

## **SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Biorremediação de Água Subterrânea Contaminada  
com Gasolina e Análise Molecular da Comunidade  
Bacteriana Presente**

## **PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA**

**Luiz Inácio Lula da Silva**

**José Alencar Gomes da Silva**

Vice-Presidente

## **MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

**Sérgio Machado Rezende**

Ministro da Ciência e Tecnologia

**Luiz Antonio Rodrigues Elias**

Secretário-Executivo

**Luiz Fernando Schettino**

Secretário de Coordenação das Unidades de Pesquisa

## **CETEM – CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL**

**Adão Benvindo da Luz**

Diretor do CETEM

**Antônio Rodrigues Campos**

Coordenador de Apoio à Micro e Pequena Empresa

**Arnaldo Alcover Neto**

Coordenador de Análises Minerais

**João Alves Sampaio**

Coordenador de Processos Minerais

**José da Silva Pessanha**

Coordenador de Administração

**Ronaldo Luiz Correa dos Santos**

Coordenador de Processos Metalúrgicos e Ambientais

**Zuleica Carmen Castilhos**

Coordenadora de Planejamento, Acompanhamento e Avaliação

# **SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL**

ISSN 0103-7374

ISBN 978-85-61121-34-1

**STA - 47**

## **Biorremediação de Água Subterrânea Contaminada com Gasolina e Análise Molecular da Comunidade Bacteriana Presente**

**Cláudia Duarte da Cunha**

Engenheira Química, D.Sc. em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Pesquisadora/ Bolsista Funcate do CETEM/MCT

**Selma Gomes Ferreira Leite**

Engenheira Química, D.Sc., Prof. Titular da EQ/UFRJ

**Alexandre Soares Rosado**

Biólogo, D.Sc., Prof. Adjunto do IMPPG/UFRJ

**Mário do Rosário**

Engenheiro Químico, M.Sc. do CENPES/PETROBRAS

**CETEM/MCT**

2008

## **SÉRIE TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**Luis Gonzaga Santos Sobral**

Editor

**Andrea Camardella de Lima Rizzo**

Subeditora

### **CONSELHO EDITORIAL**

Marisa Bezerra de M. Monte (CETEM), Paulo Sergio Moreira Soares (CETEM), Saulo Rodrigues P. Filho (CETEM), Silvia Gonçalves Egler (CETEM), Vicente Paulo de Souza (CETEM), Antonio Carlos Augusto da Costa (UERJ), Fátima Maria Zanon Zotin (UERJ), Jorge Rubio (UFRGS), José Ribeiro Aires (CENPES), Luis Enrique Sánches (EPUSP), Virginia Sampaio Ciminelli (UFMG).

A Série Tecnologia Ambiental divulga trabalhos relacionados ao setor minero-metalúrgico, nas áreas de tratamento e recuperação ambiental, que tenham sido desenvolvidos, ao menos em parte, no CETEM.

O conteúdo desse trabalho é de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es).

**Thatyana Pimentel Rodrigo de Freitas**

Coordenação Editorial

**Vera Lúcia Espírito Santo Souza**

Programação Visual

**Cláudia Duarte da Cunha**

Edição Eletrônica

---

Biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente / Cláudia Duarte da Cunha et al. – Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2008.

45p. (Série Tecnologia Ambiental, 47)

1. Biorremediação. 2. Água subterrânea. 3. Solo contaminado. 4. Análise molecular. I. Centro de Tecnologia Mineral. II. Cunha, Cláudia Duarte. III. Leite, Selma Gomes. IV. Rosado, Alexandre Soares. V. Rosário, Mário. VI. Série.

CDD – 628.55

---

## **SUMÁRIO**

<b>RESUMO</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>9</b>
<b>1   INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2   REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>14</b>
<b>2.1   Gasolina</b>	<b>14</b>
<b>2.2   Tanques de Armazenamento Subterrâneo (TAS):     Fonte de Contaminação por Gasolina</b>	<b>15</b>
<b>2.3   Legislação</b>	<b>18</b>
<b>2.4   Biorremediação</b>	<b>19</b>
<b>2.5   Ecologia Microbiana Molecular</b>	<b>27</b>
<b>3   CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>34</b>
<b>GLOSSÁRIO</b>	<b>36</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>37</b>



## RESUMO

Os vazamentos provenientes de tanques de armazenamento subterrâneo de gasolina ocasionam sérios problemas ambientais e representam um risco potencial para a sociedade, quando há o comprometimento das águas subterrâneas que abastecem uma determinada região. A fração aromática da gasolina, constituída por benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, é considerada de maior interesse pelas Agências Reguladoras porque esses compostos são relativamente solúveis, tóxicos e comprometem a saúde humana. A gasolina brasileira ainda recebe a adição de 20-25% de álcool etílico anidro, que provoca o efeito de co-solvência, aumentando a solubilidade desses compostos. Dentre os vários métodos de remediação disponíveis, a biorremediação vem se apresentando como bastante promissor, por ser considerada uma forma natural de tratamento.

A avaliação de algumas condições como a presença de microrganismos hidrocarbonoclásticos no sítio contaminado, além da presença de biosurfatantes e enzimas-chave no processo de biodegradação se faz necessário para a implantação da melhor estratégia de tratamento. Existem várias técnicas de Biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina contendo etanol entre elas a Bioestimulação e o Bioaumento. A Bioestimulação envolve a adição de nutrientes e acceptor final de elétrons e o Bioaumento a incorporação de microrganismos para aumentar a eficiência de degradação .

Para avaliar o impacto da contaminação e dos tratamentos implementados sobre a comunidade microbiana presente, técnicas de biologia molecular vem sendo implementadas. O *fingerprinting* molecular realizado através da técnica de PCR-16S (*Polymerase Chain Reaction*) associada à técnica de DGGE

*(Denaturing gradient gel electrophoresis)* pode mostrar possíveis alterações na estrutura da comunidade antes e após esses tratamentos, comparando-os com a atenuação natural. Essas técnicas permitem a análise de bactérias cultiváveis e não cultiváveis, aeróbias e anaeróbias, sendo um método rápido para avaliar mudanças estruturais na comunidade microbiana em resposta a diferentes fatores ambientais. Esses estudos irão facilitar o desenvolvimento de novas estratégias de biorremediação.

**Palavras-chave**

Biorremediação, água subterrânea, gasolina, técnicas moleculares

## ABSTRACT

Gasoline hydrocarbons originating from underground leaks or surface spills pose a potential threat to the public health and quality of potable groundwater resources. The gasoline constituents, specially the aromatic fractions as benzene, toluene, ethylbenzene and xylene, can represent a serious risk for human health as some of them are considered carcinogens. In Brazil, 20-25% anhydrous ethanol is added to gasoline promoting a co-solvency effect and altering hydrocarbon solubility in water. Several methods can be employed to remove hydrocarbons from these contaminated sites and bioremediation is currently receiving favorable publicity as promising environmentally friendly treatment technologies for remediation.

The presence of hydrocarbonoclastic microorganisms in contaminated sites associated with biosurfactants and key enzymes is necessary to enhance biodegradation process. At present, two bioremediation techniques of groundwater contaminated with ethanol-bearing gasoline have been used, including biostimulation and bioaugmentation. Bioestimulation increases the activity of indigenous populations, already present at a site, by adding nutrients and or terminal electron acceptor and Bioaugmentation involves the addition of microbial strains to optimize the process.

With the objective of evaluating the impact of contamination and the implemented bioremediation technologies on the microbial communities, molecular tools have been employed. The molecular fingerprinting, performed with PCR-16S (*Polymerase Chain Reaction*) analysis associated with the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), can show changes in the band pattern of bacterial community before and after treatments, as the changes involving natural attenuation. This technique permits

the analysis of both cultivable and non cultivable, anaerobic and aerobic bacteria and provides a rapid method to observe the changes in community structure in response to different environmental factors. Such studies will facilitate the development of new bioremediation strategies.

**Keywords**

Bioremediation, groundwater, gasoline, molecular techniques.

