

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

**AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO BACTERIANA DO BTEX (BENZENO,
TOLUENO, ETILBENZENO, XILENOS) NA PRESENÇA DE MTBE (METIL TER
BUTIL ETER) E ETANOL**

MARIA JESUS SUTTA MARTIARENA

Orientadora: Prof. Dr. Sueli Teresinha Van Der Sand

Porto Alegre
Setembro/2016

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

**AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO BACTERIANA DO BTEX (BENZENO, TOLUENO,
ETILBENZENO, XILENOS) NA PRESENÇA DE MTBE (METIL TER BUTIL ETER) E
ETANOL**

Maria Jesus Sutta Martiarena
Bacharel em Biologia

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia
Ambiental

Orientadora: Prof. Dr. Sueli Teresinha Van Der
Sand

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil
Setembro/2016

CIP - Catalogação na Publicação

Sutta Martiarena, Maria Jesus
AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO BACTERIANA DO BTEX
(BENZENO, TOLUENO, ETILBENZENO, XILENOS) NA PRESENÇA
DE MTBE (METIL TER BUTIL ETER) E ETANOL / Maria
Jesus Sutta Martiarena. -- 2016.

103 f.

Orientadora: Sueli Teresinha Van Der Sand.

Dissertação (Mestrado) -- 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, 2016.

1. Bacteria, BTEX, MTBE, Etanol. I. Van Der Sand,
Sueli Teresinha, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rio Grande do Sul, ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde e ao Programa de Pós-Graduação de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, em especial á professora Dr. Sueli Teresinha Van Der Sand pela oportunidade de trabalhar no seu Laboratório de Microbiologia Ambiental e pelo constante apoio no desenvolvimento da pesquisa. A escola de engenharia química em especial ao Laboratório de Controle e Instrumentação de Processos do Dr Jorge Otavio Trierweiler e ao doutorando Juliano Antônio Sebben. A todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento do projeto.

Um especial agradecimento para minha mãe Josefina Sutta Martiarena, quem é minha amiga, minha luz em tudo, minha guia, minha mecena. A meu noivo Quimi Vidaurre Montoya por ser meu parceiro de vida, meu suporte em todo momento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO BACTERIANA DO BTEX (BENZENO, TOLUENO, ETILBENZENO, XILENOS) NA PRESENÇA DE MTBE (METIL TER BUTIL ETER) E ETANOL

Autor: Maria Jesus Sutta Martiarena

Orientadora: Prof. Dr. Sueli Teresinha van Der Sand

RESUMO

O petróleo é a principal fonte de energia no mundo, mas alguns de seus derivados podem ser prejudiciais à natureza e à saúde. O BTEX, um derivado do petróleo, é usado em combustíveis, sendo estes a maior causa de contaminação ambiental, pois no transporte ou armazenamento destes ocorrem vazamentos que poluem solo e fontes de água. Como alternativas para diminuir a concentração do BTEX no combustível surgiram os aditivos oxigenados, os quais melhoram a qualidade do combustível e reduzem as emissões de monóxido de carbono. Os aditivos mais comuns são o MTBE e o etanol. No entanto, o MTBE é oncogênico e por isso, alguns países o substituem pelo etanol. Porém, o etanol aumenta a solubilidade do BTEX na água, a migração deste no solo, e diminui sua degradação natural. A degradação destes compostos é possível pela ação de microrganismos nativos. Em vista disto, no presente trabalho, bactérias foram isoladas de uma planta de tratamento de águas residuais da indústria petroquímica, com o objetivo de encontrar bactérias tolerantes com capacidade de degradação do BTEX. Os 30 isolados obtidos foram identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomona*, *Lysinobacterium*, *Neisseria*, *Corynebacterium* e *Leucobacter*. Quinze isolados foram tolerantes ao B, T, E, X, e destes, os isolados 16 e 25 pertencentes ao gênero *Bacillus*, foram testados para a degradação de BTEX, BTEX/MTBE, BTEX/Etanol. A maior porcentagem de degradação foi detectada no tratamento com BTEX seguido por BTEX/MTBE e BTEX/Etanol. O isolado 25 mostrou maior capacidade de degradação dos compostos.

Palavras chaves: Microrganismos, Degradação, BTEX, MTBE, Etanol.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (87 p.) Setembro, 2016.

**BACTERIAL ASSESSMENT OF BTEX (BENZENE, TOLUENE,
ETHYLBENZENE, AND XYLENES) DEGRADATION IN THE PRESENCE OF
MTBE (METHYL TERT-BUTYL ETHER) AND ETHANOL**

Author: Maria Jesus Sutta Martiarena

Advisor: Prof. Dr. Sueli Teresinha Van Der Sand

ABSTRACT

Oil is the main source of energy in the world; nevertheless, some of its derivatives could be harmful to the environment and health. BTEX is a petroleum derivative. It is used in fuels; this one is the main cause of environmental pollution, because during the transport or storage of them there are leaks that pollute the soil and water sources. In order to reduce BTEX concentration in fuel, oxygenated additives emerged; these improve the quality of the fuel and reduce carbon monoxide emissions. The most common additives are MTBE and ethanol. Due to fact that MTBE is oncogenic, some countries replace it with ethanol. Ethanol increases the solubility of BTEX in water, its migration in the ground and decreases its natural degradation. The degradation of harmful compounds by action of native microorganisms has proven to be effective. With this purpose, in the current research, bacteria were isolated from a wastewater treatment plant of petrochemical industry, in order to find tolerant bacteria and with ability to degrade BTEX. The 30 isolates obtained were identified as belonging to the genus *Bacillus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Lysinobacterium*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, and *Leucobacter*. Fifteen isolates were tolerant to B, T, E, X, and out them, isolates 16 and 25 belong to genus *Bacillus* were tested for degradation of BTEX BTEX / MTBE, BTEX / Ethanol. The highest percentage of degradation was found in the assay with BTEX followed by BTEX / MTBE and BTEX / Ethanol. Isolate 25 showed the highest capacity of degradation.

Key words: Microorganisms, Degradation, BTEX, MTBE, Ethanol.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (87 p.) September, 2016.

