



Isolamento de linhagens bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos BTEX proveniente do setor petroquímico

Isolation of BTEX hydrocarbon degrading bacterial strains from the petrochemical sector

T. M. Padilha¹; J. Sampaio²; L. Longoni²; A. Beneduzi^{1,2*}

¹Ciências Biológicas, Universidade La Salle (UNILASALLE), CEP 92010-000, Canoas-RS, Brasil

²Departamento de Diagnóstico e Pesquisa Agropecuária (DDPA) Secretaria da Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul (SEAPI), CEP 90130-060, Porto Alegre-RS, Brasil

*anelise.silveira@unilasalle.edu.br

(Recebido em 20 de junho de 2017; aceito em 29 de setembro de 2017)

O petróleo e seus derivados são responsáveis por impactos ambientais significativos e a fração dos hidrocarbonetos aromáticos BTEX é amplamente utilizada, mesmo sendo considerada altamente tóxica. Sabendo que áreas com histórico de contaminação de hidrocarbonetos possuem microrganismos capazes de sobreviver ao contaminante e que a biodegradação pode ser utilizada para minimizar ou remover estes poluentes do ambiente, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar linhagens bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos do tipo BTEX, provenientes de um solo com histórico de vinte e dois anos de contaminação do setor petroquímico em Triunfo/RS. Para isso foram coletadas amostras de solo em células de *landfarming*, com histórico de disposição de compostos derivados do petróleo e estas foram preparadas em três concentrações de BTEX (0,5%; 1%; 1,5%) como única fonte de carbono. Foram obtidos 122 isolados e estes foram testados quanto à sua capacidade de biodegradação de 5%, 10% e 20% do contaminante, sendo selecionados onze isolados promissores (linhagens 8, 10, 15, 17, 23, 24, 62, 64, 99, 126 e 128), destacando-se a linhagem 62 (*Pseudomonas* sp.) que cresceu em 20% de BTEX. Através do sequenciamento do gene 16S rRNA foi possível identificar principalmente isolados dos gêneros *Bacillus* (linhagens 8, 10, 15, 17 e 23), *Pseudomonas* (linhagens 24,62, 64, 99 e 128) e um isolado de *Paenibacillus jamilae* (linhagem 126).
Palavras-chave: bactérias, biodegradação, petróleo.

Petroleum and its derived products are responsible for significant environmental impacts and BTEX aromatic hydrocarbons fraction is widely used, although considered highly toxic. It is known that areas with a hydrocarbon contamination history have microorganisms capable of surviving and that biodegradation can be used to minimize or remove these pollutants from the environment. The objective of this work was to isolate and identify BTEX degrading bacterial strains from a soil with a history of twenty-two years of petrochemical sector contamination in Triunfo/RS. For this, soil samples were collected in *landfarming* cells, with a history of petroleum derived products disposition. The samples were prepared with three concentrations of the BTEX contaminant (0.5%, 1%, 1.5%) as the only carbon source. A total of 122 bacterial isolates were tested for biodegradability with 5%, 10% and 20% of BTEX contaminant, and eleven promising strains were selected (8, 10, 15, 17, 23, 24, 62, 64, 99, 126 and 128 strain), where the 62 strain (*Pseudomonas* sp.) grew in 20% of BTEX. Through the 16S rRNA gene sequencing was possible to identify mainly isolates of the *Bacillus* (8, 10, 15, 17 and 23 strain) and *Pseudomonas* genus (linhagens 24,62, 64, 99 and 128 strain) and one strain of *Paenibacillus jamilae* (126).
Key words: bacteria, biodegradation, petroleum.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o aumento populacional e o consequente aumento das atividades industriais vem contribuindo para o agravamento dos problemas ambientais. A exploração, o transporte e o armazenamento do petróleo e de seus derivados podem ocasionar problemas à saúde humana, afetar a qualidade dos recursos hídricos e reduzir a utilização do solo [1]. Em um último levantamento, realizado em julho de 2014, a produção de petróleo no Brasil alcançou a marca de 2,267 milhões de barris por dia, tratando-se do maior volume já registrado pelo país [2].

Entre as várias substâncias que compõem o petróleo estão os hidrocarbonetos aromáticos, principalmente os compostos BTEX, ou seja, benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos que são

derivados da fração monoaromática do petróleo, que além de serem encontrados na gasolina, são amplamente utilizados como matéria-prima para as indústrias de solvente, pesticidas, plásticos e fibras sintéticas, representando assim, um contaminante em potencial ao meio ambiente [3]. Os compostos BTEX são mais tóxicos que os compostos alifáticos possuindo uma maior mobilidade em água, e quando liberados no ambiente podem volatilizar, dissolver e aderir às partículas de solo. Devido a esta maior solubilidade, principalmente do benzeno, atingem rapidamente o lençol freático podendo causar problemas se entrarem na cadeia alimentar, no solo ou em reservatórios de água potável, pois possuem alta toxicidade [4]. Devido a estas características, eles são classificados como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA - *Environmental Protection Agency*).

