

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS E CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS
ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE FENOL**

MsC. Cátia Tavares dos Passos

Porto Alegre, RS, Brasil

Fevereiro, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS E CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS
ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE FENOL**

Cátia Tavares dos Passos

Orientador: Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

Tese de Doutorado elaborada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente,
para obtenção do Título de Doutor em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre, RS, Brasil

Fevereiro, 2010

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

P289i Passos, Cátia Tavares dos

Isolamento de bactérias e caracterização das enzimas envolvidas na degradação de fenol / Cátia Tavares dos Passos. – 2010.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

Orientação: Prof. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

1. Fenol 2. Couro 3. *Microbacterium oxydans* 4. Catecol 1,2 - dioxigenase
I. Camargo, Flávio Anastácio de Oliveira, orient. II. Título.

CDU 579.2 (043)

Este trabalho é dedicado à memória da minha mãe que sempre acreditou que eu seria capaz de alcançar tudo aquilo que eu queria, por meio dos estudos.

No meio da dificuldade, encontra-se a oportunidade
Não tentes ser bem sucedido, tenta antes ser um homem de valor
O único lugar que o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário
(Frases de Albert Einsten)

AGRADECIMENTOS

À Deus;

Ao professor Flávio Camargo pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, por toda ajuda, compreensão e horas dedicadas ao meu trabalho;

À professora Fátima Bento por estar sempre pronta a ajudar;

Ao PPGMAA e à todos os professores;

Ao meu pai, pelos bons exemplos e por apoiar todos os meus sonhos e também pelo amor incondicional e as ligações antes das 7 da manhã; e à minha irmã e aos meus sobrinhos por toda atenção e carinho dedicados a mim;

Agradeço ao Rogério pelo amor, apoio, paciência, zelo, carinho e compreensão e pelas batatinhas quando voltava cansada do laboratório;

A d. Maria, ao seu José, d. Severina, Cristina e Matheus que me acolheram como da família;

À Márcia Orantas, pela dedicação prestada à conclusão deste trabalho;

Aos laboratórios de Análise de Solos, Biologia dos Solos e Química dos Solos pelo empréstimo dos equipamentos;

Às minhas queridas amigas de dentro e fora da faculdade;

Às minhas tias Antoninha, Ivanda e Mônica por todo carinho que recebi na minha passagem por Porto Alegre;

Aos amigos e colegas de Guarapuava por toda atenção, por estarem sempre prontos à ajudar e pelas boas conversas.

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS E CARACTERIZAÇÃO DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE FENOL

¹Resumo

Foram isoladas neste trabalho seis bactérias a partir de serragem de couro contaminado com fenol, proveniente de um curtume da região de estudo. Elas foram identificadas como *Pseudomonas putida*, *Microbacterium oxydans*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Staphylococcus cohnii* utilizando-se a técnica do 16 S ribossomal. Os isolados de *M. oxydans* (BLB-2 e BLB-4) foram utilizados nos estudos posteriores, onde se verificou que ambos apresentavam alta capacidade de remoção e tolerância ao fenol, até a concentração de 750 e 1000 mg L⁻¹, respectivamente. Ao longo do trabalho, a bactéria BLB-4 perdeu a capacidade degradativa sendo esta reisolada do inóculo utilizando-se a técnica de conjugação. Após esta etapa foi realizado estudo das condições de cultivo, onde se verificou que utilizando meio mineral com peptona, juntamente com uma concentração maior de inóculo, no pH 7,0, havia um aumento da taxa de remoção de fenol. A bactéria voltou a tolerar a mesma concentração que tolerava antes de perder a capacidade degradativa (1000 mg L⁻¹). Foi constatado que ambas as bactérias utilizavam a via de degradação orto-β-cetoatipato, expressando as enzimas fenol hidroxilase e catecol 1,2-dioxigenase. Verificou-se que todas eram termoestáveis, atuavam em uma grande faixa de pH (4,0 a 9,0), que algumas foram afetadas pela presença de íons metálicos no meio de reação, como o mercúrio. Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que ambas as bactérias e suas enzimas são promissoras para serem utilizadas em processos de biorremediação.

¹ Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia da Biodegradação, biodeterioração e biorremediação, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (115 p.). Fevereiro, 2010.

ISOLATION OF BACTERIAS AND CHARACTERIZATION OF THE ENZYMES INVOLVED IN DEGRADATION OF PHENOL

²Abstract

Were isolated in this study six bacteria from leather shavings contaminated with phenol, from a tannery in the region of study. They were identified as *Pseudomonas putida*, *Microbacterium oxydans*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Staphylococcus cohnii* using the technique of the 16 S ribosomal RNA. The isolates of *M. oxydans* (BLB-2 and BLB-4), were used in others subsequent studies, which found that both bacterias had a high removal capacity and tolerance to phenol concentrations of up to 750 and 1000 mg L⁻¹, respectively. Throughout the work, the bacteria BLB-4 lost the ability of degradation, so was used the technique of conjugation to isolation of the bacteria of the inoculum. After, was made the study of culture conditions, where it was found that mineral medium with peptone, a higher concentration of inoculum and the pH 7.0, increased rate of removal of phenol. The bacteria tolerated the same concentration as tolerated before losing degrading capacity (1000 mg L⁻¹). Was found that both the bacteria used the route of degradation of ortho- β -cetoatipato, expressing the enzymes phenol hydroxylase and catechol 1,2-dioxygenase. It was found that all were heat-stable, worked in a wide range of pH (4.0 to 9.0), some were affected by the presence of metal ions in the reaction medium, such as mercury. The results presented in this study suggest that both bacteria and their enzymes are promising for use in bioremediation processes.

2 Doctoral Thesis in Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (115 p.). February, 2010.

SUMÁRIO

| | Pág. |
|--|------|
| CAPÍTULO I | |
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| CAPÍTULO II | |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 04 |
| 2.1 Aspectos toxicológicos do fenol e legislação..... | 04 |
| 2.2 Caracterização da contaminação do fenol..... | 07 |
| 2.3 Principais áreas contaminadas com fenol no Brasil..... | 10 |
| 2.4 Uso de micro-organismos para degradação de fenol..... | 12 |
| 2.5 Técnicas de remoção de compostos fenólicos..... | 16 |
| 2.6 Mecanismo de degradação de fenol..... | 20 |
| CAPÍTULO III | |
| ARTIGO 1: BIODEGRADAÇÃO DE FENOL POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE SERRAGEM DE COURO E EVIDÊNCIA DA ROTA DE DEGRADAÇÃO PELA VIA ORTO-β-CETOATIPATO | 22 |
| Resumo..... | 22 |
| Abstract..... | 22 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 23 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 25 |
| 2.1 Isolamento de bactérias resistentes ao fenol..... | 25 |
| 2.2 Identificação de bactérias tolerantes ao fenol..... | 26 |
| 2.3 Remoção de fenol usando monoculturas..... | 28 |
| 2.4 Determinação do mecanismo metabólico de degradação de fenol.... | 28 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 29 |
| 3.1 Isolamento das bactérias degradadoras de fenol..... | 29 |
| 3.2 Remoção de fenol pelos isolados bacterianos..... | 33 |
| 3.3 Mecanismo da biodegradação de fenol..... | 37 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 39 |
| REFERÊNCIAS..... | 40 |
| CAPÍTULO IV | |
| ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DA BACTÉRIA <i>Microbacterium oxydans</i> | 45 |
| Resumo..... | 45 |
| Abstract..... | 45 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 46 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 47 |
| 2.1 Bactéria..... | 47 |

| | |
|--|----|
| 2.2 Isolamento da bactéria pela técnica de enriquecimento..... | 48 |
| 2.3 Determinação da capacidade de degradação de fenol..... | 49 |
| 2.4 Efeito de diferentes condições de crescimento na biodegradação de fenol..... | 49 |
| 2.4.1 Efeito do uso de diferentes meios de degradação..... | 50 |
| 2.4.2 Efeito do tamanho do inóculo..... | 51 |
| 2.4.3 Efeito do pH na degradação de fenol..... | 51 |
| 2.5 Biodegradação de diferentes concentrações de fenol..... | 51 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 52 |
| 3.1 Isolamento de bactérias com capacidade de degradação..... | 52 |
| 3.2 Efeito do uso de diferentes meios de degradação..... | 54 |
| 3.3 Influência do tamanho inicial do inóculo no meio de degradação..... | 60 |
| 3.4 Influência do pH na degradação de fenol..... | 62 |
| 3.5 Biodegradação de diferentes concentrações de fenol..... | 65 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 68 |
| REFERÊNCIAS..... | 68 |

CAPÍTULO V

CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA BIODEGRADAÇÃO DE FENOL PRODUZIDAS PELAS BACTÉRIAS *Microbacterium oxydans* BLB-2 E BLB-4.....

| | |
|---|----|
| Resumo..... | 71 |
| Abstract..... | 71 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 72 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS..... | 74 |
| 2.1 Micro-organismos..... | 74 |
| 2.2 Enzimas..... | 74 |
| 2.3 Ensaio enzimáticos..... | 75 |
| 2.4 Tempo de reação, efeito do pH e estabilidade térmica..... | 76 |
| 2.5 Influência de íons metálicos no meio de reação..... | 77 |
| 2.6 Cinética enzimática e energia de ativação..... | 77 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 78 |
| 3.1 Tempo de reação, efeito do pH na atividade enzimática e estabilidade térmica..... | 78 |
| 3.2 Efeito da presença de metais na atividade enzimática..... | 87 |
| 3.3 Cinética enzimática e energia de ativação..... | 91 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 94 |
| REFERÊNCIAS..... | 95 |

CAPÍTULO VI

| | |
|---|-----------|
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL..... | 98 |
|---|-----------|

| | |
|---------------------------|------------|
| CAPÍTULO VII | |
| 7. CONCLUSÃO GERAL | 100 |
| REFERÊNCIAS..... | 102 |

LISTA DE TABELAS

| | Pág. |
|--|------|
| CAPÍTULO II | |
| TABELA 1: Procedência de isolados bacterianos com capacidade de degradação de fenol e concentração máxima tolerada que foram relatados na literatura..... | 13 |
| TABELA 2: Procedência de alguns isolados fúngicos com capacidade de degradação de fenol, e concentração máxima tolerada, já estudados..... | 15 |
| CAPÍTULO III | |
| TABELA 3: Identificação dos isolados bacterianos provenientes de serragem de couro que apresentaram tolerância à 500 mg L ⁻¹ de fenol em MM como única fonte de carbono, pela seqüência do gene rRNA 16S..... | 31 |
| TABELA 4: Taxa de degradação de fenol em mg L ⁻¹ h ⁻¹ dos isolados bacterianos BLB-2 e BLB-4, crescendo em MM em diferentes concentrações de fenol, como única fonte de carbono..... | 37 |
| TABELA 5: Atividades das enzimas fenol hidroxilase, catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase nas culturas dos dois isolados bacterianos, em MM contendo 250 mg L ⁻¹ de fenol..... | 38 |
| CAPÍTULO V | |
| TABELA 6: Meios utilizados nos ensaios de degradação de fenol utilizando MM adicionado de 250 mg L ⁻¹ de fenol e 500 mg L ⁻¹ de uma fonte convencional, prontamente assimilável pelos micro-organismos e um meio contendo fenol como única fonte de carbono, incubadas à 30 °C, 190 rpm..... | 50 |
| TABELA 7: Variação da concentração de peptona no meio que mais influenciou no processo de degradação, incubado a 30 °C e 190 rpm..... | 50 |
| TABELA 8: Influência do uso de diferentes meios na degradação de fenol por <i>M. oxydans</i> BLB-4, incubada à 30 °C, 190 rpm..... | 56 |
| CAPÍTULO VI | |
| TABELA 9: Concentração de substrato para qual a velocidade da reação enzimática é metade da velocidade máxima (K _m) e velocidade máxima da reação (V _{máx}) das enzimas PHO e C 1,2D, produzidas pelas bactérias <i>M. oxydans</i> BLB-2 e BLB-4..... | 92 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| CAPÍTULO III | |
| FIGURA 1: Medida da DO ₅₄₀ das bactérias isoladas de serragem de couro, pela técnica de enriquecimento, utilizando fenol como única fonte de carbono, crescendo em MM com a concentração de 500 mg L ⁻¹ de fenol, incubado à 30 °C e 190 rpm..... | 30 |
| FIGURA 2: Relação filogenética entre isolados bacterianos degradadores de fenol e relação dos organismos baseado no gene rRNA 16 S. A escala representa o valor da distância evolucionária..... | 33 |
| FIGURA 3: Efeito da concentração de fenol no processo de degradação (a) e DO ₅₄₀ (b) na cultura de <i>Microbacterium oxydans</i> BLB-2, em MM utilizando diferentes concentrações de fenol como única fonte de carbono, incubada à 30 °C e 190 rpm..... | 34 |
| FIGURA 4: Efeito da concentração de fenol no processo de degradação (a) e DO ₅₄₀ (b) na cultura de <i>Microbacterium oxydans</i> BLB-4, em MM utilizando diferentes concentrações de fenol como única fonte de carbono, incubada à 30 °C e 190 rpm..... | 35 |
| FIGURA 5: Rota metabólica de degradação aeróbia de fenol, pelas bactérias, pela via orto-β-cetoatipato e mineralização através do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA). Adaptado de Nair et al., 2008..... | 39 |
| CAPÍTULO IV | |
| FIGURA 6: Degradação de fenol e medida da OD ₆₀₀ , da bactéria <i>M. oxydans</i> BLB-4 após isolamento das bactérias, a partir do inóculo que tinha perdido a capacidade degradativa, por técnica de enriquecimento utilizando fenol como única fonte de energia em MM, incubado à 30 °C e 190 rpm..... | 53 |
| FIGURA 7: Efeito do uso de diferentes meios na degradação de fenol (a) e medida da DO ₆₀₀ nm (b), utilizando a bactéria <i>M. oxydans</i> BLB-4, incubado à 30 °C e 190 rpm. M1: 500 mg L ⁻¹ de meio Luria Bertani, 250 mg L ⁻¹ de fenol em MM; M2: 500 mg L ⁻¹ de meio nutriente, 250 mg L ⁻¹ de fenol em MM; M3: 500 mg L ⁻¹ de peptona, 250 mg L ⁻¹ de fenol em MM; M4: 500 mg L ⁻¹ de glicose, 250 mg L ⁻¹ de fenol em MM; M5: 500 mg L ⁻¹ de glicerol, 250 mg L ⁻¹ de fenol em MM; M6: 250 mg L ⁻¹ de fenol em MM..... | 55 |
| FIGURA 8: Efeito dos diferentes meios com concentrações diferentes de peptona (M3: 100 mg L ⁻¹ de peptona, 250 mg L ⁻¹ de fenol em MM; M7: 500 mg L ⁻¹ de peptona, 250 mg L ⁻¹ de fenol em MM; M8: 1000 mg L ⁻¹ de peptona, 250 mg L ⁻¹ de fenol em MM) na degradação de fenol, por <i>M. oxydans</i> BLB-4, à 30 °C e 190 rpm..... | 59 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 9: Efeito das diferentes concentrações iniciais de inóculo (DO inicial de 0,26, 0,31 e 0,48 obtidos a partir da diluição de 25 mL de inóculo em 15, 10 e 5 mL de MM, respectivamente), na degradação de fenol por <i>M. oxydans</i> BLB-4, e medida da DO ₆₀₀ nm, em meio M7 (500 mg L ⁻¹ de peptona, 250 mg L ⁻¹ de fenol em MM), incubado à 30 °C e 190 rpm..... | 61 |
| FIGURA 10: Efeito dos diferentes pHs no meio e medida da DO ₆₀₀ , na degradação de fenol por <i>M. oxydans</i> BLB-4, utilizando o meio M7 (500 mg L ⁻¹ de peptona, 250 mg L ⁻¹ de fenol em MM), com concentração inicial do inóculo de 0,31, incubado à 30 °C e 190 rpm..... | 63 |
| FIGURA 11: Degradação de diferentes concentrações iniciais de fenol pela bactéria <i>M. oxydans</i> BLB-4, usando o meio M7 (500 mg L ⁻¹ de peptona, 250 mg L ⁻¹ de fenol em MM), DO ₆₀₀ inicial de 0,31 e pH 7..... | 66 |

CAPÍTULO V

| | |
|--|----|
| FIGURA 12: Efeito do tempo de reação na atividade das enzimas PHO à 30 °C pH 7,0 e C 1,2D à 30 °C, pH 8,0, produzidas pelas bactérias <i>M. oxydans</i> BLB-2 e BLB-4..... | 79 |
| FIGURA 13: Efeito do pH na atividade das enzimas PHO à 30 °C, pH 7,0 após 30 min de reação e C 1,2D à 30 °C, pH 8,0 após 30 min de reação, produzidas pelas bactérias <i>M. oxydans</i> BLB-2 e BLB-4..... | 80 |
| FIGURA 14: Efeito da temperatura na atividade das enzimas PHO à 30 °C após 30 min de reação e C 1,2D à 30 °C após 30 min de reação, produzidas pelas bactérias <i>M. oxydans</i> BLB-2 e BLB-4..... | 84 |
| FIGURA 15: Efeito da presença de íons na atividade das enzimas PHO à 30 °C, pH 7,0 após 30 min de reação e C 1,2D à 30 °C, pH 8,0 após 30 min de reação, produzidas pelas bactérias <i>M. oxydans</i> BLB-2 e BLB-4..... | 88 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% – porcentagem
2,4-D – 2,4-diclorofenoxiacetato
BLB – identificação dada às bactérias isoladas no Laboratório de Biorremediação
°C – graus Celsius
C 1,2D – símbolo utilizado para substituir o nome da enzima catecol 1,2-dioxigenase
CF - clorofenol
DO – densidade óptica
g – grama
h – hora
Kg – quilograma
Km - quilômetro
L – litros
LB – meio Luria Bertani
 μ - micron (10^{-6})
min - minuto
m – mili (10^{-3})
M – mol
MM – meio mineral
n – nano (10^{-9})
ND – não detectado
p – pico (10^{-12})
PCR – *Polymerase Chain reaction* (Reação em cadeia de polimerase)
PHO – símbolo utilizado para substituir o nome da enzima fenol hidroxilase
PVA – polivinil álcool gel
rpm – rotações por minuto
s – segundo
TON – tonelada
W – Watts

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são citados como um dos principais contaminantes ambientais, estando presentes nos efluentes da maioria dos ramos industriais. Quando esses compostos não são tratados adequadamente e descartados no ambiente geram sérios riscos ambientais e à saúde do ser humano. No Rio Grande do Sul as indústrias de alimentos, petroquímicas, farmacêuticas, metalúrgicas e do curtimento do couro, entre outras, geram fenol em seus processos, sendo que nem todas tratam de forma adequada seus efluentes. Boa parte é descartada no ambiente sem tratamento ou permanecem em seus terrenos de forma clandestina, sem conhecimento do órgão ambiental responsável.

O fenol também pode entrar em contato com o ambiente de forma acidental através de rompimento de dutos e no transporte destes resíduos, sendo muito perigoso por envolver altas concentrações desse composto tóxico. Pode ser fatal se ingerido, inalado ou absorvido pela pele, causando também severas queimaduras, afetando o sistema nervoso central, fígado e rins.

Entre as formas de remoção de fenol podem ser citadas a catálise química, processos fotoquímicos, a ozonização, a extração líquido-líquido, entre

outros processos físicos e químicos. Esses processos podem ser caros e não resolverem o problema, pois podem transformar o contaminante em outro composto com menor massa molecular e, muitas vezes, impedir a total mineralização do contaminante, pela formação de subprodutos indesejáveis (Assalin et al., 2006).

Processos biológicos vêm ganhando destaque para a degradação de compostos aromáticos devido à possibilidade da total mineralização do contaminante. Dentro desse contexto, destacam-se os processos de biorremediação que são tecnologias que utilizam micro-organismos, especialmente os selecionados pelo seu potencial degradativo com o objetivo de minimizar o impacto das substâncias recalcitrantes no ambiente, criando condições favoráveis ao crescimento e à atividade microbiana (Caprez et al., 2002).

O uso de enzimas como agentes de descontaminação tem recebido grande atenção devido à possibilidade de serem utilizadas em compostos com alto grau de toxicidade, uma vez que micro-organismos naturais selecionados mesmo exibindo tolerância, podem ser afetados pelo contaminante (Chen et al., 1999). As enzimas apresentam características que torna vantajoso seu uso quando comparado com a catálise química convencional ou a utilização de micro-organismos promovendo maior rendimento das reações, reduzindo o custo de material.

Com base no exposto, o presente trabalho teve como objetivo a identificação de bactérias com alto potencial de degradação de fenol, recuperação da capacidade de degradação, avaliação das condições de cultivo e caracterização das enzimas que participavam da rota de degradação de fenol. Os objetivos específicos foram: a) isolar bactérias de serragem de couro proveniente de um curtume do Rio Grande do Sul; b) testar a capacidade das bactérias para degradação de fenol; c) avaliar a tolerância das bactérias ao contaminante; d) estabelecer a rota metabólica utilizada por esses micro-organismos; e) realizar a identificação das bactérias mais eficazes na remoção do contaminante; f) isolar do inóculo, bactérias que não perderam a capacidade de degradação de fenol por técnica de enriquecimento; g) investigar as condições de cultivo que mais influenciavam no aumento da velocidade de degradação de fenol; h) caracterizar as enzimas envolvidas nas primeiras etapas da degradação do fenol.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos toxicológicos do fenol e legislação

Os fenóis e seus homólogos são moléculas aromáticas que contêm hidroxil e grupos sulfônicos no anel benzênico (Alemzadeh et al., 2002) e são listados como contaminantes periódicos do ambiente. Pertence a um grupo de compostos aromáticos tóxicos perigosos produzidos por muitos processos, podendo causar problemas devido à liberação contínua de pequenas concentrações de compostos fenólicos (Fialová et al., 2004; Alemzadeh et al., 2002). Em muitos países, as agências de proteção ambiental citam o fenol como um poluente prioritário para a remediação (U.S. Environmental Protection Agency) (Khleifat, 2006).

Segundo ao anexo A da NBR 7500, o fenol sólido é considerado tóxico (venenoso), sendo que dados publicados pela CETESB-SP indicam que a concentração considerada tóxica aos humanos é de 140 mg Kg⁻¹, por via oral e de 74 mg m³ pela inalação. As bactérias toleram uma faixa de 64 mg L⁻¹ para *Pseudomonas aeruginosa* e > 1000 mg L⁻¹ para *Escherichia coli*. Segundo Fialová et al. (2004), os efeitos tóxicos para os micro-organismos incluem a permeabilização da membrana celular e coagulação citoplasmática que poderiam

causar danos às células, afetando principalmente os processos de tratamento de resíduos líquidos, causando problemas à saúde e ao meio ambiente.

Segundo a CETESB (2010a), os fenóis se tornam parte do tratamento de esgotos sanitários e de efluentes industriais, pois muitas indústrias estão ligadas à rede pública de coleta de esgotos. Por este fato, o Artigo 19-A do Decreto Estadual nº 8.468/76 do Estado de São Paulo estabelece o limite de emissão de fenóis de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, e as indústrias devem fazer o tratamento de seus efluentes na própria unidade industrial a fim de reduzir a concentração de fenol. Estas restrições para emissão de fenol ocorrem devido a reação com cloro livre, formando clorofenóis (CF). Dessa forma, o Ministério da Saúde considera a presença de fenol como padrão de potabilidade da água, limitando a concentração existente a $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ (Portaria 1469).

Wen et al. (2006) enfatizam que os CF formados são mais tóxicos que os fenóis, aumentando o risco à saúde e têm sido citados como um dos poluentes prioritários pela U.E. (União Européia) e também pela EPA (Environmental Protection Agency- USA). Estes mesmos autores ainda citam que o tratamento biológico deste tipo de resíduo é muito difícil devido à dificuldade que os micro-organismos têm de removê-lo, e que os efluentes devem ser tratados antes de serem descartados no ambiente.

A FEPAM-RS (Fundação Estadual de Proteção Ambiental), se baseia na Portaria nº 05 da Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente (Rio Grande do Sul,

1989), estabelecendo limites de emissão de fenol de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, para que efluentes líquidos sejam lançados nos corpos de água, menor que o limite estabelecido pela Legislação Brasileira, que estabelece os limites de emissão no corpo receptor de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de fenol (Artigo 34 da Resolução n.º 357/05 do CONAMA).

Segundo Peixe et al. (2006), o fenol pode ser rapidamente absorvido pela pele, devido a seu caráter lipofílico. O contato pode ocorrer por via respiratória, oral ou cutânea, sendo distribuído por todos os tecidos pelo fluxo sanguíneo. A mucosa nasal é o local onde a absorção ocorre de forma mais fácil e normalmente está relacionada aos efeitos mais tóxicos.

Há relatos de fatalidade por contato ou ingestão de fenol em adultos, com apenas 70 mg Kg^{-1} de fenol, por via oral. O fenol pode afetar severamente órgãos e tecidos, estando relacionado a casos de alteração da mucosa intestinal, causando gastrenterites, problemas cardiovasculares, por necrose do miocárdio, pneumonia devido à sensibilização da mucosa nasal, degeneração centro lobular, efeitos neurológicos e necrose de fígado e rins. Com relação à genotoxicidade o fenol pode estar relacionado com alterações no cromossomo e no DNA, incluindo medula óssea, fígado e células renais (U.S. Department of Health and Human Services, 2008). Não há estudos disponíveis do grau de exposição em adultos e crianças para estas ocorrências, devido a divergências dos protocolos existentes e à falta de mais estudos na área.

Peixe et al. (2006), relatou que em 1974 em Wisconsin nos Estados Unidos, uma população foi contaminada pela água potável, oriunda do lençol freático contaminados com fenol. Após um mês ocorreram relatos de diarreia, feridas e queimaduras na boca e urina escura. Foi estimada que a exposição diária tinha sido de 10-240 mg de fenol por pessoa. Em outro local, em North Wales, também nos Estados Unidos, doenças gastrointestinais foram relatadas devido à contaminação de um rio com fenol, sendo detectada a formação de clorofenóis.

2.2 Caracterização da contaminação do fenol

A presença de compostos orgânicos antropogênicos no ambiente é um problema de saúde pública considerável, já que hidrocarbonetos monoaromáticos como benzeno, tolueno e fenol são encontrados em grandes quantidades (Hamed et al., 2004). Clorofenóis são originados principalmente pelo seu uso em biocidas na indústria e na agricultura. Sua formação também ocorre durante o branqueamento de polpa de papel e a incineração de material orgânico na presença de cloro (Antizar-Ladislao & Galil, 2004). A indústria petroquímica descarta no ambiente compostos fenólicos provenientes de águas de lavagem da gasolina e do processamento de óleos lubrificantes e solventes (Ribeiro et al., 2001).