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. REVISAO BIBLIOGRAFICA.	4
3.1 PLANTA DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS	4
3.2 BENZENO (B)	5
3.3 TOLUENO (T)	6
3.4 ETILBENZENO (E)	7
3.5 XILENO (X)	8
3.6 METIL- TERC – BUTILO ÉTER (MTBE)	9
3.7 BTEX	10
3.8 ETANOL COMO COMBUSTÍVEL	12
3.9 BIODEGRADAÇÃO	14
3.10 SEPARAÇÃO EM FASE SOLIDA (SPE)	15
3.11 CROMATÓGRAFO DE GASES	15
4. MATERIAIS E METODOS.	17
4.1 LOCAL DE COLETA.	17
4.2 ENRIQUECIMENTO DA AMOSTRA.	17
4.3 SEMEADURA DAS AMOSTRAS.	18
4.4 PRESERVAÇÃO DAS CULTURAS BACTERIANAS.	19
4.5 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS BACTERIANOS.	19
4.6 CURVA DE CRESCIMENTO MICROBIANO	19
4.7 TESTE DE TOLERÂNCIA DAS BACTÉRIAS PARA O BTEX, MTBE E ETANOL.	20
4.8 DETERMINAÇÃO DA DEGRADAÇÃO BACTERIANA DO BTEX NA PRESENÇA DE	

MTBE E ETANOL.	21
4.8.1 TESTE DE DEGRADAÇÃO DO BTEX.	21
4.8.2 SEPARAÇÃO EM FASE SOLIDA (SPE)	22
4.8.3 CROMATOGRAFIA GASOSA - DETECTOR POR IONIZAÇÃO DE CHAMA (FID)	23
4.9 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR.	26
4.9.1 EXTRAÇÃO DE DNA CROMOSOMAL DOS ISOLADOS.	26
4.9.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).	26
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
<u>5. RESULTADOS</u>	<u>27</u>
5.1 ISOLAMENTO BACTERIANO	27
5.2 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DOS ISOLADOS	30
5.3 CURVA DE CRESCIMENTO	39
5.4 TOLERÂNCIA DAS BACTÉRIAS AO BTEX, MTBE E ETANOL.	47
5.5 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	50
5.6 DETERMINAÇÃO DA DEGRADAÇÃO BACTERIANA DO BTEX EM PRESENÇA DE MTBE E ETANOL	52
<u>6. DISCUSSÃO</u>	<u>75</u>
<u>7. CONCLUSÕES</u>	<u>80</u>
<u>8. REFERENCIAS</u>	<u>81</u>
<u>9. APENDICE</u>	<u>87</u>
9.1 APÊNDICE 1: PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores máximos permitidos na água potável segundo o Ministério de saúde PORTARIA Nº 2.914. _____	12
Tabela 2: Características físico-químicas do BTEX _____	12
Tabela 3: Programação da temperatura do forno do cromatografo. _____	25
Tabela 4: Primers utilizados para a amplificação do 16S rDNA _____	26
Tabela 5: Índices de Diversidade Alfa nos diferentes tipos de enriquecimento (BTEX) _____	29
Tabela 6: Índice de diversidade Beta na comparação entre os dias de Isolamento (10°, 20° e 30° dia) nos diferentes compostos de enriquecimento. Índice de Wilson & Schmida. _____	29
Tabela 7: Índice de diversidade Beta na comparação entre os Diferentes tipos de Enriquecimento (BTEX) no decorrer dos dias. Índice de Wilson & Schmida. _____	29
Tabela 8: Caracterização morfológica e bioquímica dos 30 isolados realizados do enriquecimento. _____	36
Tabela 9: Identificação Bioquímica dos 30 Isolados _____	39
Tabela 10: Equação das retas que relacionam a densidade ótica e o número de UFC para cada um dos Isolados. _____	41
Tabela 11- Equações da curva de calibração com padrões de Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xilenos e MTBE em concentrações de 500, 1000 e 1500ppm. _____	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da localização do Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos (SITEL) - Superintendência da Corsan.	17
Figura 2: Sistema de extração em fase sólida	23
Figura 3: Cromatógrafo de gases SHIMADZU GC Solution versão 2.4	25
Figura 4- Morfologia das colônias bacterianas isolado 1-6.	31
Figura 5- Morfologia das colônias bacterianas isolado 7-12.	32
Figura 6- Morfologia das colônias bacterianas isolado 13-18.	33
Figura 7- Morfologia das colônias bacterianas isolado 19-24.	34
Figura 8- Morfologia das colônias bacterianas isolado 25-30	35
Figura 9: Curva de crescimento dos isolados 1- 6.	42
Figura 10: Curva de crescimento dos isolados 7- 12.	43
Figura 11: Curva de crescimento dos isolados 13- 18.	44
Figura 12: Curva de crescimento dos isolados 19- 24.	45
Figura 13: Curva de crescimento dos isolados 25- 30.	46
Figura 14-Crescimento microbiano em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) dos Isolados tolerantes ao B, T, E e X, nas três concentrações testadas em meio mínimo mineral.	48
Figura 15-Crescimento microbiano em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) dos 15 Isolados em BTEX, MTBE e Etanol no meio mínimo mineral.	49
Figura 16- Posição filogenética dos 15 isolados do trabalho (negrito). Análise baseada no fragmento 16S do gene de RNA ribossômico.	51
Figura 17- Curva de crescimento dos isolados nos três tratamentos testados em meio mínimo mineral.	55
Figura 18: Concentração do B, T, E, X nos três tratamentos testados, na hora 48, 96 e 144, com inoculação dos isolados N°16 e N°25.	56
Figura 19- Cromatograma do tratamento com BTEX 48 horas de incubação: Controle	57
Figura 20- Cromatograma do tratamento com BTEX 48 horas de incubação: A, isolado N°16; B, isolado N°25.	58
Figura 21- Cromatograma do tratamento com BTEX 96 horas de incubação:	

