

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental

Márcio Luís Busi da Silva

**EFEITO DO ETANOL NA CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO
AERÓBICA DE BENZENO E TOLUENO POR *Pseudomonas putida* F1.**

**Dissertação apresentada ao Departamento de
Engenharia Ambiental da Universidade
Federal de Santa Catarina, para a obtenção
do título de Mestre em Ciências em
Engenharia Ambiental na área de
Tecnologia de Saneamento Ambiental.**

Orientador: Henry Xavier Corseuil

**FLORIANÓPOLIS
SANTA CATARINA
DEZEMBRO, 1998**

**“EFEITO DO ETANOL NA CINÉTICA DA DEGRADAÇÃO AERÓBICA DE
BENZENO E TOLUENO POR PSEUDOMONAS PUTIDA F1”**

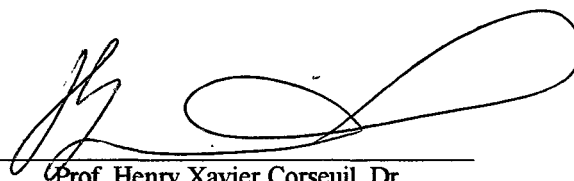
MÁRCIO LUIZ BUSI DA SILVA

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL

na Área de Tecnologias de Saneamento Ambiental.

Aprovado por:



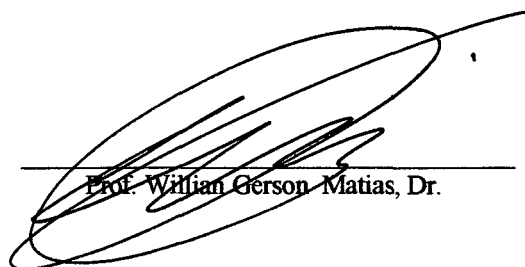
Prof. Henry Xavier Corseuil, Dr.
(Orientador)



Prof. Teresa Cristina Barbosa, Dr.^a



Prof. Dr.^a Rejane Helena Ribeiro da Costa
(Coordenadora)



Prof. Willian Gerson Matias, Dr.

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL
DEZEMBRO DE 1998

AGRADECIMENTOS

Gostaria de registrar meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho e em especial:

- Ao Professor e Orientador Dr. Henry Xavier Corseuil pelas críticas e sugestões indispensáveis para a concretização deste trabalho e fundamentalmente para minha capacitação acadêmica e profissional.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.
- Ao projeto PETROBRAS.
- Ao Supervisor do Laboratório Integrado do Meio Ambiente (LIMA), Prof. Dr. Maurício Luiz Sens, pela concessão de um período de trabalho flexível necessário para conciliação das minhas atividades como Técnico-Administrativo e mestrando.
- A todos os Professores do curso de Pós-Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina.
- Ao corpo Técnico-Administrativo do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Américo Cruz Júnior, Carlos Roberto Vieira e Nilton Sezar Pereira.
- Aos colegas Ruy Carlos F. dos Santos, Fábio N. Moreno, Júlio C. Leão, Hugo Gossman, Carlos A. Marques, Gustavo R. da Silva, Luciana Benetti, Marilda Fernandes, Cátia R. Silva, Márcia B. Lemieszek, Clarissa Soares e Cristiane R. Vieira pela grande contribuição prestada.
- À minha família pelo companheirismo e crédito, principalmente nas horas mais difíceis enfrentadas na trajetória deste trabalho.
- A Melissa Paola Mezzari pelo carinho, auxílio e paciência.

Lost for Words

*I was spending my time in the doldrums
I was caught in a cauldron of hate
I felt persecuted and paralysed
I thought that everything else would just wait*

*While you are wasting your time on your enemies
Engulfed in a fever of spite
Beyond your tunnel vision reality fades
Like shadows into the night*

*To martyr yourself to caution
Is not going to help at all
Because there'll be no safety in numbers
When the Right One walks out of the door*

*Can you see your days blighted by darkness?
Is it true you beat your fists on the floor?
Stuck in a world of isolation
While the ivy grows over the door*

*So I open my door to my enemies
And I ask could we wipe the slate clean
But they tell me to please go fuck myself
You know you just can't win*

Pink Floyd

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE QUADROS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x

CAPÍTULO 1

1.Introdução.....	1
-------------------	---

CAPÍTULO 2

2.Revisão Bibliográfica

2.1 Biorremediação.....	4
2.2 <i>Pseudomonas</i> spp. nos processos de biodegradação.....	6
2.3 Vias bioquímicas de degradação aeróbica do benzeno e tolueno por <i>Pseudomonas putida</i> F1.....	7
2.4 Cinética de degradação.....	10
2.5 Múltiplos substratos. O efeito <i>diauxie</i>	14
2.6 Mecanismos de inibição e ativação de catabólitos.....	16
2.7 Determinação da biomassa.....	18

CAPÍTULO 3

3.Materiais e Métodos

3.1 Material biológico.....	21
3.2 Meio de cultura.....	22
3.3 Compostos químicos.....	23
3.4 Microcosmos.....	23
3.5 Soluções padrões.....	23
3.6 Experimentos de biodegradação.....	25
3.7 Procedimento analítico.....	25
3.8 Preparação do inóculo.....	25
3.9 Contagem celular.....	26

	Página
3.9.1 Cinética microbiana.....	28

CAPÍTULO 4

4.Resultados e Discussão

4.1 Introdução.....	30
4.2 Determinação da biomassa.....	30
4.3 Cinética de degradação dos compostos tolueno, benzeno e etanol testados isoladamente.....	31
4.4 Influência do etanol nos parâmetros cinéticos de degradação dos compostos tolueno e benzeno	36
4.5 Análise do crescimento bacteriano em função dos substratos testados.....	45

CAPÍTULO 5

5.Conclusões e Recomendações.....	52
5.1 Conclusões.....	52
5.2 Recomendações.....	55

APÊNDICE I

Composição do meio Mineral Hunter's Base (MSB).....	56
---	----

APÊNDICE II

Condições de trabalho utilizadas do Headspace e no cromatógrafo à gás.....	58
--	----

APÊNDICE III

Tabelas de degradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos e etanol em função do tempo.....	60
--	----

APÊNDICE IV

Tabelas do número de células/mL em função do tempo de degradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos e etanol.....	70
--	----

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
--	-----------

RELAÇÃO DE FIGURAS**Página**

Figura 1	Esquema ilustrativo simulando o vazamento da gasolina e algumas considerações importantes nos processos de biorremediação do solo e aquíferos contaminados.....	5
Figura 2	Vias metabólicas construídas para degradação simultânea dos BTX.....	8
Figura 3	Biodegradação do catecol via <i>orto</i> e <i>meta</i> clivagem.....	9
Figura 4	Relação entre a taxa de crescimento bacteriano e a concentração do substrato como fonte de energia.....	11
Figura 5	Curvas de degradação para substratos que são metabolizados por diferentes tipos de cinética.....	12
Figura 6	Crescimento bifásico de uma população bacteriana em dois substratos disponíveis.....	15
Figura 7	Esquema das regiões do genoma bacteriano. Repressão e ativação dos catabólitos.....	18
Figura 8	Fotomicrografia de fluorescência de células de <i>Pseudomonas putida</i> F1.....	21
Figura 9	Microcosmos utilizados nos experimentos de biodegradação contendo 5mL de meio MSB.....	24
Figura 10	Microscópio trinocular com analizador de imagens.....	27

	Página
Figura 11	Dados obtidos e simulados para biodegradação de tolueno, benzeno e etanol testados isoladamente.....34
Figura 12	Dados obtidos e simulados para biodegradação do tolueno e benzeno conjugados ao etanol.....37
Figura 13	Dados obtidos e simulados para biodegradação de tolueno conjugado ao benzeno.....39
Figura 14	Efeito do etanol nas taxas de crescimento máxima específica (μ_{\max}) dos compostos tolueno e benzeno.....44
Figura 15	Degradação do tolueno e benzeno em função do crescimento bacteriano.....46
Figura 16	Degradação do tolueno conjugado ao benzeno em função do crescimento bacteriano.....47
Figura 17	Degradação do etanol em função do crescimento bacteriano.....48
Figura 18	Degradação do tolueno e benzeno conjugados do etanol.....50

RELAÇÃO DE QUADROS**Página**

Quadro I	Limites de solubilidade dos compostos tolueno, benzeno e etanol.....	24
----------	--	----

RELAÇÃO DE TABELAS**Página**

TABELA 1	Porcentagem de recuperação do Spike obtido para análises dos compostos etanol, benzeno e tolueno em CG-HP5890.....	26
TABELA 2	Tamanho das células de <i>Pseudomonas putida</i> obtido através do analisador de imagens em microscopia óptica de fluorescência.....	31
TABELA 3	Coefficientes de produção celular (Y) em função das concentrações testadas dos compostos tolueno, benzeno e etanol para 48, 96 e 144 horas.....	33
TABELA 4	Coefficientes de máxima taxa de utilização do substrato ($\mu_{\text{máx}}$) para os compostos tolueno, benzeno e etanol testados isoladamente.....	35
TABELA 5	Coefficientes de meia-velocidade (K_s) obtidos para os compostos tolueno, benzeno e etanol testados isoladamente.....	35
TABELA 6	Coefficientes de máxima taxa de utilização do substrato ($\mu_{\text{máx}}$) para os compostos tolueno e benzeno adicionados de 6531,73 $\mu\text{Mol/L}$ de etanol.....	38
TABELA 7	Coefficientes de meia-velocidade (K_s) obtidos para os compostos tolueno e benzeno adicionados de 6531,73 $\mu\text{Mol/L}$ de etanol.....	38
TABELA 8	Coefficientes de máxima taxa de utilização do substrato ($\mu_{\text{máx}}$) para 217,39 $\mu\text{Mol/L}$ de tolueno testado conjuntamente com 256,41 $\mu\text{Mol/L}$ de benzeno.....	40

Página

TABELA 9	Coeficientes de meia-velocidade (K_s) obtidos para os compostos tolueno e benzeno testados conjuntamente.....	40
TABELA 10	Coeficientes de máxima taxa de utilização do substrato (μ_{\max}) para o etanol adicionado de 217,39 μ Mol/L de tolueno e 256,41 μ Mol/L de benzeno.....	42
TABELA 11	Coeficientes de máxima taxa de utilização do substrato (μ_{\max}) para o etanol adicionado de 217,39 μ Mol/L de tolueno e 256,41 μ Mol/L de benzeno.....	42
TABELA 12	Efeito do etanol nas taxas de degradação (k dia-1) dos compostos tolueno e benzeno.....	43
TABELA 13	Composição do meio MSB.....	57
TABELA 14	Condições de trabalho utilizadas no Headspace HP7694.....	59
TABELA 15	Condições de trabalho utilizadas no Cromatógrafo à gás HP5890.....	59
TABELA 16	Experimento - degradação de 217,39 μ mol/L (20 mg/L) de tolueno por PpF1.....	61
TABELA 17	Controle - degradação de 217,39 μ mol/L (20 mg/L) de tolueno por PpF1.....	61

Página

TABELA 18	Experimento - degradação de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno por PpF1.....	62
TABELA 19	Controle - degradação de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno por PpF1.....	62
TABELA 20	Experimento - degradação de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol por PpF1.....	63
TABELA 21	Controle - degradação de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol por PpF1.....	63
TABELA 22	Experimento - degradação de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno adicionado de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno por PpF1.....	64
TABELA 23	Controle - degradação de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno adicionado de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20mg/L) de tolueno por PpF1.....	64
TABELA 24	Experimento - degradação de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno adicionado de 256,41/L $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno por PpF1.....	65
TABELA 25	Controle - degradação de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno adicionado de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno por PpF1.....	65
TABELA 26	Experimento - degradação de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno adicionado de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol por PpF1.....	66

Página

TABELA 27	Controle - degradação de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno adicionado de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol por PpF1.....	66
TABELA 28	Experimento - degradação de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol adicionado de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno por PpF1.....	67
TABELA 29	Controle - degradação de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol adicionado de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno por PpF1.....	67
TABELA 30	Experimento - degradação de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno adicionado de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol por PpF1.....	68
TABELA 31	Controle - degradação de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno adicionado de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol por PpF1.....	68
TABELA 32	Experimento - degradação de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol adicionado de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno por PpF1.....	69
TABELA 33	Controle - degradação de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol adicionado de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno por PpF1.....	69
TABELA 34	Crescimento bacteriano de células de PpF1 em função do tempo de degradação de 217,39 $\mu\text{Mol/L}$ (20 mg/L) de Tolueno.....	71
TABELA 35	Crescimento bacteriano de células de PpF1 em função do tempo de degradação de 256,41 $\mu\text{Mol/L}$ (20 mg/L) de Benzeno.....	71

Página

TABELA 36	Crescimento bacteriano de células de PpF1 em função do tempo de degradação de 6521,73 $\mu\text{Mol/L}$ (300 mg/L) de Etanol.....	72
TABELA 37	Crescimento bacteriano de células de PpF1 em função do tempo de degradação de 217,39 $\mu\text{Mol/L}$ (20 mg/L) de Tolueno associado a 256,41 $\mu\text{Mol/L}$ (20 mg/L) de Benzeno.....	72
TABELA 38	Crescimento bacteriano de células de PpF1 em função do tempo de degradação de 217,39 $\mu\text{Mol/L}$ (20 mg/L) de Tolueno associado a 6521,73 $\mu\text{Mol/L}$ (300 mg/L) de Etanol.....	73
TABELA 39	Crescimento bacteriano de células de PpF1 em função do tempo de degradação de 256,41 $\mu\text{Mol/L}$ (20 mg/L) de Benzeno associado a 6521,73 $\mu\text{Mol/L}$ (300 mg/L) de Etanol.....	73

RESUMO

A contaminação do solo e de águas subterrâneas por petróleo e seus derivados vem decorrendo no cotidiano em consequência dos vazamentos dos tanques de estocagem, disposição inadequada ou acidentes nos processos de transportes destes produtos. Dentre os vários constituintes da gasolina, o benzeno, etil-benzeno, tolueno e xilenos (BTEX) são de particular importância pela relativa solubilidade nos sistemas de águas subterrâneas, potencial cancerígeno e depressivo do sistema nervoso central. Os fatores que influenciam os mecanismos de ação microbiana na degradação de compostos orgânicos de interesse vem demonstrando considerável atenção em vários países nos últimos 20 anos como alternativas para otimização das tecnologias de biorremediação de solos e águas subterrâneas contaminadas pela gasolina. Enquanto a concentração dos contaminantes, biomassa ativa, biodisponibilidade, temperatura, pH, nutrientes e aceptores de elétrons tem sido frequentemente considerados, pouca atenção tem sido direcionada ao efeito do etanol presente em 22-24% na gasolina brasileira, no comportamento cinético de degradação biológica dos compostos BTEX. Este trabalho analisa e discute os efeitos dos substratos tolueno, benzeno e etanol na cinética de biodegradação por cultura pura de bactérias da espécie *Pseudomonas putida* F1. Os experimentos de biodegradação foram realizados em microcosmos contendo meio MSB, a concentração dos compostos e o inóculo celular. As análises de degradação dos compostos foram realizadas por cromatografia gasosa e a produção de biomassa ativa estimada através do volume celular obtido pelo analisador de imagens acoplado ao microscópio óptico de fluorescência. A equação de Monod foi utilizada para descrever a relação entre a taxa de degradação máxima de utilização do substrato μ_{\max} e as constantes de meia-velocidades K_s dos compostos testados. Todos os compostos testados foram degradados simultaneamente a partir de uma concentração celular aproximada de 10^6 células/mL. A presença do substrato etanol demonstrou retardar o início da degradação dos compostos tolueno e benzeno, reduzindo também as taxas de utilização destes substratos. Os resultados indicaram que o etanol foi utilizado preferencialmente nas fases iniciais do crescimento celular como fonte de carbono, interferindo nos parâmetros cinéticos de metabolização dos compostos tolueno e benzeno por PpF1.

ABSTRACT

The soil and groundwater contamination by crude oil and their derivatives have been proceeding daily from underground fuel storage tanks leaking, inappropriate arrangement or accidents in their transport processes. Within a lot of gasoline compounds, benzene, ethylbenzene, toluene and xlenes (BTEX) deserves a special attention due their relative solubility in groundwater systems, carcinogenic properties and central nervous system depresser engaging the water potability. The factors that influence microbial action in the organics compounds degradation of interest have been showing considerable attention in many countries in the last 20 years as technological alternatives for bioremediation of soil and groundwater contaminated with gasoline. While the contaminants concentrations, active biomass, bioavailability, temperature, pH nutrients and electron acceptors have been usually considered, few attention have been directioned to the presence of 22-24% of ethanol in the Brazilian gasoline concerned to the kinetics behaviour of biological degradation for BTEX mineralization. This work analyses and discusses the effects of ethanol on the toluene and benzene biodegradation kinetics by pure strain of *Pseudomonas putida* F1. Bioassays were realized in vials containing MSB media, compounds concentration and cell inoculate. The compounds degradation assay were analysed by gas chromatography and the biomass yield estimated according to the cell biovolume determined through image analyser linked to fluorescent optical microscopy approaches. The Monod model was used to describe the relation between the specific growth rate μ_{\max} and the Monod's half-velocity K_s . All the compounds tested showed to be simultaneously degraded to a cell concentration near to 10^6 cell/mL. The ethanol presence showed a delaying in the beginning of toluene and benzene degradation, also reducing the monoaromatics specific growth rate. The results pointed out that ethanol was first used in the initial phase of bacterial growth as carbon source, influencing the kinetics parameters of toluene and benzene biodegradation by PpF1.

INTRODUÇÃO

Para atender às suas necessidades biológicas e desenvolver suas atividades, o homem faz, constantemente, uso dos recursos naturais. Desses recursos são retirados a água; o ar; o alimento; a matéria prima para a execução de seu abrigo, seus meios de locomoção, seus móveis, utensílios e, principalmente, a energia que precisa para manter a vida e desenvolver suas ações (MOTA, 1997). A utilização do petróleo e de outras fontes primárias de energia não renováveis como o gás natural, o carvão, a turfa e a energia nuclear, apresentam além de custos e benefícios, inevitáveis riscos sanitários e ambientais (BRUNDTLAND *et al.*, 1991).

Em 1986 a Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (EPA) estimou que 35% dos tanques de estocagem de combustíveis nos Estados Unidos apresentaram vazamentos (BELLER *et al.*, 1992); dos quais 400.000 foram substituídos ou adaptados às legislações federais que entram em vigor no final de 1998. Ainda em relação à estas legislações, mais de 250.000 casos de vazamentos foram identificados com mais de 97.000 casos remediados. Semanalmente mais de 1.000 casos novos de vazamentos estão sendo encontrados em todo o território norte-americano (BRATBERG AND HOPKINS, 1995).

No Brasil, existem aproximadamente 27.000 postos de gasolina e, de acordo com o relatório de atividades da PETROBRAS (1996), o consumo nacional de derivados de petróleo atingiu 90 milhões de m³, equivalentes a 1,55 milhão de barris por dia, o que representou um acréscimo de 6,3% em relação ao ano anterior; como exemplo, o consumo de gasolina automotiva alcançou 16,5 milhões de m³ representando um aumento de 17,1% em relação ao ano de 1995.

As preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de águas subterrâneas pelo petróleo e seus derivados vem crescendo em São Paulo e em outras cidades como Curitiba (que já possui legislação sobre o problema) e Joinville (SC). Em Joinville, a Prefeitura local fiscalizou 65 postos da cidade, constatando que apenas um não continha problema de infiltração de gasolina no lençol freático (CORSEUIL AND MARINS, 1997; CORSEUIL, 1997; FINOTTI AND CORSEUIL, 1997).

O destino das plumas de contaminação pela gasolina nos solos e águas subterrâneas merecem destaque haja visto que dos muitos constituintes do petróleo, os compostos de benzeno, tolueno, xilenos e etilbenzenos (BTEX) apresentam propriedades

toxicológicas em baixas concentrações. Estes compostos são relativamente solúveis em águas comparados com outros compostos do petróleo e frequentemente migram através dos sistemas de águas subterrâneas contaminando possíveis fontes de água potável (EDWARDS AND GRBIC-GALIC, 1994; COZZARELLI *et al.*, 1995). Segundo a Environmental Protection Agency (EPA), o benzeno apresenta potencial cancerígeno e o tolueno pode causar depressão do sistema nervoso central (BELLER *et al.*, 1992). Desta forma, concentrações de benzeno, tolueno, xilenos e etilbenzenos superiores a 10, 700, 500 e 300µg/L respectivamente, comprometem a potabilidade da água para consumo humano (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1993). No Brasil, a legislação vigente discrimina dentre estes compostos, apenas o benzeno para concentrações acima de 10 µg/L) (CONAMA, 1986).

Para solucionar o problema, dispendiosas tecnologias físico-químicas vem sendo aplicadas para se remediar solos e aquíferos contaminados pelo petróleo e seus derivados como, por exemplo, a excavação e incineração do solo, a oxidação química, a adsorção por carvão ativado, etc. Processos de degradação biológica destes contaminantes, também conhecidos por biorremediação vem também se destacando por eliminar uma gama de contaminantes orgânicos a uma melhor relação custo-benefício (CORSEUIL, *et al.*, 1996; CORSEUIL AND ALVAREZ, 1996acd). O processo se traduz na degradação de compostos orgânicos de interesse encontrados nos solos ou águas subterrâneas por microorganismos que os utilizam metabolicamente para manutenção celular e produção de biomassa (WALTER AND CRAWFORD, 1997).

A eficiência dos sistemas biológicos na biorremediação, é extremamente dependente das propriedades cinéticas do crescimento populacional dos microorganismos e das taxas de degradação do substrato. A determinação destes parâmetros torna-se essencial para o desenvolvimento de estratégias de remoção de compostos poluentes durante a operação (KLECKA AND MAIER, 1985). Estudos de cinética microbiana podem desta maneira, prover dados que permitam avaliar a persistência dos compostos químicos em ecossistemas naturais, como as respectivas concentrações em que estes podem estar sendo transportados a possíveis sítios de exposição ao homem e outras espécies (JONES AND ALEXANDER, 1986; ALEXANDER, 1994).