O Brasil possui cerca de 166 milhões de cabeças de gado, totalizando 16% do rebanho mundial (Alves & Mancio, 2007), ocupando o quinto lugar na produção mundial de couro bovino, com 16% da produção, ficando atrás dos EUA, Rússia, Índia e Argentina (Santos et al., 2002). O Rio Grande do Sul produziu 7%, dos 44,4 milhões de peles produzidas no Brasil em 2006 perdendo para os estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso que dominam o mercado com 16, 15 e 14% da produção nacional, respectivamente. Até o ano 2000 a produção se concentrava na região sul e sudeste, onde o Rio Grande do Sul era o maior produtor com 23,5 % da produção nacional (Rosa & Correa, 2007).

Nos curtumes podem ser encontrados os mais variados produtos químicos utilizados nas diferentes etapas do processo como fungicidas, corantes, solventes, metais pesados, taninos e compostos fenólicos (Pacheco, 2005), representando uma possível fonte de contaminação em nosso estado, por se tratarem de indústrias de pequeno porte (Santos et al., 2002), existindo uma quantidade considerável de fenol em seus resíduos (Ganem, 2007; Pacheco, 2005). Em São Paulo, apenas as empresas de médio porte que fazem o tingimento do couro, devem realizar tratamento de seus efluentes líquidos, ao custo de 3 mil reais por mês para tratar 20000 L de água por dia (CETESB, 2010). Isto significa que muitos efluentes contendo altas concentrações de fenóis estão sendo descartados diretamente no meio ambiente.

A indústria de azeite de oliva gera 1200 mg L⁻¹ de compostos fenólicos, nos meses de safra (García et al., 2000), sendo superior a concentração de 469 mg L⁻¹ geradas pelas destilarias de álcool (García et al., 1997), 615 mg L⁻¹ pelas indústrias de resinas fenólicas (Hidalgo et al., 2002) e 326 mg L⁻¹ produzida pelas siderúrgicas (Santos & Linardi, 2004). Com isso, representa a indústria que possui as maiores concentrações de compostos fenólicos, conferindo cor escura ao efluente, efeitos fitotóxicos e atividade antibacteriana. Este resíduo é composto por açúcares, taninos, polifenóis, poliálcoois, pectinas e lipídeos, na sua fração orgânica (Kachouri & Hamdi, 2003). Essas indústrias representam um grande risco de impacto ambiental, já que as maiores concentrações são geradas em períodos sazonais, relacionadas com a safra da azeitona.

No Rio Grande do Sul em 2009, no município de Caçapava do Sul, houve a implantação de uma indústria beneficiadora de óleo de oliva que produz 91000 L de azeite. A produção de azeitonas na cidade em 2007 era de 1600 toneladas e espera-se produzir até 2012, 2100 toneladas de azeitonas, destinadas à produção de azeite de oliva extra virgem (Mota et al., 2009).

2.3 Principais áreas contaminadas com fenol no Brasil

Segundo a CETESB os fenóis estão presentes nas águas naturais devido às descargas de efluentes industriais que não sofreram tratamento adequado. A maior catástrofe ambiental envolvendo fenol no Brasil ocorreu no

estado de Santa Catarina, na Baía da Babitonga em 1950. Empresas de fundição depositaram em suas margens, areia contaminada com fenol e metais pesados e aparentemente nada foi feito contra isso, persistindo o problema até hoje (Demori & Bellotto, 2008).

Nas margens do rio Bocaiuna na cidade de Bocaiuna-SP, existem cinco curtumes próximos e recorrentemente o rio é contaminado por seus resíduos, apresentando coloração correspondente ao corante que foi utilizado no tingimento dos couros, com odor forte e irritante às mucosas. A estação de tratamento de água da cidade não tem capacidade para tratar estes resíduos presentes na água dos rios da região, provenientes dos efluentes descartados sem tratamento, que matam as bactérias envolvidas no processo de tratamento da água. Foi observado que os locais por onde passam os resíduos dos curtumes causam a morte de todos os seres vivos, sejam peixes, plantas ou bactérias (Camargo, 2010).

Em agosto de 2000 o *Greenpeace* coletou várias amostras de areia de fundição contaminada com fenol e outros compostos tóxicos, armazenada ilegalmente ao redor da planta da Gerdau em Sapucaia do Sul-RS, onde as análises dessas amostras demonstraram que as escórias residuais estavam contaminadas por altas concentrações de metais pesados tóxicos. As escórias armazenadas próximas as plantas estavam contaminando o solo por bifenilas policloradas (PCBs) tóxicas e persistentes. A poeira coletada em uma casa próxima à planta estava contaminada por altos níveis de PCBs, com perfis

semelhantes ao encontrado na escória e foi encontrado também fenol, hidrocarbonetos aromáticos e compostos organo-halogenados (Brigden et al., 2000).

Em 2003, no município de Catanguases, Minas Gerais, uma mancha tóxica de 1,2 bilhão de litros de resíduos, resultante do processo químico de branqueamento de papel, que é uma fonte de resíduos fenólicos entre outros compostos perigosos, se alastrou por quase 100 Km de rios, destruindo totalmente a fauna e a flora na sua trajetória, comprometendo também a subsistência da população ribeirinha (Lobato, 2003).

Resíduos sólidos industriais normalmente têm sido encaminhados para deposição final em aterros controlados que em sua maioria não operam de forma eficiente, geralmente estão localizados próximos a núcleos populacionais e ecossistemas importantes. A CETESB (2010c) cita que a contaminação de águas subterrâneas pode ocorrer devido a lixões e aterros mal operados, armazenamento e descarte de matérias primas de forma inadequada, efluentes de indústrias como das químicas, petroquímicas, alimentícias, metalúrgicas, dos curtumes entre outras, vazamento de esgotos e da rede de saneamento, agrotóxicos e fertilizantes utilizados de forma incorreta, sendo que a maioria desses resíduos possui altas concentrações de compostos fenólicos.

Um trabalho feito no estado do Rio de Janeiro avaliando amostras originadas de setores químicos de beneficiamento de compostos minerais,

metalúrgico, alimentício e de bebidas, constatou concentrações de fenol acima do permitido em nove das vinte e uma amostras analisadas, onde a maior concentração encontrada de fenol foi de 100 vezes acima do que o valor máximo permitido (Sisinno, 2003). Com isso constatou-se que a contaminação por fenol é um problema presente, e medidas devem ser tomadas para reverter esse problema.

No Rio Grande do Sul, o fenol está presente principalmente em resíduos da indústria do petróleo, na cura do couro, de papel, nas indústrias químicas e farmacêuticas e em menor proporção, embora não menos preocupante, nas indústrias de alimentos e em certos defensivos agrícolas usados na agricultura.

2.4 Uso de micro-organismos para degradação de fenol

Devido à grande ocorrência de fenol, micro-organismos hábeis em usar estes compostos como fonte de carbono e energia podem ser encontrados em muitos ambientes. Eles incluem tanto micro-organismos aeróbios como anaeróbios. A biodegradação aeróbia tem sido estudada desde o começo do século XX, onde muitos micro-organismos degradadores de fenol têm sido isolados e suas rotas de degradação têm sido elucidadas desde 1950.

A maioria dos estudos realizados em laboratório, para investigar a capacidade degradativa de micro-organismos, por sua habilidade de degradar

hidrocarbonetos, enfoca a biodegradação destes por bactérias. A despeito das propriedades tóxicas dos fenóis, numerosos micro-organismos podem utilizar esses compostos sob condições aeróbicas como única fonte de carbono e energia (Watanabe, 2002).

TABELA 1: Procedência de isolados bacterianos com capacidade de degradação de fenol e concentração máxima tolerada que foram relatados na literatura.

| Bactéria | Local do isolamento | Concentração de fenol tolerada (mg L ⁻¹) | Referência |
|---|--|--|---------------------------|
| <i>Pseudomonas putida</i> | Singapura | 750, em meio mínimo com glicose e extrato de levedura | Lob & Tar, 2000 |
| | Estados Unidos | 600, em meio com extrato de carne e peptona | Hamed et al., 2004 |
| | Taiwan, no efluente de uma indústria de alimentos | 416,5 em meio rico | Juang & Tsai, 2006 |
| <i>Pseudomonas</i> sp. | Taiwan | 200 em meio rico | Annadurai et al., 2008 |
| | Estados Unidos, de um lodo ativado contendo clorofenóis | 196 em meio mínimo | Moharikar & Purohit, 2003 |
| <i>P. solanacearum</i> e <i>P. testosteroni</i> | Índia em uma planta de tratamento de esgoto | 100 em meio mínimo com glicose | Saravanan et al., 2008 |
| | Coréia | 20 em meio mínimo | Kim et al., 2002 |
| <i>Rhizobium</i> sp. | China, nódulo de <i>Astragalus chrysopteru</i> | 1000 em meio mínimo | Wei et al., 2008 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | Tunísia, em resíduos de uma indústria de óleo de oliva | 1108 em resíduo líquido de óleo de oliva fermentado | Kachouri & Hamdi, 2004 |
| <i>Cupriavidus taiwanensis</i> | Taiwan, nódulo de <i>Mimosa</i> sp. | 1112,3 em meio mínimo | Chen et al., 2008 |
| <i>Ralstonia taiwanensis</i> | Taiwan, nódulo de <i>Mimosa</i> sp. | 900 em meio mínimo | Chen et al., 2004 |
| <i>Ralstonia eutropha</i> | Turquia | 500 em meio rico, com a bactéria imobilizada em alginato de cálcio | Tepe & Dursun, 2008 |
| <i>Halomonas campisalis</i> | Estados Unidos em um lago com alta concentração salina | 130 em meio mínimo com altas concentrações de sal | Alva & Peyton, 2003 |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> | China, de um lodo ativado | 1600 em meio mínimo | Jiang et al., 2007 |
| <i>Ewingella americana</i> | Estados Unidos em uma planta de tratamento de efluentes, no tanque de cloração | 1000 em meio mínimo | Khleifat, 2006 |
| <i>Acinetobacter</i> sp. | China de um lodo ativado | 1100 em meio mínimo | Wang et al., 2007. |
| <i>Serratia plymuthica</i> | Índia, do lodo ativado de uma indústria química | 1050 em meio mínimo | Pradhan & Ingle, 2007 |
| <i>Bacillus thermoglucosidasius</i> | Alemanha | 98 em meio mínimo | Duffner et al., 2000 |

As bactérias se destacam por apresentar alta tolerância ao fenol e rapidez na remoção deste composto como as do gênero *Pseudomonas* (Hamed et al., 2004), entre outras já bem relatadas na literatura, como *Ralstonia*, *Halomonas*, *Alcaligenes*, *Ewingella*, *Acinetobacter*, *Serratia* e alguns tipos de *Bacillus* (TABELA 1).

É possível observar nesta tabela, que há uma grande variedade de espécies sendo estudadas, com capacidades distintas de remoção de fenol, isoladas em diversos lugares do mundo a partir de diferentes amostras. No entanto, a velocidade da biodegradação depende de fatores biológicos e físico-químicos, como o número de micro-organismos, conteúdo de oxigênio ou disponibilidade de nutrientes, bem como da temperatura e da disponibilidade de água. A velocidade de degradação também depende de diversos fatores relacionados com a biodisponibilidade, estrutura, toxicidade e propriedades do contaminante, e também do potencial genético dos micro-organismos degradadores (Antizar-Ladislao & Galil, 2004).

Fungos do gênero *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Phanerochaete*, entre outros, utilizam uma larga faixa de compostos aromáticos simples e apresentam alta atividade de enzimas catabólicas, sendo considerados hábeis para degradar fenóis (García et al., 1999). Desde 1980, já é conhecido que o *Aspergillus* degrada uma ampla faixa de compostos aromáticos, sendo o *A. japonicus* o mais eficiente

para degradar fenol em relação a outras espécies como *A. terreus*, *A. niger* ou *A. flavus* (Ziino et al., 1999).

Diversos autores têm estudado a degradação de fenóis utilizando fungos filamentosos e leveduras (TABELA 2). Não há muitos estudos da biodegradação de fenol utilizando fungos filamentosos, embora já houveram avanços nesta área, onde foi possível constatar que a utilização de consórcios microbianos utilizando bactérias e fungos apresentaram ótimos resultados, principalmente em meios complexos (Costa et al., 2000).

TABELA 2: Procedência de alguns isolados fúngicos com capacidade de degradação de fenol, e concentração máxima tolerada, já estudados.

| Fungo | Local do isolamento | Concentração de fenol tolerada (mg L ⁻¹) | Referência |
|---|--|---|-----------------------------|
| <i>Aspergillus</i> sp. | Brasil, em uma lagoa fenólica de uma refinaria de petróleo | 1000, em meio mínimo suplementado com glicose | Passos et al., 2009 |
| <i>Trametes versicolor</i> | África do Sul | 125 em meio rico | Ryan et al., 2007 |
| <i>Candida tropicalis</i> | República Checa, em solo contaminado com HC aromáticos | 350 em meio mínimo | Pacá et al., 2007 |
| | México | 1500 em meio mínimo mais extrato de levedura | Galíndez-Mayer et al., 2008 |
| <i>Fusarium</i> sp . | China, de bentonita | 420 em meio mínimo | Cai et al., 2007 |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | Reino Unido | 205,8 em meio mínimo | Jones et al., 1995 |
| <i>Sacharomyces</i> sp., <i>Candida boidinii</i> e <i>Geotrichum candidum</i> | Grécia, em sistemas de decantação de óleo de oliva | 27, em resíduo de óleo de oliva | Giannoutsou et al., 2004 |
| <i>Trichosporon cutaneum</i> | Bélgica | 1000 em meio rico com células imobilizadas em membranas | Godjevargova et al., 2006 |
| <i>Neurospora crassa</i> | África do Sul | 23 em reator de membrana | Luke & Burton, 2001 |
| <i>Coriolus versicolor</i> | Reino Unido | 50 em substratos sólidos | Ullah et al., 2000 |
| <i>Aerobasidium pullulans</i> | Brasil em efluentes de indústria de aço | 1568 em meio mínimo mais extrato de levedura | Santos et al., 2009 |
| <i>Candida tropicalis</i> , <i>C. rugosa</i> e <i>Pichia membranaefaciens</i> | Brasil, Refinaria de óleo | 7, 500 e 1000, respectivamente usando meio mínimo | Rocha et al., 2007 |
| <i>Candida tropicalis</i> e <i>Aspergillus faecalis</i> | Brasil, de solo natural da floresta Amazônica | 735 em meio mínimo com lactato | Bastos et al., 2000 |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | Portugal, mina de sal com 10 mg L ⁻¹ de fenol | 300 em meio mínimo | Leitão et al., 2007 |

2.5 Técnicas de remoção de compostos fenólicos

Tradicionalmente, o fenol tem sido removido de efluentes industriais por métodos físico-químicos. Os métodos físicos e químicos são processos caros e nem sempre resolvem o problema, pois muitas vezes transformam o contaminante em outro composto com menor massa molecular ou impedem a total mineralização do contaminante, podendo gerar subprodutos indesejáveis (Assalin et al., 2006). Dentre estes métodos pode-se citar a degradação de resíduos fenólicos por oxidação, onde o uso da luz UV e a reação de Fenton não removeriam totalmente o contaminante. A técnica que utiliza luz UV associada à H_2O_2 ou somente H_2O_2 , removeria totalmente o fenol do meio (Pereira et al., 2006). O tratamento eletroquímico ou fotoeletroquímico podem ser utilizados quando os métodos biológicos não forem eficientes ou quando se requer um tratamento mais rápido, que promete completa oxidação do fenol (Andrade et al., 2006).

Técnicas recentemente desenvolvidas de biodegradação têm potencial de mineralizar estes compostos tóxicos, a pequenos custos. A degradação microbiana de contaminantes orgânicos pode ocorrer naturalmente pela disponibilidade de aceptores e doadores de elétrons, nutrientes e também pela intervenção humana, usando tecnologias de biorremediação (Scow & Hicks, 2005).

A biorremediação é um conceito geral que inclui todos aqueles processos e ações que levam à biotransformação de um ambiente contaminado,

para diminuir a concentração de um contaminante (Thassitou & Arvanitoyannis, 2001). Segundo Caprez et al. (2002), os processos de biorremediação utilizam organismos (plantas ou micro-organismo), ou suas enzimas. Especificamente, os micro-organismos selecionados pela sua capacidade de degradação de substâncias tóxicas presentes no solo e água, transformam o poluente em biomassa, água, dióxido de carbono e outros componentes toxicologicamente inertes. A bioestimulação (adição de fertilizantes) e a bioaugmentação (inoculação de micro-organismos degradadores), podem ser consideradas abordagens gerais nessa tecnologia.

As técnicas de biorremediação podem ser usadas *in situ* e *ex situ* para descontaminação de solo e da água. A técnica *in situ* é feita sem a extração do meio contaminado, com a estimulação da atividade degradativa de populações microbianas endógenas pela suplementação de nutrientes e aceptores de elétrons, ou adição de micro-organismos exógenos, com capacidade de degradação para o fenol, com ou sem provimento de nutrientes (Seabra et al., 2001).

A biorremediação *ex situ* requer a remoção física do material contaminado (usualmente solo ou sedimentos), seguido de tratamento em biorreatores, *landfarming*, compostagem ou lagoas. As técnicas de biorremediação, comparadas a outros procedimentos de recuperação ambiental,

apresentam como vantagens a completa destruição do contaminante, menor custo, maior segurança e menor interferência no ambiente (Ghazali, 2001).

A atenuação natural monitorada (bioatenuação) é uma estratégia de limpeza cuidadosamente controlada em um local contaminado, reduzindo as concentrações do contaminante a níveis que não ofereçam riscos à saúde humana e ao meio ambiente e tudo isso num prazo de tempo razoável. Embora possua uma baixa taxa de degradação, pois o processo pode durar meses até anos, é um processo *in situ* que utiliza as condições naturais encontradas na superfície do solo, sendo um método bastante aceito e a um custo inexpressivo (Seabra et al., 2001).

A técnica que utiliza biorreatores pode ser utilizada para tratamento de água e solo contaminados com compostos recalcitrantes, principalmente se o composto tóxico está adsorvido na matriz do solo, podendo ser utilizado tanto em condições aeróbias como anaeróbias. É um processo mais caro, quando comparado a bioatenuação e possui limitações de tamanho, mas promove um bom controle do processo, e com isso uma rápida taxa de degradação, onde a mineralização pode ocorrer em dias ou semanas (Thassitou & Arvanitoyannis, 2001).

Enzimas podem ser uma boa alternativa para recuperação de ambientes contaminados com xenobióticos, pois podem ser utilizadas para tratar poluentes com muita especificidade. Possuem muitas vantagens quando

comparado a tratamentos convencionais, incluindo aplicação em materiais recalcitrantes, com concentrações variáveis do contaminante (Duran & Esposito, 2000).

Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas para avaliar a possibilidade biotecnológica e ambiental da utilização das enzimas. Entre as vantagens da sua utilização está o alto nível de eficiência catalítica freqüentemente superior a catálises químicas e um alto grau de especificidade onde não são produzidos subprodutos indesejáveis. Estas características promovem maior rendimento das reações reduzindo o custo do processo (Whiteley & Lee, 2006).

Embora a utilização das enzimas seja promissora existem vários problemas práticos na utilização das enzimas de forma livre, entre eles a instabilidade da sua estrutura uma vez retirada de seu ambiente natural e sua sensibilidade para processar em condições diferentes da ótima. Seu uso efetivo pode ser amparado por suas propriedades particulares como sendo um material protéico ou peptídico, portanto, biodegradável, mas elas apresentam instabilidade para serem utilizadas sob condições ambientais (Degaldilo & Rodriguez-Nogales, 2005).

Devido a isso, as enzimas podem ser imobilizadas de várias formas e métodos, os quais podem ser classificados como físicos tendo uma interação entre o suporte e a enzima, e químicos onde ligações covalentes são formadas com as enzimas. Sistemas de biotransformações utilizando enzimas em

biorreatores são bem aceitos e podem ser usados para biorremediação de poluentes (Fernandez-Lafuente et al., 2000; Burton, 2001; Molesmy et al., 2002; Ko & Chen, 2008).

2.6 Mecanismo de degradação de fenol

Em geral, as vias metabólicas bacterianas de degradação do fenol podem ocorrer em condições aeróbias e anaeróbias. Na biodegradação aeróbia do fenol, o oxigênio molecular é usado pela enzima fenol hidroxilase para adicionar uma segunda hidroxila ao grupamento na posição orto. A reação requer uma redução do NADH_2 . O resultado é catecol (1,2-dihidroxibenzeno), molécula que pode ser degradada por dois caminhos alternativos, dependendo do organismo. Na rota orto- β -cetoatipato, o anel aromático é clivado entre as hidroxilas do catecol por uma catecol 1,2-dioxigenase. O resultado é cis, cis-muconato, que posteriormente é metabolizado no ciclo de Krebs. Na rota meta, a fissão do anel ocorre na parte adjacente para os dois grupos hidroxila do catecol. A enzima catecol 2,3-dioxigenase transforma catecol para 2-hidroxiacético semialdeído que também é metabolizado posteriormente no ciclo de krebs (Sala-Trepat & Evans, 1971; Schie & Young, 2000; Alemzadeh et al., 2002).

As enzimas catecol dioxigenases são a via metabólica comum da degradação de diversos compostos aromáticos como o fenantreno, naftaleno, tolueno, triptofano, benzoato, silicicato, antranilato, anilina, antraceno, benzeno e

fenol, sendo a etapa que antecede a metabolização do composto no ciclo de Krebs, já que os substratos aromáticos são transformados em um metabólito di-hidroxiaromático (catecol) (Santos & Linardi, 2003).

CAPÍTULO III

BIODEGRADAÇÃO DE FENOL POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE SERRAGEM DE COURO E EVIDÊNCIA DA ROTA DE DEGRADAÇÃO PELA VIA ORTO- β -CETOATIPATO

Resumo

O fenol é um resíduo produzido por diversas atividades industriais incluindo a cura do couro, o qual o utiliza para sua estabilização, que pode ser perigoso para todas as formas de vida. A biorremediação pode ser uma alternativa viável para a degradação de fenol com micro-organismos aclimatados. Este estudo foi conduzido para isolar bactérias com potencial para degradação de fenol, a partir de serragem de couro com 11 mg K⁻¹ de fenol e elucidar a rota de degradação dessas bactérias. Seis bactérias com capacidade para degradação de fenol foram isoladas pela técnica de enriquecimento, identificadas como *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* e *Microbacterium*. Os isolados mais eficientes foram *Microbacterium oxydans* BLB-2 o qual degradou até 750 mg L⁻¹ de fenol em 6 dias e *Microbacterium oxydans* BLB-4 o qual consumiu até 1000 mg L⁻¹ de fenol em 11 dias. Ambas as bactérias expressaram as enzimas fenol hidroxilase e catecol 1,2-dioxigenase, indicando que as duas cepas de *M. oxydans* utilizavam a via orto- β -cetoatipato para a degradação de fenol. Devido a alta capacidade de degradação de fenol apresentada pelas duas cepas bacterianas, acredita-se que ambas são promissoras para serem utilizadas na biorremediação de fenol em sistemas aquáticos.

Palavras-chave: serragem de couro, biorremediação, *Microbacterium oxydans*, tolerância ao fenol e degradação, fenol hidroxilase e catecol 1,2-dioxigenase.

Abstract

Phenol is a hazardous waste produced in several industrial activities including tannery, which uses it for leather stabilization. Phenol-rich tannery waste can be dangerous to the health of living systems in the environment. Bioremediation can be a viable alternative for phenol degradation with efficient microorganisms. This study was conducted to isolate potent phenol-degrading bacteria from leather shaving waste contaminated with phenol and elucidate the biochemical pathway

for monoculture isolates. Through enrichment of phenol-resistant microbial consortium, phenol-degrading monocultures of *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* and *Microbacterium* were isolated. The most efficient isolates were *Microbacterium oxydans* BLB-2 which degraded up to 750 mg phenol L⁻¹ in 6 days and *Microbacterium oxydans* BLB-4 which consumed as much as 1000 mg phenol L⁻¹ in 11 days. Both bacteria expressed phenol hydroxylase and catechol 1,2 dioxygenase activities indicating that the two strains of *Microbacterium oxydans* employ the ortho- β -ketoadipate cleavage pathway for phenol degradation. Results suggest that the two strains of *Microbacterium oxydans* are candidate organisms for bioremediation of phenol in aquatic systems.

Key-words: Tannery waste, bioremediation, *Microbacterium oxydans*, phenol tolerance and degradation, phenol hydroxylase and catechol 1,2 dioxygenase.

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos estão presentes em diversos resíduos produzidos pela atividade industrial moderna incluindo as indústrias de alimentos, petroquímica, farmacêutica, de aço, produção de papel como também da agricultura. O fenol é um composto perigoso que é tóxico em baixas concentrações pelo contato, ingestão ou inalação (Wei et al., 2008; Yang & Lee, 2007). Na manufatura do couro, os processos da cura geram uma grande quantidade de resíduos os quais são ricos em muitos compostos químicos usados em diferentes estágios do processo, incluindo fungicidas, sais, corantes, solventes, metais pesados e compostos fenólicos. O Brasil é o quinto maior produtor de couro do mundo e a maioria dos processos de curtimento do couro são operadas por pequenas companhias sem uma planta de tratamento adequada, resultando em poluição significativa do meio ambiente.

Apesar de técnicas físico-químicas poderem ser usadas para remoção de contaminantes tóxicos em locais poluídos, a biorremediação é um método biológico que é considerado o mais eficiente e de baixo custo, não sendo agressivo ao meio ambiente (Okeke et al., 1993, 1994; Wei et al., 2008; Yang & Lee, 2007). Os micro-organismos transformam e degradam fenol através da ação de várias enzimas incluindo oxigenases, hidrolases, peroxidases, tirosinases e oxidases (Nair et al., 2008; Okeke et al., 1994).

A degradação aeróbia do fenol por bactérias ocorre pela conversão inicial a um catecol correspondente através da ação de uma fenol hidroxilase. Subseqüentemente, o catecol é degradado pela fissão orto ou meta do anel aromático para intermediários, os quais podem ser metabolizados posteriormente através do ciclo de Krebs (Cai et al., 2007; Room-Trepat & Evans, 1971; Schie & Young, 2000). A fissão inicial do anel é catalizado pela catecol 1,2-dioxigenase (uma enzima de orto clivagem) ou catecol 2,3-dioxigenase (pela meta clivagem) formando ácido cis,cis-muconato e 2-hidroximucônico semialdeído, respectivamente (Gurujeyalakshmi & Oriel, 1988).