Os danos que estes derivados do petróleo causam à saúde humana já são conhecidos, devido a sua toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade, sendo que todos os compostos BTEX atuam como depressores do sistema nervoso central [5]. Devido aos problemas ambientais e de saúde causado pelos componentes aromáticos, foram desenvolvidos diversos tratamentos físicos, químicos e biológicos para a minimização destes problemas [4]. Os métodos físicos mais comumente utilizados são o acondicionamento em aterros e a incineração, mas estes métodos podem gerar resíduos tão ou mais tóxicos que o petróleo. Os processos químicos utilizam resinas e polímeros, mas contribuem para a perturbação do ambiente, enquanto os métodos biológicos apresentam vantagens, tais como, o baixo custo, a possibilidade de realização *in situ* ou *ex situ*, a ausência de subprodutos poluentes e o baixo impacto ambiental [6].

A biodegradação é um método biológico em que determinados microrganismos utilizam as substâncias contaminantes como fonte de carbono e energia, agindo assim na quebra destes compostos orgânicos. A biorremediação é uma técnica biotecnológica onde microrganismos biodegradadores são utilizados para a redução de impactos causados ao meio ambiente por contaminantes [7] e por ser uma estratégia ecologicamente viável ao transformar compostos quimicamente complexos em compostos mais simples, vem atraindo muitos estudos a fim de melhorar a sua aplicabilidade [8]. A remediação pode ocorrer de forma completa, transformando o composto orgânico poluente em CO₂, água e biomassa, sendo esta reação chamada de mineralização [9]. Sabe-se que em ambientes com histórico de contaminação, ocorre o aumento da população bacteriana no local em cerca de 10%, pois a poluição do solo é uma forma de selecionar as espécies mais adaptadas e com capacidade de degradar e utilizar o contaminante como fonte de carbono, mas estes microrganismos degradadores podem ser encontrados também em áreas que não foram poluídas, porém em menor quantidade [10]

O sucesso da biodegradação está relacionado à diversidade metabólica dos microrganismos e às limitações próprias do local, como pH, umidade, temperatura, oxigênio, nutrientes [11], assim como a concentração, o tipo de contaminante da área e a densidade populacional dos microrganismos degradadores. Por isso a necessidade de conhecer-se a área contaminada para aperfeiçoar as condições para um melhor tratamento, seja este *in situ* ou *ex situ* [12]. Além das condições ambientais, o tipo de solo também é importante para que ocorra a biorremediação, pois a textura e a porosidade estão diretamente ligadas à densidade e a permeabilidade dos gases e da água no solo. Os solos argilosos tendem a tornar o contaminante menos disponível para a microbiota, pois formam uma ligação forte com os radicais deste, retendo através da adsorção mais contaminantes que os solos arenosos, que são tratados mais facilmente [13].

Sendo o petróleo constituído por diversos componentes, são necessários consórcios microbianos para que a biodegradação ocorra de forma mais eficiente, possibilitando assim, uma maior versatilidade metabólica [14]. A degradação de compostos orgânicos está amplamente descrita na literatura, sendo a via aeróbica a mais comum por possuir uma série de reações [15]. El-Naas et al. (2014) [16] descrevem a biodegradação dos compostos aromáticos tendo início pela atividade enzimática de uma mono-oxigenase ou dioxigenase, havendo a adição de um ou dois átomos de oxigênio no substrato, ou então ocorrendo por reações denominadas como não-específicas e obtendo-se os mesmos produtos das reações promovidas pelas oxigenases, ou seja, a oxidação da molécula formando diol seguido da subsequente clivagem do anel, onde o piruvato é um dos

principais intermediários desta reação, enquanto os produtos majoritários são a biomassa e o dióxido de carbono.

Sabendo-se que áreas com histórico de contaminação de hidrocarbonetos possuem microrganismos capazes de sobreviver ao contaminante e que a biodegradação pode ser utilizada para minimizar ou remover estes poluentes do ambiente, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar linhagens bacterianas degradadoras de hidrocarbonetos do tipo BTEX, provenientes de um solo com histórico de vinte e dois anos de contaminação do setor petroquímico em Triunfo/RS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Local de coleta

As amostras de solo foram coletadas de células de *landfarming* localizadas no Sistema Centralizado de Controle de Resíduos Sólidos do Pólo Petroquímico do Sul – SICECORS/CORSAN, na cidade de Triunfo/RS. O SICECORS apresenta um histórico de aproximadamente 22 anos de disposição de resíduos sólidos com presença de compostos derivados do petróleo. Existem quatro células de *landfarming* na área de tratamento, que foram desativadas há 12 anos. Dois pontos aleatórios em cada uma de duas células desativadas foram escolhidos, totalizando quatro amostras (1A, 1B, 2A e 2B). O material coletado foi encaminhado para análise no Laboratório de Microbiologia/Unilasalle, situado em Canoas/RS.