Enquanto a biorremediação vem apresentando respostas promissoras em vários países do mundo na remediação de áreas contaminadas pelo vazamento dos derivados do

petróleo, a presença de 22-24% de etanol adicionada na gasolina brasileira para aumentar a octanagem do combustível e reduzir a poluição atmosférica pode influenciar na solubilização dos BTX e nas taxas de degradação microbiana (FERNANDES AND CORSEUIL, 1996; FERNANDES AND CORSEUIL, 1997; CORSEUIL AND ALVAREZ, 1996B; CORSEUIL, *et al.*, 1998; HUNT *et al.*, 1997).

Os objetivos deste trabalho foram:

- 1) Analisar o crescimento bacteriano de células pertencentes à espécie *Pseudomonas putida* F1 (PpF1) durante a degradação dos compostos testados como o tolueno, benzeno e etanol e quantificar a biomassa bacteriana através de estimativas do biovolume celular obtidos por microscopia óptica de fluorescência;
- 2) Investigar através do modelo cinético de degradação microbiana, os possíveis efeitos da presença do etanol nas taxas de crescimento máximo específico $\mu_{\text{máx}}$ e nas constantes de meia velocidade K_s de degradação dos compostos tolueno e benzeno por células de *Pseudomonas putida* F1.

CAPÍTULO 2

2. Revisão bibliográfica

2.1 Biorremediação

Na biorremediação, compostos químicos contaminantes podem ser degradados por microorganismos autóctones (atenuação natural) ou alóctones (bioestimulação), encontrados em solos ou águas subterrâneas (CORSEUIL AND MARINS, 1996; CORSEUIL AND ALVAREZ, 1996a) (Figura 1). A degradação de hidrocarbonetos de petróleo por microorganismos podem, por exemplo, diminuir o custo das estratégias de tratamento do contaminante *in situ* (MONTGOMERY *et al.*, 1997; KORDA ET ALL, 1997).

A degradação aeróbica dos contaminantes encontrados no subsolo ocorre através do oxigênio disponível pela sua difusão através da zona não saturada e pelo seu transporte nos movimentos das águas subterrâneas (AXELROD *et al.*, 1997). Após o consumo do oxigênio dissolvido, microorganismos anaeróbicos começam a se sobressair nas atividades de degradação, utilizando como aceptores de elétrons o nitrato, o íon férrico o sulfato e o dióxido de carbono na respectiva ordem (CHO *et al.*, 1997; LIBELO *et al.*, 1997). Desta forma, microorganismos presentes no solo podem consumir os hidrocarbonetos de petróleo, se estes forem utilizados como fonte de elétrons doadores para o metabolismo microbiano para obtenção de energia, produção e manutenção celular, como demonstra a seguinte equação estequiométrica:

HC(doador de elétrons) + O₂(acceptor de elétrons) + microorganismos + nutrientes



Os elétrons doadores neste caso, são os compostos orgânicos como os de hidrocarbonetos de petróleo. A maioria dos compostos orgânicos poluentes são primeiramente degradados aerobicamente (BELLER *et al.*, 1992; EDWARDS AND GRBIC-GALIC, 1992), i.é., quando o oxigênio está presente como acceptor final de elétrons (WALTER AND CRAWFORD, 1997).

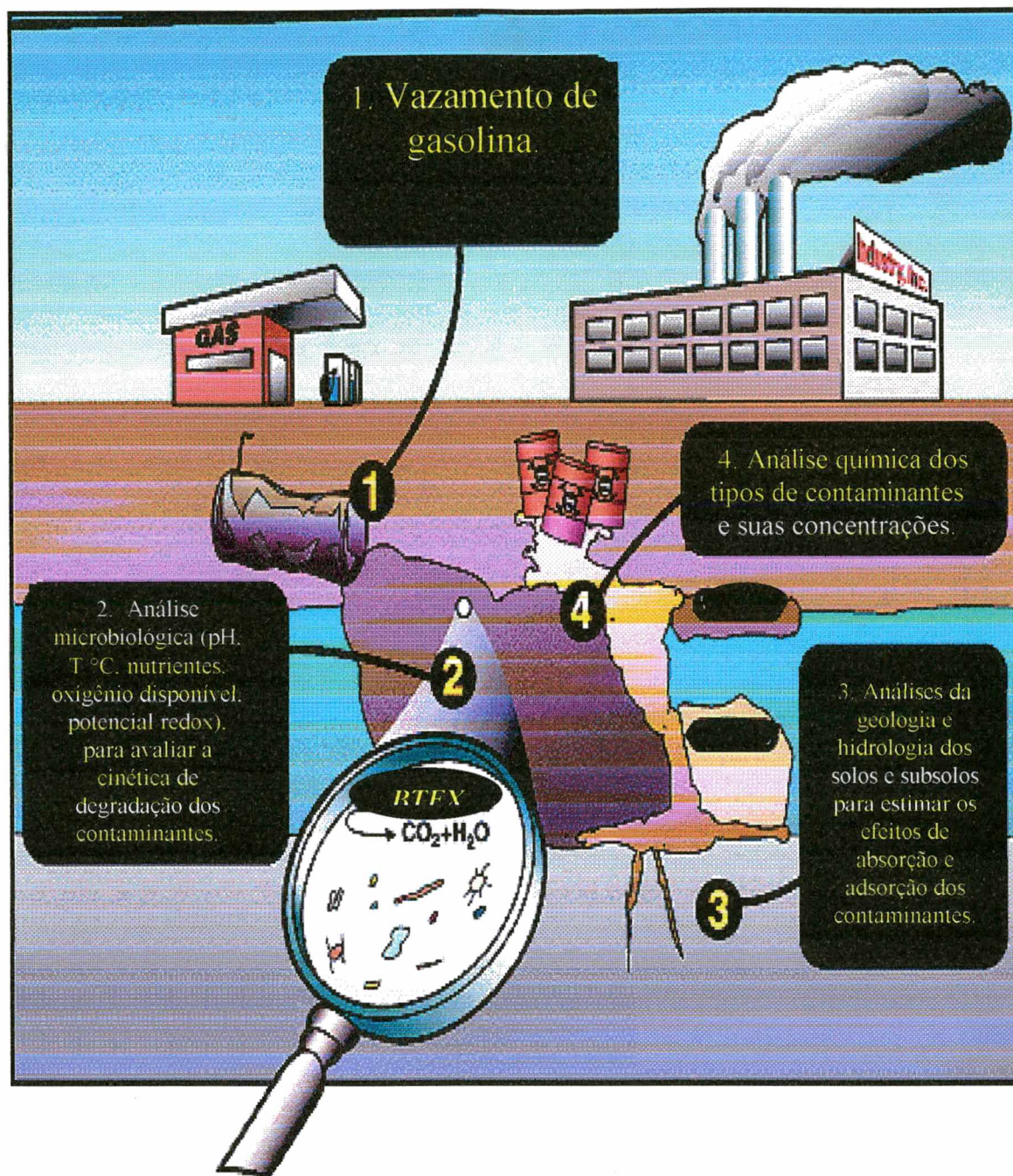


Figura 1: Esquema ilustrativo simulando o vazamento da gasolina e algumas considerações importantes nos processos de biorremediação do solos e aquíferos contaminados.

Segundo ARINBASAROV *et al.*, 1997, cerca de 20 espécies de microorganismos foram isoladas e capazes de degradarem os componentes do petróleo. A maioria (acima de 70%) pertencem ao gênero *Pseudomonas*, o restante pertencente aos gêneros *Rhodococcus* e *Xanthomonas*, com poucas formas não esporofíticas Gram-negativas.

Como visto anteriormente, nos últimos 20 anos a biorremediação tem evoluído para uma das mais empregadas tecnologias para descontaminação de uma enorme variedade dos compostos contaminantes, incluindo os hidrocarbonetos de petróleo (WALTER AND CRAWFORD, 1997).

2.2 *Pseudomonas* spp. nos processos de biodegradação.

O gênero *Pseudomonads* é frequentemente encontrado em sistemas de aquíferos em consequência da extraordinária versatilidade destes microorganismos de utilizar diversas formas de substratos orgânicos como fonte de energia. Outra característica interessante deste gênero é que muitas espécies não requerem vitaminas específicas, aminoácidos ou fatores de crescimento. Espécies de *Pseudomonads* demonstraram crescer em 127 fontes de carbono orgânico diferentes. Esta característica fisiológica permite a estas espécies habitar aquíferos aeróbicos onde os substratos orgânicos são limitados pelo carbono orgânico lixiviado da superfície. A maioria das espécies de *Pseudomonads* são aeróbicas restritas podendo existir algumas com a habilidade de utilizar vias bioquímicas alternativas. A flexibilidade destes microorganismos em termos de fontes de carbono e aceptores de elétrons utilizados, permitem a estes, crescerem em subsolos sob condições variáveis (CHAPELLE, 1993).

Pseudomonas putida, tem numerosos potenciais em aplicações industriais de biotransformação que envolvem o uso de substratos orgânicos como hidrocarbonetos alifáticos saturados e insaturados, alicíclicos e aromáticos, álcoois e éters (INOUE *et al.*, 1991). Geralmente, estes compostos orgânicos são tóxicos e comprometedores do crescimento dos microorganismos por ocasionarem a partição das membranas (HEIPIEPER AND BONT, 1994), porém, microorganismos de *P. putida* e *P. aeruginosa*, assimilam estes compostos (INOUE *et al.*, 1991; WEBER *et al.*, 1993; CRUDEN *et al.*, 1992).

2.3 Vias bioquímicas de degradação aeróbica do benzeno e tolueno por *Pseudomonas putida* F1

As vias bioquímicas de degradação dos compostos como o benzeno, tolueno e xileno foram estudadas em microorganismos da espécie *P. putida* (Figura 2) e posteriormente observadas em outros gêneros como *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Alcaligenes* e *Nocardia* (LEE *et al.*, 1995a; LEE *et al.*, 1995b). O tolueno é frequentemente o primeiro hidrocarboneto a ser degradado seguido pelos isômeros do xileno (EDWARDS AND GRBIC-GALIC, 1992) em consequência do complexo enzimático específicas das espécies de *P. putida*, como a tolueno dioxigenase e xileno oxidase, que são as primeiras a atuarem na oxidação destes compostos até a formação de um subproduto comum conhecido por catecol (Figura 2) (ZYLSTRA *et al.*, 1988).

Um dos caminhos da quebra do catecol, a *orto* clivagem, é observada pela quebra do composto entre átomos de carbono que estão ligados aos grupos hidroxila. A outra via de quebra do catecol conhecida por *meta* clivagem, difere da oxidação *orto* por ter início entre átomos de carbono onde somente um deles está ligado ao grupo hidroxila. O anel é então clivado por intermédio de uma hidrolase. Os produtos finais são ácidos orgânicos que podem ser posteriormente degradados até CO₂ (Figura 3)(CHAPELLE, 1993; LEE *et al.*, 1995a).

Estudos com *P. putida* demonstram que os processos bioquímicos envolvidos na degradação destes compostos monoaromáticos, assim como a presença de sistemas enzimáticos apropriados, contribuem potencialmente para biodegradação destes poluentes (LEE *et al.*, 1995b).

Através da bioquímica de degradação destes compostos, pode-se dizer que a facilidade de metabolizar certos compostos, está relacionada com a complexidade do metabólito que é formado. Moléculas mais complexas disponíveis aos microorganismos, são degradadas com menor eficiência, refletindo limitações bioquímicas das vias degradativas disponíveis para metabolização destas (CHAPELLE, 1993).

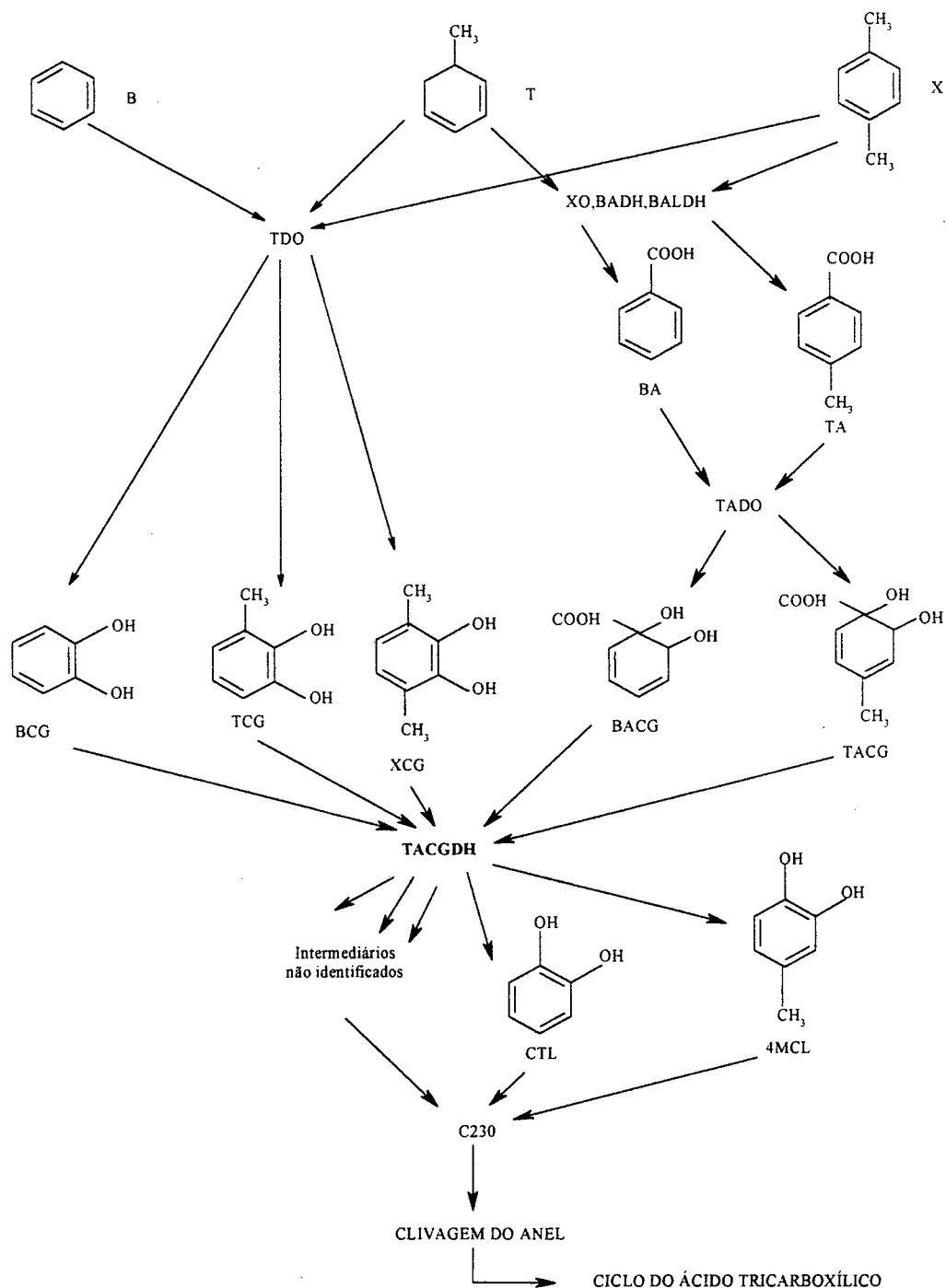


Figura 2. Vias metabólicas construídas para degradação simultânea dos BTX. Linhas pontilhadas representam a via tod e linhas sólidas representam a via tol. Abreviações: B, benzeno; T, tolueno; x, xileno; TODO, tolueno dioxigenase; XO, xileno oxidase; BADH, benzil álcool desidrogenase; BALDH, benzaldeído desidrogenase; BA, ácido benzóico; TA, ácido tolúico; TADO, toluato desidrogenase; BCG, benzeno-cis-glicol; TCG, tolueno-cis-glicol; XCG, xilenocis-glicol; BACG, benzoato-cis-glicol; TACG, toluato-cis-glicol; TACGDH, toluato-cis-glicol desidrogenase; CTL, catecol; 4MCL, 4-metilcatecol; C230, catecol 2,3-dioxigenase.

Fonte: LEE *et al.*, 1995a.

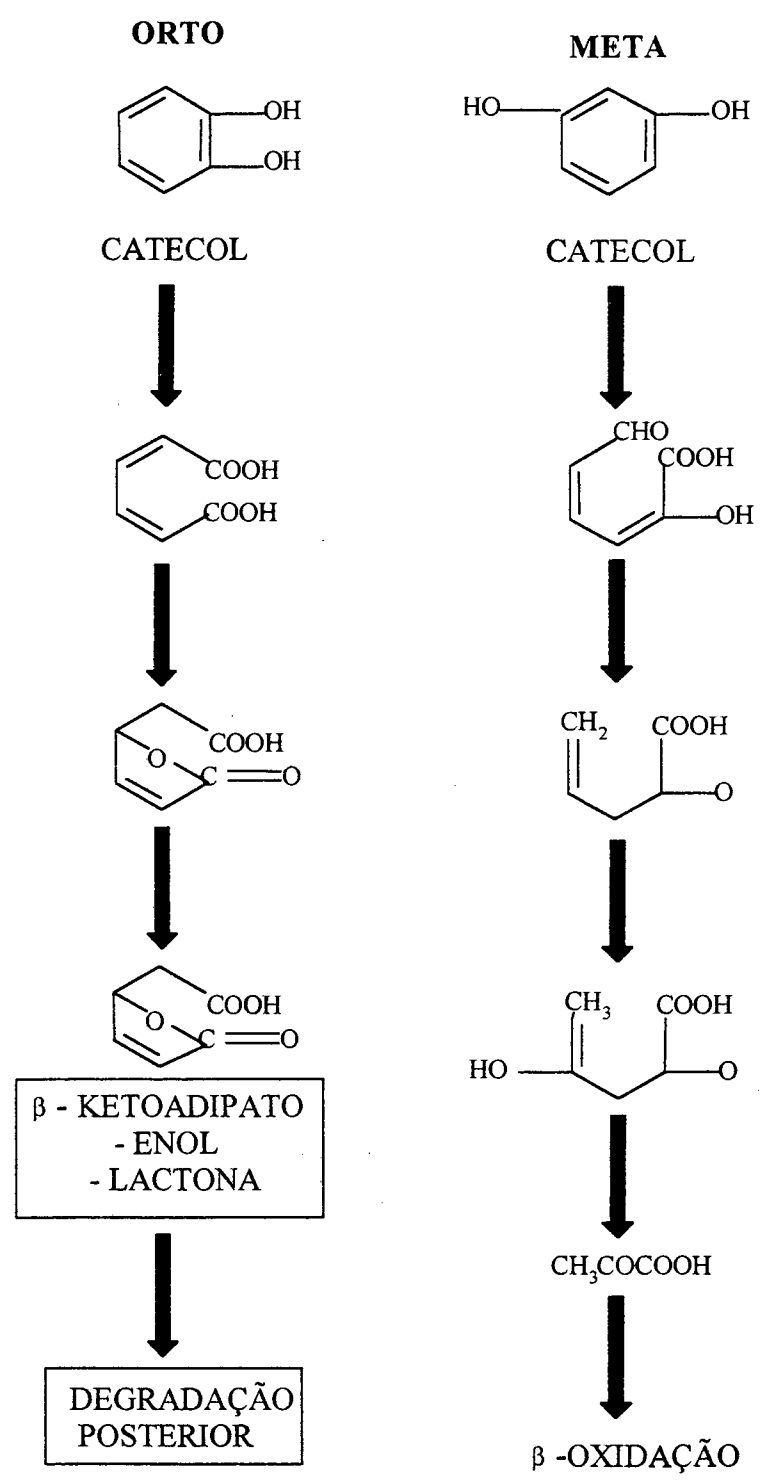


Figura 3. Biodegradação do catecol via *orto* e *meta* clivagem
Fonte: CHAPELLE, 1993.

2.4. Cinética de degradação

Informações sobre a cinética de degradação de compostos químicos são de extrema importância porque possibilitam estimar a persistência dos contaminantes no ambiente, prever suas concentrações em um dado tempo de modo a determinar a possibilidade de completa degradação destes compostos, antes que atinjam sítios de exposição aos organismos. A biodegradação de um substrato orgânico particular pode ser obtida por microorganismos que estão: (a) crescendo diretamente em função do substrato específico como única fonte de energia; (b) crescendo sobre outro nutriente orgânico como fonte de carbono e energia, e metabolizando, conseqüentemente o substrato de interesse; ou (c) não utilizando o substrato para o crescimento celular (ALEXANDER, 1994).

Se um microorganismo é inoculado em reatores contendo meio líquido, fatores de crescimento e nutrientes inorgânicos necessários para degradação de um certo composto químico, a taxa do crescimento destes organismos será diretamente proporcional a concentração do substrato disponível. Desta forma, a taxa de crescimento dos microorganismos em função da concentração do substrato pode ser expressa matematicamente segundo MONOD:

$$\mu = \mu_{\text{máx}} \frac{S}{K_s + S}$$

onde μ é a taxa de crescimento específica da bactéria, $\mu_{\text{máx}}$ é a taxa de crescimento específica máxima (que ocorre para altas concentrações de substrato), S é a concentração do substrato e K_s é a constante que representa a concentração do substrato para a qual a taxa de crescimento é a metade da taxa de crescimento máxima (ALEXANDER, 1994; ROBINSON AND TIEDJE, 1983; McCARTY, 1972). A expressão da equação de Monod, é representada graficamente na Figura 4. Os valores de K_s representam a afinidade do organismo em relação ao substrato, ou seja, quanto menor o valor de K_s , maior a afinidade do microorganismo em relação a molécula em questão. Valores de K_s podem variar para uma mesma espécie de bactéria quando vários substratos ou concentrações são analisadas. Para decomposição aeróbica do substrato o valor de K_s geralmente é menor que 20 mg/L (McCARTY, 1972).