Controle _____	59
Figura 22- Cromatograma do tratamento com BTEX 96 horas de incubação: A, isolado N°16; B, isolado N°25. _____	60
Figura 23-Cromatograma do tratamento com BTEX 144 Horas de incubação: Controle. _____	61
Figura 24- Cromatograma do tratamento com BTEX 144 horas de incubação: A, isolado N°16; B, isolado N°25. _____	62
Figura 25-Cromatograma do tratamento BTEX e MTBE 48 Horas de Incubação: Controle _____	63
Figura 26-Cromatograma do tratamento BTEX e MTBE 48 horas de incubação: A, isolado N°16; B, isolado N°25. _____	64
Figura 27- Cromatograma do tratamento BTEX e MTBE 96 horas de incubação: Controle _____	65
Figura 28- Cromatograma do tratamento BTEX e MTBE 96 horas de incubação: A, isolado N°16; B, isolado N°25. _____	66
Figura 29- Cromatograma do tratamento BTEX e MTBE 144 horas de incubação: Controle _____	67
Figura 30- Cromatograma do tratamento BTEX e MTBE 144 horas de incubação: A, isolado N°16; B, isolado N°25. _____	68
Figura 31- Cromatograma do tratamento BTEX e Etanol 48 horas de incubação: Controle. _____	69
Figura 32- Cromatograma do tratamento BTEX e Etanol 48 horas de incubação: A, isolado 16; B, isolado 25. _____	70
Figura 33- Cromatograma do tratamento BTEX e Etanol 96 horas de incubação: Controle. _____	71
Figura 34- Cromatograma do tratamento BTEX e Etanol 96 horas de incubação: A, isolado 16; B, isolado 25. _____	72
Figura 35- Cromatograma do tratamento BTEX e Etanol 144 horas de incubação: Controle. _____	73
Figura 36- Cromatograma do tratamento BTEX e Etanol 144 horas de incubação: A, isolado 16; B, isolado 25. _____	74

LISTA DE ABREVIACOES

BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xileno.
MTBE	Metil-terc-butil-eter.
DO	Densidade 3tica
UFC	Unidades Formadoras de Col3nia
FID	Detector i3nico em chama
GC	Cromat3grafo de g3s
SPE	Separa33o em fase s3lida

1. INTRODUÇÃO

No mundo inteiro a principal fonte de energia até os dias de hoje é o petróleo e seus derivados. Estes compostos são muito utilizados nas indústrias de transporte, mineração, manufatura e no comércio em geral, e assim se encontram distribuídos no ambiente (Pruden e Suidan, 2004). No entanto, embora tenham grande utilidade para a civilização humana, com o passar do tempo tem se tornado um grande problema ambiental, pois muitos dos derivados do petróleo são altamente prejudiciais para a natureza e para a saúde humana. Entre estes derivados encontra-se o BTEX.

BTEX é o acrônimo dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, que são hidratos de carbono aromáticos voláteis de baixo peso molecular e com alta solubilidade. Estes compostos estão presentes no ambiente, principalmente devido as atividades antropogênicas, tais como, a indústria petroquímica, automotriz, têxtil entre outras. O BTEX encontra-se comumente na natureza pelo fato de serem usados em conjunto na produção de diferentes combustíveis (Xu et al. 2003). Sendo este o maior meio de contaminação ambiental, pois no transporte ou armazenamento destes acontecem vazamentos acidentais. Atualmente os níveis de concentração do BTEX encontrados na natureza estão ao redor de 200mg/L (Zogorski et al.1997), que é um nível considerado tóxico para a saúde, segundo a Agência Internacional de Pesquisas do Câncer, pois pode ocasionar danos no DNA (Chen et al. 2008).

Por estas razões, nas últimas décadas tem aumentado a preocupação como o uso destes compostos e, como consequência, uma busca para diminuir a quantidade destes nos combustíveis. Assim surgiram os chamados aditivos oxigenados que melhoram a qualidade do combustível e reduziram as emissões de monóxido de carbono. Dentre os aditivos oxigenados mais comuns encontram-se os álcoois como o metanol, etanol, isopropil álcool, terc-butil-álcool e também éteres como o éter-metil-terciário

butílico (MTBE), terc-amil-metil-éter (TAME) (Maltoni, 1999). Os aditivos mais comumente usados são o MTBE e o etanol, devido ao fato que estes têm um baixo custo de produção. No entanto, o MTBE tem sido classificado como composto oncogênico pela EPA e por isso, em alguns países o MTBE é substituído pelo etanol com o objetivo de diminuir a poluição. Porém, o etanol é um álcool que aumenta a solubilidade do BTEX na água, e com isso a migração deste no solo. Além disso, o uso do álcool diminui a possibilidade de degradação natural do BTEX, pelo fato de ser um hidrato de carbono de fácil disponibilidade comparado com o BTEX. Portanto, os microrganismos presentes no ambiente utilizam etanol como uma fonte de carbono de fácil disponibilidade e, como consequência o BTEX não é usado permanecendo acumulado na natureza.

Atualmente existem distintas formas para retirar o BTEX do ambiente, alguns métodos são físico-químicos como a utilização de carvão ativado, troca iônica e uso de fentons (Matera et al. 2006). Outros são biológicos como a bioaeração, as biobarreiras e a biodegradação, este último é considerado um método amigável com o ambiente, e tem se tornado cada vez mais importante (Mazeo et al. 2010). Este método utiliza microrganismos para a degradação de diferentes compostos prejudiciais para o ambiente. No presente trabalho, bactérias foram isoladas de águas residuais da indústria petroquímica, com o objetivo de encontrar bactérias tolerantes e com capacidade de degradação do BTEX.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Isolar bactérias de um sistema de tratamento de efluentes petroquímicos e avaliar a capacidade das mesmas para degradar BTEX na presença de MTBE e etanol.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a tolerância dos isolados bacterianos para a presença de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos.
- Avaliar a tolerância dos isolados bacterianos para BTEX, MTBE e etanol 25%.
- Avaliar a capacidade dos isolados bacterianos para degradar BTEX em presença de MTBE e Etanol.
- Avaliar o perfil de degradação por cromatografia gasosa do BTEX pelos isolados bacterianos.
- Identificar as cepas por sequenciamento do 16S DNA ribossomal.

3. REVISAO BIBLIOGRÁFICA.

3.1 Planta de tratamento de águas residuais

O tratamento de água busca garantir que a água captada do meio-ambiente atenda às necessidades humanas e seja isenta de qualquer tipo de poluição e/ou contaminação (Vidal e Campos, 2009). As descargas de águas residuais industriais são constituídas por uma grande variedade de compostos químicos de diferentes características físicas, químicas e biológicas, por exemplo, peso molecular, composição, estrutura, toxicidade e biodegradabilidade (Cokgor et al., 1998). A indústria petroquímica produz águas residuais com uma grande diversidade de compostos como hidrocarbonetos, sólidos dissolvidos, matéria em suspensão, fenóis, amoníaco, sulfuretos e outros compostos. Estas águas devem ser tratadas antes de serem dispensados em fontes naturais de água ou em sistemas de efluentes domésticos (Tovar-León).