Isolamento das linhagens bacterianas biodegradadoras

O meio de cultura utilizado para o isolamento e crescimento das linhagens bacterianas foi o meio mineral de *Bushnell-Hass* (BH): 1g/L de K_2HPO_4 , KH_2PO_4 e NH_4NO_3 ; 0,2g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,05g/L de $FeCl_3 \cdot 2H_2O$ e 0,02g/L de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. Para o meio sólido foi adicionado 15g/L de ágar [17]. Foram preparadas 12 (doze) amostras em *erlemeyers* contendo 90mL do meio líquido BH enriquecido com três concentrações diferentes do contaminante BTEX: 0.5%, 1% e 1.5%. A maior fração da mistura de BTEX utilizada era de Benzeno (56,91%), de acordo com as medições realizadas previamente pelo SICECORS/CORSAN conforme Tabela 1.

Tabela 1. Composição da solução de BTEX utilizada.

Composto	Concentração
Benzeno	56,91% _m
C5-	<10% _m
C8 aromático	15,11% _m
C9+ aromático	2,87 % _m
Tolueno	24,97% _m
Não aromáticos	1441 ppm

Foram adicionados 10g do solo coletado no *landfarming* em cada uma das doze amostras e após este procedimento foram realizadas diluições seriadas até 10^{-3} das quais foram retiradas alíquotas de 0,1mL e inoculadas em triplicatas nos meios de cultura ágar BH + BTEX (0.5%, 1% e 1.5%) para a contagem, o isolamento e a seleção de colônias bacterianas biodegradadoras. As colônias foram selecionadas aleatoriamente, sendo repicadas para o meio líquido King-B (20g/L de peptona bacteriológica; 1,15g/L de K_2HPO_4 ; 1,5g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 15g/L de glicerol [18] e estas foram incubadas a 30°C por até 48 horas [17].

Teste de crescimento na presença de diferentes concentrações do contaminante dos isolados bacterianos obtidos

Todos os isolados bacterianos foram repicados em tubos fechados contendo meio BH com três diferentes concentrações do contaminante BTEX: 5%, 10% e 20%. Os isolados que obtiveram crescimento nas concentrações de 10% de BTEX foram selecionados e caracterizados pela

coloração de Gram para a análise preliminar morfológica, verificação da pureza e foram repicados para o meio Ágar Tripton de Soja (TSA) e em glicerol 20% para estocagem à -20°C.

Extração de DNA

O DNA total dos isolados foi extraído pelo método de fenol-clorofórmio com modificações [19] no Laboratório de Microbiologia Agrícola do DDPA/SEAPI. As células previamente crescidas tiveram uma alíquota de 1,5mL do meio de cultura centrifugado por 3 minutos a 9.660g rpm. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado ao precipitado 700µL de TES (10mL/L de Tris 1M pH 8; 50mL/L de EDTA 0,5M pH 8 e 30mL/L de NaCl 5M), e novamente centrifugados por 5 min a 9.660g. O sobrenadante foi descartado e então adicionado 500µL de TE1 (10mL/L de Tris 1M pH 8 e 50mL/L de EDTA 0,5M pH 8) e 25µL de lisozima e então incubado a 37°C por 1 hora. Após as amostras esfriarem a temperatura ambiente, foi adicionado 108µL de dodecil sulfato de sódio 20% (SDS) quente e 19µL de proteinase K e então incubado a 60°C por 15 minutos. Foi adicionado 200µL de acetato de amônia 7,5M e acondicionado no gelo por 15 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 9.660g. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado 1 volume de clorofórmio, e novamente centrifugado por 5 minutos a 9.660g. Foram adicionados 8µL de cloreto de sódio 5M e 0,6 volumes de isopropanol gelado, mantido no gelo por 10 minutos e após centrifugado por 15 minutos a 9.660g. Após as amostras secarem em temperatura ambiente o precipitado foi resuspenso em 30 µL de TE2 (10mL/L de Tris 1M pH 8 e 2mL/L de EDTA 0,5M pH 8).

Amplificação parcial do gene 16S rRNA

Os isolados mais promissores nos testes de biodegradação foram identificados através de sequencias parciais do gene 16S rRNA (1400 pares de bases) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores BacPaeF (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG3') [20] e Bac1542R (5' AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC3') [21]. A reação de amplificação continha os seguintes reagentes: 1 µL de DNA molde; 2,5 µL do tampão da *Taq* DNA polimerase 10x; 0,25 µL de uma solução com 0,15 mmol L⁻¹ de cada DNTP; 1,5 µL de MgCl₂ 50 mmol L⁻¹; 1,25 µL de cada oligonucleotídeo 10 mmol L⁻¹; 1 U de *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*) e água ultra pura estéril para o volume final de 25 µL. As reações foram realizadas com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguido por 37 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por: 1 fase de desnaturação de 1 min a 94°C, 1 fase de anelamento de 1 min a 50° e uma fase de extensão de 1 min 10 segundos a 72°C. A extensão final teve um ciclo a 72°C por 5 min. As reações foram realizadas em um termociclador *Veriti 96 well* (*Applied Biosystem*). Os produtos de amplificação foram corados com *blue green* e visualizados em gel de agarose 1%. Foi utilizado o marcador molecular 1 Kb *plus* DNA ladder (*Invitrogen*). Os fragmentos obtidos foram sequenciados em uma orientação no laboratório ACTGene do Centro de Biotecnologia, UFRGS e após foram comparados com as sequências disponíveis no banco de dados através do programa BLASTN (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). As sequências dos 11 isolados bacterianos promissores nos testes de biodegradação obtidos neste estudo foram depositadas no banco de dados com os números de acesso KY411881 a KY411891.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento das linhagens bacterianas biodegradadoras

A partir do crescimento em placas com ágar BH adicionado das diferentes concentrações de BTEX (0.5%, 1% e 1.5%), foi selecionado aleatoriamente um isolado de cada placa e de cada diluição, totalizando 122 isolados bacterianos.