Os micro-organismos têm potencial para sintetizar compostos aromáticos a partir de aminoácidos (Pradahn & Ingle, 2007), envolvendo, mecanismos e rotas para a degradação de compostos aromáticos. A biorremediação é uma opção atrativa para remoção de fenol e destoxificação em ambientes aquáticos e terrestres (Okeke et al., 1993, 1994). Este estudo teve por

objetivo a caracterização de bactérias degradadoras de fenol, isoladas de serragem de couro contaminado com fenol e a elucidação da rota metabólica de degradação pelas monoculturas mais promissoras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento de bactérias resistentes ao fenol

Todos os procedimentos experimentais foram realizados utilizando-se meio mineral (MM) (KH_2PO_4 , 400 mg L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 mg L⁻¹; NaCl, 100 mg L⁻¹; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 mg L⁻¹; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3 mg L⁻¹; $\text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 500 mg L⁻¹). As bactérias foram obtidas a partir de uma amostra de serragem de couro tratada com fenol (11 mg Kg⁻¹) proveniente de um curtume do estado do Rio Grande do Sul – Brasil. Amostras de 1 g foram transferidas para frascos erlenmeyers de 125 mL com 50 mL de MM suplementado com 250 mg L⁻¹ de fenol e incubado em agitador orbital (190 rpm) no escuro, à 30 °C. Após 7 dias de incubação, amostras de 1 mL contendo as células crescidas neste meio foram transferidas para outro frasco erlenmeyer, contendo o mesmo meio e o procedimento repetido mais duas vezes. Após as 3 transferências consecutivas alíquotas de 0,1 mL do crescimento foram inoculadas em MM solidificado com ágar, com a concentração de 250 mg L⁻¹ de fenol e incubadas à 30 °C até o aparecimento das colônias bacterianas. Colônias com pequenas diferenças visuais, quanto a cor, forma e brilho, foram

transferidas para tubos de ensaio contendo meio nutriente com 250 mg L⁻¹ de fenol. As culturas foram incubadas à 30 °C por 48 h e estocadas a 4 °C.

Os isolados foram investigados quanto a habilidade de crescer em MM contendo 500 mg L⁻¹ de fenol, como única fonte de carbono e energia. O inóculo bacteriano foi preparado separadamente usando as culturas estoques e transferidas para frascos erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de MM contendo 250 mg L⁻¹ de fenol e incubado à 30 °C em agitador orbital (190 rpm) por 48h. Após, as células foram coletadas por centrifugação (10 000 rpm, à 20 °C por 20 min) e ressuspendidas em MM. Uma alíquota de 4 mL, da suspensão de células, foi misturada com 76 mL de MM, com fenol e incubados em agitador orbital (190 rpm) a 30 °C por uma semana. O aumento do crescimento celular foi monitorado pela medida da densidade óptica DO₅₄₀ nm.

2.2 Identificação das bactérias tolerantes ao fenol

O DNA foi purificado a partir do isolado bacteriano usando o Wizard® Genomic DNA *purification kit*, catálogo A1123 (Promega). Os primers bacterianos universais, correspondentes à *E. coli* nas posições 27F (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), foram usados para amplificação do PCR e do 16 S do RNA ribossomal (Lane, 1991). A mistura da reação do PCR consistiu de 12,5 µl de PCR *master mix* (Promega, Madison, WI), padrão genômico DNA

template (0,5 µL), primer 27F (2,5 µl=12,5 pM), primer 1492R (2,5 µl=12,5 pM) e eluido para 25 µL de volume final com água livre de nuclease. O gene 16S rRNA foi amplificado usando 35-ciclos do PCR (desnaturação inicial, 95 °C por 5 min; desnaturação subsequente, 95 °C for 0,5 min; temperatura de anelamento, 50 °C for 1 min; temperatura de extensão, 72 °C for 1 min e extensão final, 72 °C for 5 min).

Os produtos de amplificação do PCR foram analisados por eletroforese em gel agarose 1 %. Unidades de filtro *Millipore Montage* PCR (Millipore, Billerica, MA) foram usados para remover os sais dos primers e dNTPs incorporados, de acordo com as instruções do procedimento, exceto a adição de 400 µL de água estéril livre de nuclease que foi adicionada para lavar os resíduos do PCR. Em seguida, 5 pM da seqüência do primer 519r (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3') foi adicionado a cada padrão em reações independentes. O seqüenciamento do DNA cíclico foi feito usando *BigDye terminator kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA) em reações independentes (UCR Genomics Institute, Riverside, CA).

A relação entre os isolados foi verificada usando-se o método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) e uma árvore filogenética foi construída, associando-se os grupos existentes por características de similaridade (Felsenstein, 1985). As distâncias foram computadas usando o método *Maximum Composite Likelihood* (Tamura et al., 2004). Todas as posições contendo lacunas e perdas foram

eliminadas e o *software* MEGA4 foi empregado para as análises filogenéticas (Tamura et al., 2007).

2.3 Remoção de fenol usando monoculturas

A remoção e tolerância ao fenol foram avaliadas usando-se os isolados bacterianos que produziram uma grande quantidade de biomassa nas primeiras horas de crescimento em diferentes concentrações de fenol (250, 500, 750, 1000 e 1250 mg L⁻¹) usando as mesmas condições do meio, descritas anteriormente. As culturas foram incubadas até ser observado o desaparecimento total do fenol no meio ou a estabilização das concentrações. Foi utilizado um controle sem inóculo para eliminar o efeito de fatores abióticos. O fenol foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (Hoyos et al., 2002). Os resultados foram avaliados estatisticamente utilizando o *software* STATISTICA 7.0.

2.4 Determinação do mecanismo metabólico de degradação de fenol

As células foram coletadas a partir do meio por centrifugação, lavadas três vezes com tampão fosfato pH 7,0 (10 mM para a enzima fenol hidroxilase e 50 mM para as enzimas catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase), e após sendo ressuspensas no mesmo tampão. As células foram rompidas em banho de gelo utilizando um sonicador (550 Sonic Dismembrator, Fischer

Scientific, Pittsburgh, PA.), sendo aplicado seis vezes, em tempos de 30 s, com pulsos de 70 W cada. O sonicado foi centrifugado a 10000 rpm, 4 °C por 15 min, segundo o método proposto por Alexievaa et al. (2004). O extrato celular foi centrifugado (5000 rpm, 5°C, por 15 min) e ressuspendido no tampão correspondente. A atividade da fenol hidroxilase foi determinada espectrofotometricamente (Bioespectro SP-220) pela diminuição da absorbância a 340 nm e formação de catecol correspondente (Jones et al., 1995). Os ensaios enzimáticos das enzimas catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase foram conduzidas pelo monitoramento do aumento da absorbância pela formação do ácido cis,cis-muconato a 260 nm (Varga & Neujahar, 1970) e 2-hidroximucônico semialdeído a 375 nm (Room-Trepat & Evans, 1971), respectivamente. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para catalisar a formação de 1 nM s⁻¹ de catecol ou cis,cis-muconato.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento das bactérias degradadoras de fenol

Seis bactérias degradadoras de fenol (BLB-1, BLB-2, BLB-3, BLB-4, BLB-5 e BLB-6) foram isoladas a partir da cultura contendo fenol como única fonte de carbono e energia (TABELA 3). Todos os isolados cresceram em alta concentração de fenol (500 mg L⁻¹) e a análise do crescimento celular revelou que

os isolados BLB-2 e BLB-4 tiveram a DO_{540} mais abundante, apresentando valores de 0,601 e 0,306, depois de 48 h, respectivamente (FIGURA 1). Estes dois isolados apresentaram valores de DO superiores à *Serratia* GC (Ingle & Pradahn, 2007), a qual cresceu a uma DO_{600} de 0,12 em MM contendo 100 mg L^{-1} de fenol. Kobayashi et al., 2007 relatou que uma bactéria entérica cresceu a uma baixa concentração celular (DO_{610} de 0,095). *Pseudomonas resinovarans* e *Brevibacillus* sp. P-6 apresentaram DO_{600} de cerca de 0,47 em um meio contendo 400 mg L^{-1} de fenol (Yang & Lee, 2007).

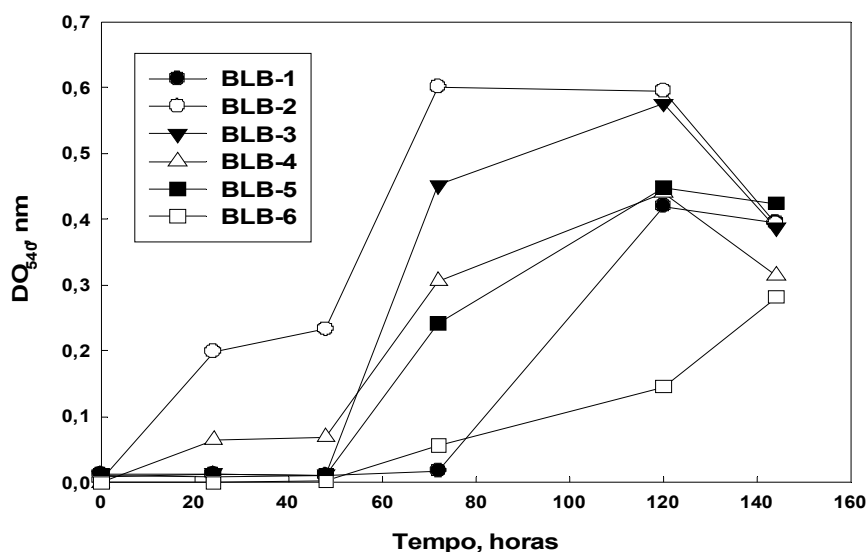


FIGURA 1: Medida da DO_{540} das bactérias isoladas de serragem de couro, pela técnica de enriquecimento, utilizando fenol como única fonte de carbono, crescendo em MM com a concentração de 500 mg L^{-1} de fenol, incubado à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 190 rpm.

TABELA 3: Identificação dos isolados bacterianos provenientes de serragem de couro que apresentaram tolerância à 500 mg L⁻¹ de fenol em MM como única fonte de carbono, pela seqüência do gene rRNA 16S.

| Isolado | Proximidade relativa (número associado) | Identidade (%) | Valor E |
|---------|--|----------------|---------|
| BLB-1 | <i>Pseudomonas putida</i> (EU275363.1) | 99 | 0.0 |
| BLB-2 | <i>Microbacterium oxydans</i> (EU373400.1) | 98 | 0.0 |
| BLB-3 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (AJ409153.1) | 99 | 0.0 |
| BLB-4 | <i>Microbacterium oxydans</i> (AJ717356.1) | 99 | 0.0 |
| BLB-5 | <i>Microbacterium oxydans</i> (AB365061.1) | 99 | 0.0 |
| BLB-6 | <i>Staphylococcus cohnii</i> (AJ717378.1) | 99 | 0.0 |

Os isolados bacterianos foram identificados pela análise da seqüência do gene 16 S (TABELA 3). O isolado BLB-1 era uma bactéria Gram negativa que pertencia ao filo *Proteobacteria*, da ordem *Pseudomonadales*, família *Pseudomonodaceae*, gênero *Pseudomonas* identificada como *P. putida*, do grupo *P. putida*. Apesar de algumas espécies de *Pseudomonas* terem sido relatadas como degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos, incluindo fenol (Afzal et al., 2007; Lee & Yang, 2007; Niu et al., 2009; Obuekwe et al., 2008) e antraceno (Santos et al., 2008), *Pseudomonas* sp. BLB -1 é um isolado superior, pois pode crescer e degradar uma alta concentração de fenol (500 mg L⁻¹), já que não havia outra fonte de carbono no meio. *P. putida* imobilizada em polivinil álcool gel (PVA) degradou somente até 75 mg L⁻¹ de fenol (El-Naas et al., 2008) e em cápsulas de quitosana com tripolifosfato degradou acima de 100 mg L⁻¹ de fenol (Hsieh et al., 2008). Ambos os isolados foram menos eficientes do que o isolado BLB-1.

A análise da seqüência do gene RNA ribossomal revelou que os isolados BLB-2, BLB-4 e BLB-5 eram do filo *Actinobacteria*, da ordem dos

Actinomycetales, subordem *Xanthomonadaceae*, família *Microbacteriaceae*, gênero *Microbacterium*, identificada como *Microbacterium oxydans* (99 % de similaridade para BLB-4 e BLB-5 e 98 % de similaridade para BLB-2). Pelo que se tem conhecimento, não há relatos sobre a degradação de compostos fenólicos por *Microbacterium oxydans*. Entretanto, *Microbacterium esteramicum* resistiu a fenóis formados a partir da hidrólise de fenamifos (Cáceres et al., 2009).

O isolado BLB-3 foi identificado como uma bactéria GRAM negativa, pertencente ao filo *Proteobacteria*, da ordem *Xanthomonadales*, gênero *Stenotrophomonas* identificado como *S. maltophilia* (99% de similaridade), sendo algumas consideradas patógenos de seres humanos. Este gênero foi relatado anteriormente por degradar co-metabolicamente 2,4,6-triclorofenol na presença de fenol, como fonte de carbono (Gómez-de-Jesús et al., 2009). *Stenotrophomonas* isolada de lodo ativado de uma indústria de óleo de oliva cresceu em altas concentrações de compostos fenólicos (Vivas et al., 2009).

O isolado bacteriano BLB-6 foi identificado como sendo Gram positiva, pertencente ao filo *Firmicutes*, da ordem *Bacilales*, da família *Staphylococaceae*, gênero *Staphylococcus* identificado como *Staphylococcus cohnii* (99 % de similaridade). Cepas deste gênero degradaram hidrocarbonetos aromáticos como fenantreno (Mallick & Dutta, 2008) e 2,4-diclorofenol (Ziagova et al., 2009). Não foram encontrados, até o momento, relatos do envolvimento desta espécie na degradação de compostos aromáticos. A seqüência de nucleotídeos dos genes 16

S do rRNA foi usado para construir a árvore filogenética dos isolados degradadores de fenol (FIGURA 2).

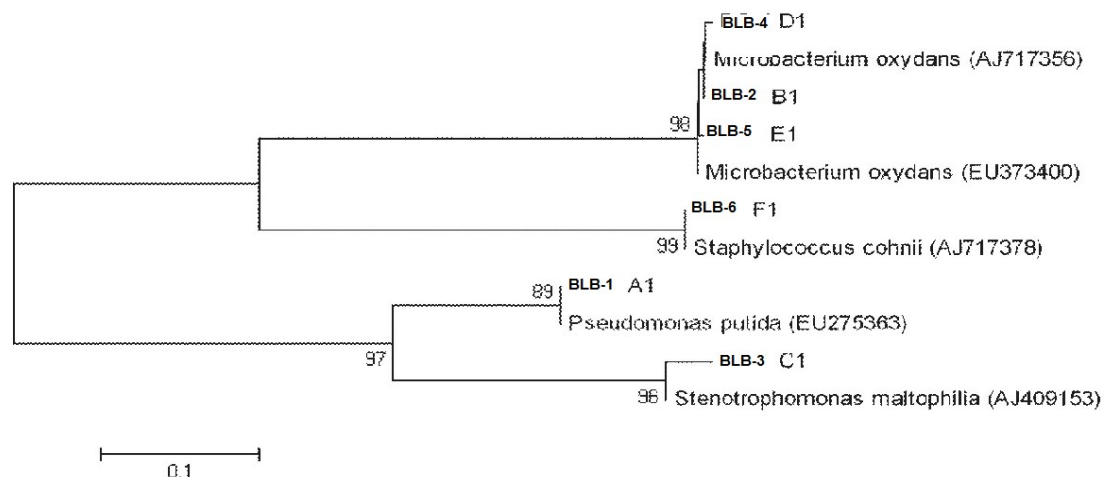


FIGURA 2: Relação filogenética entre isolados bacterianos degradadores de fenol e relação dos organismos baseado no gene rRNA 16 S. A escala representa o valor da distância evolucionária.

3.2 Remoção de fenol pelos isolados bacterianos

A degradação e o crescimento da bactéria BLB-2, em diferentes concentrações de fenol estão apresentados na FIGURA 3(a). Este isolado degradou 250 mg L⁻¹ de fenol em 48 h, degradando completamente 500 mg L⁻¹ de fenol após 72 h de incubação. Para a concentração inicial de 750 mg L⁻¹ de fenol, a fase de adaptação foi mais longa (72 h) e o isolado degradou completamente esta concentração após 144 h. Nenhum crescimento e diminuição da concentração de fenol foi observado após 11 dias de incubação a uma concentração extrema de fenol (1000 mg L⁻¹), como também não foi observado

crescimento ou degradação no frasco sem adição de inoculo, que foi utilizado como controle para verificar se haviam perdas abióticas.

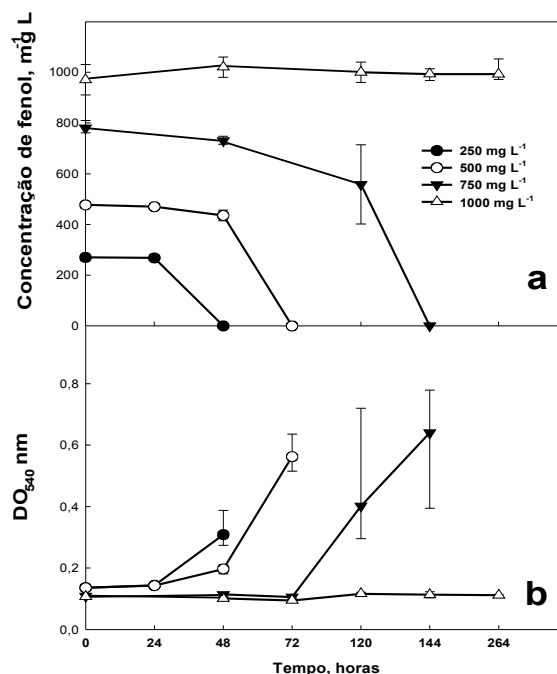


FIGURA 3: Efeito da concentração de fenol no processo de degradação (a) e DO₅₄₀ (b) na cultura de *Microbacterium oxydans* BLB-2, em MM utilizando diferentes concentrações de fenol como única fonte de carbono, incubada à 30 °C e 190 rpm.

A bactéria BLB-2 mostrou um aumento na taxa de degradação após 120 h de incubação, para a maior concentração testada, havendo total desaparecimento do composto tóxico após 144 h de incubação. Contrariamente, o aumento da taxa de degradação não foi sustentado a altas concentrações para *Alcaligenes faecalis* isolada de lodo ativado, que degradou alta concentração inicial de fenol (1.600 mg L⁻¹), em cultura em batelada (Hu et al., 2007).

O isolado bacteriano BLB-2 apresentou maior tolerância e degradação de fenol, em concentrações maiores do que as apresentadas em outros trabalhos como *Pseudomonas resinovans* e *Brevibacillus* sp. P-6, as quais foram isoladas de solos contaminados com pentaclorofenol e degradaram completamente a uma concentração máxima de 200 e 600 mg L⁻¹ de fenol em 68 e 110 h, respectivamente (Lee & Yang, 2007) e *Acinetobacter* sp., isolada de lodo ativado, que degradou 99,6 % de 500 mg L⁻¹ de fenol em MM (Cai et al., 2007).

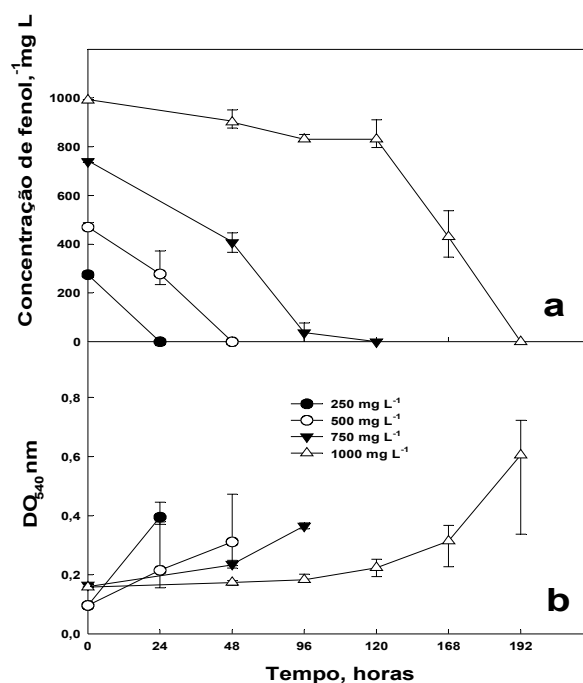


FIGURA 4: Efeito da concentração de fenol no processo de degradação (a) e DO₅₄₀ (b) na cultura de *Microbacterium oxydans* BLB-4, em MM utilizando diferentes concentrações de fenol como única fonte de carbono, incubada à 30 °C e 190 rpm.

O isolado BLB-4 degradou fenol mais rapidamente nas concentrações de 250, 500 e 750 mg L⁻¹ de fenol, do que o isolado BLB-2, degradando completamente estas concentrações após 24, 48 e 96 h de incubação, respectivamente, como mostrado na FIGURA 4(a). A maior concentração de fenol degradada por este isolado foi de 1000 mg L⁻¹ mas a taxa de degradação foi mais lenta para esta concentração, degradando totalmente após 192 h. Para 1250 mg L⁻¹, não foi observada degradação ou crescimento (dados não apresentados), sendo o mesmo observado para o frasco onde não foi realizada a adição de inóculo, logo toda a degradação de fenol foi devido a atividade catabólica da bactéria.

Baseado no perfil de degradação dos dois isolados bacterianos, pôde-se constatar que a bactéria BLB-4 se adaptou melhor à maiores concentrações de fenol do que a bactéria BLB-2, com maior taxa de remoção de fenol do meio. A taxa de degradação apresentada pelo isolado BLB-4 foi estatisticamente superior ao isolado BLB-2 (TABELA 4). O inóculo e as condições do meio podem definir a presença ou ausência de uma fase lag e sua duração (Hill & Robinson, 1975) e isso poderia explicar porque o isolado BLB-4 removeu mais rapidamente a concentração de fenol, já que exibiu maior turvação do meio, o que poderia ser relacionado com o aumento da concentração celular.

TABELA 4: Taxa de degradação de fenol em $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ dos isolados bacterianos BLB-2 e BLB-4, crescendo em MM em diferentes concentrações de fenol, como única fonte de carbono.

| Concentração de fenol (mg L^{-1}) | Velocidade de degradação de fenol ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$) | |
|--|--|----------------------------|
| | Isolado BLB-2 | Isolado BLB-4 |
| 250 | 5.625 ^{a,A} | 11.33±0.253 ^{b,A} |
| 500 | 6.630±0.09 ^{a,B} | 9.882±0.252 ^{b,B} |
| 750 | 5.086±0.095 ^{a,C} | 6.186±0.05 ^{b,C} |
| 1000 | ND* | 4.757±0.167 ^D |

*(ND) – não detectado

Média aritmética na mesma linha com a mesma letra minúscula não são significativamente diferentes entre si ao nível de confiança de 95 % ($p < 0.05$). Além disso, a média aritmética na mesma coluna com a mesma letra maiúscula não são significativamente diferentes entre si, ao nível de confiança de 95 % ($p < 0.05$).

Os valores da DO foram diretamente relacionados com a concentração de fenol acima de 750 mg L^{-1} para os isolados BLB-2 e 1000 mg L^{-1} para BLB-4, bem como a taxa de remoção de fenol do MM, como mostrado nas FIGURAS 3(b) e 4(b). Com o aumento da concentração de fenol, houve aumento da turvação do meio que poderia ser devido ao aumento da concentração celular no meio, o qual poderia ter suportado a remoção de fenol. Diminuindo a concentração de fenol, diminuiu a DO, assim como também foi observado em trabalhos anteriores, com *Nocardia hydrocarbonoxydans* (Shetty et al., 2007) e *Serratia* sp. (Kobayashi et al., 2007).

3.3 Mecanismo da biodegradação de fenol

A atividade de fenol hidroxilase foi observada nas culturas dos dois isolados degradadores de fenol testados, indicando que houve a transformação do fenol para catecol, como mostrado na TABELA 5. A atividade da fenol hidroxilase nas culturas foi de 5,0 nkat para o isolado BLB-2 e 3,3 nkat para o isolado BLB-4.

A degradação do catecol formado foi confirmada pela atividade da catecol 1,2-dioxigenase. O isolado BLB-2 apresentou atividade de 9.0 nkat para catecol 1,2-dioxigenase e atividade de 21.3 nkat foi observada para o isolado BLB-4. Não foi observada atividade para catecol 2,3-dioxigenase em ambos isolados.

TABELA 5: Atividades das enzimas fenol hidroxilase, catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase nas culturas dos dois isolados bacterianos, em MM contendo 250 mg L⁻¹ de fenol.

| Enzimas | BLB -2 (nkat) | BLB -4 (nkat) |
|-------------------------|---------------|---------------|
| Fenol hidroxilase | 5.0 | 3.3 |
| Catecol 1,2-dioxigenase | 9.0 | 21.3 |
| Catecol 2,3-dioxigenase | ND* | ND* |

* (ND) – não detectado

Devido à presença da enzima catecol 1,2-dioxigenase nas culturas, foi definido que a rota de degradação de fenol foi pela via orto- β -cetoatipato, para ambos isolados, com a clivagem do anel aromático entre os dois grupos hidroxila formando ácido cis,cis-muconato, o qual pode ser metabolizado posteriormente no ciclo de Krebs (FIGURA 5) (Schie & Yong, 2000; Nair et al., 2008). Estas observações indicaram que os isolados estudados neste trabalho, teriam a possibilidade de mineralizar fenol a produtos inócuos.

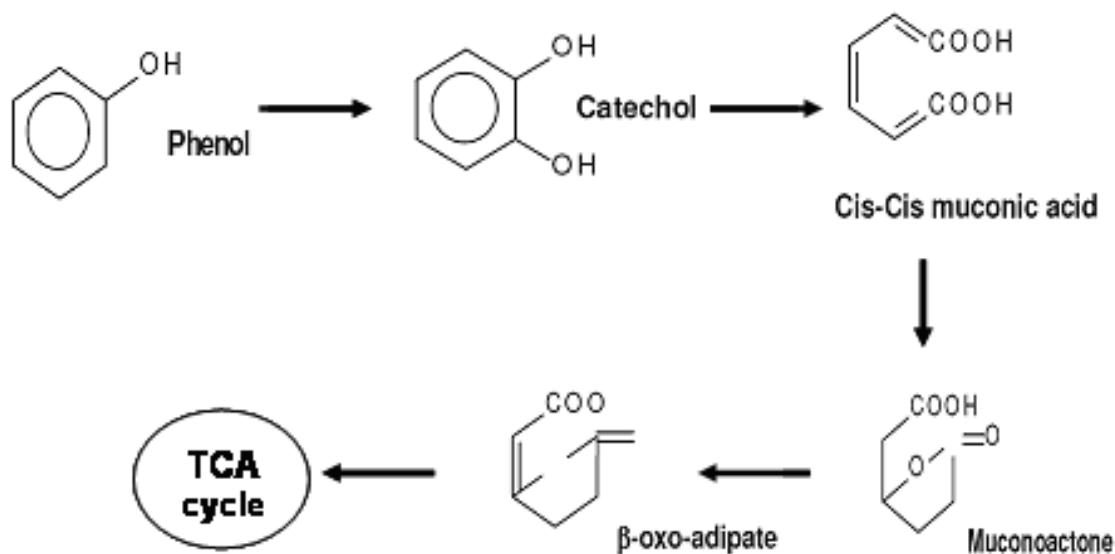


FIGURA 5: Rota metabólica de degradação aeróbia de fenol, pelas bactérias, pela via orto- β -cetoatipato e mineralização através do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA). Adaptado de Nair et al., 2008.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram isoladas 6 bactérias com tolerância ao fenol identificadas como dos gêneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Staphylococcus* e *Microbacterium oxydans*, sendo que duas *Microbacterium oxydans* (BLB-2 e BLB-4), tiveram a capacidade de degradação em concentrações muito altas de fenol, 750 e 1000 mg L⁻¹ respectivamente, utilizando a via orto- β -cetoatipato, por apresentar atividade para as enzimas fenol hidroxilase e catecol 1,2-dioxigenase. Logo, estas bactérias podem ser promissoras para serem utilizadas em processos de biorremediação.