Os tratamentos convencionais são compostos geralmente de um tratamento preliminar que consiste da remoção de sólidos grosseiros; tratamento primário, onde acontece a remoção de sólidos sedimentáveis e parte da matéria orgânica; tratamento secundário que é a utilização de microrganismos e mecanismos biológicos para remoção de matéria orgânica e nutrientes e finalmente um tratamento terciário que é um complemento do tratamento secundário e consiste na remoção de poluentes específicos. Nos tratamentos de efluentes industriais acontece o tratamento primário, que pode constar de meios físicos, como tanque decantador ou um separador de fluxo transversal, que tem um princípio de separação gravitacional. Após é aplicado um tratamento secundário, de acordo com a necessidade, que se usa principalmente para a remoção de compostos orgânicos biodegradáveis e os remanescentes do sedimento primário e quando for necessário há inclusão de uma fase biológica, uma vez que a remoção da matéria orgânica ocorre em função de reações bioquímicas. Os sistemas secundários incluem lagoas de

estabilização, filtros biológicos e reatores anaeróbios.

No Rio Grande do Sul a empresa CORSAN- SITEL é encarregada do tratamento de efluentes líquidos oriundo do complexo do Pólo Petroquímico do Sul. Segundo a SITEL: “O sistema de tratamento de efluentes líquidos tem por objetivo gerenciar e executar a prestação de serviços de tratamento de resíduos industriais, utilizando a infraestrutura implantada nos sistemas localizados no Pólo Petroquímico do Sul e no Complexo Industrial da General Motors do Brasil. O sistema de tratamento, é composto por unidades operacionais complexas, incluindo processos físico-químicos e biológicos tais como lodo ativado (com aeração prolongada) e lagoas de estabilização (tratamento terciário através de oito lagoas em série).”

3.2 Benzeno(B)

Benzeno é um hidrocarboneto monoaromático volátil com fórmula química C_6H_6 , conhecido também como benzol, é incolor, cancerígeno e altamente inflamável (McQuarrie et al. 2010). Benzeno é uma molécula não polar, composto por 92.3% de carbono e 7.7% de hidrogênio, relativamente solúvel em água 1.8g/L e solúvel em moléculas polares como clorofórmio, acetona, álcool, e tetracloreto de carbono (EPA 1989).

O benzeno foi descoberto e isolado pela primeira vez do alcatrão de carvão em 1800. Hoje em dia, o benzeno é feito principalmente a partir do petróleo. Devido à sua ampla utilização, o benzeno é classificado como um dos top 20 em volume de produção de produtos químicos produzidos nos Estados Unidos. Além disso, o benzeno é produzido também de maneira natural pelas emissões de gases de vulcões e incêndios florestais (Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2007). Os primeiros usos do benzeno são reportados no século 19 e 20. Nesse período o odor do benzeno foi considerado agradável, e por isso ele teve vários usos cotidianos como loção pós barba, descafeinador do café e desengordurador de metais (John E.

McMurry, 2012). Hoje em dia as pesquisas realizadas têm demonstrado que o benzeno é uma molécula perigosa para a saúde humana e, portanto, o seu uso mudou e passou a ser utilizado como componente de combustíveis para motores, como solvente de gorduras, ceras, resinas, óleos, tintas, plásticos, borracha; na extração de óleos de sementes e nozes; e em impressão por fotogravura. Também utilizado na fabricação de detergentes, explosivos, produtos farmacêuticos, e corantes (Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2007). Desta maneira as pessoas podem ficar expostas ao vapor emissões fugitivas de gasolina na estação de enchimento, no carro e nas garagens das casas.

Há mais de um século tem-se conhecido que a exposição excessiva ao benzeno pode danificar a medula óssea resultando em uma diminuição do número de células circulantes no sangue e, o que pode gerar anemia aplásica; outro resultado da exposição ao benzeno é o desenvolvimento de um ou mais tipos de leucemia (Snyder, 2012).

3.3 Tolueno(T)

O tolueno é um hidrocarboneto monoaromático volátil conhecido também como metilbenzeno, toluol e fenil metano. É um líquido incolor de um odor característico como tiner. Composto de 91.25 % de carbono e 8.75 % de hidrogênio com fórmula química $C_6H_5CH_3$. É mono-substituído, constituído por um grupo CH_3 que está ligado a um grupo fenila, molécula não polar, com baixa solubilidade em água 0.53g/L, no entanto é um bom solvente (Gopinath e Dhanasekar, 2012).

O tolueno está presente na natureza no petróleo bruto e na árvore de tolu (*Myroxylon balsamum*) de onde foi extraído pela primeira vez. Este composto pode ser produzido no processo de fabricação de gasolina e outros combustíveis de petróleo bruto, na produção de coque a partir do carvão e como um subproduto na produção de estireno (WHO Regional Office for Europe, 2000). O tolueno é utilizado como solvente, especialmente para tintas,

gomas, resinas, óleos e como matéria-prima na produção de benzeno, fenol e outros solventes orgânicos, na produção de polímeros e borrachas (Guidelines for Drinking-water Quality, 2004). Em grandes quantidades o tolueno pode causar danos ao sistema nervoso (cérebro e nervos), de maneira temporária, com dores de cabeça, tonturas ou inconsciência; ou de maneira permanente com alterações na coordenação motora, déficit cognitivo e perda de visão e audição. Altos níveis de exposição ao tolueno durante a gravidez podem levar a retardo mental em crianças. Outros efeitos para a saúde que possam suscitar preocupações incluem debilidade do sistema imune, danos no rim, fígado, e sistema reprodutivo (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2015).

3.4 Etilbenzeno(E)

Etilbenzeno é um hidrocarboneto monoaromático volátil, também conhecido como etano fenil e etilbenzol. É um líquido incolor, inflamável com um odor aromático. Composto de 90.51 % de carbono e 9.49 % de hidrogênio com fórmula química $C_6H_5CH_2CH_3$. É uma molécula não polar, com baixa solubilidade em água 0.15g/L., solúvel em álcool, tetracloreto de carbono, éter, e outros solventes orgânicos. O etilbenzeno evapora cerca de 94 vezes mais lentamente do que o éter (<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>).