Devido ao surgimento de muitas colônias bacterianas biodegradadoras nas placas com as concentrações de 0.5%, 1% e 1.5%, estes isolados foram submetidos ao crescimento no meio BH líquido com maiores concentrações de BTEX: 5%, 10% e 20%. De acordo com os resultados, 110

isolados apresentaram crescimento na concentração de BTEX 5%, ou seja, 90,2% dos isolados (Figura 1), e estes foram então testados em uma concentração maior com 10% BTEX, onde 11 isolados (codificados como 8, 10, 15, 17, 23, 24, 62, 64, 99, 126 e 128) apresentaram crescimento satisfatório, o que representa 10,1% dos isolados (Figura 2). Estes foram testados com 20% do contaminante, onde apenas um isolado bacteriano apresentou crescimento considerável, a linhagem 62. Com isso pode-se inferir que os isolados selecionados são bons biodegradadores. É possível identificar que na célula 1, os isolados selecionados foram mais resistentes ao aumento de concentração do BTEX, principalmente quando expostos à 10% do contaminante (Figura 2).

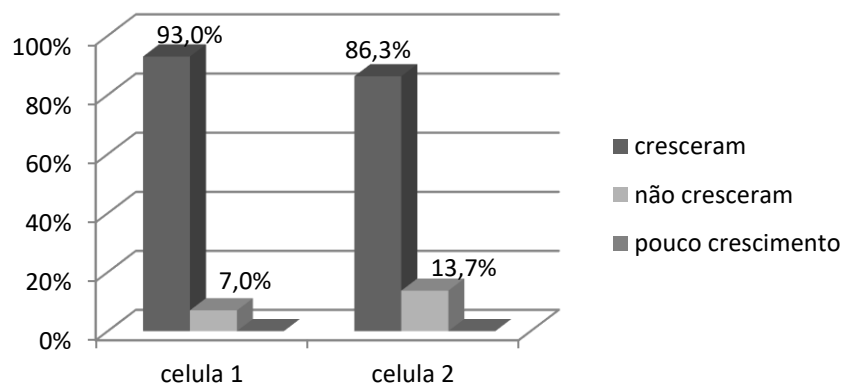


Figura 1. Percentual dos isolados bacterianos que apresentaram crescimento em 5% do contaminante BTEX.

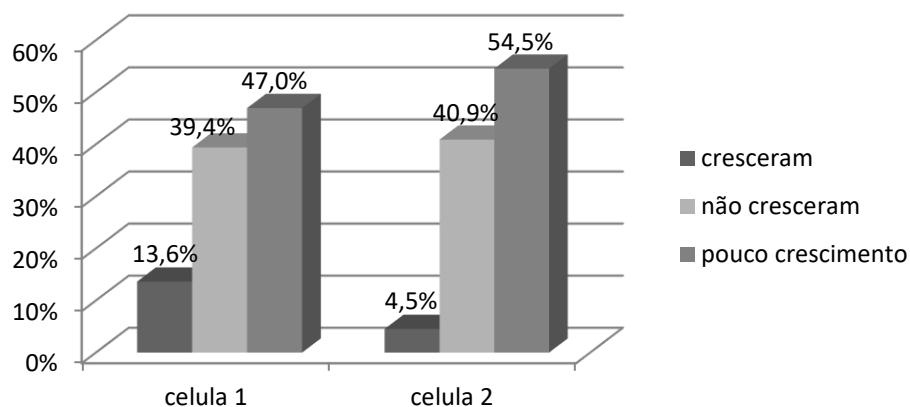


Figura 2. Percentual dos isolados bacterianos que apresentaram crescimento em 10% do contaminante BTEX.

Contagem dos isolados bacterianos heterotróficos biodegradadores

A contagem microbiana foi realizada a fim de avaliar a quantidade de bactérias heterotróficas biodegradadoras de hidrocarbonetos BTEX que ocorrem naturalmente no solo das células de *landfarming* do SICECORS, sendo estas com histórico de 22 anos de contaminação. Os parâmetros tipicamente medidos em testes laboratoriais de eficiência da biodegradação, entre outros, incluem a contagem de microrganismos heterotróficos totais e a contagem de microrganismos degradadores de um ou de vários substratos específicos [22, 23].