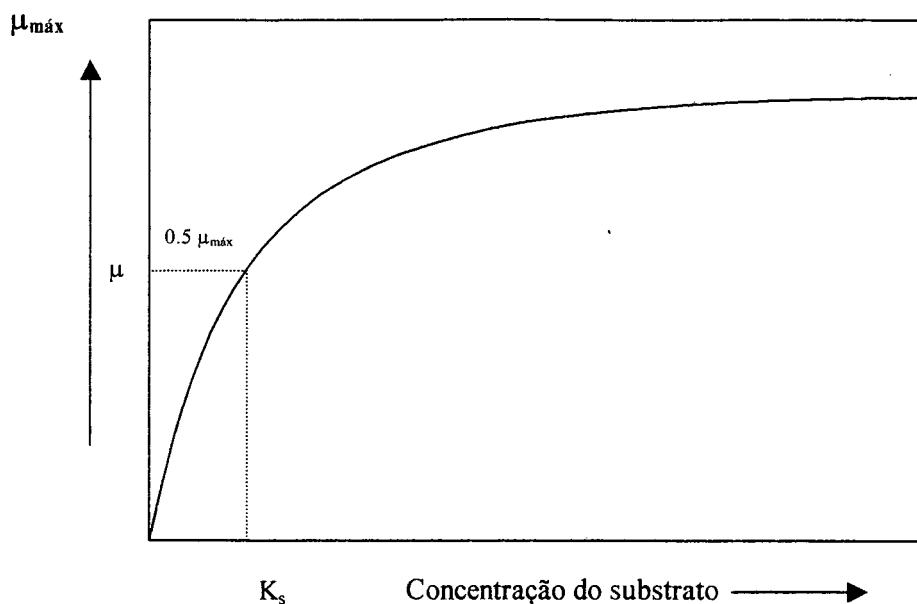


Figura 4. Relação entre taxa de crescimento bacteriano e a concentração do substrato (C) como fonte de energia.

Fonte: ALEXANDER, 1994.

Organismos capazes de crescerem sob altas concentrações de substrato, tipicamente crescem menos para baixas concentrações, provavelmente por baixa afinidade ao substrato (alto K_s). Alternativamente, organismos que crescem eficientemente em baixas concentrações de substrato, geralmente exibem baixas taxas de crescimento para altas concentrações do substrato (baixo K_s) (KLECKA AND MAIER, 1985).

Quando a concentração do substrato é muito maior que a constante de meia-velocidade K_s , ($S_0 \gg K_s$) (cinética logarítmica), a maior parte do substrato irá desaparecer, enquanto os sistemas metabólicos celulares são saturados (SIMKINS AND ALEXANDER, 1984) (Figura5). Como exemplo, a mineralização de 5,0ng/mL a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de fenol em água de lago foi obtida pela análise de cinética de degradação logarítmica (JONES AND ALEXANDER, 1986). As taxas de mineralização para altas concentrações (100 $\mu\text{g/ml}$) de benzoato por uma população de *Pseudomonas* sp. também foram medidas e calculadas pela análise de regressão não-linear, através da cinética logarítmica segundo Monod (SIMKINS AND ALEXANDER, 1984).

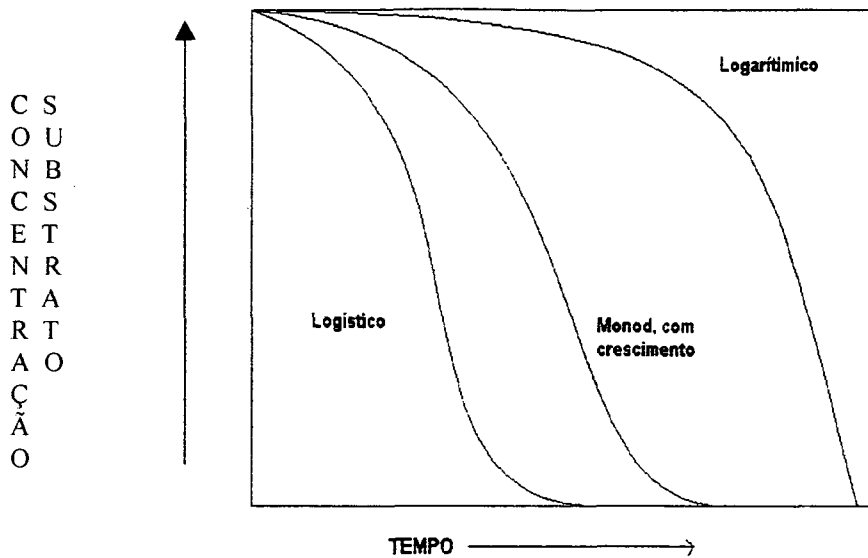


Figura 5. Curvas de degradação para substratos que são metabolizados por diferentes tipos de cinética.

Fonte: ALEXANDER, 1994.

A cinética logarítmica de degradação do substrato pode ser escrita como:

$$dS/dt = \mu_{\text{máx}}(S_0 + X_0 - S)$$

que integrando resulta em:

$$S = S_0 + X_0[1 - \exp(-\mu_{\text{máx}}t)]$$

onde S_0 é a concentração inicial de substrato, S é a concentração de substrato no tempo t e X_0 é a quantidade de substrato necessária para produzir a população microbiana inicial (ALEXANDER, 1994).

Quando a concentração inicial de substrato é muito inferior a K_s ($S_0 \ll K_s$), a taxa de crescimento diminui progressivamente, ou ainda, a taxa de crescimento microbiano torna-se proporcional a concentração do substrato (SIMIKINS AND ALEXANDER, 1984). O número de bactérias continua a crescer mesmo para baixas concentrações de substrato, porém, o período entre cada divisão celular torna-se progressivamente maior.

O modelo logístico simula este tipo de cinética e está representado na Figura 5. A cinética logística para degradação do substrato pode ser escrita como:

$$-dS/dt = dS(S_0 + X_0 - S)$$

que integrando resulta em:

$$S = S_0 + X_0 / 1 + (X_0/S_0) \exp[k(S_0 + X_0)t]$$

onde $k = \mu_{\max}/K_s$. A mineralização de 2ng/mL fenol como fonte de carbono em água de lago foi obtida através do modelo logístico de cinética de degradação (JONES AND ALEXANDER, 1986).

Quando a concentração inicial do substrato é aproximadamente a mesma que K_s , ($S_0 \sim K_s$), a situação é mais complexa porque μ não é diretamente dependente da concentração inicial do substrato (quando $S_0 \gg K_s$ ou $S_0 \ll K_s$) mas permite o crescimento microbiano (Figura 5). A curva de Monod com crescimento, é apresentada na Figura 5. Matematicamente esta curva pode ser escrita como:

$$-dS/dt = \mu_{\max} S(S_0 + X_0 - S)/K_s + S$$

ou por integração em:

$$K_s \ln(S/S_0) = (S_0 + X_0 + K_s) \ln(X/X_0) - (S_0 + X_0)\mu_{\max}t$$

onde X é a quantidade de substrato necessária para a produção da população. O metabolismo de benzoato por cultura de bactérias da espécie *Pseudomonas* sp. para concentrações deste composto próximas a K_s , demonstraram seguir a cinética de Monod com crescimento (SIMKINS AND ALEXANDER, 1984).

Para os três modelos apresentados, as células estão se multiplicando em função do substrato químico no qual a biodegradação está sendo determinada, embora os microorganismos possam estar crescendo sobre outras fontes de carbono presentes. Neste caso, um dos compostos que está servindo de suporte para o crescimento celular, poderá estar reprimindo o metabolismo de outro substrato (ALEXANDER, 1994)

2.5 Múltiplos substratos. O efeito *Diauxie*.

A cinética de degradação dos compostos orgânicos são alteradas pela presença de outros substratos nos quais os microorganismos podem utilizar simultaneamente. Quando dois substratos são metabolizados ao mesmo tempo, a degradação do composto que está presente em baixas concentrações, pode ser otimizada se a população está crescendo na presença do outro composto. Como exemplo, pode-se citar a otimização da degradação de *p*-nitrofenol (PNP), por cultura de células da espécie *Pseudomonas* sp., que cresceram na presença da glicose quando presente no meio (SCHIMIDT, *et al.*, 1987).

Quando dois ou mais substratos estão em concentrações que permitem um suporte energético para manutenção e produção de biomassa, o crescimento celular exponencial característico assume a predominância de fases exponenciais separadas por um intervalo com pouco ou nenhum crescimento (Figura 6). Durante o período de crescimento exponencial bacteriano, somente um dos substratos é metabolizado, enquanto o crescimento exponencial seguinte, corresponde ao crescimento para utilização do segundo substrato. Este fenômeno é conhecido como *diauxie*. O efeito *diauxie* é caracterizado pela repressão da síntese de enzimas metabólicas (repressão enzimática) envolvidas na degradação inicial de um segundo substrato quando microorganismos estão degradando o primeiro substrato (ALEXANDER, 1994; CALDWELL, 1995; COSTA, 1987).

Quando células de *E. coli* são cultivadas em meio contendo uma mistura de lactose e glicose (Figura 6), a glicose é consumida antes que a lactose, e as enzimas necessárias para a degradação do dissacarídeo só começam a ser sintetizadas quando a concentração de glicose no meio resulta insuficiente para o fornecimento de carbono e energia para a célula. Embora a lactose esteja presente no meio durante todo o tempo, a indução das enzimas catabólicas mantêm-se reprimida na presença de glicose.

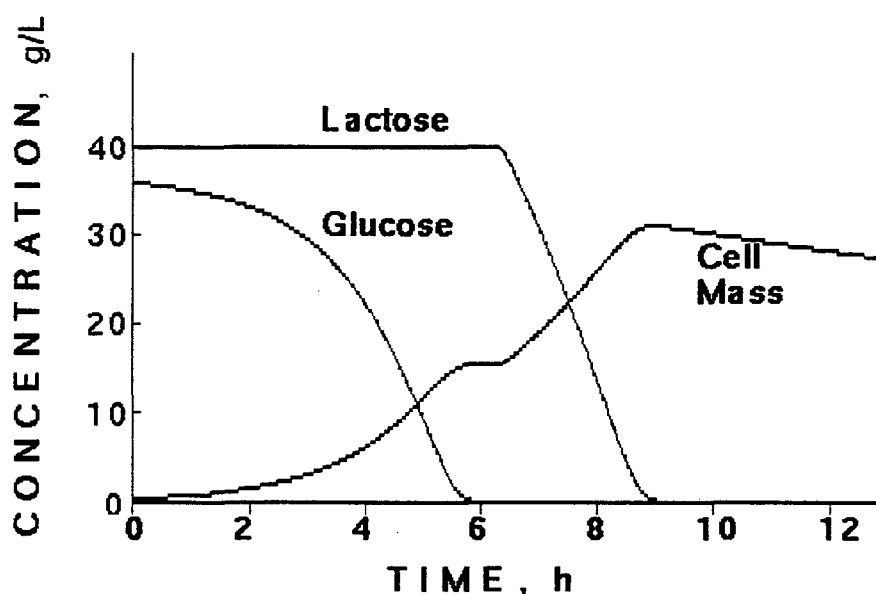


Figura 6. Crescimento bifásico de uma população bacteriana na presença de dois substratos disponíveis.

Fonte: ALEXANDER, 1994; CALDWELL, 1995.

Desta maneira, a obtenção de carbono e de energia a partir do dissacarídeo ou polissacarídeo requer um certo número de passos enzimáticos prévios até a obtenção de moléculas mais simples, enquanto a glicose e outros açúcares semelhantes podem ser captados e utilizados diretamente pelas células, sem maiores gastos energéticos (COSTA, 1987).

Pode-se prever que os microorganismos obtêm 50% mais energia da oxidação da molécula do etanol do que em relação aos compostos BTX quando presentes no meio (CORSEUIL, *et al.*, 1998). As reações metabólicas envolvidas na degradação de um determinado substrato, para obtenção de energia e multiplicação celular, são reações de oxi-redução e envolvem, portanto, a transferência de elétrons entre um substrato e um receptor de elétrons (oxigênio, nitrato, íon férrico, sulfato, etc) (CORSEUIL, 1997). As meia-reações e as respectivas energias livre de formação dos compostos tolueno, benzeno e etanol são representadas a seguir:

Doadores de elétrons	ΔG° (Kcal/ e ⁻ mol)
Tolueno: $1/36 C_7H_8 + 7/18 H_2O = 7/36 CO_2 + H^+ + e^-$	-5,46
Benzeno: $1/30 C_6H_6 + 2/5 H_2O = 1/5 CO_2 + H^+ + e^-$	-5,26
Etanol: $1/12 C_2H_6O + 1/4 H_2O = 1/6 CO_2 + H^+ + e^-$	-7,60

A mineralização de P_i (Fósforo total) e MPn (diidrogênio metil fosfonato), por cultura pura de células de *Pseudomonas testosteroni*, demonstrou que pouca ou nenhuma utilização do MPn foi obtida enquanto presente o P_i no meio e que, somente após completa remoção de P_i, se iniciou a degradação do MPn, demonstrando que, fisiologicamente, as células selecionam entre possíveis fontes de alimento, as que resultam em rendimento e custo energético mais favorável (DAUGHTON, *et al.*, 1979).

A adição de fontes alternativas de carbono como a acetona, a glicose, o metanol, ácidos orgânicos e aminoácidos demonstraram inibir a degradação anaeróbica de compostos como o *p*-nitrofenol, fenol e tolueno por culturas metanogênicas (SWINDOLL *et al.*, 1988; EDWARDS AND GRBIC-GALIC, 1994).

Como as taxas de degradação do substrato estão diretamente relacionadas com a população microbiana, o efeito *diauxie* pode não ser detectado se a biomassa presente é grande o suficiente para metabolizar simultaneamente, todas as fontes de energias presentes. SCHIMIDT, *et al.*, 1987, descreveu o efeito *diauxie* para altas concentrações de *p*-nitrofenol e glicose, utilizados como fontes de energia por células de *Pseudomonas* sp., sendo observado que a degradação simultânea destes compostos foi obtida somente quando altas concentrações de células estavam presentes no meio, ou seja, de aproximadamente 3×10^7 células/mL. Resultados semelhantes foram descritos para utilização da glicose e compostos aromáticos por *Pseudomonas putida* em reatores de batelada (REBER AND KAISER APUD SCHIMIDT, *et al.*, 1987).

2.6 Mecanismos de indução e ativação dos catabólitos.

A indução e repressão de enzimas são fenômenos homeostáticos que permitem ajustar o metabolismo celular através do controle de expressão gênica frente às mudanças que ocorrem no ambiente, como descrito para o sistema de utilização de lactose na enterobactéria *E. coli*. Na indução enzimática, uma proteína repressora inicialmente na fase ativa é desativada pela interação com uma fonte de carbono e

energia. Sob estas condições, a proteína repressora desocupa uma região regulatória do genoma celular conhecida como locus operador (O) de forma a não poder prevenir a ligação da molécula de DNA-dependente da RNA polimerase a uma outra região do genoma responsável pela ligação da molécula de DNA-dependente da RNA-polimerase, a região promotora (P). A ligação da DNA-dependente da RNA-polimerase a região P, permite o reconhecimento da informação das sequências de bases e tem-se o início do processo de formação de enzimas (Figura 7 (A)). A ativação dos catabólitos é a segundo maior mecanismo de controle de expressão gênica que afetam o metabolismo degradativo, agindo concomitantemente com a indução enzimática. Na ativação dos catabólitos, a presença de uma molécula ativa de uma proteína regulatória particular, a proteína ativadora de catabólitos (CAP), e uma proteína repressora dos catabólitos, a adenosina monofosfato cíclica (cAMP) agem para utilização de um substrato particular. A atividade da CAP está em função da concentração intracelular de cAMP e normalmente é sintetizada em uma forma inativa convertendo-se para forma ativa através da sua interação com a cAMP. A concentração de cAMP está em função do estado de energia disponível para a célula. Em meio contendo duas fontes de carbono como energia, células de *E.coli* utilizam, primeiramente a glicose produzindo altas concentrações de energia celular (ATP) e baixas concentrações de cAMP e adenosina difosfato (ADP). A partir de uma queda na concentração da glicose, o nível de ATP decresce no interior da célula e aumenta conseqüentemente o nível de cAMP, ativando a CAP (Figura 7)O complexo cAMP/CAP, liga-se a região P do genoma e facilita a ligação da DNA-dependente RNA-polimerase permitindo a transcrição do código para a utilização da lactose (CALDWELL, 1995; COSTA, 1987).

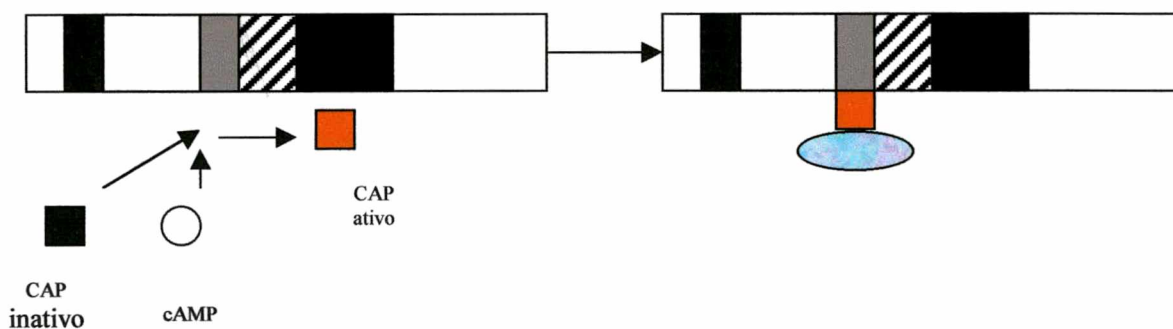
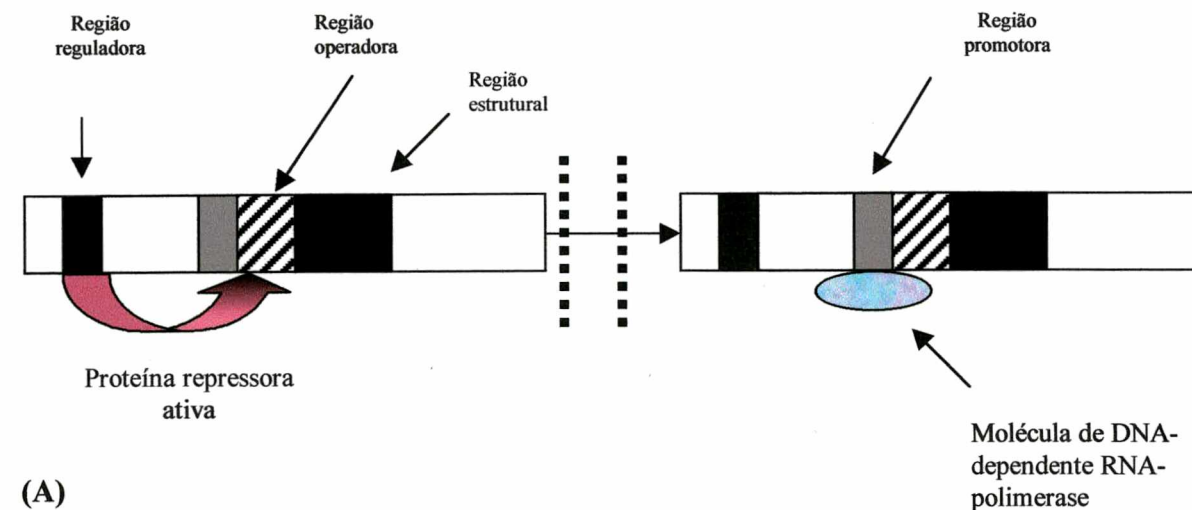


Figura 7. Esquema das regiões do genoma bacteriano. (A) Repressão. Uma proteína repressora ocupa a região do operador inibindo a ligação da DNA-dependente da RNA polimerase e prevenindo o processamento da formação enzimática. (B) Ativação dos catabólitos. Adenosina monofosato cíclica (cAMP) interage com a proteína ativadora do catabólito na forma inativa (CAP) tornando-o ativo. O CAP ativo facilita a ligação da molécula de DNA-dependente da RNA-polimerase a região promotora, permitindo a transcrição enzimática.

Fonte: CALDWELL, 1995.

2.7 Determinação da biomassa.

A biomassa de uma população bacteriana tem sido reconhecida como importante parâmetro em relação à ecologia microbiana, cinética e estimativas de taxas respiratórias ou energéticas. A contagem destes microrganismos é frequentemente requerida quando se deseja estimar a produtividade de um sistema, a produção da biomassa ou o potencial

de utilização do substrato (WALTER AND CRAWFORD, 1997).

Várias técnicas tem sido utilizadas para se determinar a biomassa bacteriana em ecossistemas naturais. Atualmente a técnica que tem recebido considerável atenção considera a medida do biovolume celular bacteriano (volume por célula) para posteriormente conversão para biomassa celular como carbono por célula ou peso seco (BRATBAK, 1985). A biomassa é obtida por vários métodos dependendo da amostra e do propósito do estudo. Técnicas comumente utilizadas provém de estimativas do biovolume bacteriano através de observações microscópicas (NORLAND *et al.*, 1987). Dentre estas técnicas, a microscopia de epifluorescência, microscopia eletrônica, microscopia de transmissão de elétrons e analisadores eletrônicos de partículas tem sido utilizados.

Células bacterianas podem ser facilmente distinguidas de outras partículas da amostra através das várias técnicas de microscopia. O corante para epifluorescência conhecido por Alaranjado de acridina (AO), é amplamente utilizado para contagem direta de bactérias, e tem sido utilizado também como metodologia para obtenção do volume bacteriano (BRATBAK, 1985). A utilização deste corante, possibilita uma contagem precisa, discriminando possíveis erros cometidos pela interferência de outras partículas, porque liga-se a moléculas de RNA ou DNA. A contagem celular através da microscopia direta tem se tornado popular devido a que muitas comunidades bacterianas que ocorrem na natureza, não podem ser estimadas através da contagem das colônias sobre vários meios de cultura em placa. Uma desvantagem da metodologia e de não poder distinguir microorganismos vivos, mortos ou dormentes. (KING AND PARKER, 1988).

Geralmente, a contagem visual direta das células são tediosas e refletem a subjetividade da enumeração. O uso de um sistema de análise de imagens acoplado a microscópios de fluorescência tem sido frequentemente utilizado para se evitar o problema. O sistema digitaliza as imagens de células coradas de um determinado campo visual através de uma câmera acoplada ao microscópio. A imagem digitalizada pode então ser arquivada, editada e analisada para contagem total dos microorganismos ou para se estimar parâmetros celulares como perímetro, área, comprimento, e largura. Os resultados podem ser expressos em unidades de pixels ou convertidos para micrômetros desde que convertidos adequadamente através de uma lâmina de calibração padrão para cada objetiva utilizada. Os resultados obtidos podem ser impressos como imagens, dados

estatísticos, ou histogramas. Ainda que os processos necessários na preparação de lâminas, ajuste do foco e mudança dos campos visuais, são os mesmos para os métodos convencionais de observação direta, as análises de imagens se destacam principalmente pela confiabilidade e otimização do tempo nos registros dos dados (SIERACKI *et al.*, 1985).