As fontes primárias de etilbenzeno no ambiente são da indústria do petróleo e da utilização de produtos petrolíferos. Etilbenzeno foi produzido pela primeira vez, em escala comercial em 1930 pela Dow Chemical nos Estados Unidos e pela BASF na República Federal da Alemanha. Na II guerra mundial foi quando a produção de etilbenzeno se desenvolveu enormemente devido a sua grande demanda, pois ele é usado na produção do estireno que é a matéria prima para a fabricação de borrachas para pneumáticos (borracha de butadieno sintética (SBR)). Assim, a produção de estireno se transformou em uma indústria gigante rapidamente. Em 1986, a capacidade de produção anual mundial de etilbenzeno excedeu 14×10^6 toneladas das quais cerca de 40 % foi

produzido na América do Norte (John Wiley e Sons, 2003). Além disso, o estireno também é um intermediário na produção de um grande número de polímeros e copolímeros comercialmente importantes como: poliestireno, borracha de estireno - butadieno (SBR), látex de estireno- butadieno (SBL), estireno acrilonitrilo - butadieno (ABS), estireno e acrilonitrilo (SAN); poliéster insaturado, resinas; e produtos diversos. Tem - se usado também na fabricação de acetato de celulose, antraquinona etílica, ácidos sulfônicos etilbenzeno, óxido de propileno e álcool α - metilbenzilo. O seu uso mais comum é na gasolina onde ele compreende 2% do peso, além disso, está presente como um componente de solventes de hidrocarbonetos, nos xilenos comerciais, pode representar de 6% a 15% do volume (Chevron Phillips Chemical Company, 2007)

Em humanos o etilbenzeno é rapidamente absorvido após a inalação e é quase completamente convertido em metabolitos solúveis, após é excretado principalmente através da urina. A toxicidade oral é baixa. Estudos mostram que o etilbenzeno não apresenta evidencias de genotoxicidade. Ainda não há dados que demonstrem a toxicidade dele em nível reprodutivo (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2010).

3.5 Xileno(X)

O xileno possui três isômeros o m-xileno, o-xileno, e p-xileno, estes são líquidos incolores, inflamáveis com um odor aromático, insolúveis na água, solúvel em álcool, éter, e muitos outros solventes orgânicos (<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>). O xileno comercial possui a mistura dos três isômeros além de ter de 6% a 15% de etilbenzeno. A maior produção de xilenos é feita no refino de petróleo de 6 a 7 milhões de toneladas métricas por ano. Do total da produção de xilenos mistos, aproximadamente 94 % é usado na fabricação dos isômeros o-, m- e p-xileno, onde o p-xileno representa quase o 88% da produção. Os isômeros de xileno são usados na produção de fibras de poliéster e resinas utilizadas em produtos,

tais como tecido, plástico moldado, películas e garrafas de bebidas. Quase o 4% da produção de xilenos, é usado em aplicações de solventes, tais como: tintas e revestimentos. A maior parte da pequena porção remanescente de produção de xilenos mistos é adicionada à gasolina para melhorar as classificações de aumento de octano (Chevron Phillips Chemical LP, 2005).

Os xilenos são liberados para a atmosfera principalmente como emissões fugitivas de diferentes indústrias tais como a petroquímica, as fabricas de produtos químicos, nos gases de escape do automóvel, e por volatilização da sua utilização como solventes. As descargas nos cursos de água são produzidas principalmente pelo derrame, armazenamento e transporte de produtos petrolíferos. Quando os xilenos são liberados nas superfícies de solo ou água eles conseguem se volatilizar na atmosfera. No entanto, baseado na mobilidade destas substâncias no solo os xilenos podem contaminar a água subterrânea, onde podem persistir por meses (Hodgson et al.2000).

A exposição aos xilenos mistos por inalação em humanos está associada á irritação do nariz e da garganta; náuseas, vômitos e desconforto gástrico; irritação ocular ligeira transitória; e efeitos neurológicos (por exemplo, memória de curto prazo prejudicada, tempo de reação diminuída, diminuição da capacidade numérica e alterações no equilíbrio corporal) (ATSDR, 2007).

3.6 Metil- terc – butilo éter (MTBE)

Metil- terc – butilo éter, também conhecido como MTBE, metil- terc – butílico éter, e tBME, é um composto químico fabricado por meio da reação química de metanol e isobutileno. É um líquido volátil, inflamável e incolor que se dissolve em água com bastante facilidade O MTBE é produzido em quantidades muito grandes e é usado como um aditivo de combustível exclusivamente em motores a gasolina. É parte de um grupo de produtos químicos vulgarmente conhecidos como "oxigenados" porque elevam o teor de oxigênio da gasolina (U.S. Environmental Protection Agency (EPA)).

O MTBE foi introduzido pela primeira vez nos anos 1980 como um aditivo nas gasolinas sem chumbo com o objetivo de melhorar a octanagem e diminuir as emissões de monóxido de carbono. Assim, em algumas áreas de Estados Unidos onde há preocupação por poluentes como o CO₂, CO e outros a EPA pode exigir a utilização de MTBE ou etanol (WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 2005). As superfícies de água podem ser contaminadas por derramamentos de gasolina. No entanto, devido à alta volatilidade do MTBE, a maior parte é perdida por evaporação. No entanto, quando há derrames de tanques de armazenamento, ou vazamento o MTBE pode causar graves problemas nas águas subterrâneas, pois ele pode se manter mais persistente (U.S. Environmental Protection Agency, 1991). Concentrações de até 200mg/L foram medidos em águas subterrâneas perto de locais de vazamento de gasolina (Zogorski et al.1997). Segundo estudos realizados por Burns e Melnick (2012) o MTBE é rapidamente absorvido após a inalação ou por via oral e é distribuído no sangue para os principais tecidos, onde ele está associado com a indução de tumores raros e incomuns, podendo causar câncer em vários órgãos.

3.7 BTEX

BTEX é o acrônimo para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos, eles são moléculas monoaromáticas voláteis, poluentes de águas, do solo e do ar e estão comumente associados com o petróleo e a indústria petroquímica (Muffah et al., 2014). O BTEX representa 80% dos compostos orgânicos voláteis (VOCs) nas instalações petroquímicas e contribui em até 59 % (w/w) dos poluentes na gasolina (Fatehifar et al., 2008). Na tabela 2 apresenta as principais características físicas químicas do BTEX.

A alta motilidade desses hidrocarbonetos em sistemas de água e no solo faz deles um dos principais poluentes do ambiente. A motilidade está relacionada a seu baixo coeficiente de partição octano-água, o que leva a uma absorção lenta do solo e, conseqüentemente, um transporte preferencial da

água, favorecendo assim a contaminação de reservatórios de água (Nakhla, 2003). Os compostos BTEX são cancerígenos e neurotóxicos; assim, a Agência de Proteção Ambiental de US classificou-os como poluentes ambientais prioritários, se tornando crítica a sua remoção dos locais poluídos (Dean, 1985). Entre eles, o benzeno é o mais cancerígeno devido à sua elevada volatilidade (coeficiente de distribuição é 0.229 a 25 °C), e maior solubilidade em água em relação a outros compostos aromáticos (0,174% - 0,187%) (Mathura e Majumder, 2010). Na tabela 1 encontram-se os valores máximos permitidos segundo o ministério de saúde do Brasil.