De acordo com a Tabela 2, pode-se observar que em algumas amostras e em algumas concentrações de BTEX, a contagem da UFC/g foi superior a 3×10^3 na amostra bruta, principalmente na célula 2. Isso indica que existe uma maior concentração de bactérias biodegradadoras nesta célula e que os microrganismos utilizaram os compostos BTEX nas diferentes concentrações como única fonte de carbono. Nas concentrações menores de BTEX (0,5% e 1%) houve um menor crescimento de colônias comparando-se com a concentração maior de 1,5%,

principalmente na célula 1. Sugere-se que isso aconteça devido a maior concentração de BTEX (1,5%), onde uma maior concentração de carbono estaria disponível para os microrganismos, principalmente na célula 2 onde foram encontrados resultados superiores à 3.0×10^3 UFC/g. Da mesma forma como foi relatado no estudo de Cruz (2013) [24] ao comparar o crescimento das células microbianas em amostras com contaminação de biodiesel, diesel e petróleo com uma amostra controle (sem contaminantes), onde a amostra controle teve um crescimento menor de colônias, também pela disponibilidade de carbono.

Tabela 2. Contagem de UFC/g de isolados bacterianos degradadores de BTEX nas diferentes células de landfarming amostradas.

Concentração de BTEX	Amostras			
	Célula 1 Amostra A	Célula 1 Amostra B	Célula 2 Amostra A	Célula 2 Amostra B
0,5%	$8,9 \times 10^2$	$> 3 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$
1,0%	$8,9 \times 10^2$	$8,4 \times 10^2$	$> 3 \times 10^3$	$> 3 \times 10^3$
1,5%	$> 3 \times 10^3$	$> 3 \times 10^3$	$> 3 \times 10^3$	$> 3 \times 10^3$

De acordo com Townsend et al. (2007) [25] a presença de uma grande população de microrganismos heterotróficos totais não apresenta necessariamente correlação direta com a biodegradação, porém, no caso deste estudo o composto contaminante estava presente no meio de cultura como a única fonte de carbono disponível e isso refletiu nos resultados, onde foi obtida uma grande concentração de colônias bacterianas que podem ser biodegradadoras do contaminante ou de isolados que cresceram com os metabólitos gerados pelos isolados biodegradadores de BTEX. A quantificação da fração da comunidade que degrada o resíduo de interesse tem sido utilizada como um dos métodos mais comuns para o monitoramento de poluição ambiental com hidrocarbonetos [26]. Mesmo com os resultados de contagem de UFC/g elevados sabe-se que esses métodos são seletivos, e apenas detectam parte da população com determinadas características bioquímicas e formas de crescimento, o que pode limitar considerações mais generalizadas a respeito do impacto da contaminação sobre esses microrganismos no solo [27]. O número de bactérias presentes no solo também varia de acordo com diversos fatores que influenciam no seu crescimento, sendo que as maiores concentrações encontram-se nos horizontes de superfície, por serem mais favoráveis às condições de temperatura, aeração, umidade e nutrição [28]. Bisognin (2012) [29] destaca que a contagem de microrganismos não é uma medida direta das atividades desses organismos no solo, e sim, um indicativo de viabilidade e/ou potencialidade microbiológica de degradação de compostos presentes em ambientes contaminados, já que a proliferação de microrganismos e a consequente degradação de hidrocarbonetos dependem dos inúmeros fatores citados anteriormente e este trabalho foi somente uma triagem preliminar.

Caracterização e identificação dos isolados promissores em biodegradar compostos BTEX

Foram selecionados onze isolados bacterianos que foram os mais promissores nos testes de biodegradação: 8, 10, 15, 17, 23, 24, 62, 64, 99, 126 e 128, utilizando como única fonte de carbono elevadas concentrações de BTEX. Estes foram submetidos à coloração de Gram, onde cinco isolados foram caracterizados como bacilos Gram negativos e seis isolados como bacilos Gram positivos.

As bactérias Gram negativas são mais tolerantes a elevadas concentrações de compostos lipofílicos, como o BTEX, do que as Gram positivas [30]. Estudos reportam que a maioria das bactérias isoladas de áreas com histórico de contaminação por óleo ou sub-produtos são Gram-negativas, sugerindo que a característica da parede celular contribua para a sobrevivência das populações nesses ambientes de estresse, pois nestas bactérias a parede celular é composta de duas camadas: uma interna de peptidoglicano e uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos e proteínas, com estrutura semelhante à da membrana plasmática. Essa bicamada das células Gram negativas confere uma maior proteção contra agentes agressores, que terão maior dificuldade em penetrar no interior da célula [31]. Assim como neste estudo, Reschke (2012) [32] ao estudar processos envolvidos com a recuperação de áreas degradadas por

hidrocarbonetos, testando diferentes concentrações de diesel, encontrou no total dos ensaios 81,8% bactérias Gram negativas, 4,5% de bactérias Gram positivas e 13,7% de fungos. Andrade (2008) [33] teve como objetivo avaliar o potencial de biodegradação da gasolina por bactérias provenientes da microbiota existente num biofiltro de tratamento de vapores de solos contaminados com combustíveis e encontrou uma dominância das bactérias Gram-negativas que representaram 86% dos isolados observados e apenas um isolado apresentou-se como Gram-positivo. O trabalho realizado por Schultz (2010) [34] isolou microrganismos com habilidade para degradar diesel e biodiesel de um solo contaminado com hidrocarbonetos. Foram isoladas oito espécies bacterianas, todas caracterizadas como bacilos Gram negativos.