CAPÍTULO 3

3 MATERIAIS E MÉTODOS**3.1 Material Biológico**

Para a realização dos experimentos de biodegradação aeróbica do tolueno, benzeno e etanol, foi utilizado cultura pura de bactérias da espécie *Pseudomonas putida* F1 (PpF1) capazes de metabolizar o tolueno (Figura 8). O material biológico foi concedido por Pedro Alvarez, P.h.D., 1997, (Department of Civil and Environmental Engineering, University of IOWA, EUA).

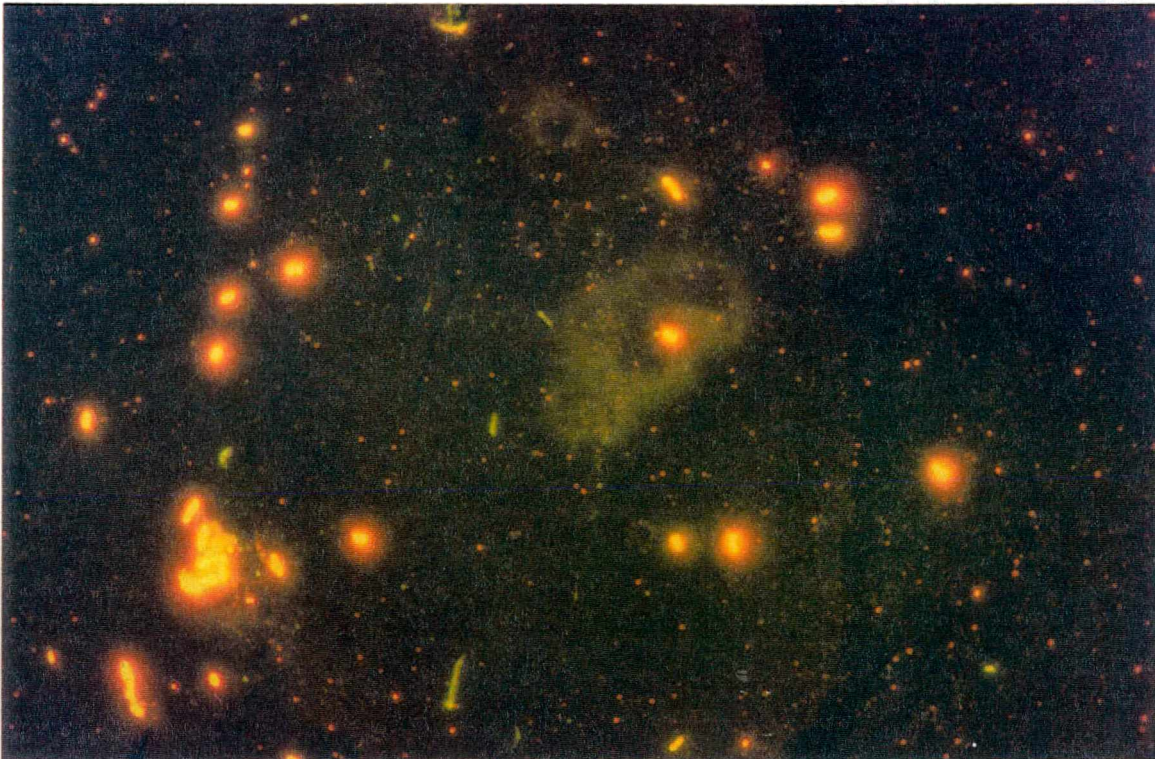


Figura 8: Fotomicrografia de fluorescência de células de *Pseudomonas putida* F1.
Aumento 1000x.

3.2 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado na propagação das células e nos experimentos de biodegradação aeróbica dos compostos testados foi o Hunter's Mineral Base (MSB) (STANIER *et al.*, 1966) (Apêndice I), o qual proporciona todos os íons metálicos catiônicos em concentrações suficientes e quantidades de nitrogênio e fósforo necessários para manter as populações de *Pseudomonads* em alta densidade.

O meio completo foi preparado por diluição de três soluções estoques: uma solução tampão (solução A), uma solução de sulfato de amônia como fonte de nitrogênio (solução C) e uma fonte de minerais (solução B).

Solução A: Foi dissolvido 141,2 g (Na_2HPO_4) e 136 g (KH_2PO_4) em 1 L de água destilada. Esta solução apresentou um pH de 7,25.

Solução C: Foi dissolvido 200 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 1 L de água destilada.

Solução de metais: Foi dissolvido os seguintes reagentes em 800 mL de água deionizada, na respectiva ordem: 10,95 g ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 1,54 g ($\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 5,00 g ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); 392 mg ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$); 248 mg ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e 177 mg ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Adicionou-se algumas gotas de H_2SO_4 para retardar a precipitação. A solução final foi avolumada para 1 L.

Solução B: 14,45 g (MgSO_4); 3,33 g ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 9,25 mg ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); 99 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 50 mL (solução de metais), avolumou-se a solução final para 1 L.

Procedimento de preparo da Solução B:

1. Foi dissolvido o MgSO_4 , o CaCl_2 e o $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ junto com o FeSO_4 em 150 mL de água.
2. Avolumou-se a solução para 950 mL com água deionizada e o pH ajustado para 6,8 com NaOH 10N. Isto foi feito vagarosamente para o pH não exceder a 7,0 e resultar na formação de um precipitado.
3. Avolumou-se a solução para 1 L e estocou-se a temperatura de 4°C.

Para preparação do meio MSB propriamente dito, foram adicionados as seguintes soluções para 1 L:

1. Solução A → 40mL

2. *Solução B* → 20mL

3. *Solução C* → 5 mL

As fontes de carbono orgânico como o tolueno, o benzeno e o etanol utilizadas nos experimentos foram acrescentadas ao meio MSB posteriormente a sua esterelização em autoclave a 120°C e 1 atm por 20 minutos.

3.3 Compostos químicos

Os compostos químicos utilizados neste trabalho foram o tolueno, o benzeno, e o etanol, todos P.A., marca MERK®, com grau analítico superior a 99%.

3.4 Microcosmos

Os microcosmos utilizados nos experimentos de biodegradação dos compostos testados foram preparados em frascos de 20 mL para Headspace AutoSampler (HP 7694) e previamente esterelizados como descrito acima. Em cada microcosmo foi adicionado:

1. 5 mL de meio MSB (para se garantir o volume de oxigênio disponível);
2. o inóculo celular preparado como descrito no item 3.7.1 (exceto para montagem da curva de calibração e experimentos controle);
3. o volume da solução padrão contendo o composto a ser analisado.

Os microcosmos preparados foram tampados hermeticamente com septos de borracha de 0,8 mm e 20 mm de diâmetro (Mod. HP) e com lacres de alumínio (Mod. HP) (Figura 9). Para cada experimento foram preparados aproximadamente 45 microcosmos. Montado os experimentos, estes foram mantidos em agitação contínua de 160 rpm em agitador Dubnhoff e sob temperatura ambiente controlada de $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.5 Soluções padrões

As soluções padrões foram preparadas gravimetricamente (EDWARDS AND GRBIC-GALIC, 1994) em balança analítica (SHIMADZU, Mod Libror AEG-120g). A pesagem dos compostos foi feita diretamente em frascos de 20 mL contendo 15 mL de água destilada.



Figura 9: Microcosmos utilizados nos experimentos de biodegradação contendo 5mL de meio MSB.

estéril e então lacrados. A concentração da solução mãe de cada composto em $\mu\text{Mol/L}$ foi calculada com base no volume de 15 mL de água no frasco. As soluções mãe foram preparadas em concentrações inferiores aos limites de solubilidade de cada composto monoaromático (Quadro 1), ou seja, 200 mg/L para o tolueno, 500 mg/L para o benzeno e 1000 mg/L para o etanol. Todas as soluções mãe preparadas, permaneceram em agitação contínua por 48 horas em agitador Dubnhoff a 160 rpm para completa solubilidade.

Quadro 1: Limites de solubilidades dos compostos tolueno, benzeno e etanol.

Composto	Limite de solubilidade a 20°C (mg/L)
Etanol	-
Tolueno	534,8
Benzeno	1791

Fonte: GUIGER, 1996.

A alíquota da solução mãe necessária para se obter a concentração desejada na preparação da curva de calibração e nos experimentos, foi realizada através de microseringas com vedação de gás (Mod. Hamilton).

3.6 Experimentos de biodegradação.

Para as análises de biodegradação foram montados os seguintes experimentos:

1. **isolados:** tolueno, benzeno e etanol nas concentrações de 217,39, 256,41 e 6521,73 $\mu\text{Mol/L}$ para tolueno, benzeno e etanol, respectivamente;
2. **conjugados:** tolueno (217,39 $\mu\text{Mol/L}$) e benzeno (256,41 $\mu\text{Mol/L}$); tolueno (217,39 $\mu\text{Mol/L}$) e etanol (6521,73 $\mu\text{Mol/L}$) e benzeno (256,41 $\mu\text{Mol/L}$) e etanol (6521,73 $\mu\text{Mol/L}$).

3.7 Procedimento analítico

Todos os experimentos foram analisados em triplicata. As análises foram realizadas sob periodicidade aleatória de tempo em horas. Os microcosmos foram diretamente analisados em cromatógrafo a gás (CG) Mod. Hewlett Packard 5890 equipado com Detector FID, coluna HP1 (Crosslinked Methyl Siloxane - diâmetro 2,65 μm e comprimento de 30 m), amostrador automático Headspace Auto sampler (HS) Mod. Hewlett Packard 7694, nas condições descritas no Apêndice II.

O limite de detecção do CG utilizado nas condições de análises para os compostos benzeno, tolueno e etanol foram de 8ppb, 8ppb e 2 ppm, respectivamente.

A precisão dos dados obtidos no CG foi testada de acordo com a porcentagem de recuperação do SPIKE⁽¹⁾ segundo métodos da EPA 8015^A (Tabela 1).

Os cromatogramas foram interpretados segundo o software ChemStation versão A.03.34. O Apêndice IV sumariza as condições de trabalho utilizadas no HS e no CG.

3.8 Preparação do inóculo

Células de PpF1 foram mantidas e repicadas em placas de Petri contendo 10 mL do meio mineral básico (MSB) acrescido de 1,5 - 2% de ágar e 1g/L de glicose e estocadas em estufa incubadora a $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Para a montagem do inóculo, células foram cuidadosamente transferidas com alça de platina das placas de Petri para Erlenmayer contendo 20 mL de meio MSB esterelizado como descrito anteriormente. A solução resuspendida serviu como padrão para o inóculo.

TABELA 1: Porcentagem de recuperação do Spike obtido para análises dos compostos etanol, benzeno e tolueno em CG HP5890.

COMPOSTOS	<u>Porcentagem de recuperação em (%)⁽²⁾</u>				<u>LIMITE QC(%)⁽³⁾</u>
	Etanol	95,8	98,9	107,1	107
Benzeno	96,3	93,1	92,6	94,5	97-91
Tolueno	94,4	92,5	91,6	94,4	96-90

O volume da solução padrão utilizada para inocular os experimentos na concentração aproximada de 10^3 células/mL foi calculada com base na contagem direta de células (item 3.9) e realizado com o auxílio de micropipetas automáticas (10 - 100 μ L).

3.9. Contagem celular

O número de bactérias/ mL e a biomassa celular foram determinados com base na microscopia direta de fluorescência (KING AND PARKER, 1988; SIERACKI *et al.*, 1985; HOBBIE *et al.*, 1977) . Segundo vários autores, os microorganismos podem ser contados utilizando-se microscopia direta e suas biomassas estimadas por fatores de conversões.

Métodos de contagem em placa (UFC) ou em tubos múltiplos (NMP) são frequentemente empregados para este propósito mas foram desconsiderados para este trabalho em virtude do consumo de tempo necessário ao período de incubação dos organismos (RODRIGUEZ *et al.*, 1992).

(1) Nome dado à solução através da qual se verifica a exatidão (resultado obtido próximo ao esperado) e a precisão do equipamento.

(2) Ou ps (%), onde $ps = 100 \times A/T$ (A= concentração obtida na análise e T = concentração esperada).

(3) Limite de qualidade total ou a % da exatidão da análise após a média das amostras (p) e o desvio padrão (Sp) utilizando-se os cálculos $p-2Sp$ e $p+2Sp$.

10 μL de cada amostra foi coletado em microseringa e espalhado sobre uma área delimitada de 1 cm^2 em lâmina de vidro para microscopia. As amostras foram fixadas com calor e coradas com alaranjado de acrinidina (A.O.) (0,01%) por 2 minutos, e então lavadas com água.

As lâminas foram observadas em microscópio trinocular equipado com analisador de imagens (Mod. OLYMPUS - BX40), em aumento de 1000x em óleo de imersão e sob fluorescência (lâmpada de halogênio Mod. Phillips 7724; 100 WHAL) (Figura 10). A contagem das células foi obtida com o auxílio do software Image-Pro Plus versão 1.3.2. Cerca de 15 à 17 campos aleatórios por cm^2 de área ocupada pela amostra foram contados. A área do campo visual foi de aproximadamente $2,92 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$ obtida através da conversão da unidade de pixel para micron pela calibração do equipamento com lâmina micrométrica (Olympus – 0,02 mm). O número aproximado de células por mL da amostra foi determinado através da fórmula: **[(número de células x área total (100 mm^2)/área do campo visual ($2,92 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$))/(0,01mL)].**

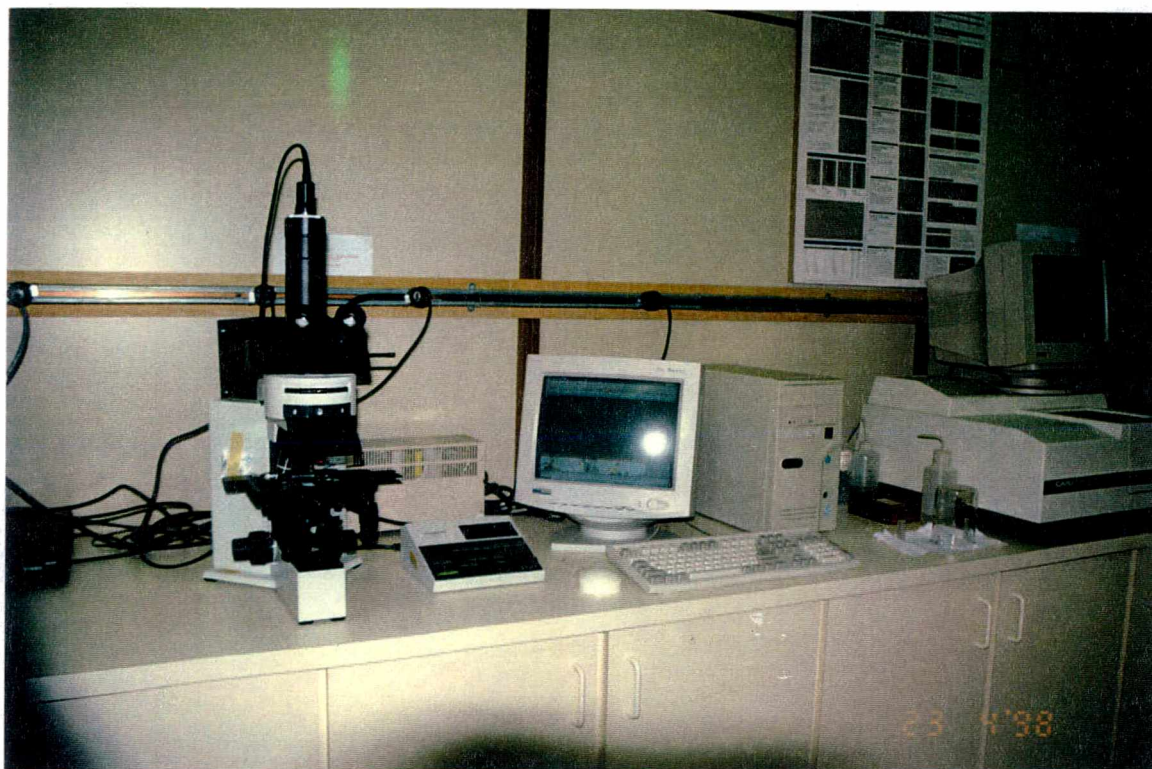


Figura 10: Microscópio trinocular com analisador de imagens.

3.9.1 Cinética Microbiana

A determinação da cinética microbiana foi obtida empiricamente em função do crescimento biológico e da utilização do substrato com base na equação de Monod, (McCARTY, 1972; ALEXANDER, 1994).

A taxa de consumo do substrato (S) pelo crescimento bacteriano em reatores em batelada pode ser descrita por:

$$dS/dt = [\mu_{\max} S/(K_s+S)]X/Y \quad (1)$$

onde μ_{\max} é a taxa de crescimento específico máxima ($\mu\text{mol dia}^{-1}$), K_s é a constante de meia-velocidade para o crescimento (μmol) e Y é o coeficiente de produção celular ($\mu\text{g(células)} \mu\text{mol(substrato)}^{-1}$). O coeficiente de produção celular Y e a biomassa inicial X_0 em g foram estimados com base no volume celular médio obtido.

A determinação do volume das células de PpF1 foi calculada (BRATBAK, 1985; NORLAND *et al.*, 1987) para bacilos (Eq. (2)) ou cocos (Eq. (3)):

$$V = \pi L^2 (C - L/3) \quad (2)$$

ou

$$V = \pi/4 L^2 (L - L/3) =$$

$$V = 4/3 \pi r^3 \quad (3)$$

Onde:

V: Volume em μm^3

L: Largura celular

C: Comprimento celular

r: Raio celular.

Utilizando-se a densidade equivalente a da água, ou seja, 1Kg/L, a biomassa celular fresca foi equivalente ao volume celular médio determinado.

A variável X que representa a concentração da biomassa foi eliminada da equação 1 através da equação abaixo:

$$X = Y(S_0 - S) + X_0 \quad (4)$$

que descreve X no tempo t para S. Depois de eliminar-se X, a equação 1 torna-se:

$$dS/dt = -[\mu_{\max}S/(K_s+S)][Y(S_0-S) + X_0]/Y \quad (5)$$

que por integração resulta em:

$$C_1 \ln\{[Y(S_0-S)+X_0]/X_0\} - C_2 \ln(S/S_0) = \mu_{\max} t \quad (6)$$

onde $C_1 = (K_s Y + S_0 Y + X_0) / (Y S_0 + X_0)$ e $C_2 = K_s Y / (Y S_0 + X_0)$. A equação 1 descreve uma curva em forma de S para o consumo do substrato durante o crescimento em reatores em batelada. As análises de regressão não-linear a partir da equação 5 foram usadas para estimar os valores de K_s e μ_{\max} com auxílio do programa computacional SigmaPlot versão 4.16.

Os dados para a curva de degradação e biomassa simulada segundo Monod, foi plotada com base na equação abaixo (ROBINSON AND TIEDJE, 1983; CORSEUIL, 1994; CORSEUIL AND WEBER, 1994):

$$dX/dt = [\mu_{\max} S / (K_s + S)] X \quad (7)$$

CAPÍTULO IV

4. Resultados e discussão

4.1 Introdução

Os possíveis efeitos do etanol na cinética de biodegradação aeróbica dos compostos tolueno e benzeno foram determinados através de experimentos em microcosmos contendo meio de cultura MSB, a concentração dos substratos e microorganismos da espécie *Pseudomonas putida* F1 (PpF1).

Os dados originais da degradação dos substratos testados, assim como da concentração celular em número de células por mL, estão apresentados nos Apêndice III e IV, respectivamente.

4.2 Determinação da biomassa

A biomassa celular de PpF1 foi obtida com base no volume celular, como descrito na equação 3. Através da observação das células de PpF1 no analisador de imagens acoplado ao microscópio óptico de fluorescência sob aumento de 1000x, determinou-se a área do diâmetro celular e conseqüentemente o raio celular (considerando a morfologia das células de PpF1 (cocos)). O diâmetro médio encontrado para uma amostragem aleatória (n=20) foi de 0,96 μm com uma variância de 3% (Tabela 2). O peso fresco obtido foi de $4,8 \times 10^{-10}$ mg. A biomassa em peso seco foi estimada considerando o valor da matéria seca para células de *P. putida* equivalente a 48,4% (BRATBAK AND DUNDAS, 1984). McCARTY, 1975 determinou o peso seco de uma célula bacteriana como sendo de 2×10^{-10} mg.

TABELA 2: Tamanho das células de *Pseudomonas putida* F1 obtidos através do analisador de imagens em microscopia óptica de fluorescência (Aumento 1000x).

Diâmetro celular (μm)	Média (μm)	Desvio Padrão	Variância
0,74	0,96	$\pm 0,19$	0,03
0,79			
0,80			
0,79			
0,90			
1,00			
1,11			
1,07			
0,97			
1,27			
0,78			
0,83			
0,97			
0,74			
1,22			
1,39			
0,90			
0,98			
1,17			
0,88			

4.3 Cinética de degradação dos compostos tolueno, benzeno e etanol testados isoladamente

Os parâmetros da cinética de biodegradação dos compostos testados foram verificados através da equação de Monod, que descreve a taxa de utilização do substrato em função do crescimento bacteriano (SIMKINS AND ALEXANDER, 1984; KLECKA AND MAIER, 1985; CORSEUIL, 1994; CORSEUIL AND WEBER, 1994).

Os valores para a máxima taxa de utilização do substrato $\mu_{\text{máx}}$, e do coeficiente de meia-velocidade K_s , foram determinados para as curvas de degradação do substrato em função do tempo, através de análises estatísticas de regressão não-linear, com a ajuda do programa computacional SIGMAPLOT 4.16.

Os coeficientes de máxima produção celular Y , determinados neste trabalho, foram obtidos após a completa degradação mensurável dos compostos de interesse. CORSEUIL, 1994; CORSEUIL AND WEBER, 1994, determinaram valores de Y segundo modelos termodinâmicos de McCARTY, 1975, de degradação dos compostos tolueno, benzeno e xileno, utilizando como base, cálculos estequiométricos que relacionam a energia livre de reação destes compostos com a produção celular máxima. Os valores encontrados por este autor foram de 0,65, 0,66 e 0,67 mg (células) $\text{mg}(\text{substrato})^{-1}$ para benzeno, tolueno e xileno, respectivamente.