A longo prazo os riscos destes compostos incluem alterações no fígado e efeitos nocivos aos rins, coração, pulmões e sistema nervoso. A exposição humana a estes compostos pode levar a danos no sistema excretor, na genética e na função da medula óssea (Irwin. 1997). Nos últimos anos a frequência de contaminação das águas subterrâneas com hidrocarbonetos, incluindo BTEX, tem aumentado (Reusser et al., 2002). Como consequência aumentou a preocupação pela mitigação de seus efeitos no ambiente, e metodologias alternativas para a degradação destes compostos foram propostas, entre elas, a adsorção, condensação, decomposição térmica, biofiltração e a oxidação fotocatalítica (Laksana et al., 2012).


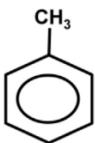
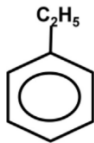
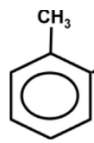
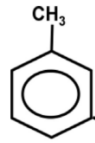
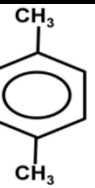
A biorremediação é um método que utiliza organismos para a degradação de compostos contaminantes de solos e das águas subterrâneas (Youngnam et al.2012). A utilização de microrganismos tem provado ser um método amigável, economicamente benéfico e altamente eficiente para remover componentes do petróleo incluindo o BTEX (Atlas e Hazen, 2011). Desde 1908 microrganismos têm sido utilizados para degradar BTEX, o *Bacillus hexabovorum* foi uma das primeiras bactérias que mostrou ter a capacidade de crescer em condições aeróbias num meio contendo tolueno e xileno. Em 1928 Gray e Thornton mostraram que em ambientes naturais como solos os microrganismos têm capacidade de degradação BTEX (Gibson e Subramanian, 1984).

Tabela 1: Valores máximos permitidos na água potável segundo o Ministério de saúde PORTARIA Nº 2.914.

Composto	Unidade	VMP
Benzeno	ug/L	5
Tolueno	mg/L	0,17
Etilbenzeno	mg/L	0,2
Xilenos	mg/L	0,3

VMP: Valor máximo permitido.

Tabela 2: Características físico-químicas do BTEX

Composto	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	o-Xileno	m-Xileno	p-Xileno
Estrutura química						
Peso molecular (g/mol)	78.11	92.13	106.16	106.16	106.16	106.16
Ponto de ebulição (°C)	80.10	110.60	136.20	144.40	139.30	137.00
Ponto de fusão (°C)	5.50	-95.00	-94.97	-25.00	-47.40	13.00
Pressão de vapor (mmHg)	95.19	28.40	4.53	6.60	8.30	3.15
Densidade (g/mL)	0.87	0.87	0.87	0.88	0.87	0.86
Solubilidade (mg/L)	1791.00	535.00	161.00	175.00	146.00	156.00

3.8 Etanol como combustível

O etanol também conhecido como álcool etílico, álcool de cereais, é um líquido incolor e inflamável. É produzido a partir de matérias primas como cana de açúcar e milho, ou a partir de resíduos agrícolas. Uma das características mais importantes do etanol é que os átomos de oxigênio dentro

dele se juntam com a mesma força das moléculas de oxigênio no ar, este fato faz com que o etanol queime mais do que a gasolina. Com o objetivo de melhorar a combustão da gasolina o etanol tem sido usado como aditivo oxigenado e assim se diminuem as emissões nocivas. Um exemplo de combustíveis oxigenados com etanol é o chamado E10, composto de 10 % de etanol e 90 % de gasolina que pode reduzir as emissões de monóxido de carbono em um 25% nos veículos antigos (U.S. Department of Energy, 2016).

O Brasil tem sido um dos maiores produtores mundiais de cana de açúcar ao longo da história. Em 1975, foi criado o Programa Nacional do Álcool-Proálcool com a finalidade de reduzir a grande dependência do petróleo importado e criar um mercado adicional para os produtores de açúcar (Empresa de pesquisa energética, 2008). De todo o etanol produzido, quase 80% é usado como carburante 5% é destinado ao uso alimentar, perfumaria e química e 15% para exportação. Existem dois tipos de etanol usados no combustível: um é o etanol anidro usado para a produção de gasolina C, que é a que pode ser comercializada no território nacional para abastecimento de veículos automotores; o outro é o etanol hidratado usado diretamente no abastecimento de veículos automotores e adquirido pelo consumidor no posto de abastecimento, para os veículos a etanol ou para os veículos com motor Flex-Fuel (União da indústria de cana de açúcar, 2007).

Não obstante o etanol se apresente como uma boa alternativa de combustível é importante assinalar que quando ele é adicionado na gasolina tem a qualidade de aumentar a solvência da gasolina e seus componentes na água. No caso do BTEX, especificamente, existem duas formas de co-solvência a do etanol-BTEX, uma refere-se à diminuição da polaridade da fase aquosa do combustível, o que facilita a dissolução do BTEX, nas águas subterrâneas, a outra se refere a como o etanol afeta o equilíbrio de partição entre o BTEX e as fases dissolvidas da gasolina (Powers, 2001).

3.9 Biodegradação

A biodegradação é o termo geral usado para descrever a conversão biológica de contaminantes orgânicos para produtos que geralmente tem energia livre mais baixa (ASCE, 2004). Dentro dos organismos que podem degradar diferentes compostos no ambiente, encontram-se os fungos, bactérias e archaeas. A biodegradação no ambiente normalmente ocorre primeiro na superfície com o ataque de bactérias, fungos e algas. Uma vez que o processo de degradação inicia na superfície, a velocidade de biodegradação depende em parte da facilidade de colonização da superfície (Dworkin et al. 2006). Mais de 100 espécies representativas de 30 gêneros microbianos tem mostrado capacidade de utilizar ou degradar hidrocarbonetos (Shree Nath Singh, 2012).

Nos últimos anos a frequência de contaminação das águas subterrâneas com hidrocarbonetos incluindo BTEX, tem aumentado (Reusser et al., 2002) e como consequência, a preocupação pela mitigação de seus efeitos no ambiente. Devido a essa preocupação, metodologias alternativas para a degradação destes compostos têm aumentado e, entre elas, a biorremediação de solos e das águas subterrâneas contaminadas por BTEX, tem recebido grande atenção (Youngnam et al., 2012).