REFERÊNCIAS

- AFZAL, M., KHALID, Z.M., SAMINA, I., SAKANDAR, R. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*. **J. Hazard Mater.**, v. 149, p. 60-66, 2007.
- ALEXIEVAA, Z., GERGINOVA, M., ZLATEVA, P., PENEVA, N. Comparison of growth kinetics and phenol metabolizing enzymes of *Trichosporon cutaneum* R57 and mutants with modified degradation abilities. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 34, p. 242-247, 2004.
- CÁCERES, T.P., MEGHARAJ, M., MALIK, S., BEER, M., NAIDU, R. Hydrolysis of fenamiphos and its toxic oxidation products by *Microbacterium* sp. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 10, 2732-2736, 2009.
- CAI, B-L., WANG, Y., TIAN, Y., HAN, B., ZHAO, H-B., BI, J-N. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. Strain PD12. **J. Environ.** 19, 222-225, 2007.
- CHEN, W.M., CHANG, C.H., CHANG, S.C. Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the *rhizobium taiwanensis*. **Res. Microbiol.**, v. 155, p. 672-680, 2004.
- EL-NAAS, M.H., AL-MUHTASEB, S.A., MAKHLOUF, S., 2008. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. **J. Hazard Mater.**, v. 164, n. 2-3, p. 720-725.
- FELSENSTEIN, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution.**, v. 39, p. 783-791.
- FIALOVÁ, A., BOSHKE, E., BLEY, T. Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements. **Int. Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p. 69-74, 2004.
- GARCÍA, I.G., PEÑA, P.R.J., VENCESLADA, J.L.B., MARTÍN, A.M., SANTOS, M.A.M., GÓMEZ, E.R. Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. **Process Biochem.**, v. 35, p. 751-758, 2000.

GÓMEZ-DE-JESÚS, A., ROMANO-BAEZ, F.J., LEYVA-AMEZCUA, L., JUÁREZ-RAMÍREZ, C., RUIZ-ORDAZ, N., GALÍNDEZ-MAYER, J. Biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol in a packed-bed biofilm reactor. **J. Hazard Mater.**, v. 161, p. 1140-1149, 2009.

GURUJEYALEKSHMI, G., OREIL, P. Isolation of phenol degrading *Bacillus stearotherophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, n. 2, p. 500-502, 1998.

HAO, O.J., KIM, M.H., SEAGREN, E.A., KIM H. Kinetics of phenol and chlorophenol utilization by *Acinetobacter* species. **Chemosphere**, v. 46, p. 797-807, 2002.

HILL, G.A., ROBINSON, C.W. Substrate inhibition kinetics phenol degradation by *Pseudomonas putida*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 17, p. 1599-1612, 1975.

HOYOS, S.E.G., MARTINEZ, N.L., RUBIO, F.C., CORMENZANA, A.R. Kinetics of aerobic treatment of olive-mill wastewater (OMW) with *Aspergillus terreus*. **Process Biochem.**, v. 37, p. 1169-1176, 2002.

HSIEH, F-M., HUANG, C., LIN, T-F., CHEN, Y-M., LIN, J-C. Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. **Process Biochem.** v. 43, p. 83-92, 2008.

HU, Z., JIANG, Y., WEN, J., BAI, J., JIA, X., HU, Z. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. **J. Hazard Mater.**, v. 147, p. 672-676, 2007.

JONES, K.H., TRUDGILL, P.W., HOPPER, D.J. Evidence of two pathways for the metabolism of phenol by *Aspergillus fumigatus*. **Arch. Microbiol.** V. 163, p. 176-181, 1995.

KACHOURI, F., HAMDY, M. Enhancement of polyphenols in olive oil by contact with fermented olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. **Process Biochem.**, v. 39, p. 841-845, 2003.

KOBAYASHI, F., DAIDAI, M., SUZUKI, N., NAKAMURA, Y. Degradation of phenol in seawater using a novel microorganism isolated from the intestine of *Aplysia kurodai*. **Int. Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 252-254, 2007.

LANE, D., 1991. 16S/23S sequencing. In: STACKEBRANDT, E., GOODFELLOW M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. John Wiley and Sons, New York, N.Y, 1991.

LEE, C-M., YANG, C-F. Enrichment, isolation, and characterization of phenol-degrading *Pseudomonas resinovarans* strain P-1 and *Brevibacillus* sp. Strain P-6. **Int. Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 206-210, 2007.

MALLICK, S., DUTTA, T.K., 2008. Kinetics of phenanthrene degradation by *Staphylococcus* sp. Strain PN/Y involving 2-hydroxy-1-naphthoic acid a novel metabolic pathway. **Process Biochem.** v. 43, p. 1004-1008, 2008.

MORRIS, J.M., JIN, S., CRIMI, B., PRUDEN, A. Microbial fuel cell in enhancing anaerobic biodegradation of diesel. **Chem. Eng. J.**, v. 146, p. 161-167, 2009.

NAIR, C.I., JAYACHANDRAN, K., SHANKAR, S. Biodegradation of phenol. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 4951-4958, 2008.

NIU, G-L., ZHANG, J-J., ZHAO, S., LIU H., BOON, N., ZHOU, N-Y. Bioaugmentation of a 4-chloronitrobenzene contaminated soil with *Pseudomonas putida* ZWL 73. **Environ. Pollut.**, v. 157, p. 763-771, 2009.

OBUEKWE, C.O., AL-JADI, Z.K., AL-SALEH, E.S. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. **Int. Biodeterioration & Biodegradation.**, p. 1-7, 2008.

OBUEKWE, C.O., AL-JADI, Z.K., AL-SALEH, E.S. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. **Int. Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 273-279, 2008.

OKEKE, B.C., PATERSON, A., SMITH, J.E., WATSON-CRAIK, I.A. Aerobic metabolism of pentachlorophenol by spent sawdust culture of 'shiitake' mushroom (*Lentinus edodes*) in soil. **Biotechnol. Lett.**, v. 15, p. 1077-1080, 1993.

OKEKE, B.C., PATERSON, A., SMITH, J.E., WATSON-CRAIK, I.A. Relationships between ligninolytic activities of *Lentinula* species and biotransformation of PCP in sterile soil. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 19, p. 284-287, 1994.

PRADAH, N., INGLE, A.O. Mineralization of phenol by a *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample. **Int. Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, p. 103-108, 2007.

SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SALA-TREPAT, J.M., EVANS, W.C. The meta cleavage of catechol by *Azotobacter* species 4-oxalocrotonate pathway. **Eur. J. Biochem.**, v. 20, p. 400-413, 1971.

SANTOS, E.C., JACQUES, R.J.S., BENTO, F.M., PERALBA, M.C., SELBACH, P.A., SÁ E.L.S., CAMARGO, F.A.O. Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 2644-2649, 2008.

SARAVANAN, P., PAKSHIRAJAN, K., SAHA, P. Growth kinetics of an indigenous mixed microbial consortium during phenol degradation in a batch reactor. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 205-209, 2008.

SCHIE, P.M., Young, L.Y. Biodegradation of phenol: Mechanisms and applications. **Bioremediation J.**, v. 4, n. 1, p. 1-18, 2000.

SHETTY, K.V., SRINIKETHAN, G., RAMANJANEYULU, R. Biological phenol removal using immobilized cells in a pulsed plate bioreactor: Effect of dilution rate and influent phenol concentration. **J. Hazard Mater.**, v. 149, p. 452-459, 2007.

TAMURA, K., NEI, M., KUMAR, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sci. (US)**, v. 101, p. 11030-11035, 2004.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI M., KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2008.

TZIOTZIOS, G., VAYENAS, D.V., LYBERATOS, G., PAVLOU, S., 2008. Modelling of biological phenol in draw-fill reactors using suspended and attached growth olive pulp bacteria. **Int. Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, p. 142-150, 2008.

VARGA, J.M., NEUJAHN, H.Y. Purification and Properties of Catechol 1,2-Oxygenase from *Trichosporon cutaneum*. **Eur. J. Biochem.**, v. 12, p. 427-434, 1970.

VIVAS, A., MORENO, B., GARCIA-RODRIGUEZ, S., BENITEZ, E. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 1319-1326, 2009.

WATANABE, K., 2002. Linking Genetics, Physiology and Ecology: an Interdisciplinary Approach for Advancing Bioremediation. **J. Biosci. and Bioeng.**, v. 94, n. 6, p. 557-562, 2002.

WEI, G., YU, J., ZHU, Y., CHEN, W., WANG L. Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chrysopteru* in mining tailing region. **J. Hazard Mater.**, v. 151, p. 111-117, 2008.

YANG, C-F., LEE, C-M. Enrichment isolation, and characterization of phenol-degrading *Pseudomonas resinovorans* strain P-1 and *Brevibacillus* sp. Strain P-6. **Int. Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 206-210, 2007.

ZIAGOVA M., KYRIAKOU G., LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M. Co-metabolism of 2,4-dichlorophenol and 4-Cl-m-cresol in the presence of glucose as an easily assimilated carbon source by *Staphylococcus xylosus*. **J. Hazard. Mater.**, v. 163, p. 383-390, 2009.

CAPÍTULO IV

ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DA BACTÉRIA *Microbacterium oxydans*

Resumo

A bactéria *M. oxydans* BLB-4, originalmente apresentava alta capacidade de degradação de fenol mas perdeu esta condição devido a transferências subseqüentes do inóculo. Devido a isso, realizou-se o isolamento das bactérias que ainda apresentavam capacidade de degradação, a partir do inóculo, pela técnica de enriquecimento, utilizando fenol como única fonte de carbono. Após, foi realizado o estudo das condições de cultivo utilizando diferentes meios de degradação, diferentes concentrações de inóculo e pH, no intuito de estabelecer as variáveis que mais influenciavam no processo de degradação. A partir dos resultados chegou-se a conclusão que o ideal foi utilizar um inóculo de densidade óptica inicial de 0,31, em meio com 100 mg L⁻¹ de peptona, a fim de não causar repressão catabólica, utilizando o pH 7, que é o pH próximo ao ótimo das enzimas que participam do processo de degradação. Foi constatado que a bactéria apresentou tolerância à 1000 mg L⁻¹ de fenol, que é considerado uma alta concentração.

Palavras-chave: pressão seletiva, condições de cultura, pH, temperatura, volume de inóculo, peptona

Abstract

The bacterium *M. oxydans* BLB-4, originally showed a high capacity for degradation of phenol but lost this due to subsequent transfers of inoculum. Based in this, was made the isolation of bacteria that still had capacity degradation from the inoculum by enrichment technique, using phenol as sole carbon source. Thus, was carried out a study of culture conditions using different modes of degradation, different inoculum concentrations and pH, to establish the variables that most influence in the degradation process. From the results reached the conclusion that the ideal was to use how inoculum a initial optical density of 0.31, 100 mg L⁻¹

peptone, in order not to cause catabolic repression, using pH 7, that is the pH near the optimum of enzymes involved in the degradation process. Was found that the bacterium was tolerant to 1000 mg L⁻¹ of phenol, which is considered a high concentration.

Keywords: selective pressure, culture conditions, pH, temperature, volume of inoculum, peptone

1. INTRODUÇÃO

Compostos fenólicos estão presentes nos efluentes de diversos tipos de indústrias como de alimentos, petroquímica, de aço, da queima da madeira, da cura do couro, entre outros, sendo encontrado em altas concentrações no ambiente, por isso é listado como um dos compostos tóxicos prioritários pela USEPA-USA para monitoramento (U.S. Environmental Protection Agency) (Khleifat, 2006). A eliminação de fenol se faz necessária para preservar a saúde humana e o meio ambiente e, dos métodos aplicados atualmente, a utilização de micro-organismos é o mais eficiente (Wei et al., 2008).

Trabalhos anteriores sugeriram que o aumento da capacidade de degradação de fenol, ou de outros compostos tóxicos, poderia ser aumentado utilizando fontes adicionais de carbono, nitrogênio, lipídeo, fosfatos, prontamente assimiláveis, mas em concentrações que não causassem uma repressão catabólica no micro-organismo, pela dificuldade de expressar as enzimas de degradação (Leonard & Lindley, 1998; Loh & Wang, 1998; Lob & Tar, 2000). Outras variáveis também foram estudadas por diversos autores como pH,

temperatura, concentração celular, na tentativa de elucidar os efeitos na velocidade de degradação (Alva & Peyton, 2003; Juang & Tsai, 2006; Khleifat, 2006). Com isso, este trabalho teve como objetivo fazer o isolamento da bactéria *M. oxydans* BLB-4, a partir do inóculo que havia perdido a capacidade de degradativa, no intuito de encontrar células ainda ativas, pelo método de enriquecimento, utilizando fenol como única fonte de carbono e avaliar as variáveis que influenciavam no crescimento, no intuito de estabelecer as condições a serem utilizadas no processo de degradação de fenol.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Bactéria

A bactéria *Microbacterium oxydans* AJ717356.1 (BLB-4) com alta capacidade para degradação de fenol foi isolada de serragem de couro, proveniente de um curtume da região de estudo, pela técnica de enriquecimento, tendo o fenol como única fonte de carbono e energia. O isolamento foi realizado no laboratório de Biorremediação, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil e a identificação foi realizada na Auburn University at Montgomery, USA, pela técnica de amplificação do 16 S do RNA ribossomal, por PCR.

2.2 Isolamento da bactéria pela técnica de enriquecimento

O inóculo foi preparado com a cultura estoque que havia perdido a capacidade de degradação de fenol, acondicionada em tubo de ensaio com ágar nutriente inclinado, acrescido de 250 mg L⁻¹ de fenol, armazenado à 4 °C. O método utilizado para isolar bactérias com capacidade degradativa foi o da técnica de enriquecimento. Para isso, lavou-se a rampa de ágar nutriente, que continha a bactéria, com 1 mL de meio mineral (MM), cuja composição: KH₂PO₄, 400 mg L⁻¹; MgSO₄.7H₂O, 200 mg L⁻¹; NaCl, 100 mg L⁻¹; CaCl₂.2H₂O, 25 mg L⁻¹; MnSO₄.H₂O, 3 mg L⁻¹; NH₄NO₃.H₂O, 500 mg L⁻¹ e realizou-se raspagem da superfície da rampa com alça de platina. Após, essa alíquota de MM, que continham as células inativadas (constatado repetindo o ensaio de degradação, utilizando o inóculo preparado conforme o item 2.4 do Capítulo III, onde as bactérias não apresentavam mais degradação em concentrações >250 mg L⁻¹), foram transferidas para frascos erlenmeyer de 125 mL, contendo 80 mL do mesmo MM com a concentração de 250 mg L⁻¹ de fenol, como única fonte de carbono e incubou-se à 30 °C, 190 rpm durante duas semanas. Após este tempo, foi realizada transferência de uma alíquota de 1 mL para outro frasco erlenmeyer, com a mesma composição, incubando-se durante 7 dias, à 190 rpm e 30 °C, repetindo este procedimento por mais duas vezes. Após, as bactérias foram isoladas novamente em placas com ágar nutriente, acrescido de 250 mg L⁻¹ de fenol, à 4 °C, as quais foram utilizadas nos ensaios posteriores.

2.3 Determinação da capacidade de degradação de fenol

O inóculo bacteriano foi preparado separadamente usando a nova cultura estoque e transferida para frasco erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio nutriente com a concentração de 220 mg L⁻¹ de fenol e incubado à 30 °C em agitador orbital (190 rpm), por 48 h. Após esta etapa as células foram coletadas e lavadas 3 vezes por centrifugação à 10000 rpm, 20 °C, durante 20 min e ressuspendidas no mesmo MM. Uma alíquota de 4 mL deste inóculo foi misturado com 76 mL de MM com a concentração final de 250 mg L⁻¹ de fenol e incubado em agitador orbital (190 rpm) à 30 °C, sendo verificada quantitativamente a degradação pelo método de Folin-Ciocalteu (Hoyos et al., 2002) e a concentração celular foi medida pela densidade óptica (DO₆₀₀ nm).

2.4 Efeito de diferentes condições de crescimento na biodegradação de fenol

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando os mesmos procedimentos descritos anteriormente para obtenção do inóculo, verificação da degradação de fenol e crescimento celular (item 2.3). Ensaios sem adição de inóculo foram realizados para todos os ensaios a fim de verificar se haviam perdas abióticas de fenol.

2.4.1 Efeito do uso de diferentes meios de degradação

O efeito de diferentes substratos na degradação de fenol por *M. oxydans* BLB-4 foi investigado utilizando seis diferentes meios de degradação, conforme apresentado na TABELA 6. Estes meios foram utilizados separadamente, a fim de avaliar o efeito destas fontes no processo de degradação. Após esta etapa, foram utilizadas variações nas concentrações dos compostos do meio que mais influenciaram no processo de degradação, para verificar se havia repressão catabólica, conforme apresentado na TABELA 7.

TABELA 6: Meios utilizados nos ensaios de degradação de fenol utilizando MM adicionado de 250 mg L⁻¹ de fenol e 500 mg L⁻¹ de uma fonte convencional, prontamente assimilável pelos micro-organismos e um meio contendo fenol como única fonte de carbono, incubadas à 30 °C, 190 rpm.

| Meio | Composição do meio |
|-----------|--|
| M1 | 500 mg L ⁻¹ de meio Luria Bertani, 250 mg L ⁻¹ de fenol e MM |
| M2 | 500 mg L ⁻¹ de meio nutriente, 250 mg L ⁻¹ de fenol e MM |
| M3 | 500 mg L ⁻¹ de peptona, 250 mg L ⁻¹ de fenol e MM |
| M4 | 500 mg L ⁻¹ de glicose, 250 mg L ⁻¹ de fenol e MM |
| M5 | 500 mg L ⁻¹ de glicerol, 250 mg L ⁻¹ de fenol e MM |
| M6 | 250 mg L ⁻¹ de fenol e MM |

TABELA 7: Variação da concentração de peptona no meio que mais influenciou no processo de degradação, incubado a 30 °C e 190 rpm.

| Meio | Composição do meio |
|-----------|--|
| M3 | 500 mg L ⁻¹ de peptona, 250 mg L ⁻¹ de fenol e MM |
| M7 | 100 mg L ⁻¹ de peptona, 250 mg L ⁻¹ de fenol e MM |
| M8 | 1000 mg L ⁻¹ de peptona, 250 mg L ⁻¹ de fenol e MM |

2.4.2 Efeito do tamanho do inóculo

Para avaliar se a concentração inicial do inóculo influenciava no tempo de degradação de fenol foram testadas três concentrações diferentes de células, as quais foram obtidas utilizando-se diferentes diluições após o processo de centrifugação, diluindo o pellet de células de 25 mL em 5, 10 e 15 mL de MM, adicionando 4 mL dessa diluição ao meio de degradação. Neste ensaio foram utilizados o mesmo MM com 250 mg L⁻¹ de fenol, acrescido de outra fonte de carbono, o qual foi determinado no ensaio anterior.

2.4.3 Efeito do pH na degradação de fenol

Diferentes pHs (4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0) no meio de degradação, foram utilizados para testar os efeitos dessa variação na capacidade degradativa da bactéria *M. oxydans* BLB-4. Para isso foram utilizados MM com a concentração de 250 mg L⁻¹ de fenol, com adição de uma fonte convencional de carbono e tamanho de inóculo, estabelecidos pelos ensaios anteriores. Os diferentes pHs foram obtidos acidificando o meio com solução de ácido cítrico 0,1 M e alcalinizando com solução de NaOH 0,1 M.

2.5 Biodegradação de diferentes concentrações de fenol

A tolerância ao fenol e remoção deste contaminante foram avaliados usando o novo inóculo bacteriano em MM, com a concentração de 250 mg L⁻¹ de

fenol e, as outras variáveis determinadas nos ensaios anteriores como, presença de outra fonte de carbono, tamanho do inóculo e pH. Foram testadas concentrações crescentes de fenol como (330, 425, 500, 770, 910 e 1000 mg L⁻¹) para a bactéria BLB-4, com as condições de incubação descritas anteriormente até total desaparecimento do fenol do meio ou estabilização da concentração.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento de bactérias com capacidade de degradação

A bactéria utilizada neste trabalho apresentava em estudos anteriores, alta capacidade de degradação de fenol, como única fonte de carbono e energia em MM, tolerando e degradando totalmente a concentração de 1000 mg L⁻¹ em 11 dias de cultivo. Foi constatado também que este micro-organismo utilizava a via de degradação orto- β -cetoatipato, devido a presença das enzimas fenol hidroxilase e catecol 1,2-dioxigenase (Capítulo III).

Com as transferências consecutivas do inóculo no decorrer do trabalho, a bactéria perdeu a capacidade degradativa. Devido a isso, a estratégia adotada para tentar isolar bactérias que ainda apresentavam capacidade de degradação de fenol, a partir do inóculo, foi utilizar a técnica de enriquecimento, com fenol como única fonte de carbono.

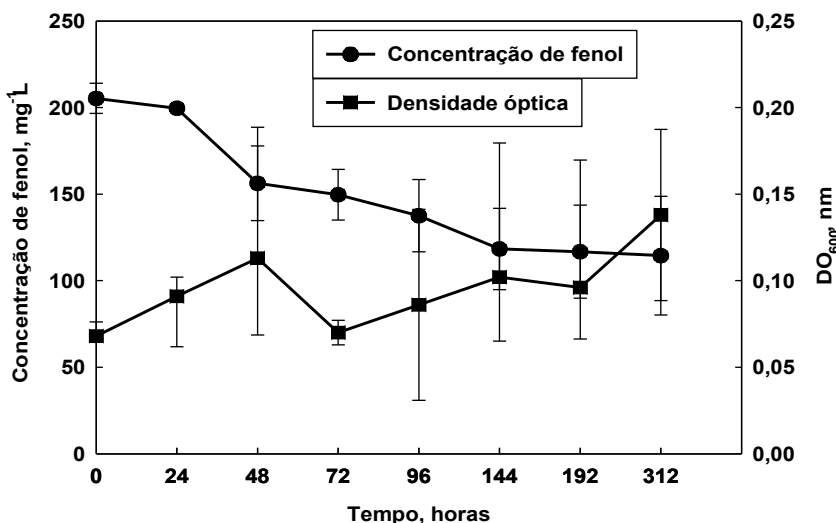


FIGURA 6: Degradação de fenol e medida da OD₆₀₀, da bactéria *M. oxydans* BLB-4 após isolamento das bactérias, a partir do inóculo que tinha perdido a capacidade degradativa, por técnica de enriquecimento utilizando fenol como única fonte de energia em MM, incubado à 30 °C e 190 rpm.

A fim de avaliar se as bactérias que foram isoladas apresentavam capacidade de degradação de fenol, realizou-se um ensaio de degradação em MM com a concentração de 220 mg L⁻¹ de fenol. Foi verificado que a bactéria *M. oxydans* BLB-4 foi capaz de reduzir em 60 % a concentração inicial de fenol, em 13 dias de incubação (FIGURA 6). No entanto, esta bactéria degradava a mesma concentração de fenol em apenas 24 h, antes de ocorrer a perda da capacidade catabólica. Constatou-se, a partir destes resultados, que a técnica para isolamento de bactérias com capacidade de degradação de fenol foi eficiente, já que o micro-organismo voltou a degradar e tolerar esta concentração de fenol, pois a produção

de qualquer massa celular neste experimento foi função do consumo do composto aromático, conforme demonstrado similarmente por Khleifat (2006), já que não houve nenhuma redução da concentração de fenol no frasco controle, sem adição de inóculo.

3.2 Efeito do uso de diferentes meios de degradação

Conforme apresentado na FIGURA 7(a), o meio M5 foi o que menos influenciou no aumento da DO_{600} , com redução em torno de 12 % da concentração inicial de fenol, em 6 dias de incubação provavelmente pela presença do glicerol. Para o mesmo tempo de ensaio foi verificado que o meio M4 reduziu apenas 8,4 % da concentração inicial de fenol, pela presença de glicose. Já para os outros meios testados foi observado que o meio M3 favoreceu a redução de cerca de 90 % da concentração inicial de fenol em 7 dias de incubação, provavelmente pela influencia da presença de peptona. Na presença de LB no meio M1, houve a redução de 11,32 % de fenol e cerca de 6,7 % de degradação no meio M2, pela presença de meio nutriente, no mesmo intervalo de tempo de incubação. Com isso, constatou-se que a peptona foi a que mais favoreceu a degradação do fenol, uma vez que reduziu o tempo de degradação de 13 para 7 dias, comparado ao ensaio onde não foi utilizada nenhuma outra fonte de carbono, utilizando o meio M6, aumentando a taxa de degradação de 60 % para 90 %. Os controles

utilizados no ensaio, sem adição do inóculo, comprovaram que todo o aumento da DO e degradação de fenol foi devido ao metabolismo da bactéria.

