo inicial para potencializar o sistema biológico da estação no tratamento de efluentes contaminados.

Neste contexto, é interessante investigar a presença de plasmídeos nestes isolados, a fim de pesquisar a presença dos genes catalisadores e a eficiência de ação destes em bactérias receptoras dos plasmídeos.

CONCLUSÃO

Três cepas de bactérias isoladas e identificadas mostraram potencial para degradação de HPAs. As maiores taxas médias de degradação de HPAs foram obtidos por *B. flexus*, que removeu 45% do antraceno após 15 dias e 47% do fenantreno após 30 dias de incubação. Taxas de degradação máximas foram obtidas quando um consórcio microbiano foi utilizado. Aproximadamente, 56% e 80% de biodegradação de antraceno em 15 e 30 dias, respectivamente e 96% e 99,6% de biodegradação de fenantreno em 15 e 30 dias, respectivamente. Visto que age sinergicamente, o consórcio de microrganismos apresenta larga capacidade enzimática capaz de degradar os poluentes. Associadas a esta capacidade, verificam-se a versatilidade e adaptabilidade de bactérias que contem plasmídeos catabólicos. A compreensão das características deste gene catabólico plasmidial é um assunto de investigação em curso.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Petrobras pelo apoio técnico e financeiro. LAABBM (Laboratório Avançado de Análises em Bioquímica e Biologia Molecular) foi apoiado por doações da FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Em memória de J. T. Silva.