A biorremediação *in situ* é aplicada em ambientes contaminados com produtos de petróleo, onde a adição de substâncias adequadas tais como oxigênio e nitrogênio, permitem que as bactérias se desenvolvam e realizem a remediação destes ambientes (Trinidade et al., 2005). Outra alternativa de biorremediação são as barreiras reativas permeáveis (PRB). Esta tecnologia é adequada para o tratamento de águas subterrâneas contaminadas, onde a água contaminada flui através de um material reativo vertical na qual os contaminantes são fisicamente, quimicamente ou biologicamente degradados (Gavaskar, 1999). Alguns outros estudos utilizaram a bioestimulação (adição de nutrientes, doador de elétrons ou acceptor) e a bioaugmentação (adicionando-se estirpes degradadoras) para remediar solos contaminados com hidrocarbonetos do petróleo. Nestes trabalhos foram adicionados, azoto,

fósforo e bactérias degradadoras, os resultados mostraram que a adição de tais bactérias aumenta a remoção de hidrocarbonetos. Além disso, a adição de azoto e de fósforo estimula o crescimento microbiano (Ruberto et al., 2003; Stallwood et al., 2005).

3.10 Separação em fase sólida (SPE)

Para realizar a cromatografia em gases é preciso ter os analitos a ser avaliados, em um solvente volátil e totalmente puro. Por esta razão se realiza uma extração no qual o soluto (analito) é transferido para um solvente volátil. A técnica de extração de fase sólida é um dos mais amplamente utilizadas na preparação de amostras para a análise por técnicas cromatográficas, eletroforéticas e até mesmo espectrofotometria. É essencialmente uma técnica de separação com base no mesmo princípio da cromatografia líquida (Żwir-Ferenc and Biziuk, 2006)

No SPE é passado numa solução (amostra) contendo os analitos de interesse, como por exemplo, hidrocarbonetos alifáticos, sobre uma fase sólida que normalmente é uma coluna pequena de plástico ou vidro contendo sílica ou outro composto específico, e neles os analitos são adsorvidos. Após a adsorção, os hidrocarbonetos são eluidos com uma pequena quantidade de outro solvente extrator, com os quais eles interagem mais fortemente do que com a fase estacionária (Simpson, 2000).

3.11 Cromatógrafo de gases

A cromatografia de gás é uma técnica utilizada para separar diferentes amostras voláteis. Para realizar a separação se precisa de uma fase móvel que é um gás inerte (azoto ou o hélio) que transporta a amostra volatilizada para dentro do injetor através da coluna cromatográfica, e a fase estacionária que geralmente está constituída por uma coluna poli-siloxano de

metilo, ou seus derivados. Os diferentes compostos são separados dependendo do seu grau de volatilidade (ponto de ebulição, de peso molecular) e de afinidade pela fase estacionária. Entre os detectores mais usados cabe mencionar o FID (ionização de chama) devido a sua grande versatilidade, possibilita detecção de uma grande classe de compostos (Skoog et al. 2008).

O detector de ionização de chama (FID) é um dos detectores mais utilizados para cromatografia em fase gasosa. Ele é o detector cromatográfico de gás mais sensível para hidrocarbonetos, como o butano ou hexano. Com uma gama linear para 6 ou 7 ordens de grandeza (10^6 - 10^7) e limites de detecção na faixa de picograma. No FID a amostra sofre combustão pela chama de hidrogênio/ar, formando íons e elétrons livres. As partículas formadas produzem um fluxo de corrente mensurável no espaço entre os dois eletrodos no detector. O fluxo de corrente resultante é de uma força maior do que o sinal produzido pelo gás portador. Este sinal diferencial fornece informações sobre a amostra (Eija. et al 2010).

4. MATERIAIS E METODOS.

4.1 Local de coleta.

As amostras foram coletadas do Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos (SITEL) - Superintendência da Corsan. Este sistema trata resíduos resultantes das atividades das indústrias do Polo Petroquímico do Sul, cidade de Triunfo, Rio Grande do Sul. Localização: BR 386, km 419, via 3, Polo Petroquímico do Sul. A coleta foi realizada no mês de março 2015. O ponto de amostragem foi a primeira caixa de entrada chamada de API (Figura 1).

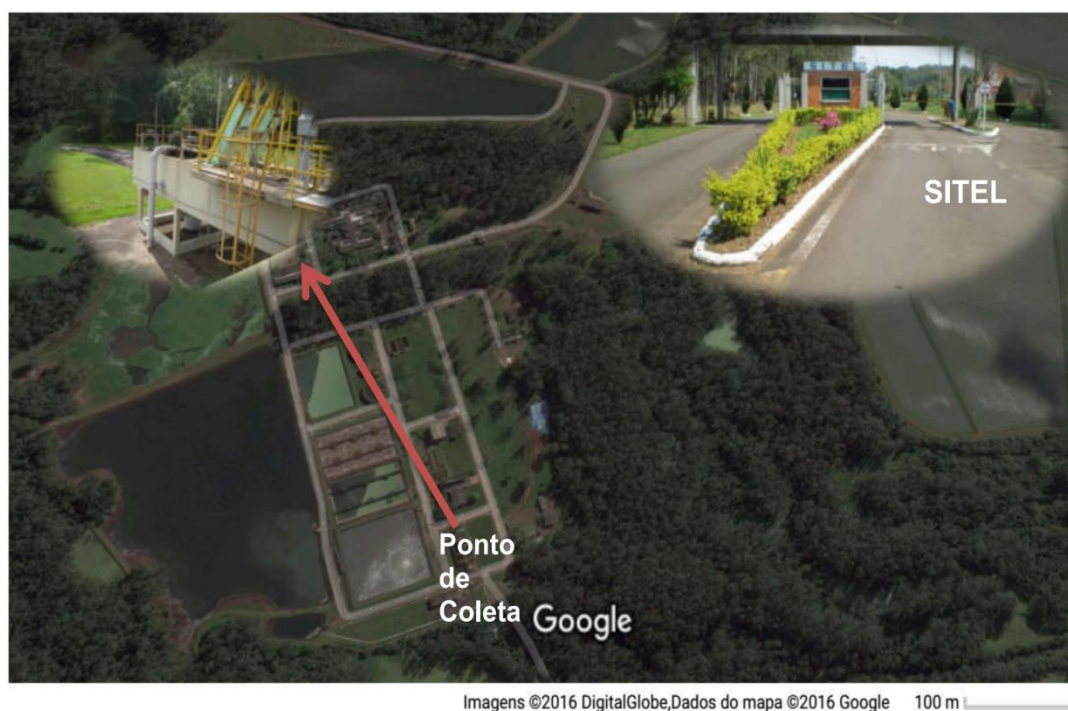


Figura 1: Mapa da Localização do Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos (SITEL) - Superintendência da Corsan.