## 1 | INTRODUÇÃO

As questões ambientais estão se tornando cada vez mais importantes para a sociedade, em função da maior percepção de que os recursos naturais estão cada vez mais escassos, e de que o desenvolvimento acelerado tem gerado problemas constantes de poluição que sempre foram negligenciados.

Os vazamentos provenientes de tanques de armazenamento subterrâneo de combustível (TAS), principalmente os que contêm gasolina, representam um risco potencial para a sociedade, se tornando um problema de saúde pública quando há o comprometimento das águas subterrâneas que abastecem uma determinada região (KAO e WANG, 2000; RIDGWAY *et al.*, 1990).

A fração aromática da gasolina constituída por benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) é considerada de maior interesse pelas Agências Reguladoras porque esses compostos são relativamente solúveis, tóxicos e comprometem a saúde humana. O benzeno é considerado carcinogênico e o tolueno e os xilenos são considerados tóxicos sistêmicos. A gasolina brasileira ainda recebe a adição de 20-26% de álcool etílico anidro, que provoca o efeito de co-solvência, aumentando, em até 20 vezes, a solubilidade de determinados compostos como o benzeno (OLIVEIRA *et al.*, 2004; LOVANH, HUNT e ALVAREZ, 2002; BÈRAUD, 1997).

As estratégias de tratamento a serem implementadas na recuperação desses locais contaminados devem ser realizadas levando-se em conta a quantidade e composição do contaminante, as características do solo e a profundidade do lençol d'água. A seleção da tecnologia mais adequada a ser empre-

gada será feita em função da melhor relação custo/eficiência e tempo de tratamento (CUNHA, 2004).

A Biorremediação vem se apresentando, portanto, como um processo bastante promissor, principalmente pela maior aceitação por parte das Agências Reguladoras e da Opinião Pública, por ser considerada uma forma natural de tratamento (MARGESIN e SCHINNER, 2001; RAHMAN *et al.*, 2002).

Dentre as várias técnicas de aplicação da Biorremediação *in situ*, a Bioestimulação é a forma mais imediata e simples de tratamento que envolve a adição de nutrientes e oxigênio necessários para acelerar o processo. Outras tecnologias vêm sendo desenvolvidas como a introdução de microrganismos endógenos, selecionados pelo potencial de degradar e/ou acelerar o processo (Bioaumento), ou a introdução de enzimas específicas, principalmente do grupo das dioxigenases, que são importantes na fase inicial de oxidação do anel benzênico (WILKSTRÖM *et al.*, 1996; HAMZAH e AL-BAHARNA, 1994).

Todos esses processos necessitam de um monitoramento eficaz para definir se a estratégia de tratamento implementada está se mostrando eficiente ou se está comprometendo, de forma negativa, o ecossistema local.

As técnicas de Biologia Molecular, associadas ao avanço no conhecimento da Bioinformática, tornaram possível uma avaliação e caracterização mais detalhada do ambiente. Essas ferramentas permitem avaliar a dinâmica populacional de um determinado ecossistema frente ao impacto causado pela presença do poluente e frente às diversas formas de tratamento utilizadas. Elas apresentam uma importância fundamental para desenvolver o conhecimento, a nível de microambiente, que até

então tem sido pouco explorado e pouco utilizado (ROSADO e DUARTE, 2002).

A análise de seqüências de RNA ribossômicos permite um conhecimento maior a cerca da filogenia e evolução microbiana (FREITAS, 2002; OLSEN, WOESE e OVERBEEK, 1994). O uso do gene 16S rRNA (*rrs*) nas técnicas de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e DGGE (Eletroforese em gel com Gradiente de Desnaturantes) permite uma avaliação da comunidade microbiana total de um ambiente. O *Fingerprinting* da comunidade gerado por essas técnicas serve para avaliar a diversidade estrutural de um ambiente natural e /ou após a interferência de fatores ambientais e da presença de um poluente (WATANABE, KODAMA e HARAYAMA, 2001; MACNAUGHTON *et al.*, 1999; ROSADO *et al.* 1997).

## 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 | Gasolina

A gasolina é um derivado do petróleo formado por uma grande variedade de hidrocarbonetos parafínicos, naftênicos, olefínicos e aromáticos, contendo de 4 à 14 átomos de carbono, compreendendo mais de 150 compostos cuja faixa de destilação varia de 30 à 220 °C. Pode ser produzida no processo de destilação direta do petróleo assim como no processo de craqueamento térmico ou catalítico de frações pesadas (OLIVEIRA *et al.*, 2004; SANTOS, 1992; FARAH, 1985).

A composição da gasolina é bastante diversificada em função do processo utilizado para a sua produção, das características do petróleo e dos aditivos nela adicionados. A ANP (Agência Nacional de Petróleo), através da portaria número 309, de 27 de dezembro de 2001, estabelece as especificações para comercialização de gasolinas automotivas em todo o território nacional e define obrigações dos agentes econômicos sobre o controle de qualidade do produto.

A gasolina é composta em média por 50 a 70% (em peso) de hidrocarbonetos alifáticos (parafinas e naftenos), 25 a 45% de aromáticos e até 20% de olefinas (BÈRAUD, 1997). Os hidrocarbonetos aromáticos são constituídos por benzeno, alquil-benzenos (tolueno, xileno, etc.) e policíclicos (naftaleno, antraceno, etc.). Além dos compostos citados, a gasolina também recebe a adição de álcool etílico anidro (20 - 25% v/v) para aumentar sua octanagem, melhorando suas características antidetonantes. Seu uso reduz em 40% a emissão de CO e hidrocarbonetos no ar, contribuindo, desta forma, para redução da poluição atmosférica.

A gasolina pode conter, também, antioxidantes que têm como objetivo evitar a formação da chamada goma, proveniente da oxidação da fração que fica fortemente aderida às paredes do carburador e válvulas, impedindo um melhor desempenho. Os detergentes e dispersantes utilizados diminuem, consideravelmente, a formação de depósitos no sistema de alimentação, melhorando a “performance” do motor (CUNHA e LEITE, 2000; FAIRBANKS, 1992).

A fração BTEX da gasolina (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) é considerada de maior importância no contexto ambiental uma vez que esses compostos são bastante solúveis em água, são tóxicos e legistados. O benzeno é classificado como carcinogênico, enquanto tolueno e xileno são classificados como tóxicos sistêmicos c. Portanto, esses compostos são indicadores específicos usados para caracterizar uma contaminação por gasolina.

## **2.2 | Tanques de Armazenamento Subterrâneo (TAS): Fonte de Contaminação por Gasolina**

As principais fontes de contaminação do solo e águas subterrâneas por gasolina são provenientes de vazamentos de tanques de armazenamento do combustível (TAS). Esses tanques são enterrados com o objetivo de ficarem protegidos contra qualquer perigo de explosão (KAO e WANG, 2000).

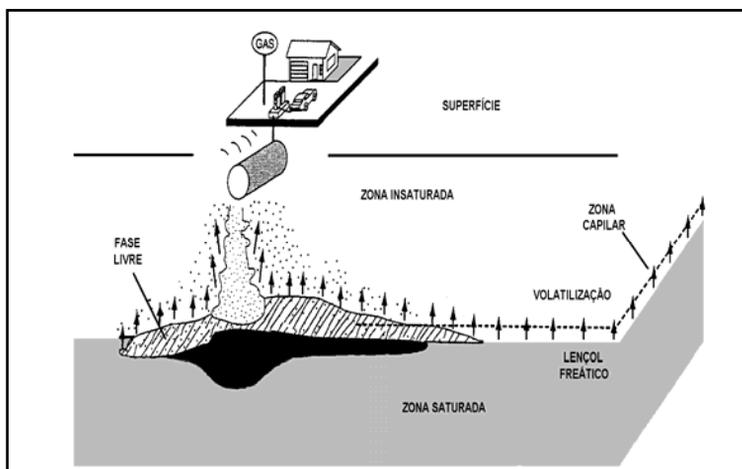
O vazamento é proveniente da corrosão desses reservatórios, geralmente constituídos de aço carbono, devido a vários fatores, entre eles a umidade. Esses tanques costumam apresentar vazamento num período médio de 20 anos após sua instalação, desde que não tenha sido feita uma proteção catódica. A perda gradual de gasolina devido a pequenas

rupturas no tanque, muitas vezes não é detectada pelo proprietário, podendo provocar incidentes de grandes proporções (OLIVEIRA *et al.*, 1991).