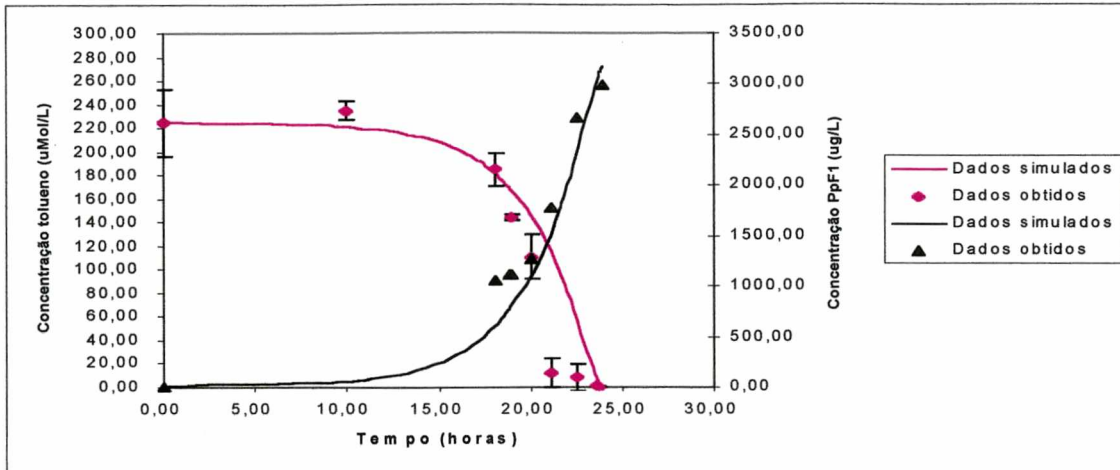
Os resultados obtidos durante a fase de crescimento celular de PpF1 em relação aos substratos testados, demonstraram que mesmo após a completa degradação destes, células de PpF1 mantiveram o crescimento (Tabelas 34, 35 e 36 (APÊNDICE IV)). A presença de outros compostos intermediários ou subprodutos formados pela metabolização dos substratos tolueno, benzeno e etanol, como por exemplo, o catecol para os compostos monoaromáticos (LEDDY *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 1995ab), suportam a idéia de que estes subprodutos serviram de substrato para manutenção do crescimento celular influenciando consequentemente nos coeficientes de Y para 48, 96 e 144 horas (Tabela 3).

Os dados obtidos e simulados da cinética de biodegradação e do crescimento da biomassa verificado nos experimentos de degradação de $217,39\mu\text{Mol/L}$ de tolueno, $256,41\mu\text{Mol/L}$ de benzeno e $6521,73\mu\text{Mol/L}$ de etanol testados isoladamente estão apresentados nas Figuras 11 (A)(B)(C). De acordo com os dados obtidos, verificou-se que os compostos tolueno e benzeno, foram completamente degradados em 24 horas (Figuras 11(A)(B)), com taxas de utilização máxima do substrato $\mu_{\text{máx}}$ respectivas de $0,56\pm 0,04\mu\text{Mol h}^{-1}$ e $0,48\pm 0,05\mu\text{Mol h}^{-1}$ (Tabela 4). Os coeficientes de meia-velocidade K_s obtidos para estes compostos testados a concentração equivalente de 20 mg/L foram de $53,14\mu\text{Mol}$ e $50,5\mu\text{Mol}$ para o tolueno e benzeno, respectivamente (Tabela 5).

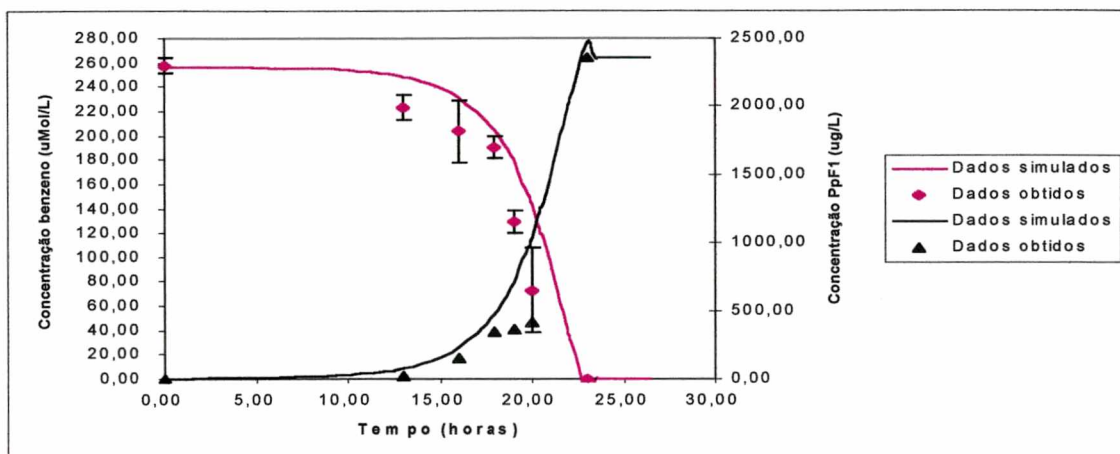
TABELA 3. Coeficientes de produção celular (Y) em função das concentrações testadas dos compostos tolueno, benzeno e etanol para 48, 96 e 144 horas.

Compostos	Coeficiente de produção celular Y ($\mu\text{g } \mu\text{Mol}^{-1}$)		
	48 h	96 h	144 h
Tolueno (217,39 μMolL)	128,73	175,23	127,62
Benzeno (256,41 μMolL)	30,59	154,68	69,78
Etanol (6521,73 μMolL)	51,62	73,89	80,64

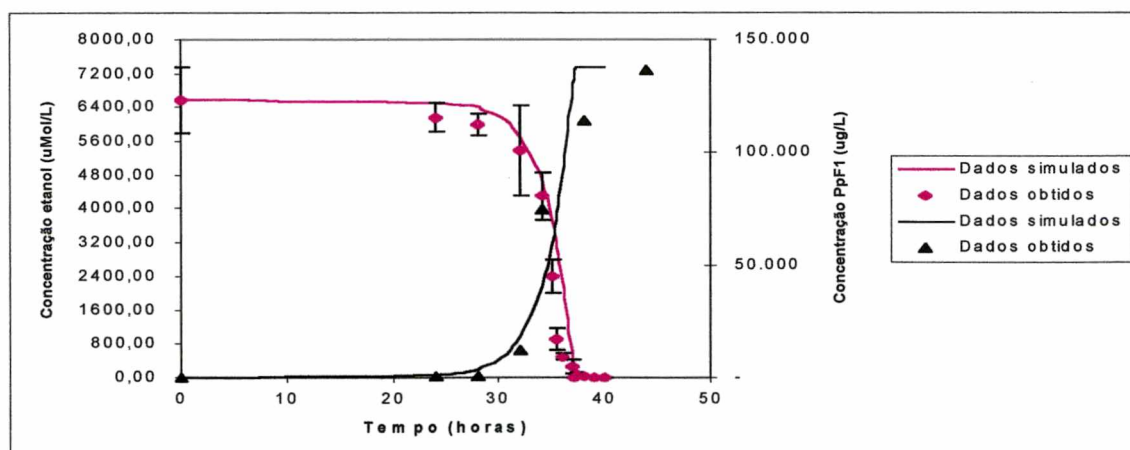
O substrato etanol testado isoladamente na concentração 6521,73 $\mu\text{Mol/L}$ demonstrou ser completamente degradado em aproximadamente 38 horas (Figura 11 C) a uma taxa de degradação inferior aquela observada para os demais compostos, ou seja, $\mu_{\text{máx}}$ 0,47 \pm 0,03 $\mu\text{Mol h}^{-1}$ (Tabela 5) e a uma constante de meia-velocidade de 2254 μMol (Tabela 5).



(A)



(B)



(C)

Figuras 11(A)(B)(C): (A) Dados obtidos e simulados para biodegradação de $217,39\mu\text{Mol/L}$ de Tolueno, (B) para biodegradação de $256,41\mu\text{Mol/L}$ de benzeno e (C) para biodegradação de $6521,73\mu\text{Mol/L}$ de etanol.

TABELA 4: Coeficientes de máxima taxa de utilização do substrato ($\mu_{\text{máx}}$) para os compostos tolueno, benzeno e etanol testados isoladamente.

Compostos	Concentração Inicial de substrato S_0 ($\mu\text{Mol/L}$)	Biomassa celular inicial X_0 ($\mu\text{g/L}$)	Coefficiente de produção celular Y ($\mu\text{g } \mu\text{Mol}^{-1}$)	Coefficiente $\mu_{\text{máx}}$ ($\mu\text{Mol h}^{-1}$)	Erro padrão	Coefficiente de correlação
Tolueno	217,39	0,2	13,85	0,56	0,046	0,98
Benzeno	256,41	0,7	9,19	0,48	0,054	0,95
Etanol	6521,73	0,7	20,92	0,47	0,035	0,98

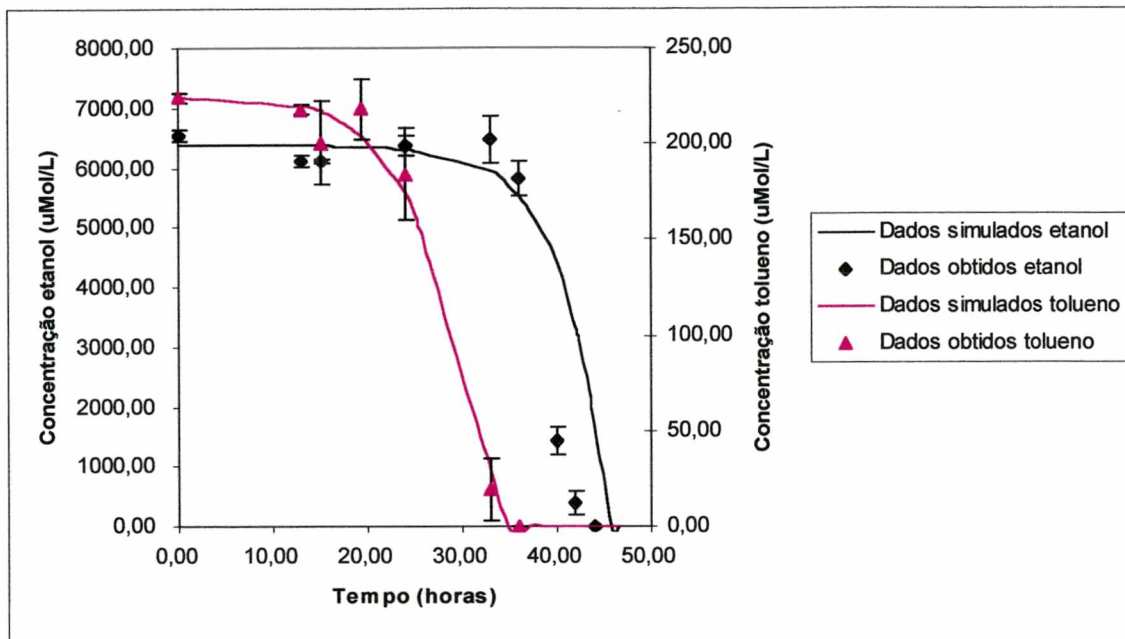
TABELA 5: Coeficientes de meia-velocidade (K_s) obtidos para os compostos tolueno, benzeno e etanol testados isoladamente.

Compostos	Concentração inicial S_0 ($\mu\text{Mol/L}$)	Biomassa inicial X_0 ($\mu\text{g/L}$)	Coefficiente de meia-velocidade K_s (μMol)	Erro padrão	Coefficiente de correlação
Tolueno	217,39	0,2	53,14	19,07	0,98
Benzeno	256,41	0,7	50,5	27,11	0,95
Etanol	6521,41	0,7	2254	529,5	0,98

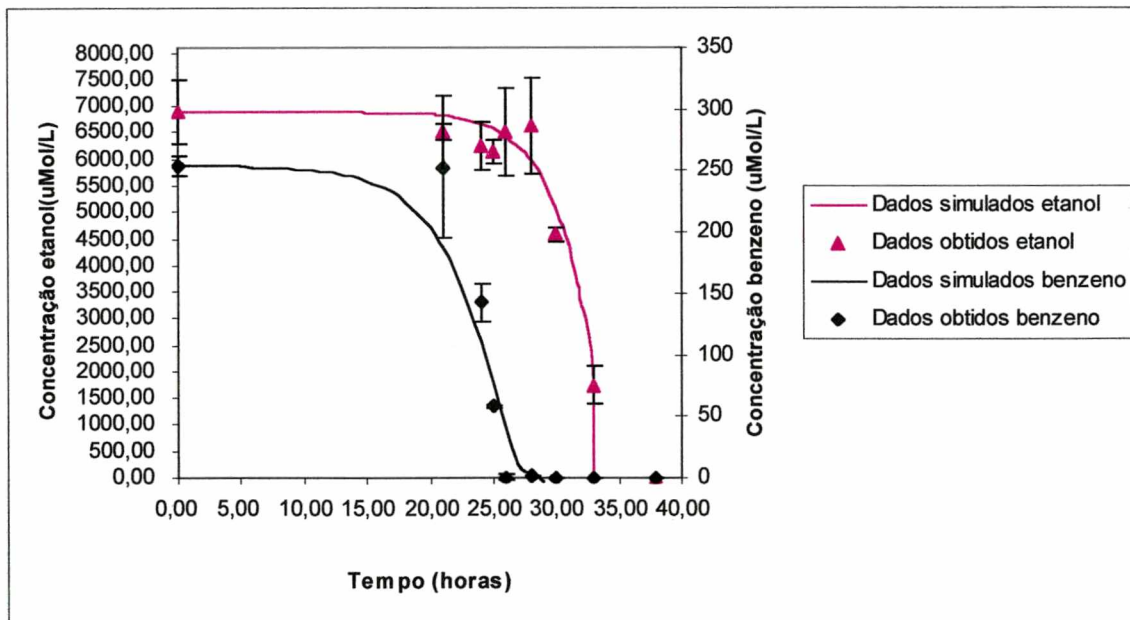
4.4. Influência do etanol nos parâmetros cinéticos de degradação dos compostos tolueno e benzeno

As figuras 12(A)(B), apresentam respectivamente, os dados obtidos e simulados da cinética de degradação de 217,39 $\mu\text{Mol/L}$ de tolueno e 256,41 $\mu\text{Mol/L}$ de benzeno testados em presença de 6521,73 $\mu\text{Mol/L}$ de etanol. De acordo com os dados apresentados nestas Figuras, observou-se que a degradação completa dos compostos tolueno e benzeno foram obtidas para 36-30 horas, respectivamente. Os coeficientes $\mu_{\text{máx}}$ e K_s obtidos para o tolueno e benzeno foram de $\mu_{\text{máx}} = 0,34 \pm 0,09 \mu\text{Mol h}^{-1}$; $K_s = 76,97 \mu\text{Mol}$ e $\mu_{\text{máx}} = 0,37 \pm 0,14 \mu\text{Mol h}^{-1}$; $K_s = 67,06 \mu\text{Mol}$, respectivamente (Tabelas 6 e 7). As taxas de $\mu_{\text{máx}}$ obtidas para os compostos tolueno e benzeno na presença do etanol foram inferiores em cerca de 39% e 23%, respectivamente. Os valores de K_s para os compostos tolueno e benzeno aumentaram consideravelmente em 45% e 33%, respectivamente quando em presença do etanol. Os menores valores encontrados da taxa de degradação dos compostos tolueno e benzeno, assim como os maiores valores de K_s obtidos para os compostos tolueno e benzeno quando em presença do etanol, poderiam indicar uma menor afinidade enzimática aos substratos monoaromáticos em função da presença do etanol.

Os compostos tolueno e benzeno testados conjuntamente, demonstraram ser totalmente degradados em 20 horas (Figura 13), a uma taxa $\mu_{\text{máx}}$ de $0,78 \pm 0,11 \mu\text{Mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $0,46 \pm 0,07 \mu\text{Mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Tabela 8). De acordo com os resultados obtidos neste experimento, verificou-se que as taxas de degradação para o substrato tolueno ($\mu_{\text{máx}}$), aumentou consideravelmente para 39% e diminuiu para o benzeno em 4%. Os maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ obtidos nesta fase experimental para o tolueno, confirmaram a afinidade enzimática da tolueno dioxigenase encontrada em PpF1 em relação ao substrato benzeno. Segundo EDWARDS AND GRBIC-GALIC, 1992 e LEE *et al.*, 1995a, o tolueno é frequentemente o primeiro hidrocarboneto a ser degradado, seguido pelos isômeros do xileno e benzeno. LEE *et al.*, 1995a, explicou ainda que, as taxas de biodegradação do benzeno verificadas por *Pseudomonas putida*.



(A)



(B)

Figuras 12(A)(B): (A) Dados obtidos e simulados para biodegradação de $217,39 \mu\text{Mol/L}$ de tolueno conjugado a $6521,73 \mu\text{Mol/L}$ de etanol ($X_0=1,30 \times 10^3$ células/mL) e (B) para biodegradação de $254,41 \mu\text{Mol/L}$ de benzeno conjugado a $6521,73 \mu\text{Mol/L}$ de etanol. Tolueno adicionado de $6521,73 \mu\text{Mol/L}$ de Etanol ($X_0= 2,7 \times 10^3$ células/mL).

TABELA 6: Coeficientes de máxima taxa de utilização do substrato ($\mu_{\text{máx}}$) para os compostos tolueno e benzeno adicionados de 6521,73 $\mu\text{Mol/L}$ de etanol.

Compostos	Concentração Inicial de substrato S_0 ($\mu\text{Mol/L}$)	Biomassa celular inicial X_0 ($\mu\text{g/L}$)	Coefficiente de produção celular Y ($\mu\text{g } \mu\text{Mol}^{-1}$)	Coefficiente $\mu_{\text{máx}}$ ($\mu\text{Mol h}^{-1}$)	Erro padrão	Coefficiente de correlação
Tolueno	217,39	0,2	34,01	0,34	0,095	0,96
Benzeno	256,41	0,7	17,7	0,37	0,147	0,97

TABELA 7: Coeficientes de meia-velocidade (K_s) obtidos para os compostos tolueno e benzeno adicionados de 6521,73 $\mu\text{Mol/L}$ de etanol.

Compostos	Concentração inicial S_0 ($\mu\text{Mol/L}$)	Biomassa inicial X_0 ($\mu\text{g/L}$)	Coefficiente de meia-velocidade K_s (μMol)	Erro padrão	Coefficiente de correlação
Tolueno	217,39	0,2	76,97	63,5	0,96
Benzeno	256,41	0,7	67,06	79,69	0,97

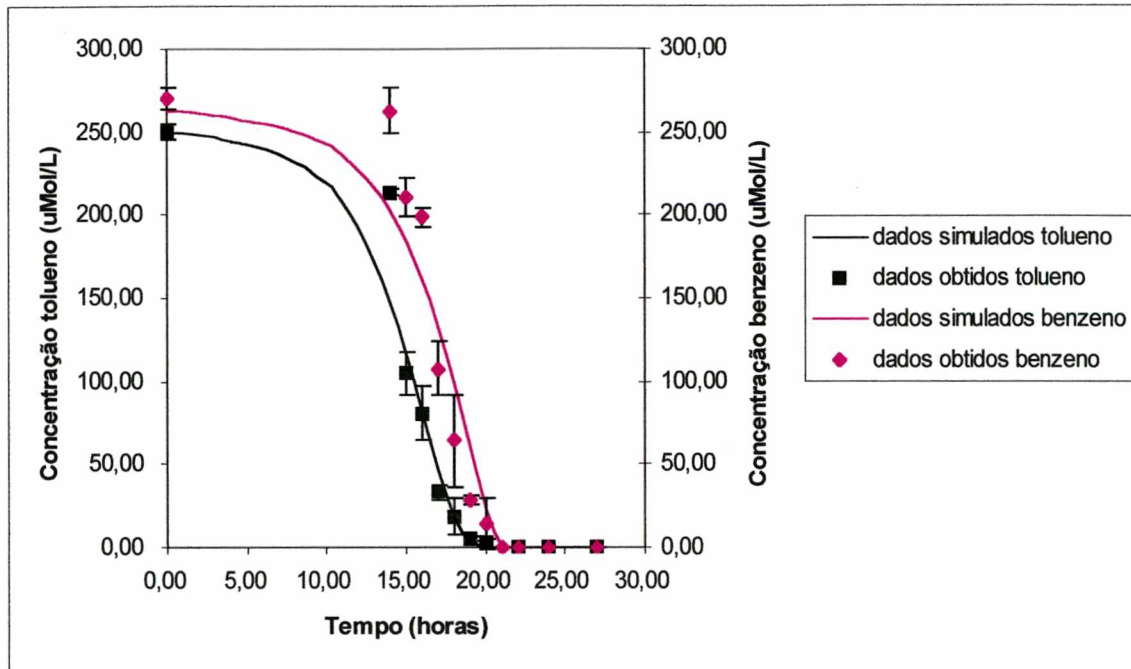


Figura 13: Dados obtidos e simulados para biodegradação de $217,39\mu\text{Mol/L}$ de Tolueno associado a $256,41\mu\text{Mol/L}$ de Benzeno ($X_0 = 1,86 \times 10^3$ células/mL).

TABELA 8: Coeficientes de máxima taxa de utilização do substrato ($\mu_{\text{máx}}$) obtidos para 217,39 $\mu\text{Mol/L}$ de tolueno testado conjuntamente com 256,41 $\mu\text{Mol/L}$ de benzeno.

Compostos	Biomassa celular inicial X_0 ($\mu\text{g/L}$)	Coefficiente de produção celular Y ($\mu\text{g } \mu\text{Mol}^{-1}$)	Coefficiente $\mu_{\text{máx}}$ ($\mu\text{Mol h}^{-1}$)	Erro padrão	Coefficiente de correlação
Tolueno	0,4	25,76	0,78	0,11	0,98
Benzeno	0,4	25,76	0,46	0,07	0,96

TABELA 9: Coeficientes de meia-velocidade (K_s) obtidos para os compostos tolueno e benzeno testados conjugadamente.