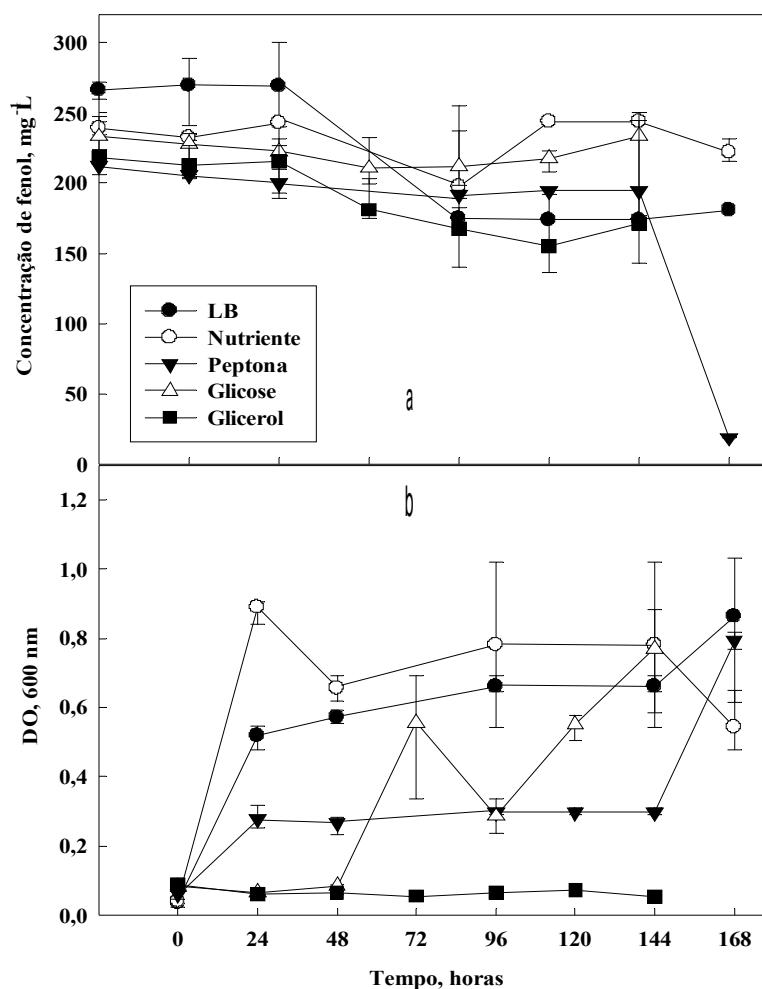


FIGURA 7: Efeito do uso de diferentes meios na degradação de fenol (a) e medida da DO_{600 nm} (b), utilizando a bactéria *M. oxydans* BLB-4, incubado à 30 °C e 190 rpm. M1: 500 mg L⁻¹ de meio Luria Bertani, 250 mg L⁻¹ de fenol em MM; M2: 500 mg L⁻¹ de meio nutriente, 250 mg L⁻¹ de fenol em MM; M3: 500 mg L⁻¹ de peptona, 250 mg L⁻¹ de fenol em MM; M4: 500 mg L⁻¹ de glicose, 250 mg L⁻¹ de fenol em MM; M5: 500 mg L⁻¹ de glicerol, 250 mg L⁻¹ de fenol em MM; M6: 250 mg L⁻¹ de fenol em MM.

Os meios que mais influenciaram no aumento da DO₆₀₀ (FIGURA 7(b)) foram o meio M1, M2 e M4, mas não foi verificada diferença entre a capacidade de remoção de fenol entre esses meios, constatando-se ainda, que não influenciavam positivamente no processo de degradação. Verificou-se um aumento da DO e da degradação de fenol na maioria dos meios utilizados (TABELA 8). A taxa de degradação de fenol foi calculada pela média da taxa de degradação por 24 h, pois neste período de tempo muitas células não apresentaram uma maior taxa de degradação e não houve um tempo correspondente para todos os experimentos realizados. Este método foi sugerido por Loh & Wang (1998) e posteriormente utilizado por Kleifat (2006), a fim de evitar os erros de interpretação causados por diferentes comprimentos das fases lag e pela dificuldade em determinar o tempo necessário para atingir a degradação completa ou sua estabilização.

TABELA 8: Influencia do uso de diferentes meios na degradação de fenol por *M. oxydans* BLB-4, incubada à 30 °C, 190 rpm.

| Meios | Taxa de degradação (mg L ⁻¹ h ⁻¹) | DO ₆₀₀ nm |
|-------|--|----------------------|
| M1 | 0,460±0,42 | 0,669±0,02 |
| M2 | 1,161±0,14 | 0,965±0,36 |
| M3 | 1,505±0,46 | 0,301±0,01 |
| M4 | 0,214±0,08 | 0,285±0,05 |
| M5 | 0,306±0,20 | 0,067±0,003 |
| M6 | 0,705±0,31 | 0,07±0,01 |

Os valores são a média de três medidas individuais ± desvio padrão. A DO₆₀₀ para o mesmo crescimento celular, em cada meio correspondente foi realizada em 96 h, as quais também foram calculadas pela média de três experimentos independentes.

Observando o valor da DO obtida para os diferentes ensaios, como apresentado na Tabela 9, constatou-se que houve repressão da degradação na

presença de nutriente, glicerol e glicose, nos meios de degradação. No entanto, quando foi utilizado glicerol no meio se verificou uma drástica redução da DO, podendo ser um resultado de repressão catabólica. Por outro lado, a glicose e o meio nutriente apresentaram taxa de degradação ainda menor, mas com uma DO maior, verificando-se também uma repressão catabólica. Este mesmo comportamento foi apresentado por *Ewingela americana* na presença de frutose (Khleifat, 2006). O mesmo ocorreu no trabalho de Papanastasiou & Maier (1982), quando se realizou a degradação de 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) na presença de glicose, onde foi verificado que houve uma inibição recíproca da degradação e que o aumento da biomassa deu a falsa impressão de tolerância ao efeito tóxico do 2,4-D.

Em outro trabalho, onde se realizou a degradação de 750 mg L⁻¹ de fenol por *Pseudomonas putida*, observou-se que a adição de 1 g L⁻¹ de glicose favorecia o crescimento celular, mas que a degradação de fenol era muito pequena (cerca de 13 %) e acima desta concentração havia uma redução ainda maior na taxa de degradação, inferior ao meio que continha somente fenol como fonte de carbono. Observou-se ainda que este comportamento foi diferente do que ocorreu quando foi adicionado extrato de levedura ao meio, mostrando mais uma vez a repressão catabólica causada pela glicose (Lob & Tar, 2000), sendo esta repressão também citada em outros trabalhos, no mesmo período (Bastos et al., 2000).

Existem outros relatos na literatura de que o uso de extrato de levedura e caseína em MM diminuíram a degradação de fenol devido ao fato que esses substratos mobilizaram carbono intracelular, nitrogênio e outras fontes de energia, com maior facilidade do que o contaminante, as quais teriam uma vantagem seletiva (Khleifat, 2006). Os resultados demonstraram claramente que esses substratos devem ser utilizados em concentrações específicas para não reprimirem a expressão da enzima fenol hidroxilase (Leornard & Lindley, 1998), que participa da primeira etapa de degradação do fenol (Sala-Trepat & Evans, 1971).

O fato da capacidade degradativa da *M. oxydans* BLB-4, estudada no presente trabalho, não ser inibida pela presença das fontes convencionais testadas indicou a possibilidade desta ser usada em meios complexos, como no tratamento de efluentes e solos impactados (Khleifat, 2006), já que as substâncias húmicas encontradas no solo são normalmente misturas de lipídeos, proteínas e carboidratos oriundos de micro-organismos e plantas (Burdon, 2001).

O uso dos meios M3, M7 e M8 na degradação de fenol estão apresentados na FIGURA 8. Pode-se observar que a presença de 100 mg L⁻¹ de peptona no meio favoreceu um aumento da velocidade da degradação, havendo o consumo de 99 % da concentração inicial de fenol em 5 dias de incubação, diminuindo em um dia, o tempo de degradação apresentado anteriormente, mesmo tendo apresentado uma menor DO, igual a 0,2. Toda a redução de fenol

neste ensaio foi devido ao metabolismo da bactéria, pois não houve redução da concentração no frasco controle sem adição de inóculo.

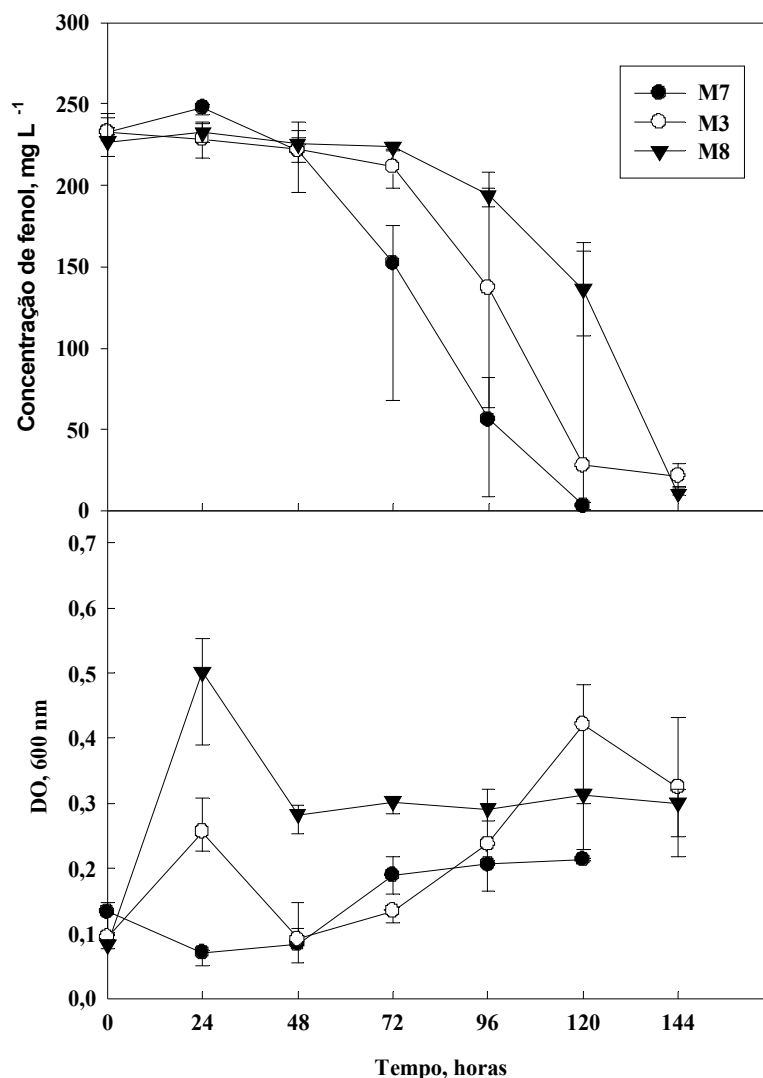


FIGURA 8: Efeito dos diferentes meios com concentrações diferentes de peptona (M3: 100 mg L⁻¹ de peptona, 250 mg L⁻¹ de fenol em MM; M7: 500 mg L⁻¹ de peptona, 250 mg L⁻¹ de fenol em MM; M8: 1000 mg L⁻¹ de peptona, 250 mg L⁻¹ de fenol em MM) na degradação de fenol, por *M. oxydans* BLB-4, à 30 °C e 190 rpm.

Para os meios que utilizaram concentrações maiores de peptona (500 e 1000 mg L⁻¹) foi verificada uma remoção de cerca de 94 % da concentração inicial de fenol em 6 dias de incubação, com uma DO₆₀₀ em torno de 0,3 para ambas, mostrando que a presença de peptona diminui o tempo de degradação, mas que a redução da concentração de peptona favoreceu ainda mais a degradação de fenol. Na menor concentração de peptona testada, não houve competição pela preferência de consumo de energia pela bactéria, ao contrário do que foi verificando nas concentrações maiores de peptona (>500 mg L⁻¹), que favoreceram o aumento da DO, levando a uma falsa condição de tolerância ao contaminante, indicando que nesta faixa de concentração poderia estar ocorrendo uma certa repressão catabólica.

3.3 Influência do tamanho inicial do inóculo no meio de degradação

O efeito da concentração inicial do inóculo sobre a velocidade de degradação de fenol foi avaliada para determinar se haveria redução do tempo de adaptação das células, com aumento da densidade celular e se isso influenciaria na redução do tempo de degradação (FIGURA 9).

Foi verificado que a DO₆₀₀ de 0,48 e 0,31, obtidas a partir da diluição dos 25 mL de inóculo com 5 e 10 mL de MM, proporcionaram uma degradação de todo o conteúdo de fenol em 5 dias, quando comparado ao ensaio que utilizou a

DO₆₀₀ inicial de 0,22, obtido com a diluição de 15 mL, que removeu cerca 90 % da concentração inicial de fenol em 5 dias. Foi observado também que para as maiores concentrações celulares, houve uma redução da DO₆₀₀ nas primeiras 24 h de ensaio. Entretanto, estas DOs não alcançaram o valor da menor concentração celular, que permaneceu praticamente constante neste período de tempo, sendo provavelmente este o motivo para que as duas maiores concentrações alcançassem mais rapidamente a degradação total do contaminante. Estes resultados mostraram que a concentração inicial de células teve influência na aceleração da degradação nas primeiras horas de cultivo, quando as células estavam se adaptando à toxicidade do novo meio, mas não teve influência na diminuição do tempo de degradação, com relação ao ensaio anterior (item 3.3).

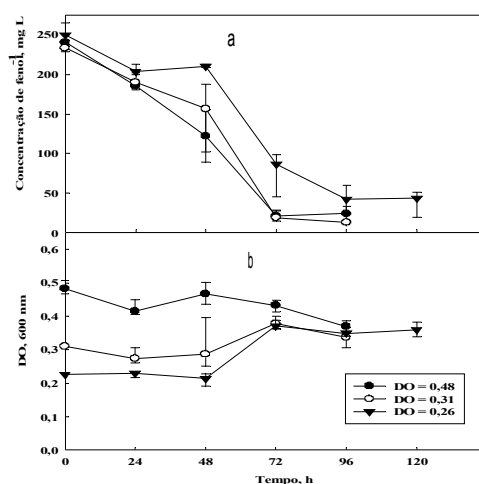


FIGURA 9: Efeito das diferentes concentrações iniciais de inóculo (DO inicial de 0,26, 0,31 e 0,48 obtidos a partir da diluição de 25 mL de inóculo em 15, 10 e 5 mL de MM, respectivamente), na degradação de fenol por *M. oxydans* BLB-4, e medida da DO₆₀₀ nm, em meio M7 (500 mg L⁻¹ de peptona, 250 mg L⁻¹ de fenol em MM), incubado à 30 °C e 190 rpm.

Para os estudos posteriores foi escolhida a concentração celular intermediária de 0,31, visando economia de inóculo, uma vez que não houve diferença dos resultados obtidos para a maior concentração celular testada. Estes resultados estão de acordo com os de Khleifat (2006), onde também foi verificado que o tamanho inicial do inóculo não afetou o tempo de degradação. No entanto o uso simultâneo de uma fonte convencional de energia e de uma concentração celular suficiente para degradação de fenol podia inibir eficientemente os efeitos tóxicos do contaminante, como também ocorreu no trabalho de Loh & Wang (1998). Foi observado nestes ensaios que não houve aumento da DO nos frascos onde não foram utilizados adição de inóculo, bem como não houve diminuição da concentração inicial de fenol, ficando comprovado que o aumento da DO foi devido ao metabolismo bacteriano e que não houveram perdas abióticas.

3.4 Influencia do pH na degradação de fenol

Diferentes pHs no meio de crescimento foram utilizados com o objetivo de avaliar a influência do pH sobre a capacidade de degradação de fenol (FIGURA 10), quando utilizado 100 mg L^{-1} de peptona e tamanho de inóculo inicial de 0,31 em MM. O pH que mais influenciou no processo de degradação foi o pH 7,0, pois reduziu o tempo de degradação de 5 para 2 dias, removendo totalmente o contaminante do meio, favorecendo também um crescimento celular mais rápido, apresentando uma maior DO_{600} (cerca de 0,5).

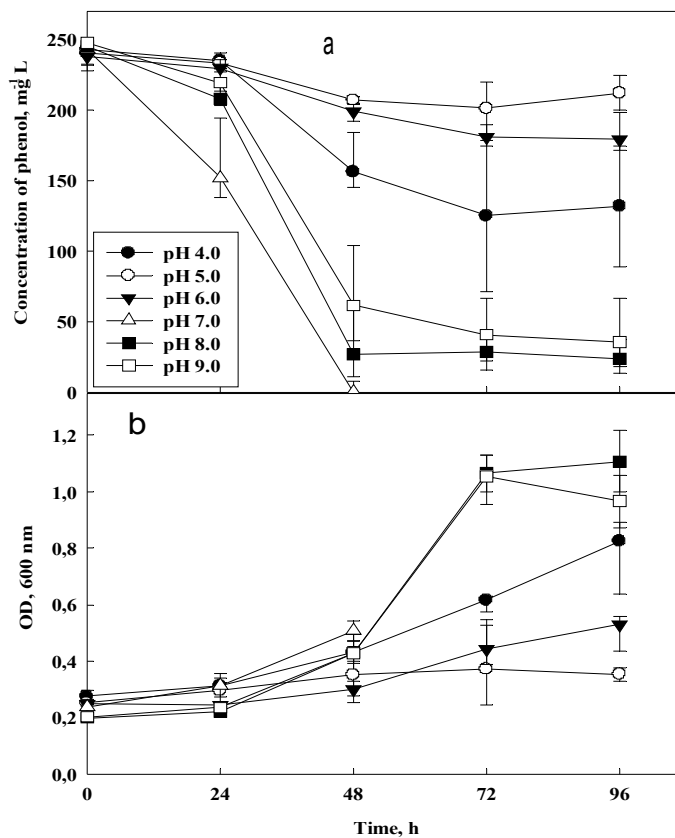


FIGURA 10: Efeito dos diferentes pHs no meio e medida da DO_{600} , na degradação de fenol por *M. oxydans* BLB-4, utilizando o meio M7 (500 mg L^{-1} de peptona, 250 mg L^{-1} de fenol em MM), com concentração inicial do inóculo de 0,31, incubado à $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e 190 rpm.

A bactéria apresentou crescimento em todos os pHs testados, mas os pHs 8,0 e 9,0 influenciaram na diminuição do tempo de degradação, reduzindo em 90 e 83 % respectivamente a concentração inicial de fenol, em 4 dias de incubação e estes pHs proporcionaram um aumento da concentração celular, apresentando uma DO_{600} em torno de 1,1 em ambos os ensaios. Estes valores de DO_{600} não são resultantes apenas do crescimento celular no meio de degradação,

pois houve turvação do meio, mostrando que algum composto químico presente no meio complexou com os produtos da reação formados, apresentando coloração marrom ao longo do tempo de incubação. No pH 4,0 observou-se a remoção de 50% da concentração inicial de fenol em 4 dias de incubação e nos pHs 5,0 e 6,0 houve degradação de 14 e 22 % da concentração inicial, no mesmo tempo de incubação. O pH 5,0 foi o que menos influenciou no crescimento celular (cerca de 0,3 unidades de DO_{600}), provavelmente devido a proximidade do ponto isoelétrico da enzima catecol 1,2-dioxigenase (Briganti et al., 1997). Não foi observada aumento da DO para os frascos controle sem adição de inóculo, ficando evidente que toda turvação no meio foi devido ao metabolismo da bactéria, não havendo perdas abióticas de fenol, pois a concentração inicial permaneceu constante.

Testes enzimáticos realizados com a bactéria *M. oxydans* BLB-4, utilizada neste trabalho (Capítulo V, item 3.1), evidenciaram também que a enzima fenol hidroxilase ficava totalmente inativa na faixa de 4,5 a 5,0, devendo ser nesta faixa o ponto isoelétrico desta enzima. A pH 7,0 verificou-se o ótimo para a atividade desta enzima, que é chave para a degradação aeróbia do fenol pelos micro-organismos. Estes resultados são coerentes com os encontrados em outros trabalhos, como para a bactéria *E. americana* onde o pH 7,5 foi o que mais favoreceu a degradação de fenol, tendo o autor definido que o pH ótimo das enzimas que participam da degradação de fenol deveriam estar em torno do mesmo pH (Kleifat, 2006). Já para *Klebsciella oxytoca* o pH que mais influenciou

foi 6,8 (Shawabkeh et al., 2007). Outro trabalho relatou que *Halomonas campisales* degradou fenol numa faixa de pH de 8,0 a 11,0, tendo o pH 8,0 favorecido a diminuição do tempo de degradação (Alva & Peyton, 2003).

Estes resultados demonstram que o pH do meio de degradação deve ser o pH ótimo das enzimas que participam do processo de degradação. No entanto, em um processo de bioaumentação de um solo contaminado, a faixa de pH poderia variar muito (de 3,7 a 8,3) em um mesmo tipo de solo e isto deve ser levado em consideração ao estabelecer a estratégia de biorremediação. Os pHs mais ácidos implicam em diversos problemas como o aumento da disponibilidade de alumínio (Pietri & Brookes, 2008) e apresentar valores abaixo da faixa ótima de atuação dessas enzimas. Nestes casos, o indicado seria fazer a correção do solo para possibilitar o uso dos isolados identificados neste trabalho em pHs até próximo de 6,5, para evitar a indisponibilidade dos nutrientes do solo. Até o momento não foi constatado na literatura a avaliação das condições de cultivo para degradação de fenol pela bactéria *M. oxydans*.

3.5 Biodegradação de diferentes concentrações de fenol

A bactéria *M. oxydans* BLB-4 foi capaz de degradar cerca de 95% da concentração inicial de fenol na faixa de 330 à 910 mg L⁻¹ (FIGURA 11). Foi observado que a partir da concentração de 500 mg L⁻¹ a bactéria apresentou melhor capacidade de adaptação ao meio para as maiores concentrações, onde

500 mg L⁻¹ e 910 mg L⁻¹ de fenol foram degradados mais rapidamente do que 425 mg L⁻¹ e 770 mg L⁻¹. Para a concentração de 1000 mg L⁻¹ a bactéria foi capaz de degradar somente 26% da concentração inicial, havendo uma estabilização da leitura a partir do tempo de 168 h. Este resultado mostrou que a bactéria resistiu a toxicidade desta concentração, embora não foi capaz de degradar totalmente, no mesmo tempo que a bactéria levava para degradar totalmente esta mesma concentração, antes de perder a capacidade degradativa (11 dias) (Capítulo III, item 3.2).

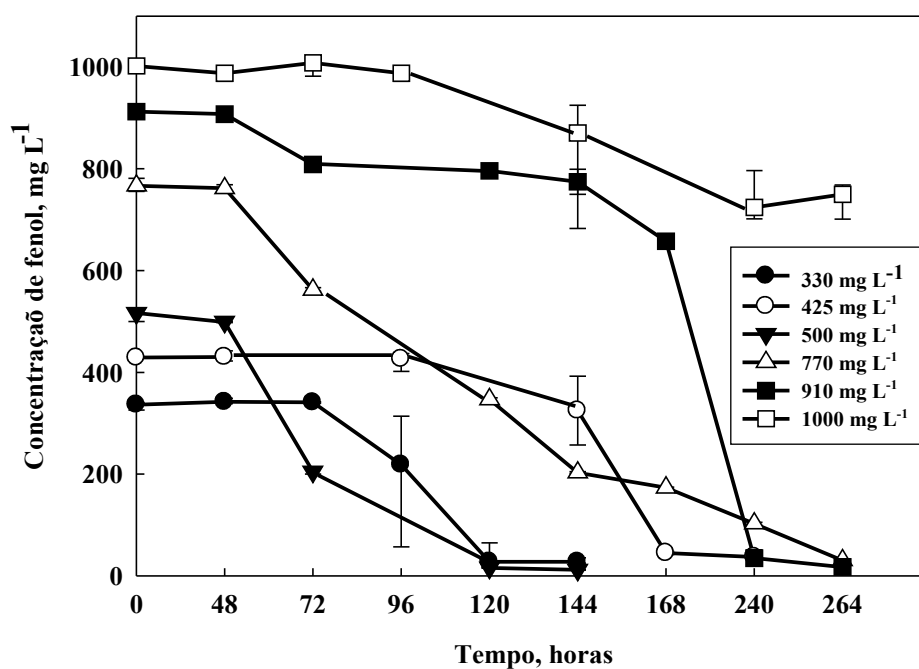


FIGURA 11: Degradação de diferentes concentrações iniciais de fenol pela bactéria *M. oxydans* BLB-4, usando o meio M7 (500 mg L⁻¹ de peptona, 250 mg L⁻¹ de fenol em MM), DO₆₀₀ inicial de 0,31 e pH 7.

A partir destes resultados ficou demonstrado que o método utilizado para isolamento do inóculo de uma bactéria que ainda possuísse capacidade degradativa, isolou uma bactéria que apresentava a mesma tolerância ao fenol, uma vez que esta foi capaz de sobreviver na mesma faixa de concentração de fenol que tolerava antes de haver apresentar perda da capacidade degradativa. Ficou evidente que toda diminuição da concentração de fenol nos diferentes experimentos foi devido a utilização do fenol pela bactéria, já que não houve diminuição da concentração inicial de fenol nos frascos controle, sem adição do inóculo.

Em outro trabalho, *Alcaligenes faecalis* isolada de lodo ativado fenólico foi capaz de degradar até uma concentração de 1600 mg L⁻¹ de fenol, em cultura em batelada (HU et al., 2007). Outras duas cepas de *Pseudomonas pseudomallei* e *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas em um efluente de uma indústria farmacêutica no Paquistão, foram capazes de degradar fenol até a concentração de 1500 mg L⁻¹ e 2600 mg L⁻¹ respectivamente, ambas em 7 dias de incubação (Afzal et al., 2007), no entanto, a maioria das bactérias estudadas tolera uma concentração de 1000 mg L⁻¹ (Jiang et al., 2007), o que mostra que a bactéria utilizada no presente trabalho, ainda apresenta um grande potencial de degradação de fenol a ser explorado.

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi realizado isolamento de uma bactéria com capacidade de degradação de fenol, a partir do inóculo que tinha perdido tal habilidade. Pelo que se tem conhecimento este foi o primeiro relato do estudo das condições de cultivo para degradação de fenol pela bactéria *M. oxydans* BLB-4. Foi constatado que os melhores parâmetros a serem utilizados foi realizar a suplementação do MM com 100 mg L⁻¹ de peptona, que favorecia um aumento da taxa de remoção de fenol, não causando repressão catabólica, associada a uma concentração celular inicial suficiente para degradação de fenol (diluir 25 mL de inóculo em 10 mL de MM), no pH 7. Foi também constatado que a bactéria voltou a degradar na mesma faixa de concentração que degradava anteriormente (até 1000 mg L⁻¹), antes de perder a capacidade degradativa, embora utilizando maior tempo para a utilização deste contaminante.

REFERÊNCIAS

- AFZAL, M.; KHALID, Z.M.; SAMINA, I.; SAKANDAR, R. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, p. 60-66, 2007.
- ALVA, V.A., PEYTON, B.M. Phenol and catechol biodegradation by the *Haloalkaliphile Halomonas campisalis*: Influence of pH and Salinity. **Environ Sci Technol.**, v. 37, p. 4397-4402, 2003.

BASTOS, A.E.R., MOON, D.H., ROSSI, A., TREVORS, J.T., TSAI, S.M. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. **Arch Microbiol**, v. 174, p. 346-352, 2000.

BRIGANTI, F., PESSIONE, E., GIUNTA, C. SCOZZAFAVA, A. Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. **FEBS letters**, v. 416, p. 61-64, 1997.

BURDON, J. Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic? **Soil Science**, v. 166, n. 11, p. 752-769, 2001.

HOYOS, S.E.G., MARTINEZ, N.L., RUBIO, F.C., Cormenzana A.R. Kinetics of aerobic treatment of olive-mill wastewater (OMW) with *Aspergillus terreus*. **Process Biochem.**, v. 37, p. 1169-1176, 2002.

HU, Z.; JIANG, Y.; WEN, J.; BAI, J.; JIA, X. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, p. 672-676, 2007.

JUANG, R-S., TSAI, S-Y. Growth kinetics of *Pseudomonas putida* in the biodegradation of single and mixed phenol and sodium salicylate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 31, p. 133-140, 2006.

KASUGA, I., NAKAJIMA, F., FURUMAI, H. Diversity of catechol 2,3-dioxygenase genes of bacteria responding to dissolved organic matter derived from different sources in a eutrophic lake. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 61, p. 449-458, 2007.