O vazamento provoca, pela ação da gravidade, infiltração vertical do combustível, podendo atingir o lençol freático. A quantidade do produto que chegará ao lençol será dependente da quantidade derramada assim como da profundidade do nível d'água e da quantidade que fica adsorvida no solo (OLIVEIRA *et al.*, 1992).

A Figura 1 apresenta o perfil de contaminação do solo e lençol freático por gasolina proveniente de vazamento de tanques de armazenamento (LAHVIS *et al.*, 1999). Uma boa parte da gasolina, ao migrar pela zona insaturada, fica retida no solo (matéria orgânica), especialmente a fração hidrofóbica, dificultando a extração física e formando a chamada fase sorvida. Esses compostos podem desorver vagarosamente e atingir o lençol freático, alcançando, ao longo do tempo, níveis consideráveis de contaminação (ROBINSON *et al.*, 1990). A fração que atinge o lençol freático se apresenta sob duas formas: a fração que se dissolve na água, formando uma pluma de contaminação denominada de fase dissolvida, e a fração hidrofóbica, que por ser menos densa que a água, fica localizada na superfície do lençol, formando uma fase livre. (CUNHA, 1996).

Muitas vezes, o transporte de hidrocarbonetos através do solo apresenta um perfil diferenciado, podendo migrar lateralmente. Esse transporte é favorecido pela presença de uma camada horizontal ou subhorizontal de condutividade hidráulica, apresentando, assim, caminhos preferenciais (OLIVEIRA *et al.*, 1992).



Fonte: Lahvis, 1999.

**Figura 1.** Perfil de contaminação após vazamento de TAS

O maior risco após um vazamento acidental é a contaminação do lençol freático, comprometendo a qualidade das águas de abastecimento (SOLANO-SERENA *et al.*, 1998). No entanto, em grandes centros urbanos, a pluma de contaminação poderá percorrer caminhos preferenciais, como tubulações de redes de esgoto, galerias de rede elétrica e particularmente o metrô, podendo provocar incêndios e explosões, colocando em risco a vida de seus usuários.

A quantidade de produto que se dissolve é dependente da solubilidade de seus compostos e do grau de mistura entre a fase livre e a água subterrânea. A solubilidade dos hidrocarbonetos presentes na gasolina é muito menor que a desses produtos isoladamente em água. Esse efeito é denominado co-solubilidade. Além desse fenômeno, a presença do etanol na gasolina brasileira provoca o efeito de co-solvência, aumentando o coe-

ficiente de partição dos compostos individuais e alterando, desta forma, a solubilidade dos hidrocarbonetos na água e, portanto, o perfil da contaminação (OLIVEIRA, 1992).

Na década de 70, houve um grande desenvolvimento econômico no Brasil e, conseqüentemente, um aumento na quantidade de postos revendedores de combustível. A experiência de outros países, como os EUA, nos mostrou que os tanques construídos nessa época, geralmente constituídos de chapas de aço carbono, corroíam e apresentavam vazamento num período aproximado de 20 anos à partir da sua instalação. Portanto, a partir dos anos 90 começou a existir uma preocupação maior com relação aos vazamentos e os riscos envolvidos na contaminação de solos e águas subterrâneas.

De acordo com os dados publicados pela Agência Nacional de Petróleo (ANP), o Brasil apresentava até março de 2006, 34.709 postos revendedores, sendo 2.089 no Estado do Rio de Janeiro e 8.484 no Estado de São Paulo (ANP, 2008).

### **2.3 | Legislação**

No Brasil, ainda não há uma legislação em nível federal para proteção ou remediação de solos e águas subterrâneas. Algumas leis existem somente em níveis locais, como no Estado de São Paulo. O valor de intervenção adotado pela CETESB indica “o limite de contaminação do solo e água subterrânea acima do qual há risco potencial à saúde humana. Ele será usado em caráter corretivo no gerenciamento de áreas contaminadas e quando for excedido irá requerer alguma forma de intervenção na área avaliada, de forma a interceptar as vias de exposição, devendo ser efetuada uma avaliação de risco caso a caso” (CASARINI *et al.*, 2001).

De acordo com o Relatório da CETESB de estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo, existe uma “tendência mundial que sugere a adoção de listas orientadoras com valores de referência de qualidade, de alerta e intervenção, como uma primeira etapa nas ações de monitoramento da qualidade, prevenção à poluição e diagnóstico de áreas suspeitas de contaminação, remetendo a avaliação de risco, caso a caso, para as áreas contaminadas. Cabe ressaltar que o uso de padrões internacionais pode levar a avaliações inadequadas, já que existem diferenças nas condições climáticas, tecnológicas e pedológicas de cada país, justificando o desenvolvimento de listas orientadoras próprias, compatíveis com as características de cada um deles” (CASARINI *et al.*, 2001; CETESB, 2005).

Nos EUA, o congresso americano estabeleceu em 1980 o CERCLA (Comprehensive Environmental Response, Compensation and Liability Act) mais conhecido como *superfund* que teve como objetivo principal identificar, analisar e remediar áreas contaminadas com resíduos perigosos. Novas tecnologias foram então desenvolvidas com o objetivo de obedecer aos critérios estabelecidos de tratamento. Neste contexto, a Biorremediação vem se apresentando como uma tecnologia promissora, tanto pelo interesse das agências reguladoras ambientais como pela maior aceitação por parte da opinião pública (USEPA/SUPERFUND, 2001; SEABRA, 2001; BOOPATHY, 2000).

## 2.4 | Biorremediação

Muitos termos têm sido usados para definir as reações que ocorrem durante a remediação de sítios contaminados. Se-

gundo NYER (1998), o termo “atenuação natural” parece ser o mais adequado para descrever todos os processos que estão acontecendo sem a intervenção do homem, sendo uma forma passiva de remediação.

A Agência de Proteção Ambiental Americana (US EPA'office) define o termo atenuação natural como “ o processo que envolve a biodegradação, dispersão, diluição, sorção, volatilização e/ou estabilização química e bioquímica do contaminante para reduzir efetivamente sua toxicidez, mobilidade ou volume a níveis que não ofereçam risco à saúde humana e ao ecossistema” (KAO e WANG, 2000; NYER, 1998).

Esta definição engloba tanto os processos bióticos quanto os abióticos para reduzir os níveis do contaminante. No entanto, a biodegradação é o mecanismo primário para atenuar os contaminantes que são biodegradáveis. De acordo com NYER e colaboradores (1998), o termo Biorremediação se refere, portanto, a todas as reações bioquímicas da atenuação natural. Esta técnica está sendo considerada adequada por oferecer baixos riscos aos sítios contaminados e é uma alternativa que favorece a relação custo-benefício do tratamento (MARGESIN e SCHINNER, 2001).

O princípio da Biorremediação se baseia na utilização de populações microbianas que possuam a habilidade de modificar ou decompor determinados poluentes. Pode-se utilizar a ação e/ou adição de microrganismos endógenos, assim como provenientes de outros sítios ou estirpes geneticamente modificadas. O principal objetivo é obter níveis de degradação até o limite de detecção do poluente ou abaixo dos valores aceitáveis ou estabelecidos pelas agências reguladoras. O benefício máximo deste processo é a completa mineralização dos compostos

assim como formação de biomassa (PRINCE *et al.*, 1993; CUNHA e LEITE, 2000; LANGWALDT e PUHAKKA, 2000). A intensidade da biodegradação de hidrocarbonetos em solo é influenciada por vários fatores que envolvem a população microbiana indígena, a disponibilidade de nutrientes e oxigênio, o pH, a temperatura, a qualidade, a quantidade e a biodisponibilidade do contaminante, assim como as propriedades do solo (MARGESIN, ZIMMERBAUER e SCHINNER, 2000).