Dos onze isolados bacterianos promissores, foram identificadas principalmente bactérias dos gêneros *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. a partir do sequenciamento do gene 16S rRNA, como consta na Tabela 3. O mesmo foi reportado por Roy et al. (2014) [35], onde a maior parte das bactérias encontradas em locais contaminados com petróleo na Índia pertenciam aos gêneros *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Paenibacillus* sp.

Tabela 3. Identificação do gênero e/ou espécie dos isolados bacterianos degradadores de BTEX.

Codificação do Isolado Bacteriano	Identificação
8	<i>Bacillus</i> sp.
10	<i>Bacillus thuringiensis</i>
15	<i>Bacillus thuringiensis</i>
17	<i>Bacillus vanillea</i>
23	<i>Bacillus</i> sp.
24	<i>Pseudomonas</i> sp.
62	<i>Pseudomonas</i> sp.
64	<i>Pseudomonas</i> sp.
99	<i>Pseudomonas</i> sp.
126	<i>Paenibacillus jamilae</i>
128	<i>Pseudomonas</i> sp.

Desde a década de 1950, vem sendo isoladas bactérias degradadoras dos compostos BTEX, pertencentes principalmente aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Beijerinckia*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Sphingomonas*, *Mycobacterium*, *Stenotrophomonas*, *Paracoccus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Gordonia*, *Bacillus*, entre outros [36, 1, 37, 29, 35]. Dentre as bactérias, o gênero *Pseudomonas* é o gênero mais citado, como agente metabolizador de petróleo e seus derivados, pois são capazes de degradar petróleo para suas necessidades de carbono e energia, na presença de oxigênio, metabolizam dois carbonos de cada vez de uma molécula grande de petróleo [38].

Segundo Teixeira (2007) [37], a partir do isolamento e caracterização de microrganismos capazes de degradar compostos BTEX, C9 e etanol, de solo com histórico de contaminação de resíduos petroquímicos foram escolhidos cinco isolados que apresentaram maior crescimento, onde o gênero predominante foi *Pseudomonas*. Uma cepa bacteriana da espécie *Pseudomonas putida*, foi a primeira a ser geneticamente construída e patenteada para a finalidade de biodegradação. *P. putida* apresenta a capacidade de metabolizar quatro hidrocarbonetos de petróleo bruto: cânfora, octano, xileno e naftaleno [39]. Já Otenio et al. (2005) [40], estudaram a atividade degradadora da espécie *Pseudomonas putida* CCM 852, que mostrou-se eficiente em degradar tolueno e xileno. Esses resultados devem-se à adaptabilidade do gênero *Pseudomonas* a diversos substratos.

Morales (2008) [41] a partir de uma amostra de *landfarming* do SICECORS - Triunfo e a partir de uma caixa separadora água-gasolina de um posto de combustível de Porto Alegre, isolou 183 microrganismos e avaliou a produção de biossurfactantes e a degradação do etanol e fração BTX, presentes na gasolina comercial e gasolina pura, com benzeno, tolueno e xileno. Foram escolhidos quatro isolados que apresentaram produção de biossurfactantes que corresponderam a uma cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp. e também foram identificados dois isolados que mostraram-se bons degradadores de BTEX, pertencentes à espécie *Burkholderia vietnamiensis*.

Dorr (2008) [42] utilizou quinze estirpes escolhidas pela capacidade de crescimento na presença do substrato em que foram enriquecidos (benzeno, tolueno, etilbenzeno ou xilenos). Foi possível identificar, dentre os organismos analisados, as espécies *Stenotrophonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus tropicalis* e uma bactéria não cultivável. Lima (2005) [43] ao avaliar biodegradação dos isômeros de xileno em cultura pura identificou a espécie *Bacillus megaterium*, a partir de 40 linhagens previamente conhecidas, como a mais promissora, sendo capaz de degradar isômeros de xileno, isolados ou misturados, o que demonstra um favorecimento na sua utilização em processos de biorremediação de ambientes poluídos por este petroderivado. A predominância de *Bacillus* sp. sugere sua grande adaptação a ambientes contaminados em função do seu excelente potencial de biodegradação de hidrocarbonetos.

Kronbauer (2014) [44] testou consórcios microbianos em solo sem histórico de contaminação. O solo estéril foi contaminado em laboratório com 1,5% de óleo diesel e a partir desse ponto foram adicionados os consórcios microbianos, identificados como C1 composto por três bactérias, *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *B. pumilus* e consórcio C2 composto pelas mesmas três bactérias e mais o fungo *Aspergillus fumigatus*. Os consórcios C1 e C2 mostraram boa capacidade de degradação dos BTEX, degradando mais de 95% desses compostos num período de 45 dias.

Segundo Arafa (2003) [45], a partir de três amostras de solo contaminado no leste da Arábia Saudita foram isolados e selecionados microrganismos que obtiveram crescimento em meio mineral enriquecido com BTEX para compor um consórcio. Foram isolados onze microrganismos de acordo com diferenças morfológicas e identificados como *Paenibacillus pabuli*, *Micromonospora* spp., *Proteus mirabilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pallidus*, *Bacillus smithii* e *Klebsiella pneumoniae*.