KHLEIFAT, K.M. Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: Effect of carbon starvation and some growth conditions. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2010-2016, 2006.

LEONARD, D., LINDLY, N.D. Growth of *Ralstonia eutropha* on inhibitory concentrations of phenol: diminished growth can be attributed to hydrophobic perturbation of phenol hydroxylase activity. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 25, p. 271-277, 1999.

LOB, K-C., TAR, C.P-P. Effect of additional carbon sources on biodegradation of phenol. **Bull Environ. Contam. Toxicol.**, v. 64, p. 756-763, 2000.

LOH, K.C., WANG, S.J. Enhancement of biodegradation of phenol and a nongrowth substrate 4-chlorophenol by medium augmentation with conventional carbon sources. **Biodegradation**, v. 8, p. 329-338, 1998.

PAPANASTASIOU, A.C. MAIER, W.J. Kinetics of biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate in the presence of glucose. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 24, p. 2001-2011, 1982.

PIETRI, J.C.A., BROOKES, P.C. Relationships between soil pH and microbial properties in a UK arable soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1856-1861, 2008.

SALA-TREPAT, J.M., EVANS, W.C. The meta cleavage of catechol by *Azotobacter* species 4-oxalocrotonate pathway. **Eur. J. Biochem.**, v. 20, p. 400-413, 1971.

SANTOS, P.M., SÁ-CORREIA, I. Characterization of the unique organization and co-regulation of a gene cluster required for phenol and benzene catabolism in *Pseudomonas* sp. M1. **J. Biotechnol.**, v. 131, p. 371-378, 2007.

SHAWABKEH, R., KHLEIFAT, K.M., AL-MAJALI, I., TARAWNEH, K. Rate of biodegradation of phenol by *Klebsiella oxytoca* in minimal medium and nutrient broth conditions. **Bioremediation Journal**, v. 11, n. 1, p. 13-19, 2007.

WEI, G., YU, J., ZHU, Y., CHEN, W., WANG, L. Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chrysopterus* in mining tailing region. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 111-117, 2008.

CAPÍTULO V

CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA BIODEGRADAÇÃO DE FENOL PRODUZIDAS PELAS BACTÉRIAS

Microbacterium oxydans BLB-2 E BLB-4

Resumo

Os compostos fenólicos são tóxicos para a maioria dos micro-organismos, dificultando seu uso em processos de biorremediação, fazendo com que a utilização de enzimas torne-se uma boa alternativa para degradação destes contaminantes. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar as propriedades catalíticas das enzimas fenol hidroxilase (PHO) e catecol 1,2 dioxigenase (C 1,2D), produzidas por *Microbacterium oxydans* BLB-2 e BLB-4. Para isso foram testados diferentes faixas de pH (4,5 a 9,0), temperatura (10 a 110 °C), tempo de reação (10 a 120 min), a presença de diferentes metais no meio de reação, bem como determinada a constante de Michaelis-Menten e a energia de ativação pela lei de Arrhenius.

Palavras-chave: atividade enzimática, termoestabilidade, biorremediação, fenol hidroxilase, catecol 1,2-dioxigenase.

Abstract

Phenolic compounds are toxic to most microorganisms, making their use in bioremediation process, so that the use of enzymes has become a good alternative to degradation of these contaminants. The objective of this study was to characterize the catalytic properties of enzymes phenol hydroxylase (PHO) and catechol 1,2-dioxygenase (C 1,2D), produced by *Microbacterium oxydans* BLB-2 and BLB-4. For that tested different pH ranges (4.5 to 9.0), temperature (10 to 110 °C), reaction time (10 to 120 min), the presence of different metals in the reaction, as well as the Michaelis - Menten and the activation energy by Arrhenius law. It was observed that the enzymes produced by BLB-2 did not have good stability as a function of reaction time. All enzymes were active in a wide range of pH and resist the high temperatures. It was also observed that some of the metal ions tested completely inhibited the catalytic action of enzymes, making it difficult to use

freely in the environment. It was observed that the values of the Michaelis-Menten and the activation energy were not in complete agreement with other authors. Thus, we conclude that all the enzymes presented here could be used in wastewater treatment.

Key-words: enzymatic activity, thermostability, bioremediation, phenol hydroxylase, catechol 1,2-dioxygenase

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são provenientes de fontes naturais e antropogênicas, sendo essas últimas as mais preocupantes. Grandes concentrações destes contaminantes são sintetizadas por diversos tipos de indústrias, como de alimentos, têxtil, de aço, química, petroquímica, de papel, do curtimento do couro, entre outros. O fenol pode causar sérios riscos à saúde humana, podendo afetar também a flora e a fauna. A síntese desses compostos tóxicos por processos industriais representam, portanto, um sério risco para o ambiente, sendo de muito interesse o conhecimento das reações enzimáticas envolvidas na degradação e descontaminação dos ambientes impactados (Enroth et al., 1988).

Baixas concentrações de fenóis são tóxicas para a maioria dos micro-organismos (Léonard & Lindley, 1999), principalmente aos não adaptados, por ocorrer sensibilização da membrana citoplasmática, tendo agravamento desse efeito com o aumento da concentração deste composto (Komarkova et al., 2003). Quando há uma alta concentração do contaminante no ambiente, os micro-

organismos não são eficientes para removê-los, pois sofrem com a toxicidade do composto, sendo inativados. No entanto, muitos micro-organismos têm capacidade de degradar compostos aromáticos e quando utilizados em processos de degradação, normalmente levam a mineralização total do contaminante (Pradhan & Ingle, 2007), mas apresentam limitações quanto à concentração do composto tóxico.

Devido a isso, os processos de biorremediação que utilizam enzimas vem ganhando espaço, devido a diversas vantagens, como a possibilidade de serem utilizadas em materiais recalcitrantes, em diversas concentrações do contaminante, numa grande faixa de pH e temperatura, eliminando a necessidade de aclimatação da biomassa, com uma maior facilidade de controle do processo (Durán & Esposito, 2001).

A via aeróbia da biodegradação de fenol pelos micro-organismos, ocorre inicialmente pela conversão desse composto a um catecol correspondente, pela ação de uma fenol hidroxilase (PHO). O catecol formado pode ser metabolizado por duas vias, através da ação de enzimas dioxigenases. Estas enzimas têm a capacidade de converter compostos aromáticos em intermediários, no entanto, a bactéria *Microbacterium oxydans* sintetiza apenas a enzima intradiol, a catecol 1,2-dioxigenase (C 1,2D), a qual metaboliza o catecol pela via orto, formando do ácido cis,cis-muconato que pode ser metabolizado ao ciclo de Krebs (Cai et al., 2007; Gurujeyalakshmi & Oriel, 1988; Sala-Trepat & Evans, 1971; Schie

& Young, 2000, Vetting & Ohlendorf, 2000). Com isso, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar as condições de uso das enzimas PHO e C 1,2D, expressadas pelas bactérias *M. oxydans* BLB-2 e BLB-4, com o intuito de fornecer subsídios para viabilizar seu uso em processos de biorremediação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados no presente trabalho foram as bactérias *Microbacterium oxydans* EU373400.1 (BLB-2) e *Microbacterium oxydans* AJ717356.1 (BLB-4), isoladas de serragem de couro, provenientes de um curtume da região de estudo, por técnica de enriquecimento, tendo o fenol como única fonte de carbono e energia e após ser restabelecida sua capacidade degradativa por pressão seletiva. Este isolamento foi realizado no laboratório de Biorremediação, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil e a identificação foi realizada na Auburn University at Montgomery, USA, pela técnica de amplificação do 16 S ribossomal RNA, por PCR.

2.2 Enzimas

Foram realizados o cultivo das bactérias *M. oxydans* BLB-2 e BLB-4 em meio nutritivo, adicionado de 250 mg L⁻¹ de fenol, em agitador orbital à 190 rpm, 30

°C, durante 48 h. As enzimas PHO e C 1,2-D, foram obtidas pelo rompimento celular. Para isso as células foram separadas do meio de cultivo por centrifugação e lavadas duas vezes com tampão fosfato pH 7,0 gelado e ressuspendidas no mesmo tampão. A escolha do tampão e de sua concentração molar foi de acordo com o ensaio que estava sendo realizado, 10 mM para PHO e 50 mM para C 1,2-D sendo que a faixa de pH determinava o tipo de tampão escolhido (tampões acetato (4,0 a 6,0), fosfato (6,5 a 7,0) e Tris-HCl (7,5 a 9,0)). As células foram rompidas com um sonicador (550 Sonic Dismembrator, Fischer Scientific, Pittsburgh, PA.), sendo aplicado seis vezes, com pulsos de 30 s à 70 W cada. Os sonicados foram centrifugados à 10000 rpm à 4 °C, durante 15 min, de acordo com Alexievaa et al. (2004). O extrato enzimático cru foi centrifugado (5000 rpm, a 5°C, por 15 min), para obtenção do extrato celular.

2.3 Ensaio enzimáticos

A atividade da enzima PHO foi determinada pela diminuição da absorbância à 340 nm pela oxidação do NADPH e formação de catecol correspondente (Jones et al., 1995), preparando o substrato em tampão fosfato 10 mM (pH 7,0). Os 3 mL da mistura da reação para esta enzima continham fenol 0,1 mM, EDTA 1,33 mM, tampão fosfato 10 mM e extrato cru. A atividade da enzima C 1,2D foi determinada pelo monitoramento do aumento da absorbância pela formação do ácido cis,cis-muconato à 260 nm (Varga & Neujahar, 1970). O

substrato para esse ensaio foi preparado em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). A mistura da reação continha 3 mL de 0,5 mM de catecol, mercaptoetanol 0,15 mM, tampão Tris-HCl 50 mM e extrato cru. Ambos os ensaios foram realizados utilizando o espectrofotômetro Bioespectro SP-220. Os ensaios foram realizados à 30 °C, de forma estática. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima requerida para catalisar a formação de 1 mM de catecol ou cis,cis-muconato, por min. A atividade específica foi calculada como unidade enzimática por mg de proteína. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford, usando Serum Albumina Bovina como padrão (Bradford, 1976).

2.4 Tempo de reação, efeito do pH e estabilidade térmica

Os ensaios para determinar o tempo ótimo e a estabilidade da atividade enzimática em função do tempo de reação foram realizados durante 120 min, à 30 °C, em intervalos de 10 min. Os ensaios de atividade enzimática em função do pH, foram realizados numa faixa de pH de 4,0-9,0, usando tampões na concentração de 10 mM para os ensaios da PHO e 50 mM para os da C 1,2D, utilizando os tampões acetato (4,0 a 6,0), fosfato (6,5 a 7,0) e Tris-HCl (7,5 a 9,0), na concentração molar requerida para cada ensaio. A estabilidade térmica das enzimas foi avaliada, utilizando-se diferentes temperaturas (10 – 110 °C), e a atividade enzimática determinada após 30 min de reação.

2.5 Influência de íons metálicos no meio de reação

Os efeitos da presença de íons metálicos no meio de reação da PHO e C 1,2D foram determinados utilizando tampões adequados aos ensaios das enzimas estudadas, contendo sulfato de cobre, cloreto de magnésio, cloreto de mercúrio, cloreto de manganês, acetato de potássio, cloreto de ferro nas concentrações de 1 mM e cloreto de mercúrio e sulfato de amônio, nas concentrações de 10 mM.

2.6 Cinética enzimática e energia de ativação

Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten (1913) das enzimas PHO e C 1,2D foram determinadas usando diferentes concentrações iniciais de fenol (150 a 0,5 mM) e catecol (100 a 0,5 mM) para a bactéria BLB-2 e as concentrações iniciais de fenol de (150 a 0,1 mM) e de catecol de (50 a 0,1 mM) para a bactéria BLB-4. Estes parâmetros foram calculados utilizando um *Lineweaver Burk plot*, com o *Software* SigmaPlot 10.0. Para o cálculo da energia de ativação, foi utilizado a Lei de Arrhenius. Todas as reações realizadas para a mesma enzima utilizaram o mesmo extrato enzimático crú.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Tempo de reação, efeito do pH na atividade enzimática e estabilidade térmica

Os resultados dos ensaios que determinaram o melhor tempo de reação para as enzimas PHO e C 1,2D, para ambas as bactérias, são apresentados na FIGURA 12. Pôde-se observar que para a bactéria *M. oxydans* BLB-2 o melhor tempo de reação para a enzima PHO foi de 10 min, apresentando atividade específica de $0,3411 \text{ U mg}^{-1}$. Após esse tempo a atividade enzimática decresceu gradativamente até cerca de 5 % da atividade inicial, aos 120 min de ensaio. Para a enzima C 1,2D, foi observado um pico de atividade enzimática entre os tempos de 20 e 30 min ($0,1460 \text{ U mg}^{-1}$), sendo observado após esse tempo um decréscimo gradativo na atividade desta enzima. Esses resultados mostram que ambas enzimas produzidas por esta bactéria alcançam rapidamente o pico de máxima atividade, mas que não permaneceram estáveis por muito tempo, nas condições em que foram testadas ou são degradadas por proteinases que podem estar sendo produzidas pela própria bactéria.

Os ensaios da estabilidade das enzimas produzidas pela bactéria *M. oxydans* BLB-4 em função do tempo mostraram que em 10 min de reação a enzima PHO já apresentou 87 % da máxima atividade enzimática obtida neste ensaio. A maior atividade encontrada para esta enzima foi no tempo de 70 min de

reação ($0,0033 \text{ U mg}^{-1}$), mantendo-se mais ou menos constante após esse tempo. A enzima C 1,2D teve sua atividade enzimática aumentada em função do tempo de reação, tendo o pico da atividade máxima aos 110-120 min de ensaio ($0,1514 \text{ U mg}^{-1}$).

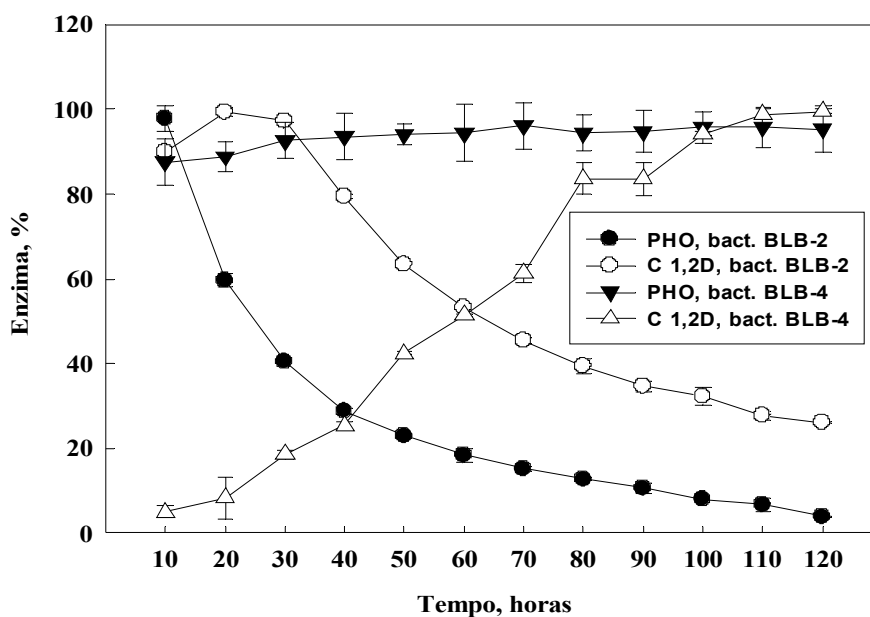


FIGURA 12: Efeito do tempo de reação na atividade das enzimas PHO à $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ pH 7,0 e C 1,2D à $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 8,0, produzidas pelas bactérias *M. oxydans* BLB-2 e BLB-4.

A partir destes resultados foi possível observar, que ambas enzimas produzidas pela bactéria BLB-4 apresentaram boa estabilidade a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por um tempo de 2 h de ensaio, mostrando-se superiores às enzimas produzidas pela bactéria BLB-2 em termos de estabilidade, no entanto a PHO produzida pela bactéria BLB-2 apresentou atividade enzimática específica bastante superior à

apresentada pela mesma enzima produzida pela bactéria BLB-4. A atividade da C 1,2D expressada por ambas bactérias praticamente não apresentou variação na atividade específica para estes ensaios. Há relatos que a C 1,2D produzida por *Pseudomonas aeruginosa* ficou estável, mesmo após 60 min de incubação, na temperatura de 40 °C, pH 7.0 (Wang et al., 2006), mostrando boa estabilidade em função do tempo, semelhante ao apresentado neste estudo pela bactéria BLB-4.

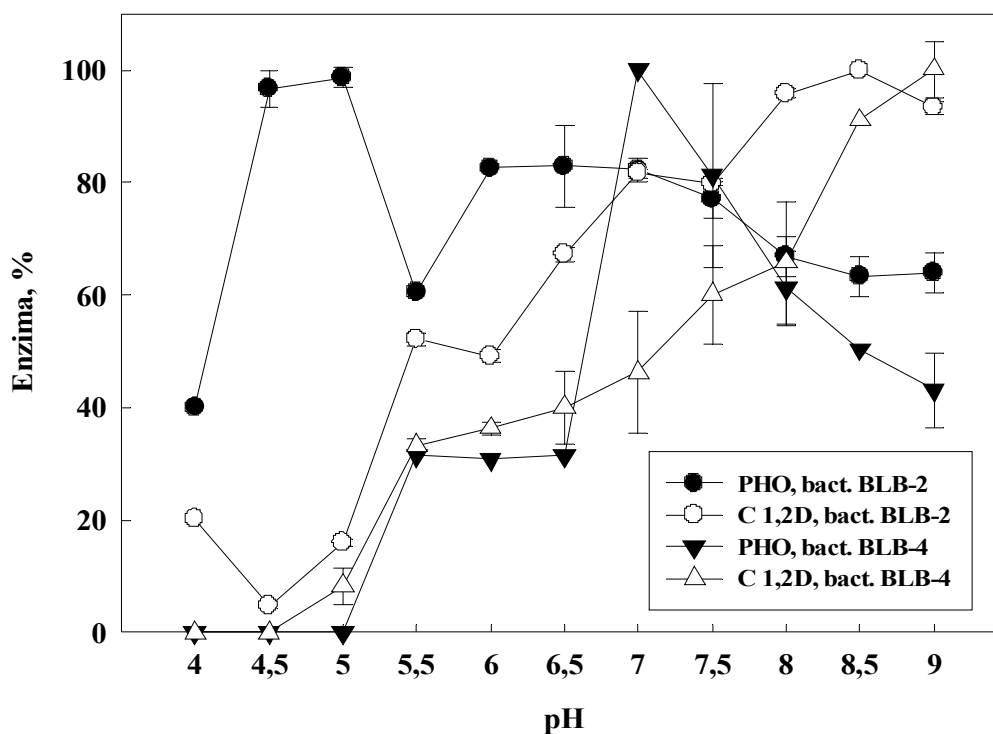


FIGURA 13: Efeito do pH na atividade das enzimas PHO à 30 °C, pH 7,0 após 30 min de reação e C 1,2D à 30 °C, pH 8,0 após 30 min de reação, produzidas pelas bactérias *M. oxydans* BLB-2 e BLB-4.

A máxima atividade observada para as enzimas produzidas pela bactéria *M. oxydans* BLB-2 foi na faixa de pH de 4,5 a 5,0 para a enzima PHO apresentando atividade específica de $0,1788 \text{ U mg}^{-1}$, tendo uma redução de 40 % da máxima atividade no pH de 5,5 (FIGURA 13). Foi observado um novo aumento da atividade desta enzima para pHs maiores que 5,5, cerca de 80 % da atividade máxima, até o pH 7,0, apresentando uma nova redução acima deste pH. A C 1,2D comportou-se de forma diferente, apresentando uma redução de quase 100 % de atividade enzimática no pH 4,5. Houve um aumento gradativo da atividade, até ocorrer o pico máximo no pH 8,5 ($0,1157 \text{ U mg}^{-1}$). Já as enzimas produzidas por *M. oxydans* apresentaram pH ótimo de atuação diferente das enzimas produzidas por *M. oxydans* BLB-2, onde a PHO apresentou atividade na faixa de pH de 5,5-9,0, com um ótimo no pH 7,0, apresentando atividade específica para esta enzima de $0,0052 \text{ U mg}^{-1}$. A enzima C 1,2D também apresentou atividade para a mesma faixa de pH, com um ótimo no pH 9,0 ($0,0471 \text{ U mg}^{-1}$). O decaimento da atividade enzimática pode ter ocorrido provavelmente por estar em torno do ponto isoelétrico das enzimas. Em estudo anterior foi apresentado o ponto isoelétrico para a C 1,2D produzida por *Acinetobacter radioresistens*, que se apresentou em torno do pH 5,0 (Briganti et al., 1997), ficando próximo ao pH onde houve a queda de atividade, apresentada pela mesma enzima, produzidas pelas bactérias utilizadas neste trabalho.

Os resultados encontrados neste trabalho são bastantes promissores devido ao fato das enzimas atuarem em uma ampla faixa de pH, sendo que as enzimas sintetizadas pela bactéria *M. oxydans* BLB-2 apresentaram maior tolerância à variação de pH (4,0 a 9,0) e também maior atividade específica para ambas enzimas, do que as enzimas expressadas pela bactéria BLB-4. Outro aspecto interessante foi o pH ótimo de atuação, que divergiu entre as mesmas enzimas produzidas pelas duas bactérias estudadas, verificando-se que se forem utilizadas em conjunto, haveria a possibilidade de aumentar a eficiência do extrato enzimático, devido a este apresentar uma maior faixa de atuação de pH. As diferentes respostas ao pH apresentado pelas diferentes enzimas utilizadas neste trabalho pode ter sido devido à trocas no pH influenciarem na ligação do substrato ou na atividade catalítica das enzimas, pois podem alterar o estado de ionização dos aminoácidos, que podem ser diferentes, entre as enzimas expressadas pelas duas bactérias. Entretanto, isso só seria evidenciado fazendo-se um seqüenciamento de todas as enzimas aqui estudadas.

O pH ótimo da PHO expressada pela bactéria BLB-4 está próximo ao relatado em estudos anteriores, que foi de 7,4 e 7,6 para PHO produzida por *Candida tropicalis*, com a reação ocorrendo à 37 °C, embora esta enzima não tenha apresentado atividade até o pH 6,0 (Pacá et al.,2007). O pH ótimo para PHO produzida por *Trichosporum cutaneum*, *in vitro* e *in situ*, foi de 7,5, realizando-se o ensaio entre as temperaturas de 22 e 30 °C, sendo que a enzima

foi ativa do pH 6,5 a 8,5 (Mörtberg & Neujahr, 1988). Estes resultados mostraram que o pH ótimo da PHO de *M. oxydans* BLB-2, divergiu do pH ótimo apresentado por outros micro-organismos, e ambas bactérias aqui estudadas cresceram em uma faixa mais ampla de pH.

O pH que proporcionou maior atividade para a C 1,2D, produzida por ambas bactérias, estão próximos à relatos da literatura. Foi observado que C 1,2D produzida por *Rhodococcus* sp An-22 crescendo em anilina, apresentou atividade numa faixa de pH de 7,5 a 11,6, com atividade máxima no pH de 8,5. A mesma bactéria crescendo em L-malato, apresentou parâmetros iguais, embora que neste caso o pH ótimo foi de 8,0 (Matsumura et al., 2004), mostrando que o meio de cultivo influenciou nos parâmetros de reação dessa enzima. A C 1,2D purificada, produzida por *Acinetobacter radioresistens*, também apresentou pH ótimo semelhante, tendo um platô de atividade máxima na faixa de pH de 6,0 a 8,5, na temperatura de 37-47 °C (Briganti et al., 1997).

Já a C 1,2D de *Pseudomonas putida*, apresentou atividade ótima no pH 7,0 a 30 °C (Kalogeris et al., 2006), divergindo tanto dos resultados apresentados neste trabalho, quanto dos outros relatos encontrados na literatura. Foi possível observar a partir desses resultados, que a C 1,2D apresentou uma ampla faixa de ação em diferentes pHs, no entanto, a enzimas C 1,2D utilizadas neste trabalho, apresentaram novamente uma maior faixa de atuação.

Foi possível observar para a bactéria BLB-2 que ambas enzimas apresentaram boa estabilidade térmica, sendo a PHO ativa até a temperatura de 100 °C, sendo inativada à 110 °C e a C 1,2D foi ativa até a temperatura de 90 °C, sendo inativada totalmente à temperatura de 100 °C (FIGURA 14). A faixa de temperatura de 50-60 °C foi a que mais influenciou a reação da PHO produzida por *M. oxydans* BLB-2, apresentando atividade específica em torno de 0,1411 U mg⁻¹. Acima destas temperaturas foi observada diminuição constante na atividade enzimática.

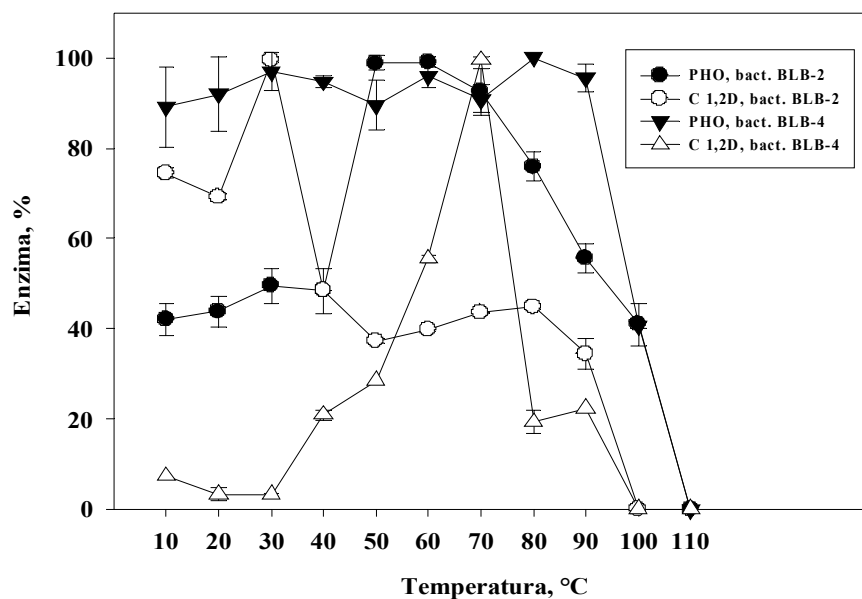


FIGURA 14: Efeito da temperatura na atividade das enzimas PHO à 30 °C após 30 min de reação e C 1,2D à 30 °C após 30 min de reação, produzidas pelas bactérias *M. oxydans* BLB-2 e BLB-4.