Um dos primeiros relatos da utilização de hidrocarbonetos presentes na gasolina por microrganismos foi feito em 1942 por HAAS *apud* ZOBELL (1946). Ele isolou várias estirpes degradadoras de tanque de armazenamento subterrâneo (TAS) contendo gasolina. Aproximadamente 66% das culturas isoladas pertenciam ao gênero *Pseudomonas*, indicando que a habilidade em utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono é uma característica própria deste gênero.

Dentre os vários tratamentos que compõem o processo de Biorremediação *in situ*, a Bioestimulação parece ser o mais usual. Este tratamento envolve basicamente a adição de nutrientes (N e P) e oxigênio, necessários para estimular os microrganismos endógenos, acelerando o consumo da matéria orgânica presente (contaminante) (MARGESIN, ZIMMERBAUER e SCHINNER, 2000).

O nitrogênio é o nutriente mais comumente adicionado em processos de Biorremediação. Ele pode ser utilizado tanto para o crescimento celular ( $\text{NH}_4^+$  ou  $\text{NO}_3^-$ ) quanto como aceptor final de elétrons ( $\text{NO}_3^-$ ). Ele pode ser adicionado na forma de uréia ou cloreto de amônio, mas também pode ser utilizado como qualquer sal de amônio, como o nitrato de amônio (LIEBEG e CUTRIGHT, 1999). O fósforo pode ser empregado como fos-

fato de sódio, fosfato de potássio, sais orto fosfóricos e polifosfatos. Essas fontes são facilmente assimiladas pelo metabolismo microbiano, estimulando a biodegradação de hidrocarbonetos. O estímulo algumas vezes é imediato, mas pode requerer algum tempo para que o benefício seja evidente e raramente a adição de outros elementos, além de P, N e O<sub>2</sub>, pode estimular a biodegradação em ambientes naturais e impactados (ALEXANDER, 1999).

O oxigênio é o fator metabólico mais crítico no processo. Em função da concentração de oxigênio ser limitada nos ambientes subsuperficiais, a injeção de peróxido de hidrogênio como fonte de oxigênio é uma técnica bastante utilizada em tratamentos *in situ*. Dentre as vantagens da sua aplicação podemos citar o custo relativamente baixo envolvido na aplicação, a possibilidade de utilização de concentrações altas para prover suprimento de oxigênio maior do que a saturação com ar proporciona, além de não persistir no ambiente. As desvantagens do uso do peróxido incluem a toxicidez aos microrganismos e a rápida decomposição em ambientes subterrâneos (WATTS *et al.*, 2003; KORDA *et al.*, 1997; ATLAS, 1991).

A Biorremediação pode, também, utilizar além da população indígena, presente nos sítios para degradar os contaminantes, a adição de um inóculo microbiano proveniente dessa mesma microbiota indígena, que apresente capacidade de degradar ou produzir substâncias que favoreçam a eficiência do processo. Esse tipo de tratamento é denominado Bioaumento (CUNHA e LEITE, 2000; JANSSON *et al.*, 2000; LIEBEG e CUTRIGHT, 1999; CHEN e TAYLOR, 1997).

A utilização de microrganismos endógenos é preferencial aos provenientes de outros sítios ou aos microrganismos genética-

mente modificados, pois não necessita de um monitoramento mais incisivo e é mais “natural” do ponto de vista ecológico : as chamadas “tecnologias verdes” (CHEN e TAYLOR, 1997).

O uso do Bioaumento, como tecnologia de Biorremediação, tem sido bastante reportado na literatura (RUBERTO, VAZQUEZ e MAC CORMACK, 2004; BARATHY e VASUDEVAN, 2001; IWAMOTO e NASU, 2001; NOCENTINI, PINELLI e FAVA, 2000). A concentração do inóculo adicionado é um fator bastante importante para aumentar a taxa de biodegradação. A efetividade está diretamente relacionada à manutenção de uma concentração significativa durante todo o período de tratamento, muitas vezes conseguida através de adições periódicas. Esta inoculação intermitente pode permitir uma distribuição mais uniforme dos microrganismos na área tratada (GILBERT e CROWLEY, 1998).

A taxa de biodegradação de hidrocarbonetos é dependente de uma série de parâmetros físico-químicos como temperatura, pH, nutrientes inorgânicos e oxigênio. A capacidade de determinados microrganismos de produzir ou sintetizar enzimas específicas e essenciais ao processo é tão importante quanto a produção de biossurfatantes *in situ*, que promove a solubilização e transporte dos contaminantes, disponibilizando-os para o ataque microbiano (DÈZIEL *et al.* 1996).

#### 2.4.1 | Produção de Biossurfatantes

Uma das limitações nos processos de Biorremediação *in situ* é a baixa solubilidade dos hidrocarbonetos de petróleo, uma vez que parte fica aderida à matéria orgânica presente ou retida nos espaços da matriz do solo. Este fato impede a biodisponi-

bilidade desses poluentes, dificultando, conseqüentemente, sua biodegradação.

O uso de surfatantes sintéticos em sistemas de tratamento de solo contaminado por petróleo pode facilitar a recuperação dessas áreas, aumentando a área superficial para o ataque microbiano; porém, podem promover acúmulo desses compostos nos ecossistemas, podendo causar sérios danos ambientais (MULLIGAN e GIBBS, 2001; HEALY, DEVINE e MURPHY, 1996).

Como alternativa ao uso desses surfatantes sintéticos nos processos de Biorremediação podemos citar a adição de emulsificantes microbianos e/ou a estimulação da produção *in situ* de biossurfactantes pelos microrganismos endógenos. Este último tem recebido atenção especial por apresentar vantagens como baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, alta seletividade e pelo grande interesse no uso de produtos considerados naturais, principalmente pela maior aceitação por parte da opinião pública (MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; RAHMAN *et al.*, 2002).

Existe uma grande quantidade de microrganismos capazes de produzir diferentes tipos de biossurfactantes entre eles bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A quantidade produzida e sua estrutura química irão depender de alguns fatores como temperatura, pH, elementos traços e fontes de nitrogênio e fósforo, sendo necessário estudos preliminares para a otimização do processo (CUNHA *et al.*, 2004; RON e ROSENBERG, 2001).

Rahman e colaboradores (2002) testaram diferentes métodos de Biorremediação *ex situ* de solo contaminado com gasolina. Os resultados obtidos demonstraram que a adição de biossurfatante ao solo contaminado com gasolina aumentou as taxas

de biodegradação, em função da melhor solubilização desses hidrocarbonetos para degradação microbiana.

Os agentes tensoativos microbianos apresentam uma vasta aplicação em vários campos da indústria, incluindo a farmacêutica, a de cosméticos, na agricultura, assim como nos processos de tratamento de sítios contaminados com hidrocarbonetos de petróleo (BANAT, MAKKAR e CAMEOTRA, 2000; SIGH et al., 2007). O grande interesse atual incide em viabilizar tecnicamente sua produção *in situ* como estratégia de recuperação de ambientes impactados (RON e ROSENBERG, 2001; BOGNOLO, 1999).