Compostos	Concentração inicial S_0 ($\mu\text{Mol/L}$)	Biomassa inicial X_0 ($\mu\text{g/L}$)	Coefficiente de meia-velocidade K_s (μMol)	Erro padrão	Coefficiente de correlação
Tolueno	217,39	0,2	204,1	51,04	0,98
Benzeno	256,41	0,7	76,17	36,16	0,96

TB 101, foram menores em relação ao tolueno e ao xileno, em resultado da baixa atividade da enzima tolueno dioxigenase, específica desta espécie de microorganismo. Segundo SCHIMIDT, *et al.*, 1987, a mineralização de compostos químicos de interesse, podem ser afetadas se substratos suplementares forem acrescentados, ou seja, quando dois substratos são metabolizados simultaneamente, a degradação do composto que está presente em menor concentração é influenciada se a população está crescendo inicialmente na presença de um outro substrato presente em maior concentração. Como exemplo, SWINDOLL, *et al.*, 1988, determinaram que a adição de fontes alternativas de carbono, como a glicose ou aminoácidos, reduziram as taxas de mineralização do *p*-nitrofenol por *Pseudomonas* sp., em resposta a maior facilidade de degradação aos compostos adicionados.

As taxas de degradação do substrato etanol quando testado na presença do tolueno e do benzeno foram de $0,31 \pm 0,08 \mu\text{Mol h}^{-1}$ e $0,46 \pm 0,03 \mu\text{Mol h}^{-1}$ (Tabela 10). De acordo com os dados apresentados, verificou-se que o substrato tolueno reduziu consideravelmente a taxa de degradação do etanol em 34%. A presença do benzeno conjugado ao etanol, não demonstrou influenciar nas taxas de degradação deste substrato, como se verifica nas Tabelas 4 e 10. Os coeficientes de meia-velocidade obtidos para o etanol reduziram em aproximadamente 43% e 26% quando na presença dos composto tolueno e benzeno, respectivamente (Tabela 11). De acordo com os coeficientes K_s obtidos para o etanol quando na presença dos compostos tolueno e benzeno, pode-se deduzir uma maior afinidade das células de PpF1 ao etanol quando também presentes os compostos monoaromáticos.

TABELA 10: Coeficientes de máxima taxa de utilização do substrato ($\mu_{\text{máx}}$) para o etanol adicionados de 217,39 $\mu\text{Mol/L}$ de tolueno e 256,41 $\mu\text{Mol/L}$ de benzeno.

Compostos	Concentração Inicial de substrato S_0 ($\mu\text{Mol/L}$)	Biomassa celular inicial X_0 ($\mu\text{g/L}$)	Coefficiente de produção celular Y ($\mu\text{g } \mu\text{Mol}^{-1}$)	Coefficiente $\mu_{\text{máx}}$ ($\mu\text{Mol h}^{-1}$)	Erro padrão	Coefficiente de correlação
Etanol + Tolueno	6521,73	0,3	7	0,31	0,082	0,95
Etanol + Benzeno	6521,73	0,6	16,13	0,46	0,032	0,95

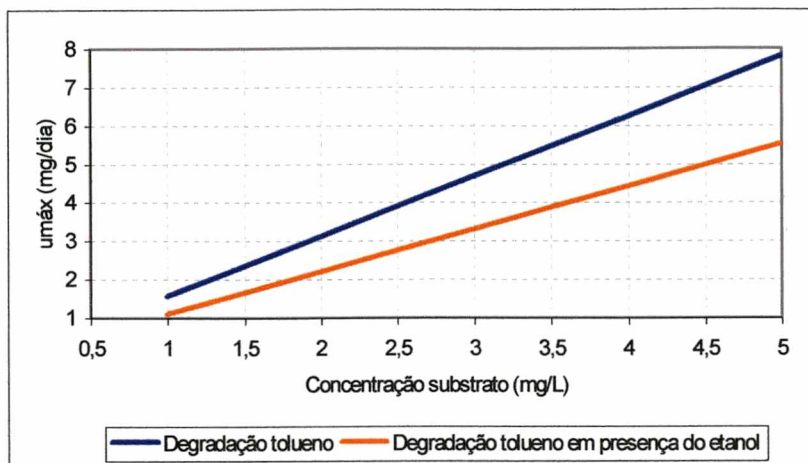
TABELA 11: Coeficientes de meia-velocidade (K_s) obtidos para o composto etanol adicionado de 217,39 $\mu\text{Mol/L}$ de tolueno ou 256,41 $\mu\text{Mol/L}$ de benzeno.

Compostos	Concentração inicial S_0 ($\mu\text{Mol/L}$)	Biomassa inicial X_0 ($\mu\text{g/L}$)	Coefficiente de meia-velocidade K_s (μMol)	Erro padrão	Coefficiente de correlação
Etanol + Tolueno	6521,73	0,3	1276	1592	0,95
Etanol + Benzeno	6521,73	0,6	1666	496,5	0,95

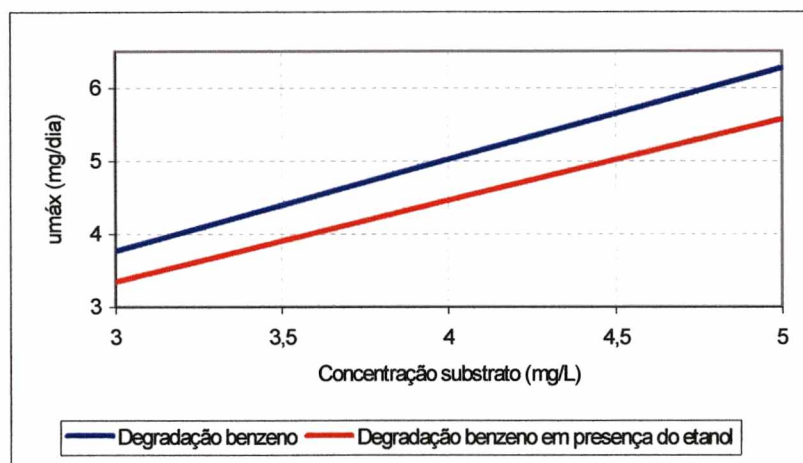
As taxas de degradação $k \text{ dia}^{-1}$ ($\mu_{\text{máx}}/Y$) observadas para os compostos tolueno e benzeno na presença do etanol foram reduzidas respectivamente em 75% e 60% (Tabela 12). As Figuras 14(A)(B), apresentam as taxas de crescimento máxima específicas em $\mu_{\text{máx}} \text{ dia}^{-1}$ para os compostos tolueno e benzeno. De acordo com estas Figuras observou-se que as taxas de utilização dos compostos benzeno e tolueno pela presença do etanol foi reduzida em aproximadamente 23% e 39%, respectivamente.

TABELA 12: Efeito do etanol nas taxas de degradação ($k \text{ dia}^{-1}$) dos compostos tolueno e benzeno.

Compostos	Valores $k \text{ dia}^{-1}$	Valores $k \text{ dia}^{-1}$ (Na presença do etanol)	% de redução
Tolueno	0,97	0,24	75%
Benzeno	1,25	0,50	60%



(A)



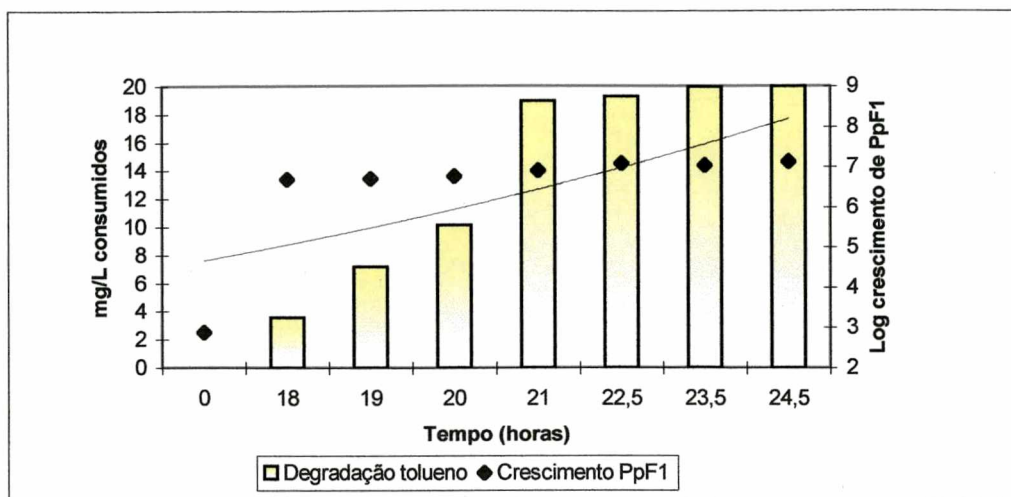
(B)

Figuras 14(A)(B): (A) Efeito do etanol nas taxas de crescimento máximo específico ($\mu_{\text{máx}}$) dos compostos tolueno e (B) benzeno.

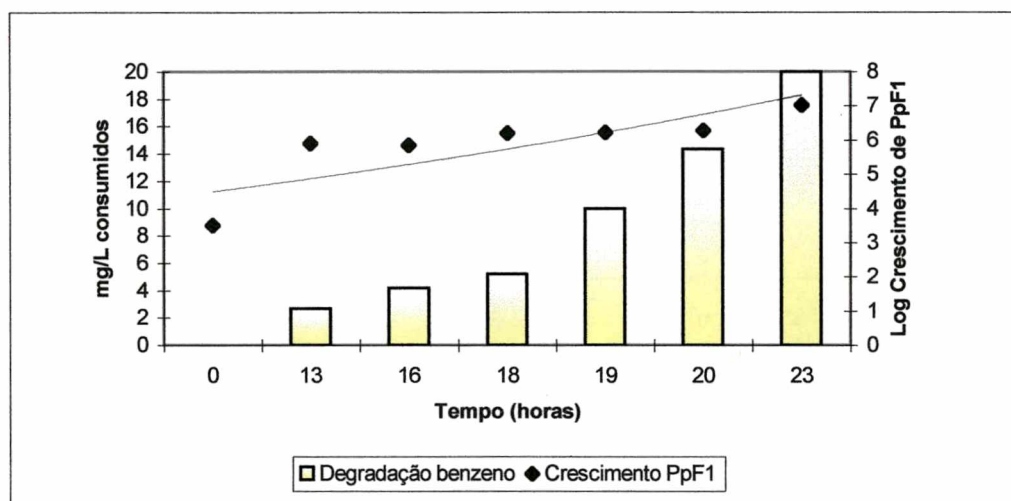
4.5 Análise do crescimento bacteriano em função dos substratos testados

Os modelos matemáticos utilizados para descrever as curvas de biodegradação de um determinado substrato podem apresentar grandes variações em função da presença de um segundo substrato disponível como fonte de energia para os microorganismos. A correta interpretação destes modelos depende, portanto, do conhecimento dos mecanismos de onde a população metabolicamente ativa, está crescendo. O início da degradação mensurável dos compostos tolueno e benzeno testados isoladamente, foi detectado em 18 h e 13 h para uma população de células equivalente a $4,79 \times 10^6$ e $7,87 \times 10^5$ células/mL, respectivamente (Figuras 15 (A)(B)). Quando testados conjugadamente, estes compostos demonstraram ser visualmente consumidos em 14 h para uma população de $2,68 \times 10^6$ células/mL (Figura 16). Ainda em relação à esta figura, pode-se observar através do consumo dos substratos, a maior afinidade da enzima tolueno dioxigenase característica de PpF1 ao substrato tolueno, confirmando os resultados descritos nas literaturas consultadas.

O crescimento bacteriano em função dos compostos testados apresentaram fases iniciais onde nenhuma degradação mensurável dos compostos foi detectada. WIGGINS, *et al.*, 1987, apontam que este período inicial de ausência de degradação corresponde em uma fase associada a vários fatores como: (a) um tempo necessário para o sistema enzimático ser induzido ou para mutações genéticas poderem ocorrer; (b) tempo necessário para que populações metabolicamente ativas se tornem suficientemente grande para degradar um composto químico e (c) a preferência da utilização de outros substratos presentes, antes do composto químico de interesse. A presença de um complexo enzimático próprio à degradação dos compostos testados como a tolueno dioxigenase, pode excluir a possibilidade da existência de uma fase de aclimatação necessária de indução enzimática em células de PpF1.



(A)



(B)

Figuras 15 (A)(B) : (A) Degradação de 20 mg/L de tolueno em função do crescimento bacteriano ($Y = 0,1859x + 3,0004$; $R^2 = 0,98$) e (B) degradação de 20 mg/L de benzeno em função do crescimento bacteriano ($Y = 0,1441x + 3,6076$; $R^2 = 0,96$).

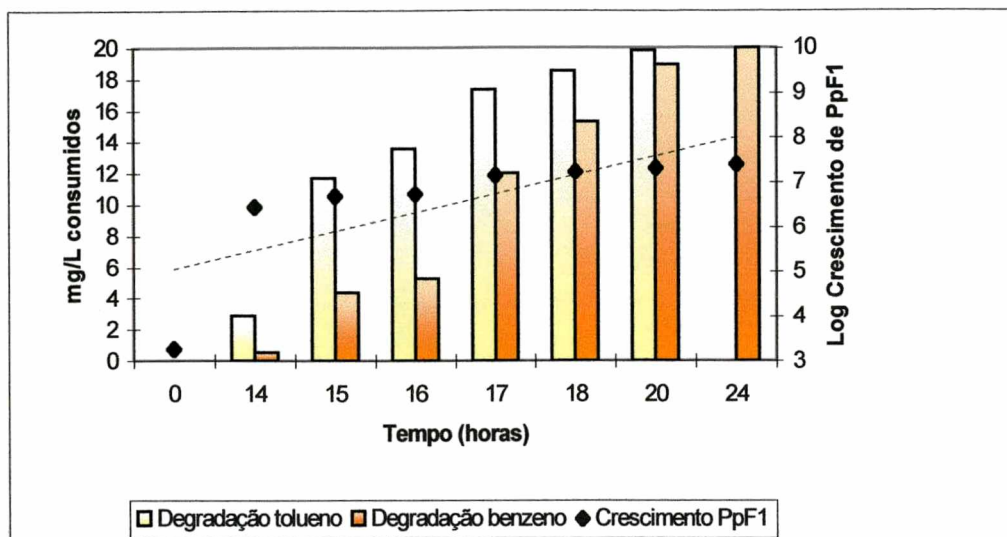


Figura 16 : Degradação de 20mg/L de tolueno conjugado a 20mg/L de benzeno em função do crescimento bacteriano ($Y = 0,187x + 3,6302$; $R^2 = 0,93$).

Com relação ao substrato etanol testado isoladamente, pode-se verificar um maior período sem detecção da degradação deste composto em relação aos compostos de tolueno e benzeno (Figura 17). De acordo com esta Figura, observou-se que o início da degradação do etanol foi detectado em 24 horas a uma concentração bacteriana de $2,19 \times 10^6$ células/mL. Este maior período sem degradação mensurável deste substrato em relação aos substratos tolueno e benzeno, poderia estar correlacionado a maior concentração deste substrato testado. Como todos os compostos foram utilizados como fonte de substrato para crescimento celular de Ppfl, o tempo em fase de aclimatação poderia ser explicado como período necessário para células de PpF1 desenvolverem uma população crítica suficiente para início da degradação mensurável dos substratos (CORSEUIL AND WEBER, 1994). Desta maneira, se uma população inicial bacteriana é de 10^2 células por unidade de volume e se em cada divisão celular é destruído 1,0 pg do substrato orgânico, um declínio na concentração de um composto presente a uma concentração de $0,1 \mu\text{g}$ por unidade de volume não seria detectada inicialmente (ALEXANDER, 1994).

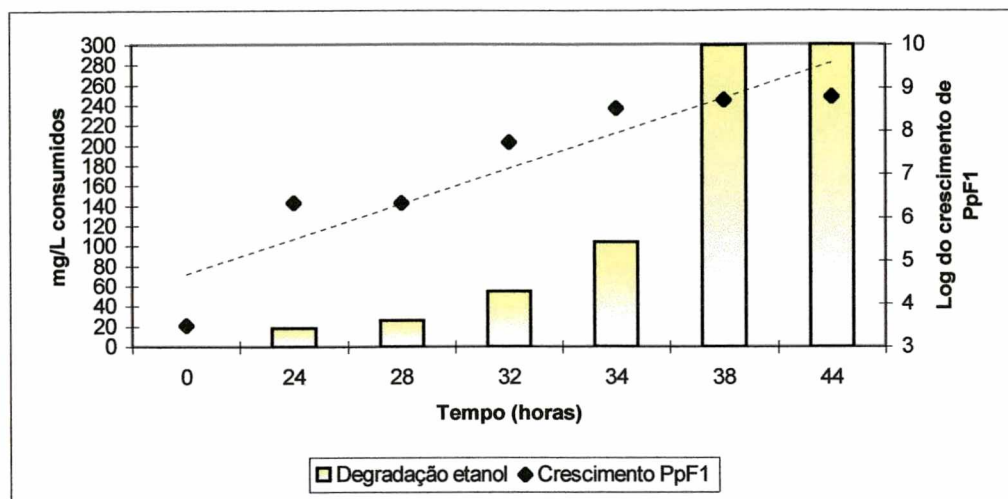
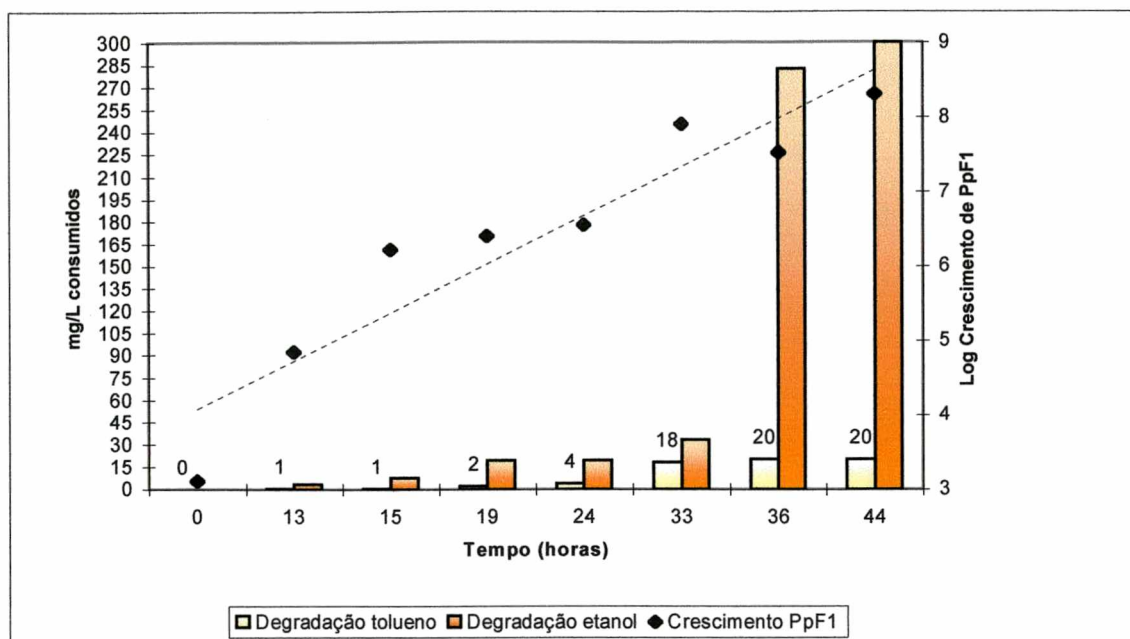


Figura 17 : Degradação de 300 mg/L de etanol em função do crescimento bacteriano ($Y = 0,1285x + 3,3516$; $R^2 = 0,97$).

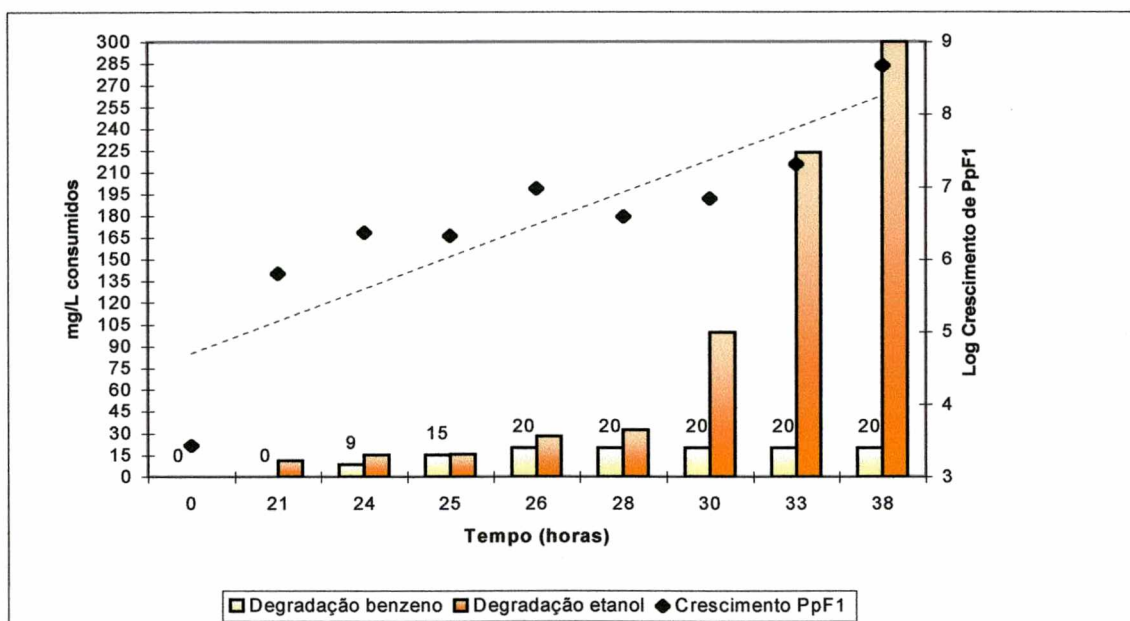
Segundo este mesmo autor, a aparente fase de aclimação está relacionada então, a imprecisão das análises em detectar a perda de 100 pg destruídos por uma população inicial de 10^2 ou 10^3 células. É evidente notar também que esta aparente fase de aclimação é maior para maiores concentrações de substratos testados por unidade de volume quando expostos a população celular de 10^3 células por volume. A degradação de 50 ng/mL de *p*-nitrofenol (PNP), por células de *Pseudomonas* sp. foi alcançada, por exemplo, somente quando a concentração celular atingiu 3×10^7 células/mL (SCHIMIDT *et al.*, 1987). Da mesma forma, a degradação de 2 μ g de PNP em água de lago também foi detectada somente após a concentração celular atingir 10^5 células/mL, concretizando a hipótese que o período de aclimação está relacionado ao tempo necessário para que pequenas populações de organismos capazes de degradar compostos químicos de interesse, atinjam densidades celulares consideráveis para a detecção da mineralização (WIGGINS, *et al.*, 1987).