Obuekwe et al. (2009) [46], a partir de 30 amostras de solo coletados em vários sítios contaminados com hidrocarbonetos no Kuwait, foram isolados 46 microrganismos capazes de crescer em meio mineral com incremento de petróleo cru como única fonte de carbono, destes, 79% foram caracterizados como Gram positivos, e identificados como *Bacillus* sp. (93%) e *Paenibacillus* sp. (7%), já os isolados Gram negativos foram identificados como pertencentes aos gêneros *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Williamsia*. Os testes de degradação demonstraram que o gênero *Paenibacillus* sp. foi capaz de degradar 74% do petróleo cru, *Pseudomonas* sp. 70% e *Bacillus* sp. variou a capacidade de degradação de acordo com a espécie, sendo que os melhores degradadores foram *B. cereus* com 85,6 % de degradação, enquanto que *B. licheniformis* degradou 10,7%.

A identificação de isolados bacterianos degradadores de BTEX evidencia pela bibliografia revisada que as bactérias mais identificadas que possuem esta característica são dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, o que corrobora com os resultados deste estudo.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que mesmo após 12 anos sem receber resíduos contaminados com derivados de petróleo, a microbiota local ainda é capaz de degradar tais contaminantes. Foram selecionadas linhagens bacterianas com habilidade de tolerar diferentes concentrações do BTEX, utilizando-o como única fonte de carbono e energia. Dentre os onze isolados bacterianos selecionados (linhagens 8, 10, 15, 17, 23, 24, 62, 64, 99, 126 e 128) pode-se destacar o isolado 62, identificado como *Pseudomonas* sp., pois este foi o único que cresceu satisfatoriamente em 20% de BTEX. Dentre aqueles que cresceram com 10% do contaminante como fonte de carbono, foi possível identificar gêneros importantes na degradação de hidrocarbonetos aromáticos, tais como *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. e a espécie *Paenibacillus jamilae*. Com isso observa-se a importância da identificação de microrganismos com potencial de degradação, principalmente de compostos contaminantes derivados do petróleo. Através deste conhecimento, pode-se formular técnicas para que a biorremediação traga resultados satisfatórios, possibilitando assim, uma utilização correta do microrganismo de acordo com as condições específicas de cada local e de cada contaminante presente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jacques RJS, Silva KJ, Bento FM, Camargo FA. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. *Ciênc Rural*. 2010 Fev;40(2):310-317.
- Portal Brasil. Produção de petróleo totaliza 2,267 bilhões de barris por dia em julho. Portal Brasil, Brasília, 2 set. 2014. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/infraestrutura/2014/09/producao-de-petroleo-totaliza-2-267-milhoes-de-barris-por-dia-em-julho>>. Acesso em: 02 set. 2014.
- Bolden AL, Kwiatkowski CF, Colborn T. New look at BTEX: are ambient levels a problem? *Environ Sci Technol*. 2015 Apr;49(9):5261-5276, doi:10.1021/es505316f.
- Tiburtius ERL, Peralta-Zamora P, Emmel A, Leal ES. Degradação de BTXs via processos oxidativos avançados. *Quím Nova*. 2005;28(1):61-64.
- Carvalho DA, Oliveira RM, Silva CRS, Martinhon PT, Silva SA. Analysis of BTEX in water: comparison between two chromatographic columns. *Revista Ambiente e Água*. 2014 Jan/mar;9(1):149-160, doi:10.4136/ambi-agua.1171.
- Singh C, Lin J. Isolation and characterization of diesel oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. *Afr J Biotechnol*. 2008;7(12):1927-1932, doi:10.5897/AJB07.728.
- Ayotamuno MJ. et al. Bio-remediation of a sludge containing hydrocarbons. *Appl Energy*. 2007 Sep;84(9):936-943, doi:10.1016/j.apenergy.2007.02.007.
- Alexander M. Biodegradation and Bioremediation. 2nd ed. Nova York (USA): Academic Press; 1999. Environmental effects; p.269-298.
- Phillips TM, Liu D, Seech AG, Lee H, Trevors JT. Bioremediation in field box plots of a soil contaminated with wood-preserved: a comparison of treatment conditions using toxicity testing as a monitoring technique. *Water, Air Soil Pollut*. 2000 Jul;121(1):173-187, doi: 10.1023/A:1005218426532.
- Atlas RM. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev*. 1981;45(1):180-209.
- Mattney GC. Assessment and remediation of petroleum contaminated sites. Florida: CRC Press; 1994. 384 p.
- Skipper HD. Principles and applications of soil microbiology. 2nd ed. Nova Jersey (USA): Prentice Hall; 1999. Bioremediation of contaminated soils; p. 469-481.
- Meurer EJ. Fundamentos de química do solo. Porto Alegre: Evangraf; 2006. 285 p.
- Deppe U, Richnow HH, Michaelis W, Antranikian G. Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. *Extremophiles*. 2005;9(6):461-470, doi:10.1007/s00792-005-0463-2.
- Cookson J Jr. Bioremediation engineering – design and application. Nova York: McGraw-Hill Inc.; 1995. 524 p.
- El-Nass MH, Acio JA, El Telib AE. Aerobic biodegradation of BTEX: progresses and prospects. *J Environ Chem Eng*. 2014 Jun;2(2):1104-1122, doi:10.1016/j.jece.2014.04.009.
- Atlas RM. Handbook of media for environmental microbiology. Nova York: CRC Press; 1995. 544 p.
- Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 1995 Feb;61(2):793-796.
- Sambrook J, Russel DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Nova York: Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 2100 p.
- Stackebrandt E, Liesack W. Handbook of new systematic. London (UK): Academic Press; 1993. Nucleic acids and classification; p. 158-160.
- Edwards U, Rogall T, Blockerl H, Emde M, Bottger EC. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16s ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res*. 1989;17(19):7843-7853, doi:10.1093/nar/17.19.7843.
- Tomasella RC. Efeito da adição de butanol na biodegradabilidade da gasolina e do óleo diesel [monograph]. Rio Claro (SP): Universidade Estadual Paulista; 2009. 61 p.
- Mariano AP. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel [thesis]. Rio Claro (SP): Universidade Estadual Paulista; 2006. 162 p.
- Cruz JM. Avaliação ecotoxicológica da biodegradação utilizando inóculo enriquecido com *Bacillus subtilis* em solo contaminado com petróleo, diesel e biodiesel [dissertation]. Rio Claro (SP): Universidade Estadual Paulista; 2013. 68 p.
- Townsend RT, Bonner JS, Autenrieth RL. Microbial dynamics during bioremediation of a crude oil-contaminated coastal wetland. *Bioremediat J*. 2007 May;4(3):203-218, doi:10.1080/10588330008951110.
- Kataoka APAG. Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de “landfarming” [thesis]. Rio Claro (SP): Universidade Estadual Paulista; 2001. 202 p.
- Junior HED, Moreira FMS, Siqueira JO, Silva R. Metais pesados, densidade e atividade microbiana em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. *Rev Bras Ciênc Solo*. 1998;22(4):631-640.