#### 2.4.2 | Vias metabólicas e enzimas envolvidas no processo de degradação de hidrocarbonetos aromáticos

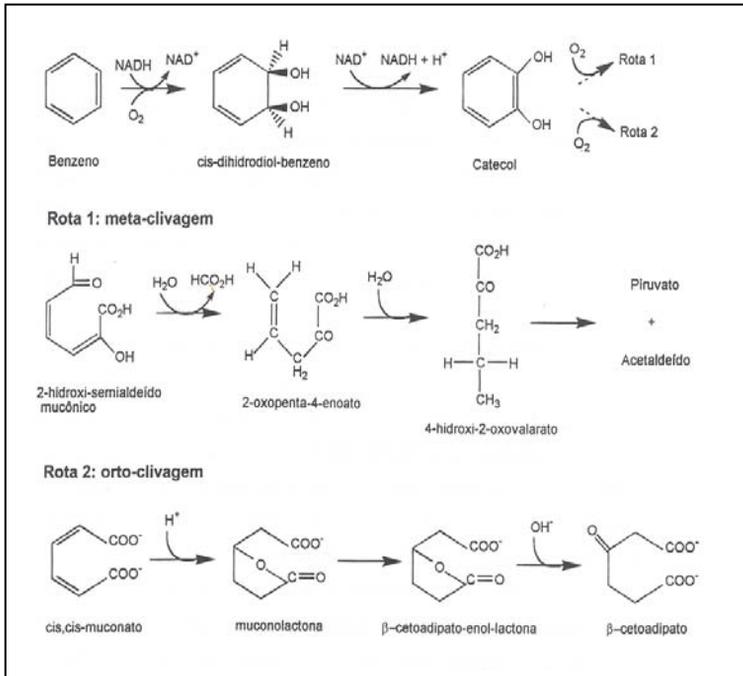
Uma grande quantidade de hidrocarbonetos aromáticos, presentes na natureza ou incorporados como compostos xenobióticos, pode ser degradada por vários microrganismos através de rotas catabólicas específicas.

As dioxigenases atuam no processo de biodegradação desses hidrocarbonetos aromáticos e compõem um sistema enzimático multicomponente possuindo uma faixa ampla de especificidade pelo substrato. Essas enzimas convertem os hidrocarbonetos aromáticos aos correspondentes arenos cis-diol (GIBSON e PARALES, 2000). A Figura 2 apresenta a oxidação do benzeno por duas diferentes vias metabólicas (URURAHY, 1998).

O intermediário cis-dihidrodiol é oxidado a catecol que é então facilmente convertido por rotas metabólicas conhecidas como a clivagem orto ( $\beta$ -cetoadipato) e a clivagem meta ( $\alpha$ -cetoadi-

pato) realizada pelas enzimas catecol 1,2 dioxigenase e catecol 2,3 dioxigenase, respectivamente (URURAHY, 1998; LOH e CHUA, 2002). Há, então, a formação de ácidos que são utilizados via ciclo do ácido tricarbóxico (WILKSTRÖM *et al.*, 1996; HAMZAH e AL-BAHARNA, 1994;).

A enzima catecol 2,3 dioxigenase catalisa a oxidação do catecol ao 2 hidroxí-semialdeído mucônico e sua atividade enzimática representa um potencial para sua produção comercial e aplicação industrial (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 2000). A detecção de genes catabólicos funcionais para avaliação do potencial de biodegradação por uma população bacteriana indígena em sítios contaminados tem sido bastante reportados (KASUGA *et al.*, 2007; MESEARCH *et al.*, 2000; SEI *et al.*, 1999). O interesse atual na estrutura e na funcionalidade dessas dioxigenases se deve, em parte, ao fato dos hidrocarbonetos aromáticos serem contaminantes em potencial de solos e águas subterrâneas e que sua remoção pelos microrganismos endógenos representa uma excelente solução de tratamento. O estudo, portanto, desses sistemas enzimáticos que oxidam o anel aromático, e a utilização de métodos moleculares associados à sua detecção são de importância fundamental em prover conhecimento científico para implantação, desenvolvimento e monitoramento de tecnologias de Biorremediação (JOHRI *et al.*, 1999; GIBSON, 2000).



Fonte: Ururahy, 1998.

**Figura 2.** Rotas metabólicas de degradação do benzeno

## 2.5 | Ecologia Microbiana Molecular

Em função do grande avanço tecnológico, foi possível verificar que o conhecimento a cerca da biodiversidade existente no planeta é praticamente insignificante. O estudo de caracterização e conhecimento da dinâmica de determinados ecossistemas ainda é pequeno apesar de todo o esforço que vem sendo realizado. Esta falta de conhecimento se deve em grande parte ao fato de que os microrganismos precisam ser cultivados para

serem caracterizados. Sabe-se hoje em dia que apenas uma pequena fração dos microrganismos presente no meio ambiente (0,1 a 10%) podem ser cultivados por técnicas-padrão. Essas técnicas clássicas, baseadas no cultivo desses microrganismos, além de possuírem um custo elevado, demandam um tempo relativamente grande para análise, havendo a possibilidade, também, de após várias gerações, os microrganismos apresentarem alterações fisiológicas e até genéticas significativas, como também a de só crescerem em meios específicos (ROSADO e DUARTE, 2002; THERON e CLOETE, 2000).

Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, associadas ao conhecimento em bioinformática, tornou-se possível a caracterização de comunidades microbianas mistas em determinados ecossistemas, revelando os grupos atuantes, muitos destes até então desconhecidos. Essa revolução do conhecimento possibilitou a criação de um novo campo na Microbiologia Ambiental denominado Ecologia Microbiana Molecular (ROSADO *et al.*, 1997).

Apesar da utilização dessas novas técnicas para o estudo da diversidade microbiana, as tradicionais, que envolvem enriquecimento e cultivo, também são fundamentais para obter um conhecimento mais detalhado a respeito de capacidades metabólicas e caracterização fenotípica, podendo, desta forma, chegar o mais próximo possível da caracterização do ambiente real.

A utilização de técnicas moleculares permite, portanto, um conhecimento mais aprofundado dos grupos microbianos presentes, após a seleção natural imposta por condições extremas, como a presença de substâncias poluentes e de suas

formas distintas de tratamento. Do ponto de vista técnico, esses métodos são viáveis porque são rápidos e sensíveis para identificar e monitorar a população microbiana presente e atuante no processo de Biorremediação (WILKSTRÖM *et al.*, 1996).

Os resultados obtidos com essas técnicas possibilitam definir com maior precisão o melhor processo de Biorremediação a ser implementado, desenvolvendo mecanismos que promovam a utilização máxima de um determinado grupo presente na comunidade microbiana. A presença de uma grande quantidade de cópias de um gene catabólico em uma área contaminada pode ser um indicativo de que esteja ocorrendo um processo de biodegradação natural ou que a estratégia de tratamento empregada seja eficiente.

As bactérias que, na presença de oxigênio, degradam hidrocarbonetos aromáticos, utilizam enzimas dioxigenases para ativar e clivar o anel, estando envolvidas na degradação de BTEX. Portanto, a detecção dos genes correspondentes, serve como base para monitorar o processo, se apresentando como excelentes indicadores (MESEARCH *et al.*, 2000). O gene que codifica a enzima catecol 2,3 dioxigenase tem sido bem caracterizado, permitindo o desenho de iniciadores específicos da família das dioxigenases (SEI *et al.*, 1999; MESHARCH *et al.*, 2000).

Mesearch e colaboradores (2000) desenvolveram iniciadores específicos para o gene que codifica a enzima catecol 2,3 dioxigenase (C23DO) com o objetivo de avaliar a biodegradação de solos impactados por petróleo. A utilização da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) competitivo demonstrou ser esta uma ferramenta poderosa para monitorar a Bior-

remediação e mostrar evidências de que a atenuação natural estava ocorrendo.

### 2.5.1 | Extração de ácidos nucleicos a partir de amostras ambientais

Os métodos de amostragem (coleta do material) representam uma etapa importante para utilização de técnicas moleculares (extração de DNA e/ou RNA para amplificação por PCR). A escolha do melhor método de extração está vinculada ao tipo de ácido nucleico a ser isolado e o tipo de ambiente estudado.

Existem muitos protocolos descritos para extração direta e indireta de DNA de solo (amostras ambientais). A extração direta envolve a lise celular direta na matriz seguida da extração do DNA (OGRAM *et al.*, 1987), enquanto a extração indireta envolve a separação das células para posterior lise e extração do DNA (TORSVIK, 1980; HOLBEN *et al.*, 1988). Em ambos os métodos, é necessário uma etapa posterior de purificação dos ácidos nucleicos (ROSADO *et al.*, 1997).