ALVAREZ AND HUNT, 1997 concluíram que nenhuma variação no período de fase de aclimação dos compostos tolueno e benzeno por PpF1 foi detectado quando estes foram testados isoladamente ou na presença de 50, 100 e 300 mg/L de etanol quando uma

população inicial de aproximadamente 10^6 células/mL foi inoculada. Geralmente os solos e águas naturais possuem pequenas populações de microorganismos agindo em muitos compostos orgânicos sintéticos para manter seu crescimento (ALEXANDER, 1994). Com base nisto, os efeitos de uma população microbiana relativamente alta, testadas experimentalmente podem mascarar algumas informações precisas na cinética de degradação de um determinado composto de interesse quando presente nestes ambientes naturais. Enquanto 4 mg/L ou 2,5 mg/L de tolueno e benzeno, respectivamente foram utilizados para produção de células de 10^3 para 10^6 células/mL (Figuras 15(A)(B), cerca de 0,55mg/L de tolueno ou 0,1 mg/L de benzeno em presença do etanol, foram utilizados para atingir esta mesma concentração final(Figuras 18(A)(B)). Os dados indicaram que a produção inicial de células ocorreu em função da utilização do etanol como fonte de substrato. Após atingir a concentração aproximada de 10^6 células/mL, as células degradaram simultaneamente os compostos. Ainda em relação as Figuras 18(A)(B), observou-se que o etanol retardou consideravelmente da degradação dos compostos tolueno e benzeno para 33 e 26 horas, respectivamente. Os dados obtidos sugerem que mesmo sendo degradado por caminhos enzimáticos diferentes, a presença do etanol testado a uma concentração superior aos compostos tolueno e benzeno (300:20 mg/L), estaria reprimindo a metabolização dos substratos tolueno e benzeno, e sendo utilizado inicialmente na produção celular (*efeito diauxie*) até a obtenção de uma população relativamente alta (10^6 células/mL) onde se observou o consumo simultâneo dos compostos. A presença de uma população relativamente grande, pode mascarar os mecanismos de utilização preferencial do substrato como descrito previamente neste trabalho. Como descrito por CORSEUIL, 1997, a utilização preferencial ao substrato etanol pode ser explicada tanto pela facilidade de metabolização deste substrato como pela obtenção de maior energia liberada pela quebra desta molécula em relação aos compostos monoaromáticos de tolueno e benzeno. Segundo SCHIMIDT, *et al.*, 1985 e 1987, quando dois substratos estão presentes em altas concentrações e são utilizados como fonte de energia por uma determinada população microbiana, o composto metabolizado preferencialmente pode causar a repressão no metabolismo de degradação do segundo.



(A)



(B)

Figuras 18 (A)(B): (A) Degradação de 20mg/L de tolueno em presença de 300 mg/L de etanol em função do crescimento bacteriano ($Y = 0,106x + 3,7136$; $R^2 = 0,91$) e (B) degradação de 20mg/L de benzeno em presença de 300 de etanol em função do crescimento bacteriano ($Y = 0,127x + 3,4031$; $R^2 = 0,96$).

Experimentos onde a glicose e o fenol foram consumidos simultaneamente por uma população de *Pseudomonas putida* (ATCC 17514), observou-se que mesmo apresentando vias enzimáticas distintas para metabolização destes compostos, a presença da glicose demonstrou afinidade pela enzima de degradação do fenol, reduzindo conseqüentemente a atividade de metabolização do fenol (WANG *et al.*, 1996).

CAPÍTULO V

5. Conclusões e Recomendações

5.1 Conclusões

O presente estudo avaliou os efeitos do etanol no crescimento e no comportamento cinético de biodegradação aeróbica dos compostos tolueno e benzeno em cultura pura de células da espécie *Pseudomonas putida* F1. As principais conclusões obtidas neste trabalho foram:

A biomassa total foi determinada através do biovolume celular determinado através de análises de imagens obtidas por microscopia óptica de fluorescência. O valor do peso seco encontrado para uma célula bacteriana da espécie *P. putida* F1 foi de $2,2 \times 10^{-10}$ mg. A utilização de um sistema de análise de imagens acoplado ao microscópio óptico como o utilizado neste trabalho, estimou rápida e precisamente a concentração celular e a biomassa nos microscosmos utilizados.

Os coeficientes de produção celular (Y) obtidos, variaram de acordo com os experimentos conduzidos. Valores de Y para os compostos tolueno, benzeno e etanol, testados isoladamente foram de 13,85, 9,19 e 20,92 $\mu\text{g } \mu\text{mol}^{-1}$, respectivamente. Mesmo após a completa degradação mensurável dos compostos de interesse, observou-se o crescimento bacteriano para 48, 96 e 144 horas.

A degradação mensurável dos compostos testados foram obtidas a partir de uma concentração bacteriana aproximada de 10^6 células/mL.

As taxas de degradação ($\mu_{\text{máx}}$) obtidas pela análise de regressão não-linear para 217,39 $\mu\text{Mol/L}$ de tolueno, 256,49 $\mu\text{Mol/L}$ de benzeno e 6521,73 $\mu\text{Mol/L}$ de etanol testados isoladamente foram de 0,56 $\mu\text{Mol h}^{-1}$, 0,48 $\mu\text{Mol h}^{-1}$ e 0,47 $\mu\text{Mol h}^{-1}$, respectivamente. Os

valores do coeficiente de meia-velocidade obtidos nesta fase experimental foram de 53,14 μ Mol, 50,5 μ Mol e 2254 μ Mol para o tolueno, benzeno e etanol, respectivamente.

As taxas de degradação máxima obtidas para o tolueno e benzeno testados conjugadamente foram de 0,78 μ Mol h⁻¹ e 0,46 μ Mol h⁻¹ com respectivos coeficientes K_s de 204,1 μ Mol e 76,17 μ Mol. Microorganismos da espécie PpF1 confirmaram nesta fase experimental, uma maior taxa de degradação do composto tolueno em relação ao benzeno evidenciado pela especificidade enzima-substrato conferida a enzima tolueno dioxigenase, característica desta espécie de microorganismo.

As taxas de degradação dos tolueno e benzeno em presença do etanol foram de 0,34 μ Mol h⁻¹ e 0,37 μ Mol h⁻¹, respectivamente. O etanol demonstrou reduzir as taxas de utilização máxima do tolueno e benzeno em cerca de 39% e 23%, respectivamente. As taxas de degradação dos substratos tolueno e benzeno (k dia⁻¹) foram reduzidas em 75% e 60%, respectivamente. Os coeficientes K_s obtidos para o tolueno e benzeno testados em presença do etanol aumentaram para 76,97 μ Mol (31%) e 67,06 μ Mol (32%), respectivamente.

Os resultados obtidos nos experimentos de crescimento bacteriano em função do consumo dos substratos testados, comprovaram que células de PpF1 seletivas aos compostos tolueno e benzeno pela presença da enzima tolueno-dioxigenase, cresceram preferencialmente no substrato etanol. Esta utilização inicial do etanol testado a uma maior concentração em relação aos compostos tolueno e benzeno, poderia ser explicada através dos mecanismos de repressão enzimática existentes nos microorganismos. Estes resultados sugerem que em outras espécies de microorganismos encontrados em solos e aquíferos, o etanol pode demonstrar um efeito muito mais significativo na redução das taxas de degradação dos BTX.

Os resultados obtidos através das curvas de degradação dos compostos tolueno e benzeno testados segundo Monod, demonstraram uma variação no comportamento de células de PpF1 em resposta da presença do etanol. Nos casos de biorremediação *in situ*, a

preferência dos microorganismos ao substrato etanol pode retardar o início de degradação dos compostos BTX, deplecionando as concentrações de oxigênio, aceptores de elétrons e nutrientes necessários para a degradação destes.

O conhecimento adquirido deste estudo, poderá prover informações adicionais na interpretação dos dados de cinética microbiana em ecossistemas naturais, assim como elucidar maneiras de otimizar os processos de degradação dos compostos BTX em casos de contaminação ambiental.

5.2 Recomendações

1. Definir um modelo matemático que avalie a influência do etanol na degradação dos compostos BTX.
2. Determinar parâmetros cinéticos de biodegradação *in situ* para se avaliar a importância dos efeitos interativos dos compostos BTX no ambiente.
3. Avaliar os efeitos do etanol na biodegradação dos BTX em outras espécies de microorganismos para a obtenção de dados adicionais do comportamento enzimático em outras populações bacterianas.
4. Testar diferentes concentrações do etanol na degradação dos compostos BTX.
5. Estudar através de técnicas de biologia molecular a separação e quantificação de enzimas relacionadas a degradação dos BTX.

APÊNDICE I

Composição do meio Mineral Hunter's Base (MSB).

TABELA 13: Composição do meio MSB (STAINER ET AL., 1966):

Solução A	Solução C	Metais	Solução B	MSB
Na_2HPO_4 - 141,2g/L	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 200g/L	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10,95g/L	MgSO_4 14,45 g/L	Solução A: 40mL
KH_2PO_4 - 136g/L		$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,54g/L	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,33g/L	Solução B: 20 mL
		$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5,00g/L	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot$ $4\text{H}_2\text{O}$ 9,25mg/L	Solução C: 5mL
		$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot$ $6\text{H}_2\text{O}$ 392 mg/L	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 99mg	
		$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot$ $6\text{H}_2\text{O}$ 248 mg/L	Metais 44 50mL	
		$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ $\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 177.mg/L		

APÊNDICE II

Condições de trabalho utilizadas no Headspace e no cromatógrafo gasoso.

TABELA 14: Condições de trabalho utilizadas no Headspace HP7694.

Parâmetros	Valor (T°C)	Parâmetros	Valor (min.)	Parâmetros	Valor (psi)
Oven	75	Ciclo CG	7	Pressão de arraste	6,1
Loop	80	Equilíbrio do vial	4	Pressão no vial	19,6
Tr. Line	80	Pressurização	0,13		
		Loop	0,01		
		Equilíbrio do Loop	0,01		
		Injeção	0,3		

TABELA 15: Condições de trabalho utilizadas no Cromatógrafo à gás HP5890.

Parâmetros	Valores (T°C)	Parâmetros	Valores (min.)	Eventos Integração	Valores
Injetor A	250	Oven Equilíbrio	2	Área rejeitada	0
Detector A	300			Altura do pico inicial	0,04
Detector B	220			Limite Inicial	0
Oven	70 – 2min.			Integração	0,2
Taxa T°C/min	10/min.				

APÊNDICE III

Tabelas de degradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos e etanol em função do tempo.

TABELA 16: Experimento - degradação de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	256,88	204,69	212,00	224,52	28,25
10	226,15	241,58	237,85	235,19	8,05
18	182,95	171,67	199,15	184,59	13,81
19	141,05	145,31	146,04	144,13	2,69
20	104,46	95,57	131,80	110,61	18,88
21	9,206	24,79	0,83	11,61	12,15
22,5	1,16	1,69	21,30	8,05	11,47
23,5	0	2,15	0,00	0,71	0,41
24,5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TABELA 17: Controle - degradação de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	227,54	217,47	204,78	216,59	11,40
18	229,28	215,34	254,19	232,93	19,68
20	180,23	203,28	226,22	203,24	22,99
23,5	186,6	282,13	236,25	234,99	47,77

TABELA 18: Experimento - degradação de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	253,35	264,71	254,74	257,60	6,19
13	213,76	234,37	221,89	223,34	10,38
16	177,93	229,48	203,82	203,74	25,77
18	180,39	198,12	192,84	190,45	9,10
19	118,84	132,78	135,43	129,01	8,91
20	45,92	111,48	61,92	73,10	34,18
23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TABELA 19: Controle - degradação de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	239,60	226,97	251,35	239,30	12,19
16	247,32	252,71	248,60	249,54	2,81
20	237,15	248,16	270,33	251,88	16,89
23	224,17	231,58	252,98	236,24	14,96

TABELA 20: Experimento - degradação de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	5694,45	7018,13	7023,06	6578,54	765,65
24	5810,10	6218,91	6475,71	6168,24	335,68
28	6035,71	6233,02	5729,36	5999,36	253,78
32	6233,02	4180,26	5729,36	5380,88	1069,82
34	4034,19	3896,19	4957,67	4296,01	577,14
35	2069,67	2333,06	2833,82	2412,18	388,17
35.5	608,28	1022,73	1087,91	906,30	260,14
36	558,71	407,78	510,97	492,48	77,14
37	426,28	143,41	210,58	260,09	147,79
37.5	128,08	16,32	23,06	55,82	62,66
38	10,91	24,45	17,93	17,76	6,77
39	7,82	7,04	12,36	9,07	2,87
40	10,97	5,41	9,13	8,50	2,83
44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TABELA 21: Controle - degradação de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	5938,43	6096,95	6883,36	6306,24	506,04
34	6279,28	6409,78	5770,6	6153,22	337,72
37	6811,56	6853,32	6906,13	6857,00	47,39
44	6928,00	6671,63	6698,34	6765,99	140,93

TABELA 22: Experimento - degradação de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno adicionado de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	263,91	285,62	259,97	269,83	13,81
14	261,37	269,89	256,98	262,74	6,56
15	206,44	224,32	201,7	210,82	11,92
16	194,37	195,76	205,64	198,59	6,14
17	94,15	126,06	102,96	107,72	16,47
18	32,64	77,65	82,07	64,12	27,35
19	31,42	26,12	28,47	28,67	2,65
20	30,42	0,55	11,62	14,19	15,10
21	0,16	0,67	0,19	0,34	0,28
22	0,19	0,19	0,28	0,22	0,05
24	0,14	0,21	0,17	0,17	0,03
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TABELA 23: Controle - degradação de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno adicionado de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	260,89	262,75	251,12	258,25	6,24
16	264,52	262,3	272,82	266,54	5,54
20	266,53	266,2	294,46	275,73	16,22
27	268,35	271,93	262,3	267,52	4,86

TABELA 24: Experimento - degradação de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno adicionado de 256,41/L $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	246,16	254,47	249,67	250,10	4,17
14	213,06	216,3	211,95	213,77	2,26
15	100,97	118,85	93,52	104,44	13,01
16	70,23	72,59	99,09	80,63	16,02
17	30,61	38,46	31,13	33,40	4,38
18	5,81	22,43	27,14	18,46	11,20
19	6,13	5,06	4,43	5,20	0,85
20	5,30	0,45	1,00	2,25	2,65
22	0,36	0,23	0,33	0,30	0,06
24	0,00	0,26	0,20	0,15	0,13
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TABELA 25: Controle - degradação de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno adicionado de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	233,01	222,51	216,22	223,91	8,48
16	239,46	223,31	239,67	234,14	9,38
20	231,45	233,91	254,76	240,04	12,80
27	240,28	235,25	237,91	237,81	2,51

TABELA 26: Experimento - degradação de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno adicionado de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	244,06	258,96	258,33	253,78	8,42
21	247,96	244,52	265,38	252,62	11,18
24	187,08	77,35	164,19	142,87	57,88
25	42,57	73,3	59,07	58,31	15,37
26	0,19	0,27	1,39	0,61	0,67
28	0,00	0,17	3,37	1,18	1,89
30	0,00	0,14	0,14	0,09	0,08
33	0,00	0,23	0,00	0,07	0,13
38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TABELA 27: Controle - degradação de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno adicionado de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	262,55	250,44	283,07	265,35	16,49
25	238,79	255,01	257,24	250,34	10,07
30	261,64	275,98	263,48	267,03	7,80
38	278,46	260,17	265,42	268,01	9,41

TABELA 28: Experimento - degradação de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol adicionado de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	6848,54	7345,76	6451,15	6881,81	448,23
21	5577,04	7192,34	7116,89	6628,75	911,59
24	5928,78	7480,21	6189,13	6532,70	830,82
25	6673,06	6524,89	6367,26	6521,73	152,92
26	5557,95	6483,26	6682,89	6241,36	600,21
28	6377,34	6092,32	5942,91	6137,52	220,71
30	4714,06	4616,82	4452,28	4594,38	132,32
33	2128,95	1694,91	1431,36	1751,74	352,25
38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TABELA 29: Controle - degradação de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol adicionado de 256,41 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de benzeno por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	7959,36	6008,13	7001,78	6989,75	975,67
25	6185,45	6386,28	6671,91	6414,54	244,45
30	6930,8	6633,69	6576,47	6713,65	190,21
38	6549,28	6732,39	6903,86	6728,51	177,32

TABELA 30: Experimento - degradação de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno adicionado de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	227,43	221,81	223,46	224,23	2,88
13	214,88	219,71	219,36	217,98	2,69
15	201,65	220,53	232,14	218,10	15,38
19	214,88	219,71	175,65	200,5	21,56
24	195,60	156,66	200,81	184,35	24,12
33	26,83	0,32	30,80	19,31	16,57
36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TABELA 31: Controle - degradação de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno adicionado de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	220,07	221,61	237,97	226,55	9,91
33	233,19	225,30	242,43	233,64	8,57
40	219,03	205,68	187,80	204,17	15,66
44	213,72	220,59	227,53	220,61	6,90

TABELA 32: Experimento - degradação de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol adicionado de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	6719,34	6412,04	6473,50	6534,96	162,60
13	6591,30	6787,60	6027,89	6468,93	394,36
15	6264,13	6465,69	6385,60	6371,80	101,48
24	6102,52	6100,56	6143,30	6115,46	24,13
33	6228,95	6026,86	6079,50	6111,77	104,83
36	5614,82	6015,67	-	5815,24	283,44
40	1194,56	1438,32	1660,93	1431,27	233,26
42	270,84	622,30	262,73	385,29	205,29
44	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

TABELA 33: Controle - degradação de 6521,73 $\mu\text{mol/L}$ (300 mg/L) de etanol adicionado de 217,39 $\mu\text{mol/L}$ (20 mg/L) de tolueno por PpF1.

Tempo (horas)	Amostra 1 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 2 $\mu\text{mol/L}$	Amostra 3 $\mu\text{mol/L}$	Média $\mu\text{mol/L}$	Desvio Padrão
0	6852,73	6526,36	6524,56	6634,55	188,95
33	6949,30	6325,02	7200,08	6824,8	450,61
40	6381,50	6897,65	7440,73	6906,62	529,67
44	6885,21	6322,45	7559,39	6922,35	619,30

APÊNDICE IV

Tabelas do número de células/mL em função do tempo de degradação dos compostos hidrocarbonetos monoaromáticos e etanol.

TABELA 34: Crescimento bacteriano de células de PpF1 em função do tempo de degradação de 217,39 $\mu\text{Mol/L}$ (20 mg/L) de Tolueno.

Tempo (horas)	Amostra 1 (células/mL)	Amostra 2 (células/mL)	Amostra 3 (células/mL)	Média (células/mL)	Desvio padrão
0	$0,87 \times 10^3$	$1,17 \times 10^3$	$0,29 \times 10^3$	$0,77 \times 10^3$	$\pm 0,447$
10	$3,65 \times 10^6$	$5,15 \times 10^6$	$3,43 \times 10^6$	$4,07 \times 10^6$	$\pm 0,936$
18	$6,01 \times 10^6$	$3,43 \times 10^6$	$4,93 \times 10^6$	$4,79 \times 10^6$	$\pm 1,295$
19	$6,22 \times 10^6$	$6,46 \times 10^6$	$2,57 \times 10^6$	$5,08 \times 10^6$	$\pm 2,179$
20	$6,18 \times 10^6$	$4,58 \times 10^6$	$6,62 \times 10^6$	$5,79 \times 10^6$	$\pm 1,073$
21	$8,80 \times 10^6$	$7,27 \times 10^6$	$8,16 \times 10^6$	$8,07 \times 10^6$	$\pm 0,768$
22,5	$1,28 \times 10^7$	$1,13 \times 10^7$	$1,22 \times 10^7$	$1,21 \times 10^7$	$\pm 0,075$
24,5	$1,15 \times 10^7$	$1,33 \times 10^7$	$1,61 \times 10^7$	$1,36 \times 10^7$	$\pm 0,231$
48	$1,28 \times 10^8$	$1,37 \times 10^8$	$1,177 \times 10^8$	$1,27 \times 10^8$	$\pm 0,096$
96	$0,85 \times 10^8$	$1,37 \times 10^8$	$2,97 \times 10^8$	$1,73 \times 10^8$	$\pm 1,101$
144	$1,07 \times 10^8$	$1,31 \times 10^8$	$1,41 \times 10^8$	$1,26 \times 10^8$	$\pm 0,174$

TABELA 35: Crescimento bacteriano de células de PpF1 em função do tempo de degradação de 256,41 $\mu\text{Mol/L}$ (20 mg/L) de Benzeno.