Para a C 1,2D o pico de atividade máxima foi observado na temperatura de 30 °C (0,0694 U mg⁻¹), ambas verificadas após 30 min de reação, apresentando uma queda gradativa para temperaturas superiores a esta. O estudo da estabilidade térmica mostra que as enzimas produzidas pela bactéria *M. oxydans* BLB-4, também não são sensíveis à altas temperaturas, apresentando alta atividade enzimática até 90 °C e 70 °C, respectivamente. A 100 °C, quase 60 % da atividade enzimática da PHO foi perdida e à 110 °C a enzima foi totalmente inativada, apresentando a máxima atividade na temperatura de 80 °C, com atividade específica de 0,041 U mg⁻¹. A C 1,2D, teve redução de cerca de 80 % da sua atividade à 80 - 90 °C, apresentando um ótimo a 70 °C (0,271 U mg⁻¹), ficando totalmente inativa a 100 °C.

A partir desses resultados foi possível constatar novamente que a atividade específica da enzima PHO foi superior para a enzima produzida pela bactéria BLB-2, no entanto a temperatura influenciou melhor a atividade da enzima C 1,2D produzida pela bactéria BLB-4, verificando-se um aumento bastante considerável na atividade desta enzima, na temperatura de 70 °C.

Estudo anterior mostrou que a temperatura ótima encontrada para a C 1,2D, produzida por *Pseudomonas putida*, era igual a temperatura ótima, encontrada para a enzima sintetizada pela bactéria BLB-2 no presente trabalho (30 °C), havendo queda da atividade em temperaturas superiores a 40 °C (Kalogeris et al., 2006). Outros três trabalhos apresentaram temperatura ótima

para C 1,2D acima da temperatura relatada, onde a enzima produzida por *Acinetobacter radioresistens*, apresentou temperatura ótima na faixa de 37-47 °C (Briganti et al., 1997) e a enzima produzida por *Pseudomonas aeruginosa* foi na temperatura de 40 °C (Wang et al., 2006). A C 1,2D produzida por *Rhodococcus* sp An-22 crescendo em anelina e L-malato, apresentaram a melhor atividade e termoestabilidade na temperatura de 45 °C (Matsumura et al., 2004). Mesmo que as enzimas estudadas neste trabalho tenham apresentado temperatura ótima diferente da maioria dos estudos encontrados na literatura, percebeu-se que a C 1,2D produzida por *M. oxydans* BLB-2 e BLB-4, apresentaram uma faixa de atuação maior, permanecendo ativa em altas temperaturas (até 90 °C).

Não foram encontrados trabalhos com estudo da temperatura ótima de atuação da enzima PHO, no entanto observou-se que esta também era uma enzima que permanecia ativa até altas temperaturas (100 °C) e apresentou temperatura ótima em uma faixa considerada bastante elevada (50-60 °C) para a bactéria BLB-2. Estes resultados mostraram que todas as enzimas estudadas eram termoestáveis. Trabalho anterior constatou que provavelmente as enzimas produzidas por *Bacillus thermoglucosidasius* deviam apresentar um ótimo em torno de 65 °C, já que esta bactéria degradava fenol pela meta clivagem, nesta faixa de temperatura (Duffner et al., 2000). Com isso, constatou-se que haviam poucos relatos de enzimas e micro-organismos termófilos utilizados na degradação de fenol. A termoestabilidade foi uma característica bastante

importante encontrada para estas enzimas, pois quando as enzimas atuam em biorreatores, se elas atuarem em uma faixa elevada de temperatura, diminui o risco de degradação por micro-organismos da faixa dos mesófilos, que possam estar presentes no meio de reação.

3.2 Efeito da presença de metais na atividade enzimática

Pôde-se observar, a partir dos resultados apresentados, que todos os íons afetaram negativamente a atividade da enzima PHO produzida por *M. oxydans* BLB-2 (FIGURA 15). A presença de Cu^+ e Mg^{2+} reduziram em 30 % a atividade desta enzima e a presença do íon K^+ reduziu em 25 % a atividade enzimática, comparado ao ensaio realizado sem adição dos metais que apresentou uma atividade específica de $0,0648 \text{ U mg}^{-1}$. Quando foram adicionados os outros sais, não foi observado redução na leitura da absorbância, ficando evidente, portanto, que os íons Hg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} e NH_4^{2+} inibiram a reação de conversão do fenol à catecol.

A atividade da enzima C 1,2D produzida pela mesma bactéria foi favorecida na presença dos íons K^+ , Fe^{2+} e NH_4^+ , havendo um acréscimo da atividade enzimática em torno de 3, 15 e 3 %, respectivamente, comparado ao ensaio sem adição dos sais ($0,1351 \text{ U mg}^{-1}$). Os íons que mais afetaram a atividade desta enzima foram o Cu^{2+} que inibiu totalmente a conversão do catecol à ácido cis, cis-muconato e o Mn^{2+} , que diminuiu em 98 % a atividade desta

enzima. Já a presença dos íons Mg^{2+} e Hg^{2+} diminuíram em cerca de 3 % a atividade desta enzima.

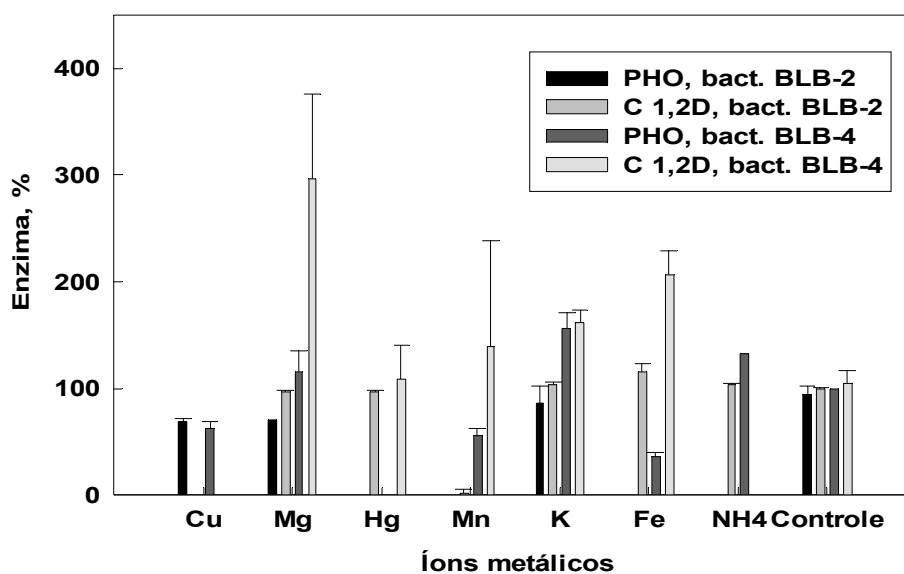


FIGURA 15: Efeito da presença de íons na atividade das enzimas PHO à 30 °C, pH 7,0 após 30 min de reação e C 1,2D à 30 °C, pH 8,0 após 30 min de reação, produzidas pelas bactérias *M. oxydans* BLB-2 e BLB-4.

Foi observado que a enzima PHO produzida pela bactéria BLB-4 teve sua atividade totalmente inibida na presença do Hg^{+2} . Quando foram adicionados os íons Cu^{2+} , Mn^{2+} e Fe^{2+} , houve uma diminuição da atividade desta enzima em cerca de 63, 55 e 36 %, respectivamente. Quando foram adicionados ao meio de reação, os íons Mg^{2+} , K^+ e NH_4^+ , estes proporcionaram um aumento da atividade enzimática em torno de 15, 36 e 32 %. A enzima C 1,2D produzida pela mesma bactéria foi totalmente inibida na presença de Cu^{2+} e NH_4^+ , a adição do Hg^{2+} no

meio de reação praticamente não afetou a atividade desta enzima. No entanto, a presença dos íons Mg^{2+} , Mn^{2+} , K^+ e Fe^{2+} aumentaram em média 197, 39, 62 e 107 % a atividade desta enzima.

Pode-se observar que o Cu^{+2} inibiu totalmente a ação das duas C 1,2D, afetando negativamente também a atividade da PHO, mostrando que a presença desse íon afetaria muito um processo de remoção de fenol. O íon Hg^{+2} inibiu totalmente a ação das enzimas PHO produzidas pelas duas bactérias e afetou negativamente a atividade da enzima C 1,2D produzida pela bactéria BLB-2. Constatou-se então, que a uma provável presença de mercúrio afetaria a etapa inicial de degradação de fenol, impedindo então, a complexação deste composto.

Os íons Mn^{+2} e Fe^{+2} inibiram a atividade enzimática somente da enzima PHO produzida pela bactéria BLB-2, mas ambos os íons favoreceram a ação da enzima C 1,2D produzida pela bactéria BLB-4. O Fe^{+2} favoreceu a ação das duas C 1,2D, mostrando que a presença deste íon estimulou a ação desta enzima, sendo interessante sua utilização em um processo real a fim de estimular a conversão do catecol à ácido cis,cis-muconato. Há relatos na literatura sobre a utilização do ferro na degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos a fim de favorecer a atividade da C 1,2D, pois o ferro é um elemento que desempenha funções celulares essenciais para esta enzima, que estão intimamente relacionadas ao metabolismo desses compostos, como a participação na estrutura

do sistema multicomponente das dioxigenases e como co-fator enzimático (Harayama, 1999).

O íon NH_4^+ inibiu totalmente a atividade da enzima PHO produzida pela bactéria BLB-2 e C 1,2D, produzida pela bactéria BLB-4, mas favoreceu a ação das outras enzimas, mostrando que em um efluente que contivesse amônia poderiam ser utilizadas as enzimas PHO produzida pela bactéria BLB-4 e C 1,2D, produzida pela bactéria BLB-2. O íon Mg^{+2} favoreceu a ação das duas enzimas expressadas pela bactéria BLB-4, mas inibiu a ação das enzimas produzidas pela bactéria BLB-2 e o K^+ favoreceu a ação da PHO produzida pela bactéria BLB-4 e as duas C 1,2D, mostrando que a presença desses metais, no meio de reação, também seriam bastantes promissores.

Sendo assim, verificou-se que estas enzimas precisam atuar sob condições controladas, já que a aplicação direta no meio ambiente prejudicaria a ação de alguma delas, pois alguns íons provavelmente se ligam ao sítio de inibição, interrompendo a ligação do substrato com a enzima. Os outros íons que diminuem ou aumentam a atividade de ambas as enzimas devem, provavelmente, afetar a regulação enzimática, afetando por sua vez, a transformação do substrato pela enzima (Lehninger & Cox, 2002).

Trabalho anterior apresentou resultados para a C 1,2D produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, que estão em parte, de acordo com os resultados aqui apresentados, já que o Cu^{2+} também inibiu a atividade desta enzima, assim como

ocorreu em nosso trabalho. No entanto, a enzima produzida pela bactéria *P. aeruginosa* também foi inibida na presença de Ag^+ e Mn^{2+} (Wang et al., 2006), mostrando que a atuação dos íons nas enzimas tem mais influencia com relação a seqüência de aminoácidos, correspondente ao RNA dos micro-organismos que as estão expressando, do que do tipo de enzima. Logo, esses indicadores devem ser bem investigados para determinar as melhores condições de atuação e fatores que afetam as diversas enzimas produzidas por diferentes micro-organismos.

3.3 Cinética enzimática e energia de ativação

A tendência da mudança da velocidade inicial da reação, de acordo com a concentração inicial do substrato, para todas as enzimas aqui estudadas, estavam de acordo com o modelo de Michaelis-Menten (1913). Devido a isso, foi possível calcular o valor de K_m e de V_{max} para a PHO e C 1,2D, conforme apresentado na TABELA 9, onde se pôde verificar que o K_m para as enzimas PHO e C 1,2D produzidas pela bactéria BLB-2 são bastante inferiores ao K_m apresentado pelas mesmas enzimas, produzidas pela bactéria BLB-4. Isso significa que a velocidade máxima de reação apresentada pelas enzimas da bactéria BLB-2 são atingidas em concentrações menores do substrato do que para as enzimas produzidas pela bactéria BLB-4, o que pode explicar a rápida conversão do substrato observada na FIGURA 10 (item 3.1 do presente capítulo),

que ocorreria nos primeiros minutos de ensaio, para as enzimas produzidas pela bactéria BLB-2.

TABELA 9: Concentração de substrato para qual a velocidade da reação enzimática é metade da velocidade máxima (K_m) e velocidade máxima da reação ($V_{m\acute{a}x}$) das enzimas PHO e C 1,2D, produzidas pelas bactérias *M. oxydans* BLB-2 e BLB-4.

| Bactérias | K_m (mM) | | $V_{m\acute{a}x}$ (mM min ⁻¹) | |
|-------------------------|------------|--------|---|--------|
| | PHO | C 1,2D | PHO | C 1,2D |
| <i>M. oxydans</i> BLB-2 | 0,0152 | 0,0093 | 0,1749 | 0,077 |
| <i>M. oxydans</i> BLB-4 | 7,4416 | 8,6451 | 43,859 | 52,110 |

Um estudo cinético utilizando PHO comercial *in situ*, apresentou K_m de 0,0073 mM e V_{max} de 0,00013 mM min⁻¹ (Mörtberg & Neujahr, 1987). Outro trabalho, apresentado posteriormente (Mörtberg & Neujahr, 1988) pelos mesmos autores, trabalhando com PHO purificada de *Trichosporon cutaneum*, encontrou valor de K_m de 0,03 mM. C 1,2D de *Pseudomonas aeruginosa*, reagindo a 24 °C e pH de 7,5, apresentou valor de K_m de 0,0059 mM (Wang et al., 2006). Em outro estudo foi realizado ensaio para determinar a constante de Michaelis- Menten de C 1,2D no pH de 7,5, produzida por *Streptomyces setonii*, onde foi encontrado um valor de 0,0018 mM (An et al., 2001). Foi observado ainda que o valor de K_m da C 1,2D produzida por *Acinetobacter radioresistens* foi de 0,00324 mM à 25 °C, pH 8.0 (Briganti et al., 1997). Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ encontrados nesse trabalho, para ambas enzimas, divergem dos resultados publicados na literatura, o que pode ser devido ao uso de concentrações maiores de substrato, na faixa de 10³

vezes maior, que as concentrações utilizadas nos outros estudos. Outro motivo da constante de Michaelis-Menten ter divergido entre as diferentes fontes, pode ser devido às enzimas terem sido expressadas por micro-organismos distintos, o que ocasiona diferenças na composição molecular das mesmas.

Quando foi testado o efeito da temperatura na atividade enzimática de ambas as enzimas foram observadas que a máxima atividade enzimática para a enzima PHO ocorreu primeiramente na temperatura de 50 °C e para a enzima C 1,2D à 30 °C. Com estas constatações foram calculadas a energia de ativação de ambas enzimas, a partir da equação de Arrhenius. A energia de ativação da PHO e da C 1,2D produzidas pela bactéria BLB-2 foram determinadas como 5,000 e 8,148 Kcal mol⁻¹, respectivamente. Para a bactéria BLB-4 a energia de ativação da PHO e da C 1,2D foram determinadas como 5,7979 e 2,5583 Kcal mol⁻¹, respectivamente. Mönteberg & Neujahr (1988) constataram que PHO de *Trichosporon cutaneum in situ* apresentou energia de ativação de 5,7834 Kcal mol⁻¹ no pH 7,5, semelhante ao aqui encontrado. A energia de ativação encontrada para C 1,2D, produzida por *Trichosporon cutaneum* apresentou um valor intermediário ao valor calculado para as enzimas investigadas neste trabalho, sendo de 3,57 Kcal mol⁻¹ (Briganti et al., 1997). Com isso, observou-se que foi necessária uma maior energia de ativação para alcançar a máxima atividade da enzima C 1,2D produzida pela bactéria BLB-2 e menor energia pela enzima produzida por *M. oxydans* BLB-4, com relação à enzima apresentada na literatura.

Seriam necessários mais estudos para que os resultados possam ser comparados, levando-se em conta a origem dessas enzimas.

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi observado que as enzimas PHO e C 1,2D produzidas pelas bactérias BLB-2 e BLB-4, isoladas em nosso laboratório, atuaram em um grande faixa de pH (4,5 a 9,0), onde as enzimas produzidas pela bactéria *M. oxydans* BLB-2 não apresentaram boa estabilidade em função do tempo ou foram degradadas por proteases produzidas pelo próprio micro-organismo, comparado às enzimas produzidas pela bactéria BLB-4. Verificou-se também que todas as enzimas eram termoestáveis, já que se mantinham ativas em altas temperaturas, até 100 °C ambas as PHO e as C 1,2D até 90 °C. Constatou-se que a presença de íons metálicos afetava a capacidade catalítica das enzimas, onde alguns inibiram totalmente seu poder catalítico, como o mercúrio que inativou ambas as PHO, devido a ser um metal que causa inibição não competitiva em algumas enzimas. A constante de Michaelis-Menten encontrada para as PHO foram de 0,0152 mM para a bactéria BLB-2 e de 7,4416 mM para a bactéria BLB-4, e para as enzimas C 1,2D de 0,0093 mM para BLB-2 e de 8,6451 mM para BLB-4. A energia de ativação da PHO e da C 1,2D produzidas pela bactéria BLB-2 foi de 5,000 e 8,148 Kcal mol⁻¹, respectivamente e para a bactéria BLB-4 foi de 5,7979 e 2,5583 Kcal mol⁻¹.

REFERÊNCIAS

ALEXIEVAA, Z., GERGINOVA, M., ZLATEVA, P., PENEVA, N. Comparison of growth kinetics and phenol metabolizing enzymes of *Trichosporon cutaneum* R57 and mutants with modified degradation abilities. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 34, p. 242-247, 2004.

AN, H-R., PARK, H-J., KIM, E-S. Cloning and expression of thermophilic catechol 1,2-dioxygenase gene (*catA*) from *Streptomyces setonii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 195, p. 17-22, 2001.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRIGANTI, F., PESSIONE, E., GIUNTA, C. SCOZZAFAVA, A. Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. **FEBS letters**, v. 416, p. 61-64, 1997.

CAI, B-L., WANG, Y., TIAN, Y., HAN, B., ZHAO, H-B., BI, J-n. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. Strain PD12. **J. Environ.**, v. 19, p. 222-225, 2007.

DUFFNER, F.M., KIRCHNER, U., BAUER, M.P., MÜLLER, R. Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. **Gene**, v. 256, p. 215-221, 2000.

DURÁN, N., ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, p. 83-99, 2000.

GURUJEYALEKSHMI, G., OREIL, P. Isolation of phenol degrading *Bacillus stearothermophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, n. 2, p. 500-502, 1988.

HARAYAMA, S. Functional and evolutionary relation among diverse oxygenases. **Annual Review Microbiology**, Washington, v.46, p.565-601, 1992.

JONES, K.H., TRUDGILL, P.W., HOPPER, D.J. Evidence of two pathways for the metabolism of phenol by *Aspergillus fumigatus*. **Arch. Microbiol.**, v. 163, p. 176-181, 1995.

KALOGERIS, E., SANAKIS, Y., MAMMA, D., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D., STAMATIS, H. Properties of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* immobilized in calcium alginate hydrogels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1113-1121, 2006.

KOMÁRKOVÁ, E., PÁČA, J., KLAPKOVÁ, E., STIBOROVÁ, M., SOCCOL, C.R., SOBOTKA, M. Physiological changes of *Candida tropicalis* population degrading phenol in fed batch reactor. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 46, p. 537-542, 2003.

LÉONARD, D.L., LINDLEY, N.D. Growth of *Ralstonia eutropha* on inhibitory concentrations of phenol: diminished growth can be attributed to hydrophobic perturbation of phenol hydroxylase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 271-277, 1999.

MATSUMURA, E., OOI S., MURAKAMI, S. TAKENAKA, S. AOKI, K. Constitutive synthesis, purification, and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from the aniline-assimilating bacterium *Rhodococcus* sp. AN-22. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 2, p. 71-76, 2004.

MICHAELIS, L., MENTEN, M.L. Kinetik der Invertinwirkung **Biochem. Z.**, v. 40, p. 386-387, 1913.

MOLESMY, P., NEUFELD, R.J., GUIOT, S.R. Production of size-controlled gellan gum microbeads encapsulating gasoline-degrading bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 10-18, 2002.

MÖRTBERG, M., NEUJAHN, H.Y. In situ and in vitro kinetics of phenol hydroxylase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 146, n. 1 p. 41-46, 1987.

MÖRTBERG, M., NEUJAHN, H.Y. Activation enthalpies and pH dependence of phenol hydroxylase from *Trichosporon cutaneum*, in vitro and in situ. **FEB 06579**, v. 242, n. 1, p. 75-78, 1998.

NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger Princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. cap. p.

PÁČA, JR.J., KREMLÁČKOVÁ, V., TUREK, M., SUCHA, V., VILÍMKOVÁ, L., PÁČA, J., HAKECKÝ, M., STIBOROVÁ, M. Isolation and partial characterization of cytoplasmic NADPH-dependent phenol hydroxylase oxidizing phenol to catechol in *Candida tropicalis* yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 919-926, 2007.

PRADHAN, N., INGLE, A.O. Mineralization of phenol by a *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample. **Int. Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, p. 103-108, 2007.

SALA-TREPAT, J.M., EVANS, W.C. The meta cleavage of catechol by *Azotobacter* species 4-oxalocrotonate pathway. **Eur. J. Biochem.**, v. 20, p. 400-413, 1971.

SCHIE, P.M., YOUNG, L.Y. Biodegradation of phenol: Mechanisms and applications. **Bioremediation J.**, v. 4, n. 1, p. 1-18, 2000.

VARGA, J.M., NEUJAHN, H.Y. Purification and Properties of Catechol 1,2-Oxygenase from *Trichosporon cutaneum*. **Eur. J. Biochem.**, v. 12, p. 427-434, 1970.

VETTING, M.W., OHLENDORF, D.H. The 1.8 Å crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker. **Structure**, v. 8, p. 429-440, 2000.

WANG, C-L., YOU, S-L., WANG, S-L. Purification and characterization of a novel catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* with benzoic acid as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1594-1601, 2006.

CAPÍTULO VI

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO GERAL

Este trabalho contribuiu para o isolamento de novas cepas de bactérias com capacidade de degradação de fenol, aclimatados à região de estudo, as quais apresentaram alta capacidade de remoção de fenol, mostrando-se promissoras para serem utilizadas tanto em processos de remoção direta de fenol como também, na utilização de suas enzimas. As enzimas expressadas pelas bactérias aqui estudadas, apresentaram uma característica muito importante, a de termoresistência, que é bastante procurada, por diversos pesquisadores, pelo fato de serem enzimas mais eficientes em processos de remoção, quando utilizadas em biorreatores. Esta característica faz com que se diminua a possibilidade de deterioração das enzimas, durante o processo de remoção do contaminante, por micro-organismos mesófilos, devido a possibilidade da utilização de temperaturas de operação elevadas.

Neste trabalho também foi realizado estudo das condições de cultivo dos micro-organismos na degradação de fenol, apresentando os melhores parâmetros a serem utilizados no processo em meio mineral, no entanto, este estudo trouxe informações importantes quanto a utilização desses micro-organismos em condições naturais. Onde, a utilização deles, diretamente em um

lodo ativado de uma indústria, para diminuição da concentração de fenol, seria interessante, embora a concentração de material orgânico, proveniente do processo, poderia causar uma repressão catabólica, diminuindo ou cessando a capacidade de remoção do contaminante tóxico. Assim, a sua utilização deveria ser investigada para cada caso específico.

Foi realizado também a caracterização das enzimas que participavam do processo de degradação, expressadas pelas bactérias estudadas no presente trabalho, onde foi verificado que pouco estudo tem sido realizado na área, neste sentido. Mais estudos devem ser realizados, portanto, para que se tenha um conhecimento profundo da ação destas enzimas, para que as mesmas possam ser utilizadas em situações reais, onde poderão sofrer a ação de vários interferentes. Este tipo de estudo preliminar, auxilia na resolução de problemas operacionais, viabilizando o uso destas enzimas.

Mais estudos devem ser realizados para viabilizar a utilização das bactérias apresentadas neste trabalho, bem como suas enzimas, embora muitos avanços já tenham sido realizados, neste sentido, a partir deste estudo.

5. CONCLUSÃO GERAL

Foram isoladas 6 bactérias com tolerância ao fenol identificadas como dos gêneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Staphylococcus* e *Microbacterium oxydans*, sendo que duas *Microbacterium oxydans* (BLB-2 e BLB-4), tiveram a capacidade de degradação em concentrações muito altas de fenol, 750 e 1000 mg L⁻¹ respectivamente, utilizando a via orto-β-cetoatipato, por apresentar atividade para as enzimas fenol hidroxilase e catecol 1,2-dioxigenase.

Foi realizado isolamento da bactéria *M. oxydans* BLB-4 com capacidade de degradação de fenol, a partir do inóculo que tinha perdido a capacidade de degradação por técnica de enriquecimento.

Pelo que se tem conhecimento este foi o primeiro relato do estudo das condições de cultivo para degradação de fenol, pela bactéria *M. oxydans* BLB-4, sendo constatado que os melhores parâmetros a serem utilizados era a suplementação do MM com 100 mg L⁻¹ de peptona, que favorecia um aumento da taxa de remoção de fenol, não causando repressão catabólica, associada a uma concentração celular inicial suficiente para degradação de fenol (diluir 25 mL de inóculo em 10 mL de MM), no pH 7. Foi também constatado que a bactéria voltou a degradar na mesma faixa de concentração que degradava anteriormente (até 1000 mg L⁻¹), antes de perder a capacidade degradativa, embora utilizando maior tempo de remoção.

No presente trabalho, foi observado que as enzimas PHO e C 1,2D produzidas pelas bactérias BLB-2 e BLB-4, atuaram em um grande faixa de pH (4,5 a 9,0), onde as enzimas produzidas pela bactéria *M. oxydans* BLB-2 não apresentaram boa estabilidade em função do tempo ou foram degradadas por proteases produzidas pelo próprio micro-organismo, comparado às enzimas produzidas pela bactéria BLB-4.

Verificou-se que todas as enzimas eram termoestáveis, já que se mantinham ativas em altas temperaturas, até 100 °C ambas as PHO e as C 1,2D até 90 °C. Constatou-se que a presença de íons metálicos afetava a capacidade catalítica das enzimas, onde alguns inibiram totalmente seu poder catalítico, como o mercúrio que inativou ambas as PHO.

A constante de Michaelis-Menten encontrada para as PHO foram de 0,0152 mM para a bactéria BLB-2 e de 7,4416 mM para a bactéria BLB-4, e para as enzimas C 1,2D de 0,0093 mM para BLB-2 e de 8,6451 mM para BLB-4. A energia de ativação da PHO e da C 1,2D produzidas pela bactéria BLB-2 foi de 5,000 e 8,148 Kcal mol⁻¹, respectivamente e para a bactéria BLB-4 foi de 5,7979 e 2,5583 Kcal mol⁻¹.