Uma grande parte desses protocolos foi testada em um número limitado de tipos de solo, principalmente com baixo conteúdo de matéria orgânica, não podendo, dessa forma, ser aplicado para todos os tipos de amostras ambientais (WILKSTRÖM *et al.*, 1996).

### 2.5.2 | RNA Ribossômico 16S (rRNA 16S)

As seqüências de RNA ribossomais 16S têm sido preferencialmente escolhidas para determinação da estrutura filogenética de espécies procarióticas porque apresentam vantagens como:

- encontram-se presentes em todos os organismos;
- parecem ser geneticamente estáveis;
- possuem tamanho razoável;
- derivam de um ancestral comum.

Essas moléculas são constituídas de regiões altamente conservadas entre organismos que compartilham aquela espécie de rRNA, e regiões variáveis, sendo o grau de variação nessas regiões específicas diferente. Portanto, a análise das seqüências dos RNAs ribossômicos, permite um conhecimento maior da filogenia e evolução microbiana (OLSEN, 1994; WOESE, 1987; ROSADO e DUARTE, 2002).

### 2.5.3 | PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A reação em cadeia da polimerase foi inicialmente descrita por SAIKI e colaboradores (1985). Esta técnica permite amplificar “in vitro” segmentos específicos de DNA, gerando várias cópias destes.

Para que a amplificação ocorra é necessário utilizar um par de iniciadores (*primers*) que flanqueiam a região alvo. Geralmente envolvem de 30 a 45 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo constituído de: 1) desnaturação do DNA, 2) anelamento dos *primers*, 3) extensão ou alongamento pela enzima *Taq* polimerase. A utilização desta enzima termoestável, obtida de *Thermus aquaticus*, se deve às altas temperaturas empregadas na desnaturação do DNA.

A eficiência e especificidade do método são influenciadas por uma série de fatores como o iniciador utilizado, o regime de repetição dos ciclos, os reagentes e suas concentrações, a

presença de aditivos, o grau de pureza das amostras entre outros (ROSADO *et al.* 1997).

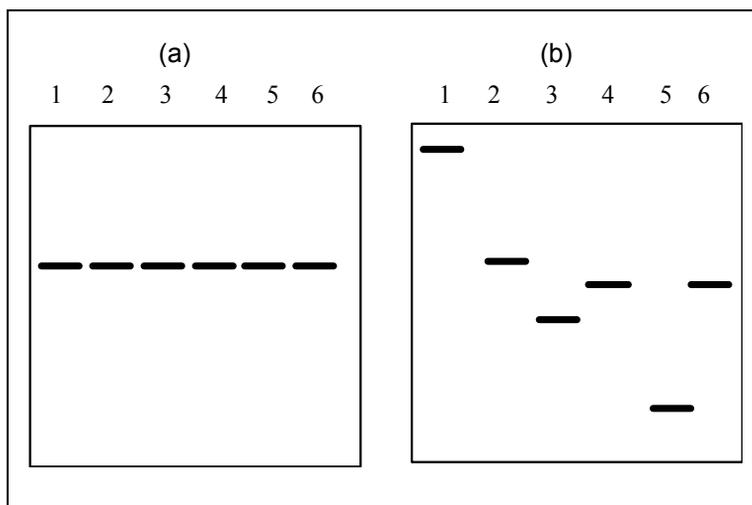
#### 2.5.4 | DGGE (Eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes)

Esta metodologia é aplicada na determinação direta da diversidade genética de populações microbianas complexas. Ela se baseia na eletroforese dos produtos de PCR em géis de poliacrilamida contendo um gradiente crescente de agentes desnaturantes (uréia e formamida). Os fragmentos que possuem o mesmo tamanho e seqüências nucleotídicas diferentes podem ser separados pela diferença na mobilidade das moléculas após a desnaturação química de seus domínios chamados “*Melting Domains*”.

A mobilidade eletroforética do DNA é sensível à estrutura secundária da molécula que pode ser helicoidal, parcialmente desnaturada e fita simples. Portanto, a desnaturação parcial promove uma movimentação mais lenta no gel comparada à molécula em fita dupla ou simples. As moléculas que possuem seqüências nucleotídicas diferentes irão parar de migrar em posições diferentes no gel, gerando perfis diferenciados, o que não era possível de verificar através da visualização em gel de agarose. A Figura 3 apresenta um esquema da visualização dos produtos de PCR em gel de agarose e separados através da eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) (ROSADO e DUARTE, 2002).

Através desta técnica é possível detectar, aproximadamente, 50% das variações de seqüências em fragmentos de DNA com até 500 pares de bases (MYERS, 1985). Quando se acrescenta à extremidade 5' de um dos iniciadores um “grampo” de

GC contendo de 30 a 50 nucleotídeos, há um impedimento da dissociação das fitas de DNA aumentando para 100% a detecção das variações existentes (MUYZER, 1993).



**Figura 3.** Produtos de PCR vistos após eletroforese em (a) gel de agarose e (b) em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE)

Esta técnica pode ser usada para complementar o monitoramento nos estudos de impactos ambientais. Além de avaliar a diversidade genética de amostras ambientais, estudando o efeito da presença de um determinado poluente na estrutura da comunidade microbiana, é possível verificar àqueles que se adaptam e atuam no processo de Biorremediação. Pode também ser aplicada no monitoramento de microrganismos inoculados *in situ*, avaliando sua permanência ou eliminação nos processos de Bioaumentação (FRANCO *et al.* 2006; IWAMOTO e NASU, 2001; KAO *et al.*, 2008).

### 3 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os vazamentos de gasolina provenientes de tanques de armazenamento e tubulações subterrâneas, em postos de serviço, são as principais fontes de contaminação do solo e águas subterrâneas por BTEX. Várias considerações sobre a aplicabilidade das tecnologias usuais de remediação desses sítios contaminados têm mostrado que os métodos físicos e químicos apresentam custos mais elevados, podendo ser em muitos casos inviáveis economicamente. Os processos biológicos oferecem uma grande quantidade de tecnologia alternativas e mais econômicas para o tratamento desses sítios. A avaliação do impacto causado sobre a comunidade microbiana, após estas diferentes formas de remediação, nos fornece informações importantes de comprometimento da técnica, ajudando a confirmar ou não sua aplicabilidade.

O conhecimento a cerca da biodegradação de compostos poluentes no meio ambiente tem sido bastante estudado através de métodos convencionais de cultivo em laboratório, isolando microrganismos degradadores, com potencial para atuação nos processos de remediação. A aplicação recente das técnicas moleculares tem mostrado uma maior diversidade destes microrganismos presentes em áreas impactadas, muitos deles diferentes dos isolados em condições laboratoriais. Portanto, as técnicas de ecologia microbiana molecular vão servir para detectar espécies dominantes que os métodos convencionais não conseguiriam. A maior razão para a incapacidade de detecção pelos métodos de cultivo convencionais se deve a diferença nas condições fisiológicas impostas pelo ambiente natural e pelo cultivo em laboratório, onde o aporte de nutrientes é consideravelmente diferente.

As comunidades microbianas em ambientes impactados tendem a se reorganizar, favorecendo o predomínio dos microrganismos mais aptos a utilizar e tolerar os compostos poluentes. Desta forma, as comunidades se tornam menos diversas do que no ambiente sem estresse, sendo dependentes tanto da complexidade do material poluente quanto da concentração e tempo de exposição dos microrganismos a estes compostos.

Neste contexto, as técnicas moleculares vem sendo muito utilizadas com o objetivo de monitoramento ambiental. O perfil da comunidade dominante gerado pela técnica de DGGE/TGGE de fragmentos de rRNA 16S tem sido empregado para examinar os efeitos das diferentes técnicas de biorremediação utilizadas, sobre a comunidade bacteriana endógena, numa quantidade bem grande de situações envolvendo experimentos tanto em escala laboratorial, planta-piloto quanto em campo. Atualmente a vantagem de utilizar o gene 16S rRNA (*rrs*) incide na grande base de dados disponível, mas a medida que novos genomas forem sequenciados, novos genes poderão ser utilizados como marcadores moleculares.