Tempo (horas)	Amostra 1 (células/mL)	Amostra 2 (células/mL)	Amostra 3 (células/mL)	Média (células/mL)	Desvio padrão
0	$2,20 \times 10^3$	$5,30 \times 10^3$	$2,00 \times 10^3$	$3,16 \times 10^3$	$\pm 1,850$
13	$8,59 \times 10^5$	$6,44 \times 10^5$	$8,59 \times 10^5$	$7,87 \times 10^5$	$\pm 1,520$
16	$6,44 \times 10^5$	$3,61 \times 10^5$	$10,73 \times 10^5$	$6,92 \times 10^5$	$\pm 2,001$
18	$1,28 \times 10^6$	$1,93 \times 10^6$	$1,50 \times 10^6$	$1,57 \times 10^6$	$\pm 0,459$
19	$1,50 \times 10^6$	$1,93 \times 10^6$	$1,52 \times 10^6$	$1,65 \times 10^6$	$\pm 0,242$
20	$2,62 \times 10^6$	$1,54 \times 10^6$	$1,52 \times 10^6$	$1,89 \times 10^6$	$\pm 0,629$
23	$1,95 \times 10^7$	$0,50 \times 10^7$	$0,75 \times 10^7$	$1,07 \times 10^7$	$\pm 0,777$
48	$4,00 \times 10^7$	$2,36 \times 10^7$	$4,34 \times 10^7$	$3,56 \times 10^7$	$\pm 1,058$
96	$2,03 \times 10^8$	$2,17 \times 10^8$	$1,21 \times 10^8$	$1,80 \times 10^8$	$\pm 0,519$
144	$0,68 \times 10^8$	$0,70 \times 10^8$	$1,04 \times 10^8$	$0,812 \times 10^8$	$\pm 0,203$

TABELA 36: Crescimento bacteriano de células de PpF1 em função do tempo de degradação de 6521,73 $\mu\text{Mol/L}$ (300 mg/L) de Etanol.

Tempo (horas)	Amostra 1 (células/mL)	Amostra 2 (células/mL)	Amostra 3 (células/mL)	Média (células/mL)	Desvio padrão
0	$2,42 \times 10^3$	$3,16 \times 10^3$	$3,57 \times 10^3$	$3,05 \times 10^3$	$\pm 0,582$
24	$2,29 \times 10^6$	$2,10 \times 10^6$	-	$2,19 \times 10^6$	$\pm 0,134$
28	$2,14 \times 10^6$	$2,36 \times 10^6$	$1,93 \times 10^6$	$2,14 \times 10^6$	$\pm 0,215$
32	$4,61 \times 10^7$	$6,31 \times 10^7$	$5,54 \times 10^7$	$5,48 \times 10^7$	$\pm 0,851$
34	$3,17 \times 10^8$	$2,16 \times 10^8$	$4,87 \times 10^8$	$3,40 \times 10^8$	$\pm 1,369$
38	$6,20 \times 10^8$	$4,42 \times 10^8$	$4,96 \times 10^8$	$5,19 \times 10^8$	$\pm 0,912$
44	$5,30 \times 10^8$	$5,49 \times 10^8$	$7,81 \times 10^8$	$6,20 \times 10^8$	$\pm 1,397$
48	$1,55 \times 10^9$	$1,10 \times 10^9$	$1,94 \times 10^9$	$1,53 \times 10^9$	$\pm 0,420$
96	$1,65 \times 10^9$	$2,44 \times 10^9$	$2,47 \times 10^9$	$2,19 \times 10^9$	$\pm 0,466$
144	$2,66 \times 10^9$	$2,09 \times 10^9$	$2,43 \times 10^9$	$2,39 \times 10^9$	$\pm 0,287$

TABELA 37: Crescimento bacteriano de células de PpF1 em função do tempo de degradação de 217,39 $\mu\text{Mol/L}$ (20 mg/L) de Tolueno associado a 256,41 $\mu\text{Mol/L}$ (20 mg/L) de Benzeno.

Tempo (horas)	Amostra 1 (células/mL)	Amostra 2 (células/mL)	Amostra 3 (células/mL)	Média (células/mL)	Desvio padrão
0	$2,80 \times 10^3$	$1,80 \times 10^3$	$1,00 \times 10^3$	$1,86 \times 10^3$	$\pm 0,901$
14	$3,00 \times 10^6$	$3,00 \times 10^6$	$2,42 \times 10^6$	$2,68 \times 10^6$	$\pm 0,553$
15	$4,93 \times 10^6$	$4,72 \times 10^6$	$5,04 \times 10^6$	$4,89 \times 10^6$	$\pm 0,162$
16	$3,79 \times 10^6$	$5,95 \times 10^6$	$6,87 \times 10^6$	$5,53 \times 10^6$	$\pm 1,581$
17	$1,45 \times 10^7$	$1,28 \times 10^7$	$1,59 \times 10^7$	$1,44 \times 10^7$	$\pm 0,155$
18	$1,55 \times 10^7$	$1,52 \times 10^7$	$2,06 \times 10^7$	$1,71 \times 10^7$	$\pm 0,303$
20	$2,14 \times 10^7$	$1,71 \times 10^7$	$2,23 \times 10^7$	$2,02 \times 10^7$	$\pm 0,277$
24	$3,25 \times 10^7$	$1,92 \times 10^7$	$2,42 \times 10^7$	$2,53 \times 10^7$	$\pm 0,671$

TABELA 38: Crescimento bacteriano de células de PpF1 em função do tempo de degradação de 217,39 $\mu\text{Mol/L}$ (20 mg/L) de Tolueno associado a 6521,73 $\mu\text{Mol/L}$ (300 mg/L) de Etanol.

Tempo (horas)	Amostra 1 (células/mL)	Amostra 2 (células/mL)	Amostra 3 (células/mL)	Média (células/mL)	Desvio padrão
0	$0,80 \times 10^3$	$1,90 \times 10^3$	$1,20 \times 10^3$	$1,30 \times 10^3$	$\pm 0,556$
13	$0,75 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$	$0,35 \times 10^5$	$0,70 \times 10^5$	$\pm 0,327$
15	$2,00 \times 10^6$	$1,78 \times 10^6$	$1,25 \times 10^6$	$1,67 \times 10^6$	$\pm 0,385$
19	$3,00 \times 10^6$	$2,75 \times 10^6$	$1,80 \times 10^6$	$2,51 \times 10^6$	$\pm 0,633$
24	$4,35 \times 10^6$	$3,15 \times 10^6$	$3,24 \times 10^6$	$3,58 \times 10^6$	$\pm 0,668$
33	$1,09 \times 10^7$	$1,06 \times 10^7$	$0,29 \times 10^7$	$0,81 \times 10^7$	$\pm 0,453$
36	$3,48 \times 10^7$	$2,87 \times 10^7$	$3,67 \times 10^7$	$3,34 \times 10^7$	$\pm 0,417$
40	$3,57 \times 10^7$	$3,24 \times 10^7$	$6,89 \times 10^7$	$4,56 \times 10^7$	$\pm 2,018$
42	$0,76 \times 10^8$	$1,04 \times 10^8$	$1,22 \times 10^8$	$1,00 \times 10^8$	$\pm 0,231$
44	$1,75 \times 10^8$	$1,34 \times 10^8$	$2,95 \times 10^8$	$2,01 \times 10^8$	$\pm 0,836$

TABELA 39: Crescimento bacteriano de células de PpF1 em função do tempo de degradação de 256,41 $\mu\text{Mol/L}$ (20 mg/L) de Benzeno associado a 6521,73 $\mu\text{Mol/L}$ (300 mg/L) de Etanol.

Tempo (horas)	Amostra 1 (células/mL)	Amostra 2 (células/mL)	Amostra 3 (células/mL)	Média (células/mL)	Desvio padrão
0	$1,18 \times 10^3$	$3,12 \times 10^3$	$3,80 \times 10^3$	$2,70 \times 10^3$	$\pm 1,359$
21	$2,14 \times 10^5$	$6,44 \times 10^5$	$10,70 \times 10^5$	$6,42 \times 10^5$	$\pm 4,280$
24	$2,29 \times 10^6$	$3,43 \times 10^6$	$1,28 \times 10^6$	$2,33 \times 10^6$	$\pm 1,075$
25	$2,06 \times 10^6$	$1,28 \times 10^6$	$3,00 \times 10^6$	$2,11 \times 10^6$	$\pm 0,861$
26	$9,45 \times 10^6$	$9,85 \times 10^6$	-	$9,65 \times 10^6$	$\pm 0,282$
28	$4,04 \times 10^6$	$2,36 \times 10^6$	$5,26 \times 10^6$	$3,88 \times 10^6$	$\pm 1,456$
30	$8,16 \times 10^6$	$7,51 \times 10^6$	$5,15 \times 10^6$	$6,94 \times 10^6$	$\pm 1,583$
33	$1,97 \times 10^7$	$2,38 \times 10^7$	$1,84 \times 10^7$	$2,06 \times 10^7$	$\pm 0,281$
38	$5,33 \times 10^8$	$5,15 \times 10^8$	$3,87 \times 10^8$	$4,78 \times 10^8$	$\pm 0,796$

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, M. 1994. **Biodegradation and bioremediation**. Academic Press, San Diego, California, 302 p.
- ALVAREZ, P.J.J. AND HUNT, C.S. 1997. Effect of ethanol on aerobic BTX degradation. **Fourth International In Situ and On-Site Biorremediation Symposium**. Volume 1, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p 49-54.
- ARINBASAROV, M.U.; KARPOV, A.V.; SELEZNEV, S.G.; GRISHCHENKOV, V.G. AND BORONIN, A.M. 1997. Approaches to creation of bacterial consortium for efficient biorremediation of oil-contaminated soil. **Fourth International In Situ and On-Site Biorremediation Symposium**. Volume 4, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p 523-528.
- AXELROD, R.; SEVERN, S.; STEIN, C.; STOLTE, L.M. AND SHORT, A. 1997. Natural attenuation as an effective solvent plume management strategy. **Fourth International In Situ and On-Site Biorremediation Symposium**. Volume 1, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p 111-116.
- BELLER, H.R.; GRBIC-GALIC, D. AND REINHARD, M. 1992. Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. **Applied And Environmental Microbiology**, 58(3): 786-793.
- BRATBAK, G. AND DUNDAS, I. 1984. Bacterial dry matter content and biomass estimations. **Applied And Environmental Microbiology**, 48(4):755-757.
- BRATBAK, G. 1985. Bacterial biovolume and biomass estimation. **Applied And Environmental Microbiology**, 49(6): 1488-1493.

BRATBERG, D. AND HOPKINS, L. 1995. Risk based corrective action and risk assessment procedures in the United States: a 1995 survey. **Proceedings of the 1995 Petroleum Hydrocarbon and Organic Chemicals in Groundwater: Prevention, Detection, and Restoratio Conference.** American Petroleum Institute. Houston, TX, November 29-December 1, p. 639-650.

BRUNDTLAND, G.H. 1991. **Nosso Futuro Comum.** Comissão Mundial sobre o meio ambiente e desenvolvimento. 2ª. Edição. Editora da Fundação Getúlio Vargas, Rio de Janeiro, Rj.

CALDWELL, D.R. 1995. **Microbial Physiology and Metabolism.** Wm. C. Brown Communicatios, Inc, USA. 353 p.

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

CHO, J.S.; WILSON, J.T. AND WEAVER, J.W. 1997. Criteria for selection of intrinsic bioremediation for petroleum hydrocarbon plumes. **Fourth International In Situ and On-Site Biorremediation Symposium.** Volume 1, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p 97-102.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolucao N.º 20, de 18 de junho de 1986.

CORSEUIL, H.X. 1994. Limitações da biomassa autóctone na degradação de compostos tóxicos em solos. **Revista Bio**, 2: 46-56.

CORSEUIL, H.X. AND WEBER, W.J. 1994. Potential biomass limitations on rates of degradation of monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils. **Wat. Res.**, 28(6): 1415-1423.

CORSEUIL, H.X.; Prado, M.A. AND MARINS, M.D.M 1996. Biorremediação Passiva de Águas Subterrâneas Contaminadas por Derramentos de Gasolina. 11º Congresso Brasileiro de Engenharia Química, RJ, set/96.

CORSEUIL, H.X. AND P.J.J. ALVAREZ 1996a. Natural Bioremediation Perspective for BTX-Contaminated Groundwater in Brazil. *Wat. Sci.Tech.*, 34 (7-8): 311-318.

CORSEUIL, H.X. AND ALVAREZ, P.J.J. 1996b. Implications of the Presence of Ethanol on Intrinsic Bioremediation of BTX Plumes in Brasil. *Hazardous Waste and Hazardous Materials* 13 (2): 213-221.

CORSEUIL, H.X. AND P.J.J. ALVAREZ 1996c. Natural Bioremediation of Aquifer Material Contaminated with Gasoline-Ethanol Mixtures. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 27(1)19-26.

CORSEUIL, H.X. AND P.J.J. ALVAREZ 1996d. Natural Bioremediation Perspective for BTX-Contaminated Groundwater in Brazil. *Proceedings 18th IAWQ Conference Biennial International Conference*, Singapore, Conference Preprint Book 4, p 9-16.

CORSEUIL, H.X. 1997. **Biorremediação natural de aquíferos contaminados com derramamentos de gasolina**. Dissertação para Professor Titular, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, 71p.

CORSEUIL, H.X. AND MARINS, M.D. 1997. Contaminação de águas subterrâneas por derramentos de gasolina: o problema é grave? *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental*, 22, 50-54.

CORSEUIL, H.X., HUNT, C.S.; SANTOS, R.C.F. e ALVAREZ, P.J.J. 1998. The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation. *Water Research*, 32, 2065-2072.

- COSTA, S.O .P.. 1987. Genética molecular e de microorganismos. Os fundamentos da Engenharia genética. **Editora Manole LTDA**. 559 p.
- COZZARELI, I.M.; HERMAN, J.S. AND BAEDECKER, M.J. 1995. Fate of microbial metabolites in a coastal plain aquifer: The role of electron acceptors. **Env. Sci. Technol.** 29, 458-469.
- CRUDEN, D.L.; WOLFRAM, J.H.; ROGERS, R.D.; GIBSON, D.T. 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain wich grows with p-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. **Applied And Environmental Microbiology**, 58(9):2723-2729.
- DAUGHTON, C.G.; COOK, A.M. AND ALEXANDER, M. 1979. Phosphate and soil binding: factors limiting bacterial degradation of ionic phosphorus-containing pesticide metabolites. **Applied And Environmental Microbiology**, 37(3):605-609.
- EDWARDS, E.A. AND GRBIC-GALIC. 1992. Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under stricly anaerobic conditions. **Applied And Environmental Microbiology**, 58(8):2663-2666.
- EDWARDS, E.A. AND GRBIC-GALIC. 1994. Anaerobic degradation of toluene and xylene by a methanogenic consortium. **Applied And Environmental Microbiology**, 60(1):313-322.
- FERNANDEZ, M. AND CORSEUIL, H.X. 1996. Contaminação de Águas Subterrâneas por Derrramento de Gasolina: Efeito Cossolvência. **3º Simpósio Ítalo-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental (SIBESA)**, Gramado, junho/96.

- FERNANDES, M. AND CORSEUIL, H.X. 1997. Efeito potencial do etanol na solubilização dos BTX em águas subterrâneas contaminadas com gasolina. **Anais do VI Congresso Brasileiro de Geoquímica**, Salvador, outubro/97, Vol. I, p 150-153.
- FINOTTI, A.R. AND CORSEUIL, H.X. 1997. O uso de ações corretivas baseados no risco ambiental na remediação de aquíferos contaminados por vazamentos em postos de gasolina. **Anais do 19º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, Foz do Iguaçu, em Setembro/97, p 2448-2452.
- GUIGER, N. 1996. **Poluição de águas subterrâneas e do solo causada por vazamentos em postos de abastecimento**. Ontario Waterloo hydrogeologic. 356p.
- HEIPIEPER, H.J. AND BONT, J.A.M. 1994. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to ethanol and toluene at level of fatty acid composition of membranes. **Applied And Environmental Microbiology**, 60(12): 4440-4444.
- HOBBIE, J. E., DALEY, R.J., AND JASPER, S. 1977. Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. **Applied and Environmental Microbiology** (33), 1225-8.
- HUNT, C.S.; CRONKHITE, L.A.; CORSEUIL, H.X. AND ALVAREZ, P.J.J. 1997. Effect of Ethanol on Anaerobic Toluene Degradation in Aquifer Microcosms. **Proceedings of 213th ACS National Meeting**, San Francisco, Abril,97, p 424-426.
- INOUE, A.; YAMAMOTO, M. AND HORIKOSHI, K. 1991. *Pseudomonas putida* which can grow in the presence of toluene. **Applied And Environmental Microbiology**, 57(5): 1560-1562.

- JONES, S.H. AND ALEXANDER. 1986. Kinetics of mineralization of Phenols in lake water. **Applied And Environmental Microbiology**, 51(5):891-897.
- KING, L.K. AND PARKER, B. 1988. A simple, rapid method for enumerating total viable and metabolically active bacteria in groundwater. **Applied And Environmental Microbiology**, 54(6):1630-1631.
- KLECKA, G.M. AND MAIER, W.J. 1985. Kinetics of microbial growth on Pentacholophenol. . **Applied And Environmental Microbiology**, 49(1):46-53.
- KORDA, A.; TENENTE, A.; SANTAS, P.; GIDARAKOS, E.; GUILLERME, M. AND SANTAS R. 1997. Biological remediation of oil spill of the Saronikos Gulf, Greece. **Fourth International In Situ and On-Site Biorremediation Symposium**. Volume 4, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p 451-456.
- LEDDY, M.B.; PHIPPS, W AND RIDGWAY H.F. 1995. Catabolite-mediated mutations in alternate toluene degradative pathways in *Pseudomonas putida*. **Applied And Environmental Microbiology**, 177(16):4713-4720.
- LEE, J.Y.; JUNG, K.H.; CHOI, S.H. AND KIM H.S. 1995a. Combination of the tod and the tol pathways in redesigning a metabolic route of *Pseudomonas putida* for the mineralization of a benzene, toluene, and p-xilene mixture. **Applied and Environment Microbiology**. 61(6): 2211-2217.
- LEE, J.Y.; JUNG, K.H.; AND KIM, H.S. 1995b. Amplification of toluene dioxigenase genes in a hibrid *Pseudomonas strain* to enhance the biodegradation of benzene, toluene, and p-xilene mixture. **Biotechnology and Bioengineering**, 45: 488-494.
- LIBELO, E.L.; STAUFFER, T.B.; GEER, M.A.; MACINTYRE, W.G. AND BOGGS, J.M. 1997. A field study to elucidate processes involved in natural attenuation. **Fourth International In Situ and On-Site Biorremediation Symposium**. Volume 1, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p 23-28.

- MONTGOMERY, M.T.; BOYD, T.J.; SPARGO, B.J.; COFFIN, R.B. AND MUELLER, J.G. 1997. Bacterial productivity in BTEX- and PAH- contaminated aquifers. **Fourth International In Situ and On-Site Biorremediation Symposium**. Volume 4, April 28-May 1, New Orleans, Louisiana, p 125-130.
- McCARTY, P.L. 1972. Stoichiometry of biological reactions. **Toward a unified concept of biological waste treatment design**. International conference, Atlanta, Georgia, 85-151p.
- McCARTY, P.L. 1975. Stoichiometry of biological reactions. **Progress in Water Technology**, 7: 157-165 75
- MOTA, S. 1991. **Introdução à Engenharia Ambiental**. 1ª. Edição. ABES. 280p.
- NORLAND, S.; HELDAL, M.; TUMYR, O. 1987. On the relatio between dry mattet and volume of bacteria. **Microb. Ecol.** 13:95-101.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 1993. **Valores guia para a qualidade da água potável**. 2ª. Edição, Vol. 1.
- PETROBRAS. 1996. Relatório de Atividades, Rio de Janeiro, RJ.
- ROBINSON, J.A. AND TIEDJE, J.M. 1983. Nonlinear estimation of Monod growth kinetics parametes from a single substrate depletion curve. **Applied And Environmental Microbiology**, 45(5):1453-1458.
- RODRIGUEZ, G.G.; PHIPPS, D.; ISHIGURU, K. AND RIDWAY, H.F. 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. **Applied And Environmental Microbiology**, 58(6):1801-1808.

SCHIMIDT, S.K.; SIMKINS, S. AND ALEXANDER M. 1985. Models for the kinetics of biodegradation of organic compounds not supporting growth. **Applied And Environmental Microbiology**, 50(2):323-331.

SCHIMIDT, S.K; SCOW, K.M AND ALEXANDER, M. 1987. Kinetics of p-Nitrophenol mineralization by *Pseudomonas* sp.: Effects of second substrates. **Applied And Environmental Microbiology**, 53(11):2617-2623.

SIERACKI. M.E.; JOHNSON, P.W.; SIEBURTH, J.M. 1985. Detection, enumeration, and sizing of planktonic bacteria by image-analyzed epifluorescence microscopy. **Applied And Environmental Microbiology**, 49(4):799-810.

SIMMKINS, S. AND ALEXANDER, M. 1984. Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentrations and population density. **Applied And Environmental Microbiology**, 47(6):1299-1306.

STANIER, R.Y., PALLERONI, N.J. AND DUODORFF, M. 1966. The aerobic *Pseudomonas*: a taxonomic study. **J. Gen. Microbiol.**, 43: 159-271.

SWINDOLL, C.M.; AELION, C.M. AND PFAENDER, F.K. 1988. Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities. **Applied And Environmental Microbiology**, 54(1): 212-217.

TEST METHODS FOR EVALUATING SOLID WASTE PHYSICAL CHEMICAL METHODS. 1996. **Environmental Protection Agency, Office of Solids Waste and the National Technical Information Service (NTIS)**. SW-846, EPA 8015 A.

WALTER, M.V. AND CRAWFORD, R.L. 1997. **Manual of environment microbiology**. ASM Press, Washington, D.C. 894p.

- WANG, K.W.; BALZIS, B.C. AND LEWANDOWSKI, G.A. 1996. Kinetics of phenol biodegradation in the presence of glucose. **Biotechnology and Bioengineering**, 51: 87-94.
- WIGGINS, B. A., JONES, S.H. AND ALEXANDER, M. 1987. Explanations for the acclimation period preceding the mineralization of organic chemicals in aquatic environments. **Applied And Environmental Microbiology**, 53(4):791-796.
- WEBER, F.J.; OOIJKAAS, L.P.; SCHEMEN, R.M.W.; HARTMANS, S. AND BONT, J.A.M. 1993. Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to high concentrations of styrene and other organic solvents. **Applied and Environment Microbiology**. 59(10): 3502-3504.
- WEBER, W.J., Jr. AND CORSEUIL, H.X. 1994. Inoculation of Contaminated Subsurface Soils with Enriched Indigenous Microbes to Enhance Bioremediation Rates. **Water Research** 28, 1407-1414.
- ZYLSTRA, G.J.; McCOMBIE, W.R.; GIBSON D.T. AND FINETTE, B.A. 1988. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1: genetic organization of the *tod* operon. **Applied and Environment Microbiology**. 54(6): 1498-1503.