28. Brady NC, Buckman HO. *Natureza e propriedade dos solos*. Rio de Janeiro: Freitas Bastos; 1994. 878 p.
29. Bisognin RP. *Análise do potencial microbiano de uma biopilha na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos [dissertation]*. Santa Cruz do Sul (RS): Universidade de Santa Cruz do Sul; 2012. 139 p.
30. Sikkema J, Bont JAM, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev*. 1995 Jun;59(2):201-222.
31. Richard JY, Vogel TM. Characterization of soil bacteria consortium capable of degrading diesel fuel. *Int Biodeterior Biodegrad*. 1999 Sep/oct;44(2-3):93-100, doi:10.1016/S0964-8305(99)00062-1.
32. Reschke KSS. *Estudos microbiológicos para tratamento de água subterrânea de áreas contaminadas por hidrocarbonetos [dissertation]*. São Leopoldo(RS): Universidade do Vale do Rio dos Sinos; 2012. 99 p.
33. Andrade DM. *Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina [dissertation]*. Florianópolis (SC): Universidade de Santa Catarina; 2008. 96 p.
34. Schultz FM. *Avaliação de microrganismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel [dissertation]*. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010. 137 p.
35. Roy A, Pal S, Kazy SK, Sarkar P, Sar P, Ghoshal AK. Characterization of culturable bacterial communities in petroleum hydrocarbon contaminated sludge of oil refineries and oil exploration sites. *J Environ Res Develop*. 2014 Jan/mar;8(3):451-458.
36. Mutnuri S, Vasudevan N, Kaestner M. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005 Jun;67(4):569-576, doi:10.1007/s00253-005-1905-6.
37. Teixeira AS. *Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial [dissertation]*. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007. 95 p.
38. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. Porto Alegre: Editora Artmed; 2005. 920 p.
39. Pelczar JrJM, Chan ECS, Krieg NR. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. Volume 2. São Paulo: Pearson Education do Brasil; 1997. 517 p.
40. Otenio MH, Silva MTL, Marques MLO, Roseiro JC, Bidoia ED. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852. *Braz J Microbiol*. 2005 Jul;36(3):258-261, doi:10.1590/S1517-83822005000300010.
41. Morales DL. *Biodegradação da fração BTX e Etanol da Gasolina comercial pura por microrganismos isolados de locais impactados [dissertation]*. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008. 148 p.
42. Dorr F. *Consórcios degradadores de BTEX: isolamento, caracterização e avaliação do potencial de degradação [dissertation]*. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2008. 176 p.
43. Lima LA. *Biodegradabilidade de isômeros de xileno por bactérias isoladas do Terminal Portuário de SUAPE – PE [dissertation]*. Recife (PE): Universidade Federal de Pernambuco; 2005. 118 p.
44. Kronbauer ML. *Uso da bioaugmentação para remediação de solos contaminados por óleo diesel [dissertation]*. Santa Cruz do Sul: Universidade de Santa Cruz do Sul; 2014. 98 p.
45. Arafá MA. Biodegradation of some aromatic hydrocarbons (BTEXs) by a bacterial consortium isolated from polluted site in Saudi Arabia. *Pak J Biol Sci*. 2003;6(17):1482-1486.