Novas técnicas moleculares vêm surgindo, em especial as que utilizam genes funcionais, para ajudar a elucidar as funções desempenhadas por populações específicas no ambiente e com isso contribuir para definir uma melhor estratégia de remediação de ambientes impactados e oferecer uma contribuição direta sobre a eficiência do processo.

## GLOSSÁRIO

Ácidos nucleicos – Macromoléculas contendo unidades repetidas de nucleotídeos. Podem ser classificadas como DNA (ácido desoxirribonucléico) e RNA (ácido ribonucléico)

BTEX – Fração de hidrocarbonetos aromáticos composta por benzeno, tolueno, etilbenzeno, o-xileno, m-xileno e p-xileno.

DGGE – Técnica para obtenção do perfil de comunidades microbianas através das diferenças na composição de sequências de DNA em diferentes organismos, separadas por eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes .

PCR-16S – método de amplificação *in vitro* de um fragmento do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico.

*Fingerprinting* – termo literal “impressão digital” que se refere ao perfil característico das comunidades microbianas estudadas.

16S rRNA (*rrs*) – Gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico. Considerado um cronômetro molecular.

## BIBLIOGRAFIA

- Agência Nacional de Petróleo (ANP)b. Disponível na INTERNET via [http://www.anp.gov.br/documentos/portarias/p009\\_1997.pdf](http://www.anp.gov.br/documentos/portarias/p009_1997.pdf), arquivo consultado em julho de 2008.
- ALEXANDER, M. In: Biodegradation and bioremediation. Academic Press, 2<sup>nd</sup> ed., San Diego, California, 239p, 1999.
- ATLAS, R. M. Microbial hydrocarbon degradation: bioremediation of oil spill. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 52: 149-156, 1991.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl. Microbiol Biotechnol.** 53: 495-508, 2000.
- BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Environ. International** 26: 413-416, 2001.
- BÈRAUD, J. F. Introduction. In: **Handbook of diagnostic procedures for petroleum-contaminated sites**. LECOMTE, P., MARIOTTI, C. (Ed.) Chichester: John Wiley & Sons., 1997.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** 152: 41-52, 1999.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology** 74: 63-67, 2000.
- CASARINI, D. C. P. Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo. CETESB, São Paulo. 247p., 2001.
- CETESB. Decisão de Diretoria Nº 195-2005- E, de 23 de novembro de 2005, Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo – 2005, em substituição aos Valores Orientadores

de 2001, e dá outras providências. Disponível na internet via: [http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela\\_valores\\_2005.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf), arquivo consultado em julho de 2008.

CHEN, C.-I. ; TAYLOR, R. T. Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. **Appl Microbiol Biotechnol** 48: 121-128, 1997.

CUNHA, C. D. Avaliação da Biodegradação de gasolina em solo. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro ,1996.

CUNHA, C. D. Avaliação de diferentes tecnologias de biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente. **Dissertação de Doutorado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro ,2004.

CUNHA, C. D. da; LEITE, S. G. F. Gasoline Biodegradation in different soil microcosms. **Brazilian Journal of Microbiology** 31: 45-49, 2000.

CUNHA, C. D.; ROSÁRIO, M.; ROSADO, A. S.; LEITE, S. G. Serratia sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. **Process Biochemistry** 39(12):2277-2282, 2004.

DÈZIEL, E.; PAQUETTE, G.; VILLEMUR, R.; LÉPINE, F. e BISAILLON, J. Biosurfactant production by a soil Pseudomonas strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology** 62(6): 1908-1912, 1996.

FAIRBANKS,M.M. Consumidor Ganha Novas Gasolinas. **Revista Química e Derivados**. 298:16-18, 1992.

FARAH,M.A. Caracterização do Petróleo e seus Produtos, Parte 1- Combustíveis, Petrobrás - CENPES / DIVEN, 1985.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J. M.; ALI, S.; COWAN, D. Immobilization of functionally unstable catechol-2,3-dioxygenase

- greatly improves operational stability. **Enzyme and Microbial Technology** 26: 568-573, 2000.
- FRANCO, N. O.; CUNHA, C. D.; ROSADO, A. S. Métodos Moleculares para análise de comunidades microbianas em ambientes aquáticos: III. DGGE. **Boletim da Sociedade Brasileira de Limnologia** 35(3): 67-71, 2006.
- FREITAS, F. F. Análise molecular da comunidade bacteriana presente em microcosmos contaminado com óleo cru. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Rio de Janeiro, 85p, 2002.
- GIBSON, D.T.; PARALES, R.E. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology** 11: 236-243, 2000.
- GILBERT, E. S.; CROWLEY, D. E. Repeated application of carvone-induced bacteria to enhance biodegradation of polychlorinated biphenyls in soil. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 50: 489-494, 1998.
- HAMZAH, R. Y. & AL-BAHARNA, B. S. Catechol ring-cleavage in *Pseudomonas cepacia*: the simultaneous induction of ortho and meta pathways. **Appl. Microbiol Biotechnol.** 41: 250-256, 1994.
- HEALY, M. G.; DEVINE, C. M.; MURPHY, R. Microbial production of biosurfactants. **Resources, Conservation and Recycling** 18:41-57, 1996.
- HOLBEN, W. E.; JANSSON, J. K.; CHELM, B. K.; TIEDJE, J. M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. **Appl. Environ. Microbiol.** 54:703-711, 1988.
- IWAMOTO, T.; NASU, M. Current bioremediation practice and perspective. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 92(1): 1-8, 2001.
- JANSSON, J. K.; BJÖRKLÖF, K.; ELVANG, A. M.; JORGENSEN, K. S. Biomarkers for monitoring efficacy of bioremediation by microbial inoculants. **Environmental Pollution** 107: 217-223, 2000.

- JOHRI, A. K.; DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N. e LEGGE, R. L. Characterization and regulation of catabolic genes. **Critical Reviews in Microbiology** 25 (4): 245-273 ,1999.
- KAO, C. M.; CHEN, C. Y.; CHEN, S. C.; CHIEN, H. Y.; CHEN, Y. L. Application of in situ bioremediation to remediate a petroleum-hydrocarbon spill site: Field and microbial evaluation. **Chemosphere** 70:1492–1499,2008.
- KAO, C.M.; WANG, C.C. Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. **Wat. Res.** 34 (13): 3413-3423, 2000.
- KASUGA, I.; NAKAJIMA, F.; FURUMAI, H. Diversity of catechol 2,3-dioxygenase genes of bacteria responding to dissolved organic matter derived from different sources in a eutrophic lake. **FEMS Microbiol Ecol** 61: 449–458, 2007.
- KORDA, A.; SANTAS, P.; TENENTE, A.; SANTAS, R. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48: 677-686, 1997.
- LAHVIS, M.A.; BAEHR, A. L. e BAKER, R.J. Quantification of aerobic biodegradation and volatilization rates of gasoline hydrocarbons near the water table under natural attenuation conditions. **Water Resources Research**, 35 (3):753-765, 1999.
- LANGWALDT, J. H. & PUHAKKA, J. A. On-site biological remediation of contaminated groundwater: a review. **Environmental Pollution** 107: 187-197, 2000.
- LIEBEG, E. W.; CUTRIGHT, T. J. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 44: 55-64, 1999.
- LOH, K-C.; CHUA, S-S. *Ortho* pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of *meta* pathway at high substrate concentrations. **Enzyme and Microbial Technology**, 30:620-626, 2002.