REFERÊNCIAS

- AFAL, M., KHALID, Z.M., SAMIA, I., SAKANDAR, R. Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*. **J. Hazard Mater.**, 149, p. 60-66, 2007.
- ALEXIEVAA, Z., GERGINOVA, M., ZLATEVA, P., PENEVA, N. Comparison of growth kinetics and phenol metabolizing enzymes of *Trichosporon cutaneum* R57 and mutants with modified degradation abilities. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 34, p. 242-247, 2004.
- ALVA, V.A., PEYTON, B.M. Phenol and catechol biodegradation by the *Haloalkaliphile Halomonas campisalis*: Influence of pH and Salinity. **Environ Sci Technol.**, v. 37, p. 4397-4402, 2003.
- AN, H-R., PARK, H-J., KIM, E-S. Cloning and expression of thermophilic catechol 1,2-dioxygenase gene (*catA*) from *Streptomyces setonii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 195, p. 17-22, 2001.
- ANDRADE, L.S., LAURINHO, E.A., OLIVEIRA, R.V., ROCHA-FILHO, R.C., CASS, Q.B. Development of a HPLC method to follow the degradation of phenol by electrochemical or photoelectrochemical treatment. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, p. 2, p. 369-373, 2006.
- ANNADURAI, G., LING, L.Y., LEE, J-F. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance phenol degradation by *Pseudomonas putida*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 171-178, 2008.
- ANTIZAR-LADISLAO, B., GALIL, N.I. Biosorption of phenol and chlorophenols by acclimated residential biomass under bioremediation conditions in a sandy aquifer. **Water Research**, v. 38, p. 267-276, 2004.
- ALEMZADEH, I., VOSSOUGH, F., HOUSHMANDI, M. Phenol biodegradation by rotating biological contactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 11, p. 19-23, 2002.
- ALVA, V.A., PEYTON, B. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: Influence of pH and salinity. **Environ. Sci. Technol.**, v. 37, p. 4397-4402, 2003.

ALVES, D.D., MANCIO, A.B. Maciez da carne bovina – uma revisão. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, p. 193-216, 2007.

ASSALIN, M.R., SILVA, P.L., DURÁN, N. Comparison of the efficiency of ozonation and catalytic ozonation (Mn II and Cu II) in phenol degradation. **Química Nova**, v. 29, p. 1, p. 24-27, 2006.

BASTOS, A.E.R., MOON, D.H., ROSSI, A., TREVORS, J.T., TSAI, S.M. Salt-tolerant phenol degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. **Arch. Microbiol.**, v. 174, p. 346-353, 2000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRIGANTI, F., PESSIONE, E., GIUNTA, C. SCOZZAFAVA, A. Purification, biochemical properties and substrate specificity of a catechol 1,2-dioxygenase from a phenol degrading *Acinetobacter radioresistens*. **FEBS letters**, v. 416, p. 61-64, 1997.

BRIDGEN, K. STRINGER, R. LABUNSKS, I. **Poluição por organoclorados e metais pesados associada ao fundidor de ferro da Gerdau em Sapucaia do Sul, Brasil, 2000**. Laboratório de Pesquisa do Greenpeace. Universidade de Exeter. Nota Técnica 21/00, 2000.

BURDON, J. Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic? **Soil Science**, v. 166, n. 11, p. 752-769, 2001.

BURTON, S.G. Development of bioreactors for application of biocatalysts in biotransformations and bioremediation. **Pure Appl. Chem.**, v. 73, n. 1, p. 77-83, 2001.

CÁCERES, T.P., MEGHARAJ, M., MALIK, S., BEER, M., NAIDU, R. Hydrolysis of fenamiphos and its toxic oxidation products by *Microbacterium* sp. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 10, 2732-2736, 2009.

CAI, W., LI, J., ZHANG, Z. The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium* sp. **Journal of Hazardous Materials**, v. 148, p. 38-42, 2007.

CAMARGO, B. Indústria de couro gera problemas ao ambiente e à população., **VOMM Turbo Tecnologia do Brasil**, São Paulo 04, ago. 2006 Disponível em:

<[HTTP://www.vomm.com.br/secao.php?secao=artigo&cod=41](http://www.vomm.com.br/secao.php?secao=artigo&cod=41)>. Consultado em: 23 jan. 2010.

CAPREZ, M.A.C., BORGES, A.L.N., BISPO, M.G., PEREIRA, D. Biorremediação: tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v. 30, n. 179, p. 32-37, 2002.

CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo), Secretaria de Estado do Meio ambiente: **Ficha de informação de produto químico**. Disponível em: <[HTTP://www.cetesb.sp.gov.br](http://www.cetesb.sp.gov.br)>. Consultado em: 24 jan. 2010a.

CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo), Secretaria de Estado do Meio ambiente: **Câmara ambiental da indústria de couros, peles, assemelhados e calçados**. Disponível em: <[HTTP://www.cetesb.sp.gov.br](http://www.cetesb.sp.gov.br)>. Consultado em: 24 jan. 2010b.

CHEN, W., BRÜHLMANN, F., RICHINS, R.D., MULCHANDANI, A. Engineering of improved microbes and enzymes for bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 2, p. 137-141, 1999.

CHEN, W-M., CHANG, J-S., WU, C-H., CHANG, S-C. Characterization of phenol and trichloroethene degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 672-680, 2004.

CHEN, B-Y, YOU, J-W., HSIEH, Y-T., CHANG, J-S. Feasibility study of exponential feeding strategy in fed-batch cultures for phenol degradation using *Cupriavidus taiwanensis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 175-180, 2008.

COSTA, A.J.M.P., MORITA, D.M., SOBRINHO, P.A. Adaptação da biomassa de lodos ativados para elevadas concentrações de fenol e nitrogênio amoniacal. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 5, n. 1, p. 32-36, 2000.

DEGALDILLO, R., RODRIGUEZ-NOGALES, J.M. Stability and catalytic kinetics of microencapsulated β -galactosidase in liposomes prepared by the dehydration-rehydration method. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 33, p. 15-21, 2005.

DEMORI, J., BERTTOLLO, V.R. **Análise Histórica da contaminação por metais pesados na Baía de Babitonga-SC**. Itajaí: UNIVALLI, 2008.

DUFFNER, F., KIRCHNER, U., BAUER, M.P., MÜLLER, R.M. Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: cloning and

sequence analysis of five genes involved in the pathway. **Gene**, v. 256, p. 215-221, 2000.

DURÁN, N., ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 28, p. 83-99, 2000.

EL-NAAS, M.H., AL-MUHTASEB, S.A., MAKHLOUF, S. Biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* immobilized in polyvinyl alcohol (PVA) gel. **J. Hazard Mater.**, v. 164, n. 2-3, p. 720-725, 2008.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUIBAN, J.M., ALI, S., COWAN, D. Immobilization of functionally unstable catechol 2,3-dioxygenase greatly improves operational stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 568-573, 2000.

FIALOVÁ, A., BOSHKE, E., BLEY, T. Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast *Candida maltosa* using BOD measurements. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p. 69-76, 2004.

GALÍNDEZ-MAYER, J., RAMÓN-GALLEGOS, J., RUIZ-ORDAZ, N., JUÁREZ-RAMÍREZ, C., SALMERÓN-ALCOCER, A., POGGI-VARALDO, H.M. Phenol and 4-chlorophenol biodegradation by yeast *Candida tropicalis* in a fluidized bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, p. 147-157, 2008.

GANEM, R.S. **Curtumes: Aspectos Ambientais**. Consultoria Legislativa área IX, Meio Ambiente e Direito Ambiental, Organização Territorial, Desenvolvimento Urbano e Regional, Brasil, jun. 2007.

GARCÍA, I.G., PEÑA, P.R.J., VENCESLADA, J.L.B., MARTÍN, A.M., SANTOS, M.A.M., GÓMEZ, E.R. Removal of phenol compounds from olive mill wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 751-758, 2000.

GARCÍA, I.G., VENCESLADA, B., PEÑA, P.R.J., GÓMEZ, E.R. Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. **Water Research**, v. 31, n. 8, p. 2005-2011, 1997.

GHAZALI, F.M. Bioremediation of petroleum hydrocarbons by microbial consortia. **Process NSF Workshop**, Kuala Lumpur, 2001.

GODJEVARGOVA, T., IVANOVA, D., ALEKSIEVA, Z., BURDELOVA, G. Biodegradation of phenol by immobilized *Trichosporon cutaneum* R57 on modified polymer membranes. **Process biochemistry**, v. 41, p. 2342-2346, 2006.

GÓMEZ-DE-JESÚS, A., ROMANO-BAEZ, F.J., LEYVA-AMEZCUA, L., JUÁREZ-RAMÍREZ, C., RUIZ-ORDAZ, N., GALÍNDEZ-MAYER, J. Biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol in a packed-bed biofilm reactor. **J. Hazard Mater.**, v. 161, p. 1140-1149, 2009.

GURUJEYALEKSHMI, G., OREIL, P. Isolation of phenol degrading *Bacillus stearotherophilus* and partial characterization of the phenol hydroxylase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, n. 2, p. 500-502, 1998.

HAMED, T.A., BAYRAKTAR, E., MEHMETOGLU, U., MEHMETOGLU, T. The biodegradation of benzene, toluene and phenol in a two-phase system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, p. 137-146, 2004.

HAO, O.J., KIM, M.H., SEAGREN, E.A., KIM H. Kinetics of phenol and chlorophenol utilization by *Acinetobacter* species. **Chemosphere**, v. 46, p. 797-807, 2002.

HARAYAMA, S. Functional and evolutionary relation among diverse oxygenases. **Annual Review Microbiology**, Washington, v. 46, p. 565-601, 1992.

HIDALGO, A., JAUREGUIBEITIA, A., PRIETO, M.B., RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, C., SERRA, J.L., LLAMA, M.J. Biological treatment of phenolic industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV – 1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 221-226, 2002.

HILL, G.A., ROBINSON, C.W. Substrate inhibition kinetics phenol degradation by *Pseudomonas putida*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 17, p. 1599-1612, 1975.

HOYOS, S.E.G., MARTINEZ, N.L., RUBIO, F.C., CORMENZANA, A.R. Kinetics of aerobic treatment of olive-mill wastewater (OMW) with *Aspergillus terreus*. **Process Biochem.**, v. 37, p. 1169-1176, 2002.

HSIEH, F-M., HUANG, C., LIN, T-F., CHEN, Y-M., LIN, J-C. Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. **Process Biochem.** v. 43, p. 83-92, 2008.

HU, Z., JIANG, Y., WEN, J., BAI, J., JIA, X., HU, Z. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. **J. Hazard Mater.**, v. 147, p. 672-676, 2007.

JAWETZ, E., MELNICK, J.L., ADELBERG, E.A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A., Vigésima edição, 1998.

JIANG, Y., WEN, J., BAI, J., JIA, X., HU, Z. Biodegradation of phenol at high initial concentration by *Alcaligenes faecalis*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, p. 672-676, 2007.

JONES, K.H., TRUDGILL, P.W., HOPPER, D.J. Evidence of two pathways for the metabolism of phenol by *Aspergillus fumigates*. **Arch. Microbiol.**, p. 163, v. 176-181, 1995.

JUANG, R-S, TSAI, S-Y. Growth kinetics of *Pseudomonas putida* in the biodegradation of single and mixed phenol and sodium salicylate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 31, p. 133-140, 2006.

KACHOURI, F., HAMDY, M. Enhancement of polyphenols in olive by contact with fermented olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. **Process biochemistry**, v. 39, p. 841-845, 2003.

KALOGERIS, E., SANAKIS, Y., MAMMA, D., CHRISTAKOPOULOS, P., KEKOS, D., STAMATIS, H. Properties of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* immobilized in calcium alginate hydrogels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1113-1121, 2006.

KASUGA, I., NAKAJIMA, F., FURUMAI, H. Diversity of catechol 2,3-dioxygenase genes of bacteria responding to dissolved organic matter derived from different sources in a eutrophic lake. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 61, p. 449-458, 2007.

KHLEIFAT, K.M. Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: Effect of carbon starvation and some growth conditions. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2010-2016, 2006.

KIM, J-H., OH, K-K., LEE, S-T., KIM, S-W., HONG, S-I. Biodegradation of phenol and chlorophenols with defined mixed culture in shake-flasks and a packed bed reactor. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1367-1373, 2002.

KO, C-H., CHEN, S-S. Enhanced removal of three phenols by laccase polymerization with MF/UF membranes. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2293-2298, 2008.

KOBAYASHI, F., DAIDAI, M., SUZUKI, N., NAKAMURA, Y. Degradation of phenol in seawater using a novel microorganism isolated from the intestine of *Aplysia kurodai*. **Int. Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 252-254, 2007.

KOMÁRKOVÁ, E., PÁCA, J., KLAPKOVÁ, E., STIBOROVÁ, M., SOCCOL, C.R., SOBOTKA, M. Physiological changes of *Candida tropicalis* population degrading phenol in fed batch reactor. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 46, p. 537-542, 2003.

KHLEIFAT, K.M. Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: Effect of carbon starvation and some growth conditions. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2010-2016, 2006.

LANE, D., 1991. 16S/23S sequencing. In: STACKEBRANDT, E., GOODFELLOW M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. John Wiley and Sons, New York, N.Y, 1991.

LEE, C-M., YANG, C-F. Enrichment, isolation, and characterization of phenol-degrading *Pseudomonas resinovans* strain P-1 and *Brevibacillus* sp. Strain P-6. **Int. Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 206-210, 2007.

LEITÃO, A.L., DUARTE, M.P., OLIVEIRA, J.S. Degradation of phenol by a halotolerant strain of *Penicillium chrysogenum*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 220-225, 2007.

LÉONARD, D.L., LINDLEY, N.D. Growth of *Ralstonia eutropha* on inhibitory concentrations of phenol: diminished growth can be attributed to hydrophobic perturbation of phenol hydroxylase activity. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 271-277, 1999.

LOB, K-C., TAR, P-P. Effect of additional carbon sources on biodegradation of phenol. **Bull Environ. Contam. Toxicol.**, v. 64, p. 756-763, 2000.

LOBATO, E. Trajédia anunciada. **IstoÉ**, São Paulo, 05 abr. 2003. Disponível em: <HTTP:// www.interjornal.com.br>, Consultado em: 25 jan. 2010.

LOH, K.C., WANG, S.J. Enhancement of biodegradation of phenol and a non-growth substrate 4-chlorophenol by medium augmentation with conventional carbon sources. **Biodegradation**, v. 8, p. 329-338, 1998.

LUKE, A.K., BURTON, S.G. A novel application for *Neurospora crassa*: Progress from batch culture to a membrane bioreactor for the bioremediation of phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, p. 348-356, 2001.

MALLICK, S., DUTTA, T.K., 2008. Kinetics of phenanthrene degradation by *Staphylococcus* sp. Strain PN/Y involving 2-hydroxy-1-naphthoic acid a novel metabolic pathway. **Process Biochem.** v. 43, p. 1004-1008, 2008.

MÁSTER, E. R.; MOHN, W. W., Psychrotolerant bacteria isolated from arctic soil that degrade polychlorinated biphenyls at low temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4823-4829, 1998.

MATSUMURA, E., OOI S., MURAKAMI, S. TAKENAKA, S. AOKI, K. Constitutive synthesis, purification, and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from the aniline-assimilating bacterium *Rhodococcus* sp. AN-22. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 2, p. 71-76, 2004.

MICHAELIS, L, MENTEN, M.L. Kinetik der Invertinwirkung **Biochem. Z.**, v. 40, p. 386-387, 1913.

MOHARIKAR, A., PUROHIT, H.J. Specific ratio and survival of *Pseudomonas* CF600 as co-culture for phenol degradation in continuous cultivation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 52, p. 255-260, 2003.

MOLESMY, P., GUIOT, S.R., Neufeld, R.J. Production of size-controlled gellan gum microbeads encapsulating gasoline-degrading bacteria. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 10-18, 2002.

MORRIS, J.M., JIN, S., CRIMI, B., PRUDEN, A. Microbial fuel cell in enhancing anaerobic biodegradation of diesel. **Chem. Eng. J.**, v. 146, p. 161-167, 2009.

MÖRTBERG, M., NEUJAHN, H.Y. In situ and in vitro kinetics of phenol hydroxylase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 146, n. 1 p. 41-46, 1987.

MÖRTBERG, M., NEUJAHN, H.Y. Activation enthalpies and pH dependence of phenol hydroxylase from *Trichosporon cutaneum*, in vitro and in situ. **FEB 06579**, v. 242, n. 1, p. 75-78, 1998.

MOTA, M.C., LEÃO, F.F., OLDONI, A., LUZ, M.L.G.S., GOMES, M.C. LUZ, C.A.S., PEREIRA-RAMIREZ, O. Determinação da viabilidade econômica de uma indústria

de azeite de oliva no Rio Grande do Sul. In: **XVIII CIC, XI ENPOS, I Mostra de Iniciação Científica**, Pelotas: UFPEL, 2009. Pelotas.

NAIR, C.I., JAYACHANDRAN, K., SHANKAR, S. Biodegradation of phenol. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 4951-4958, 2008.

NELSON, D.L, COX, M.M. **Lehninger Princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002. cap. p.

NIU, G-L., ZHANG, J-J., ZHAO, S., LIU H., BOON, N., ZHOU, N-Y. Bioaugmentation of a 4-chloronitrobenzene contaminated soil with *Pseudomonas putida* ZWL 73. **Environ. Pollut.**, v. 157, p. 763-771, 2009.

OBUEKWE, C.O., AL-JADI, Z.K., AL-SALEH, E.S. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. **Int. Biodeterioration & Biodegradation.**, p. 1-7, 2008.

OBUEKWE, C.O., AL-JADI, Z.K., AL-SALEH, E.S. Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwait desert environment. **Int. Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 273-279, 2008.

OKEKE, B.C., PATERSON, A., SMITH, J.E., WATSON-CRAIK, I.A. Aerobic metabolism of pentachlorophenol by spent sawdust culture of 'shiitake' mushroom (*Lentinus edodes*) in soil. **Biotechnol. Lett.**, v. 15, p. 1077-1080, 1993.

OKEKE, B.C., PATERSON, A., SMITH, J.E., WATSON-CRAIK, I.A. Relationships between ligninolytic activities of *Lentinula* species and biotransformation of PCP in sterile soil. **Let. Appl. Microbiol.**, v. 19, p. 284-287, 1994.

PÁCA JR., J., KREMLÁCKOVÁ, V., TUREK, M., SUCHÁ, V., VILÍMKOVÁ, L., PÁCA, J., HALECKÝ, M., STIBOROVÁ, M. Isolation and partial characterization of cytoplasmic NADPH-dependent phenol hydroxylase oxidizing phenol to catechol in *Candida tropicalis* yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 919-926, 2007.

PACHECO, J.W.F. **Curtumes**. CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo), Série Relatório: São Paulo, 2005.

PAPANASTASIOU, A.C. MAIER, W.J. Kinetics of biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate in the presence of glucose. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 24, p. 2001-2011, 1982.

PASSOS, C.T., BURKERT, J.F.M., KALIL, S.J., BURKERT, C.A.V. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. Isolada de um solo contaminado no sul do Brasil. **Quim. Nova**, v. 32, n. 4, p. 950-954, 2009.

PEIXE, T.S., NASCIMENTO, E. S., ROSA, H.V.D. Determinação de fenol urinário por cromatografia em fase gasosa em trabalhadores que utilizam resinas fenólicas em fundições. **Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, abr-jun, 2006.

PEREIRA, J.S.F., KUNZ, A., HOEHNE, L. Degradação de resíduo de fenol por diferentes processos avançados de oxidação (PAOs). In: **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira da Química**, Lindóia-SP, 2006.

PIETRI, J.C.A., BROOKES, P.C. Relationships between soil pH and microbial properties in a UK arable soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1856-1861, 2008.

PRADHAN, N., INGLE, A.O. Mineralization of phenol by a *Serratia plymuthica* strain GC isolated from sludge sample. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 60, p. 103-108, 2007.

SÃO PAULO (Estado). CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo). Secretaria do Meio Ambiente. **Projeto CETESB, GTZ**. Lista Holandesa de Valores 6530, 1-16, 1999.

RIBEIRO, R.R., LIMA, A.P., GINORIS, Y.P., COELHO, M.A.Z. Remoção biológica de fenol e nitrogênio amoniacal de efluentes em reator batelada seqüencial. In: **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, Maringá-PR, 2001.

ROCHA, L.L., CORDEIRO, R.A., CAVALCANTE, R.M., NASCIMENTO, R.F., MARTINS, C.S., SANTAELLA, S.T., MELO, V.M.M. Isolation and characterization of phenol-degrading yeast from an oil refinery wastewater in Brazil. **Mycopathologica**, v. 164, p. 183-188, 2007.

SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

ROSA, S.E.S., CORREA, A.R. **A indústria de curtumes no Brasil**. BNDES Setorial BNDES, Rio de Janeiro, v. 3, p. 1-4, out. 2007.

RYAN, D., LEUKES, W., BURTON, S. Improving the bioremediation of phenolic wastewaters by *Trametes versicolor*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 579-587, 2007.

SALA-TREPAT, J.M., EVANS, W.C. The meta cleavage of catechol by *Azotobacter* Species 4-oxalocrotonate pathway. **Eur. J. Biochem.**, v. 20, p. 400-413, 1971.

SANTOS, A.M.M.M., CORREA, A.R., ALEXIM, F.M.B., PEIXOTO, G.B.T. **Panorama do Setor de couro no Brasil**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, v. 16, p. 57-59, set. 2002.

SANTOS, V.L., LINARDI, V.R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents – identification and degradation potencial. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1001-1006, 2004.

SANTOS, P.M., SÁ-CORREIA, I. Characterization of the unique organization and co-regulation of a gene cluster required for phenol and benzene catabolism in *Pseudomonas* sp. M1. **J. Biotechnol.**, v. 131, p. 371-378, 2007.

SANTOS, E.C., JACQUES, R.J.S., BENTO, F.M., PERALBA, M.C., SELBACH, P.A., SÁ E.L.S., CAMARGO, F.A.O. Anthracene biodegradation and surface activity by an iron-stimulated *Pseudomonas* sp. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 2644-2649, 2008.

SANTOS, V.L., MONTEIRO, A.S., BRAGA, D.T., SANTORO, M.M. Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, n. 2-3, p. 1413-1420, 2009.

SARAVANAN, P., PAKSHIRAJAN, K., PRABIRKUMAR, S. Kinetics of phenol and m-cresol biodegradation by an indigenous mixed microbial culture isolated from a sewage treatment plant. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, p. 1508-1513, 2008.

SEABRA, P.N., MEIO, I.S., SILVA, C.M.M.S. SCRAMIM, S., SPESSOTO, A. **Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria de petróleo. Biodegradação**. Embrapa Meio Ambiente. p. 41-59, Jaguariúna, SP, 2001.

SCHIE, P.M., YOUNG, L.Y. Biodegradation of phenol: Mechanisms and applications. **Bioremediation Journal**, v. 4, n. 1, p. 1-18, 2000.

SCOW, K.M., HICKS, K.A. Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 246-253, 2005.

SHAWABKEH, R., KHLEIFAT, K.M., AL-MAJALI, I., TARAWNEH, K. Rate of biodegradation of phenol by *Klebsiella oxytoca* in minimal medium and nutrient broth conditions. **Bioremediation Journal**, v. 11, n. 1, p. 13-19, 2007.

SHETTY, K.V., SRINIKETHAN, G., RAMANJANEYULU, R. Biological phenol removal using immobilized cells in a pulsed plate bioreactor: Effect of dilution rate and influent phenol concentration. **J. Hazard Mater.**, v. 149, p. 452-459, 2007.

SISINNO, L.S. Disposição em aterros controlados de resíduos sólidos industriais não-inertes: avaliação dos componentes tóxicos e implicações para o ambiente e para a saúde humana. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 2, 2003.

TAMURA, K., NEI, M., KUMAR, S., 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. **Proceedings of the National Academy of Sci. (US)**, v. 101, p. 11030-11035, 2004.

TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI M., KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2008.

THASSITOU, P.K., ARVANITOYANNIS, I.S. Bioremediation: a novel approach to food waste management. **Trends in Food Science & Technology**, v.12, p. 185-196, 2001.

TZIOTZIOS, G., VAYENAS, D.V., LYBERATOS, G., PAVLOU, S., 2008. Modelling of biological phenol in draw-fill reactors using suspended and attached growth olive pulp bacteria. **Int. Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, p. 142-150, 2008.

ULLAH, M.A., KADHIM, H., RASTALL, R.A., EVANS, C.S. Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor*, for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, p. 832-837, 2000.

UNITED STATES (USA). **Toxicological profile for phenol**. U.S. Department of health and human services. Public Health Service. Agency for toxic substances and disease registry. Sept. 2008.

UNITED STATES (USA). Department of Health and Human Services. Public Health Service. **Agency for toxic substances and disease registry**, set. 2008.

VARGA, J.M., NEUJAHN, H.Y. Purification and Properties of Catechol 1,2-Oxygenase from *Trichosporon cutaneum*. **Eur. J. Biochem.**, v. 12, p. 427-434, 1970.

VETTING, M.W., OHLENDORF, D.H. The 1.8 Å crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker. **Structure**, v. 8, p. 429-440, 2000.

VIVAS, A., MORENO, B., GARCIA-RODRIGUEZ, S., BENITEZ, E. Assessing the impact of composting and vermicomposting on bacterial. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 1319-1326, 2009.

WANG, C-L., YOU, S-L., WANG, S-L. Purification and characterization of a novel catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas aeruginosa* with benzoic acid as a carbon source. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1594-1601, 2006.

WANG, Y., TIAN, Y., HAN, B., ZHAO, H-B., BI, J-N., CAI, B-I. Biodegradation of phenol by free and immobilized *Acinetobacter* sp. Strain PD12. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 222-225, 2007.

WATANABE, K. Linking genetics, physiology and ecology: an interdisciplinary approach for advancing bioremediation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 557-562, 2002.

WEI, G., YU, J., ZHU, Y., CHEN, W., WANG, L. Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chysopteru* in mining tailing region. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, p. 111-117, 2008.

WEN, J., LI, H., BAI, J., LANG, Y. Biodegradation of 4-chlorophenol by *Candida albicans* PDY-07 under Anaerobic Conditions. **Chinese J. Chem. Eng.**, v. 14, n. 6, p. 790-795, 2006.

WHITELEY, C.G., LEE, D-J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 291-316, 2006.

YANG, C-F., LEE, C-M. Enrichment isolation, and characterization of phenol-degrading *Pseudomonas resinovorans* strain P-1 and *Brevibacillus* sp. Strain P-6. **Int. Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 206-210, 2007.

ZIAGOVA M., KYRIAKOU G., LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES M. Co-metabolism of 2,4-dichlorophenol and 4-Cl-m-cresol in the presence of glucose as an easily assimilated carbon source by *Staphylococcus xylosus*. **J. Hazard. Mater.**, v. 163, p. 383-390, 2009.

ZIINO, M., CURTO, R.B.L., SALVO, F., SIGNORINO, D., CHIOFALO B., GIUFFRIDA, D., Lipid composition of *Geotrichum candidum* single cell protein grown in continuous submerged culture. **Biosource Technology**, v. 67, p. 7-11, 1999.