REFERÊNCIAS

1. Beeckman, G. B.; *International Journal of Water Resources Development* **1998**, *14*, 353.
2. Nascimento, J. F.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil, **2004**.
3. Hambright, K. D.; Parparov, A.; Berman, T.; *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **2000**, *10*, 393.
4. Tirburtius, E. R. L.; Zamora, P. P.; Leal, E. S.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 441.
5. Azevedo, D. A.; Gerchon, E.; Reis, E. O.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 165.
6. Gerales-Kataoka, A. P. A.; *Tese de doutorado*, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, Brasil, **2001**.
7. Sabaté, J.; Bayona, J. M.; Solanas, A. M.; *Chemosphere* **2001**, *44*, 119.
8. Fan, S.; Zhao, L.; Lin, J.; *Talanta* **2007**, *72*, 1618.
9. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories. vol. 2: Risk Assessment and Fish Consumption Limits, Second edition. EPA 823-B-97-009, Office of Water, U.S. EPA, Washington, D.C., **1997**.
10. Chaillan, F.; Le Flèche, A.; Bury, E.; Phantavong, Y.; Grimont, P.; Saliot, A.; Oudot, J.; *Res. Microbiol.* **2004**, *155*, 587.
11. Gaylarde, C. C.; Bellinaso, M. L.; Manfio, G. P.; *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **2005**, *34*, 36.
12. Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T.; *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Huntington, 2001.
13. Leão, S.; Martins, A.; Mejia, G. I.; Palomino, J. C.; Robledo, J.; Telles, M. A. S.; Portaeles, F.; *Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria*, 2004.
14. Knight, G. C.; Seviour, E. M.; Seviour, R. J.; *Water Res.* **1995**, *29*, 2085.
15. Carr, E.; Eason, H.; Feng, S.; Hoogenraad, A.; Croome, R.; Soddell, J.; Lindrea, K.; Seviour, R.; *Appl. Microbiol.* **2001**, *90*, 309.
16. Ogawa, G.; Ishida, M.; Urano, N.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *55*, 261.
17. Wagner, M.; Erhart, R.; Manz, W.; Amann, R.; Lemmer, H.; Wedi, D.; Schleifer, K.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 792.
18. Rosenberg, E.; Zuckerberg, A.; Rubinovitz, C.; Gutnick, D. L.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1979**, *37*, 402.
19. Ishige, T.; Tani, A.; Sakai, Y.; Kato, N.; *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3481.
20. Gallego, J. L. R.; Loreda, J.; Llamas, J. F.; Vazquez, F.; Sanchez, J.; *Biodegradation* **2001**, *12*, 325.
21. Caposio, P.; Pessione, E.; Giuffrida, G.; Conti, A.; Landolfo, S.; Giunta, C.; Gribaudo, G.; *Res. Microbiol.* **2002**, *153*, 69.
22. Gao, J.; Ellis, L. B. M.; Wackett, L. P.; *Nucleic Acids Res.* **2006**, *38*, 488.
23. Thangaraj, K.; Kapley, A.; Purohit, H. J.; *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 2488.
24. Zhao, Z. Y.; Wong, J. W. C.; *Environ. Technol.* **2009**, *30*, 291.
25. Chang, B. V.; Chang, I. T.; Yuan, S. V.; *J. Environ. Sci. Health, Part A: Environ. Sci. Eng.* **2008**, *43*, 233.
26. Naggari, A. Y. E.; Kamel, M. M.; Aladly, A. A.; Ismail, N. A.; *J. Am. Sci.* **2010**, *6*, 661.
27. Ruger, H. J.; *Mar. Ecol.: Prog. Ser.* **1989**, *57*, 45.
28. Ortigosa, M.; Garay, E.; Pujalte, M. J.; *Microbiologia* **1997**, *13*, 453.
29. Ivanova, E. P.; Vysotskii, M. V.; Svetashev, V. I.; Nedashkovskaya, O. I.; Gorshkova, N. M.; Mikhailov, V. V.; Yumoto, N.; Shigeri, Y.; Taguchi, T.; Yoshikawa, S.; *Int. Microbiol.* **1999**, *2*, 267.
30. Suresh, K.; Prabakaran, S. R.; Sengupta, S.; Shivaji, S.; *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2004**, *54*, 1369.
31. Lee, J. H.; Lee, D. G.; Park, J. I.; Kim, J. Y.; *Korean J. Chem. Eng.* **2010**, *27*, 187.
32. Souza, S. A.; *Dissertação de mestrado*, Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil, **2011**.
33. Khanna, P.; *Tese de doutorado*, Thapar University of India, India, **2011**.
34. Khanna, P.; Goyal, D.; Khanna, S.; *Polycyclic Aromat. Compd.* **2011**, *31*, 1.
35. Das, K.; Mukherjee, A. K.; *J. Appl. Microbiol.* **2007**, *102*, 195.
36. Baird, C.; Cann, M.; *Química Ambiental*, 2ª ed., Editora Bookman: Porto Alegre, **2002**, cap. 12.
37. Valdman, E.; *Tese de doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, **2004**.
38. Loibner, A. P.; *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *2*, 15.
39. Abd-Elsalam, H. E.; Hafez, E. E.; Hussain, A. A.; Ali, A. G.; El-Hanafy, A. A.; *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* **2009**, *5*, 31.
40. Menn, F. M.; Applegate, B. M.; Saylor, G. S.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 6.
41. Radwan, S. S.; Sorkhoh, N. A.; *Adv. Appl. Microbiol.* **1993**, *39*, 29.
42. Samanta, S. K.; Bhushan, B.; Jain, R. K.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *55*, 627.
43. Liu, Y.; Zhang, J.; Zhang, Z.; *Biodegradation* **2004**, *15*, 205.
44. Zhang, H.; Kallimanis, A.; Koukkou, A. I.; Drinas, C.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, *65*, 124.
45. Coral, G.; Karagoz, K.; *Ann. Microbiol. (Heidelberg, Ger.)* **2005**, *55*, 255.
46. Venkateswaran, K.; Harayama, S.; *Can. J. Microbiol.* **1995**, *41*, 767.
47. Jacques, R. J. S.; Santos, E. C.; Bento, F. M.; Peralba, M. C. R.; Selbach, P. A.; Sá, E. L. S.; Camargo, F. A. O.; *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2005**, *56*, 143.
48. Barkay, T.; Navon-Venezia, S.; Ron, E. Z.; Rosenberg, E.; *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 2697.
49. Wong, J. W. C.; Zhao, Z.; Zheng, G.; *Proceedings of the Annual International Conference on Soils, Sediments, Water and Energy* **2010**, *15*, 36.
50. Rosenberg, E.; Ron, E. Z.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **1997**, *8*, 313.
51. Zhao, Z. Y.; Wong, J. W. C.; *Environ. Technol.* **2009**, *30*, 291.
52. Romine, M. F.; Stillwell, L. C.; Wong, K. K.; Thurston, S. J.; Sisk, E. C.; Sensen, C.; Gaasterland, T.; Fredrickson, J. K.; Saffer, J. D.; *J. Bacteriol.* **1990**, *181*, 5.
53. Greated, A.; Lambertsen, L.; Williams, P. A.; Thomas, C. M.; *Environ. Microbiol.* **2002**, *4*, 12.
54. Maeda, K.; Nojiri, H.; Shintani, M.; Yoshida, T.; Habe, H.; Omori, T.; *J. Mol. Biol.* **2003**, *326*, 1.
55. Leahy, J. G.; Colwell, R. R.; *Microbiol. Rev.* **1990**, *5*, 303.
56. Dunn, N. W.; Gunsalus, I. C.; *J. Bacteriol.* **1973**, *114*, 974.
57. Pannucci, J.; Okinaka, R. T.; Sabin, R.; Kuske, C. R.; *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 1.
58. *The Biology of Acinetobacter*; Towner, K. J.; Bergogne-Bérézin, E.; Fewson, C. A., eds.; *F.E.M.S. Symposium No. 57*, Paris, 1991.
59. Frantz, B.; Chakrabarty, A. M.; *The biology of Pseudomonas* **1996**, *10*, 295.