- LOVANH, N.; HUNT, C. S.; ALVAREZ, P. J. J. Effect of ethanol on BTEX biodegradation kinetics: aerobic continuous culture experiments. **Water Research**, 36: 3739-3746, 2002.
- MACNAUGHTON, S. J.; STEPHEN, J. R.; VENOSA, A. D.; DAVIS, G. A.; CHANG, Y-J.; WHITE, D. C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. **Appl. Environ. Microbiol.** 65(8): 3566-3574, 1999.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 58(4): 428-434, 2002.
- MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation (Natural Attenuation and Bioestimulation) of Diesel-Oil-Contaminated soil in a alpine glacier skiing area. **Applied and Environmental Microbiology** 67(7): 3127-3133, 2001.
- MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. **Chemosphere** 40: 339-346, 2000.
- MESEARCH, M. B.; NAKATSU, C. H.; NIES, L. Development of catechol 2,3-dioxygenase – specific primers for monitoring bioremediation by competitive quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology** 66 (2): 678-683, 2000.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology** 60:371-380, 2001.
- MUYZER, G.; DE WAAL, E. C. e UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology** 59 (3): 695-700, 1993.
- MYERS, R. M.; FISCHER, S. G.; LERMAN, L. S.; MANIATIS, T. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a

- GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel eletrophoresis. **Nucleic Acids Research** 13: 3131-3145, 1985.
- NOCENTINI, M.; PINELLI, D.; FAVA, F. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures : the residual concentration problem. **Chemosphere** 41: 1115-1123, 2000.
- NYER, E.K. In: Groundwater and soil remediation: practical methods and strategies. Ann Arbor Press, Michigan ,1998.
- OGRAM, A.; SAYLER, G. S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **J. Microbiol Methods** 7: 57-66, 1987.
- OLIVEIRA, E. Contaminação de aquíferos por hidrocarbonetos provenientes de vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneo. **Dissertação de Mestrado**, Universidade de São Paulo, Instituto de Geociências, São Paulo, 111p., 1992.
- OLIVEIRA, F. S., TEIXEIRA, L. S. G., ARAUJO, M. C. U., KORN, M. Screening analysis to detect adulterations in Brazilian gasoline samples using distillation curves. **Fuel** 83: 917-923, 2004.
- OLIVEIRA,E.; CLEARY,R.W.; CUNHA,R.C.A.; PACHECO,A.. Gasoline Hydrocarbons: Groundwater Pollution Potencial in Metropolitan São Paulo. **Wat. Sci. and Tech.** 24(11) :189-200 (1991).
- OLSEN, G. J.; WOESE, C. R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology** 176 (1): 1-6, 1994.
- PRINCE, R. C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. **Critical Reviews in Microbiology**, 19(4): 217-242, 1993.
- RAHMAN, K. S. M.; BANAT, I. M. ; THAHIRA, J. ; THAYUMANAVAN, T. ; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poltry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. **Bioresource technology** 81: 25-32, 2002.

- RIDGWAY, H. F.; PHIPPS, S. D.; CLARK, D. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. **Appl. Environ. Microbiol.** 56(11): 3565-3575, 1990.
- ROBINSON, K.G.; KIM, K.; FARMER, W.S.; NOVAK, J.T. Bioremediation Removes Gasoline Residues. **Pollution Engineering** 22(8): 76-79, 1990.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology** 3(4): 229-236, 2001.
- ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: Genética e Melhoramento de Microrganismos. Mello, I. S. (ed.). EdUSP, São Paulo (2002).
- ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; van ELSAS, J. D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia** 28: 135-147, 1997.
- RUBERTO, L.; VAZQUEZ, S. C.; MAC CORMACK, W. P. Effectiveness of the natural bacteria flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. **International Biodeterioration & Biodegradation** (in press), 2004.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLINS, K. B. & ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239: 487-494. (1985).
- SANTOS, M.A.E. Gasolina Brasileira x Gasolina Exterior. **Seminário sobre Qualidade e uso da Gasolina**. I.B.P., Rio de Janeiro, 82-94 pp, 1992.
- SEABRA, P.N. Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria de petróleo. **II Workshop sobre Biodegradação**. Campinas, SP, 2001.

- SEI, K.; ASANO, K-I.; TATEISHI, N.; MORI, K.; IKE, M.; FUJITA, M. Design of PCR primers and gene probes for the general detection of bacterial populations capable of degrading aromatic compounds via catechol cleavage pathway. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 88(5): 542-550, 1999.
- SIGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O.P. Biosurfactants in Microbiology and Biotechnology: Part II. Application aspects. **Biotechnology advances** 25: 99-121, 2007.
- SOLANO-SERENA, F.; MARCHAL, R.; BLANCHET, D.; VANDECASTEELE, J-P. Intrinsic capacities of soil microflorae for gasoline degradation. **Biodegradation** 9: 319-326, 1998.
- THERON, J.; CLOETE, T. E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Critical Reviews in Microbiology** 26 (1): 37-57, 2000.
- TORSVIK, V. L.; GOKSOYR, J. Isolation of bacterial DNA from soil. **Soil Biol. Biochem.** 12:15-21, 1980
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY/ SUPERFUND. Disponível na Internet via <http://www.epa.gov/superfund/index.htm>. arquivo consultado em 2008.
- URURAHY, A. F. P. Biodegradação de resíduo oleoso proveniente de refinaria de petróleo. **Dissertação de Doutorado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, 344p, 1998.
- WATANABE, K.; KODAMA, Y.; HARAYAMA, S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. **Journal of Microbiological Methods** 44: 253-262, 2001.
- WATTS, R. J.; WASHINGTON, D.; HOWSAWKENG, J.; LOGE, F. J.; TEEL, A. L. Comparative toxicity of hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and superoxide anion to *Escherichia coli*. **Advances in Environment Research** 7: 961-968, 2003.

- WILKSTRÖM, P.; WIKLUND, A.; ANDERSSON, A-C.; FORSMAN, M. DNA recovery and PCR quantification of catechol 2,3-dioxygenase genes from different soil types. **Journal of Biotechnology** 52:107-120, 1996.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews** 51: 221-271, 1987.
- ZOOBEL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Bact. Review** 10:1-49, 1946.

## SÉRIES CETEM

As Séries Monográficas do CETEM são o principal material de divulgação da produção científica realizada no Centro. Até o final do ano de 2007, já foram publicados, eletronicamente e/ou impressos em papel, cerca de 200 títulos, distribuídos entre as seis séries atualmente em circulação: Rochas e Minerais Industriais (SRMI), Tecnologia Mineral (STM), Tecnologia Ambiental (STA), Estudos e Documentos (SED), Gestão e Planejamento Ambiental (SGPA) e Inovação e Qualidade (SIQ). A Série Iniciação Científica consiste numa publicação eletrônica anual.

A lista das publicações poderá ser consultada em nossa homepage. As obras estão disponíveis em texto completo para download. Visite-nos em <http://www.cetem.gov.br/series>.

### Últimos números da Série Tecnologia Ambiental

**STA-46 – Fungos filamentosos: agentes de degradação de petróleo e de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs).** Judith Liliana Solórzano Lemos, Claudia Afonso Barros, Sabrina Dias de Oliveira e Acácia Pedrazza Reiche, 2008.

**STA-45 – Emprego de Fungos Filamentosos na Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo: Estado da Arte.** Sabrina Dias de Oliveira, Judith Liliana Solórzano Lemos e Claudia Afonso Barros, 2008.

**STA-44 - Neutralização de Emissão de Gases de Efeito Estufa: um Indicador de Desenvolvimento Sustentável nas Responsabilidades Socioambiental Empresarial e Individual.** Eraldo José Brandão, Luis Gonzaga Santos Sobral, Ana Claudia Nioac de Salles e Sueli Mello Braga, 2008.

## **INFORMAÇÕES GERAIS**

CETEM – Centro de Tecnologia Mineral  
Avenida Pedro Calmon, 900 – Cidade Universitária  
21941-908 – Rio de Janeiro – RJ  
Geral: (21) 3867-7222  
Biblioteca: (21) 3865-7218 ou 3865-7233  
Telefax: (21) 2260-2837  
E-mail: [biblioteca@cetem.gov.br](mailto:biblioteca@cetem.gov.br)  
Homepage: <http://www.cetem.gov.br>

## **NOVAS PUBLICAÇÕES**

Se você se interessar por um número maior de exemplares ou outro título de uma das nossas publicações, entre em contato com a nossa biblioteca no endereço acima.

Solicita-se permuta.

We ask for interchange.