4.2 Enriquecimento da amostra

As amostras foram enriquecidas adicionando-se cada um dos seguintes compostos benzeno (B) (teor 99%-Dinâmica), tolueno (T) (92,14%-

Dinamica), etilbenzeno (E) (99%-Merck) e xilenos (X) (98,5%-Neon), em separado. Portanto foram utilizados 10 erlenmeyers com capacidade de 250mL cada, sendo oito (para cada um dos compostos BTEX em duplicata) e dois erlenmeyers foram utilizados como controle. Os frascos continham 160 mL de meio mínimo mineral (K_2HPO_4 2g/L, KH_2PO_4 3g/L, Na_2HPO_4 6g/L, NH_4Cl 1g/L, $CaCl_2$ 0.017g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/L, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.001g/L, MoO_3 1mg/L, $ZnCl_2$ 3.3mg/L, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.3mg/L, H_2BO_3 1mg/L, $CoCl_3 \cdot 6H_2O$ 6mg/L, $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ 1mg/L, $MnSO_4$ 8.2 mg/L (Eldon R. Rene et. al. 2006)), e 40mL da amostra. As amostras foram incubadas por 30 dias sob agitação de 120 rpm a temperatura de 25°C. A cada 48 horas do dia 1 ao dia 10; do dia 11 ao dia 20; e do dia 21 ao dia 30 foram adicionados 100µL, 200 µL e 400µL respectivamente, de cada um dos compostos por separado B, T, E e X.

4.3 Semeadura das amostras

A cada de 10 dias foi retirado uma alíquota de 100µL de cada um dos frascos para realizar diluições seriadas $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ posteriormente foi retirado 100 µL de cada diluição e semeado pela técnica de pour plate em duas placas contendo meio de cultura TSA (agar tripticaseína de soja) e duas placas com ágar infuso de cérebro e coração. Os meios de cultivo foram suplementados com anfotericina-B (2,5 mg/L) para evitar o crescimento fúngico. As placas foram incubadas em temperatura de 25°C por 24 horas.

Após do crescimento, com a ajuda de um estereoscópio e um microscópio o crescimento bacteriano foi avaliado de acordo as características morfológicas da colônia como forma, elevação, borda, comprimento, cor da colônia. As colônias bacterianas que apresentaram semelhanças morfológicas foram agrupadas de acordo com seus morfotipos e repicados duas vezes em outras placas com meio de cultura TSA, pelo método de esgotamento. Com a obtenção de colônias isoladas foi realizado a coloração de Gram para confirmação da pureza da colônia e separação dos isolados em Gram positivos e negativos.

4.4 Preservação das culturas bacterianas

Após o isolamento as bactérias, foram repicadas em tubos com 5 mL de TSB (caldo tripticaseína de soja) e incubadas por 20 horas a 25°C. Destas culturas foram retiradas 400 µL e adicionados a criotubos contendo 100 µL de glicerol 50% e armazenados em freezer a -20°C. Além disso, os isolados foram repicados em tubos com meio TSA inclinado e incubados por 20 horas a 25°C posteriormente armazenados em geladeira a 4°C.

4.5 Identificação bioquímica dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos foram recuperados em meio TSA e foi realizada novamente a coloração de Gram para confirmação da pureza. Posteriormente a reação com o KOH 3% foi utilizada para conferir os resultados da coloração Gram, além disso, foi realizada a coloração do endósporo utilizando a técnica de Schaeffer-Fulton e a coloração de capsula utilizando a técnica de Maneval's. A identificação bioquímica foi realizada utilizando diferentes testes bioquímicos, como teste da catalase, citocromo oxidase, oxidação/ fermentação, utilização de citrato, liquefação de gelatina (gelatinase), produção de H₂S, indol e motilidade, vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP), hidrólise do amido, produção de nitrato, crescimento em NaCl 7%, bile esculina e gema de ovo.

4.6 Curva de crescimento microbiano

Para realizar a curva de crescimento as bactérias preservadas foram reativadas em placas com meio de cultura TSA e incubadas por 20 horas em estufa a 25°C. Após, as colônias foram repicadas em 50 mL de TSB e incubadas sob agitação 120 rpm a 25°C. Nas horas 6, 12, 24, 48, 72, 96, foi retirado de cada tubo 1 mL de cultura, o qual foi diluído em TSB na razão de 1:8, para determinar a densidade ótica (DO) utilizando um espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. Além de isso, as alíquotas retiradas

foram diluídas até 10^{-2} em NaCl 0,8% e semeadas por espalhamento em superfície, em placa com meio de cultivo PCA, para determinar a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Assim foi realizada uma curva de crescimento utilizando o modelo matemático de Gompertz:

$$Y = a * \exp(-\exp(b - c * t))$$

Onde Y é a densidade da população (logaritmo do número de unidades formadoras de colônias/ logaritmo do número de unidades formadoras de colônias tempo inicial) em um dado tempo t (h). Os parâmetros a b e c, são estimados pelo modelo.

4.7 Teste de tolerância das bactérias para o BTEX, MTBE e Etanol.

Para determinar a tolerância das bactérias aos compostos, o seguinte procedimento foi realizado: (a) As bactérias preservadas foram reativadas em tubos com 5 mL de TSB e incubadas por 20 horas em estufa a 25°C. (b) Após foi retirado um mL da cultura para medir a densidade ótica e calcular as UFC, assim de cada uma das culturas foi retirada 10^{10} UFC e estas foram centrifugadas a 7000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi resuspendido com um mL de NaCl 0.8%. Este procedimento foi realizado duas vezes para remover todos os resquícios de meio de cultura das células. (c) Finalmente o pellet foi resuspendido em um mL de NaCl 0.8% e 100 μ L da suspensão bacteriana foi retirado para realizar diluições seriadas de 10^{-1} e 10^{-2} ; da última diluição foi retirado 100 μ L e semeado em placas com TSA para conferir o número de UFC. (d) Em frascos contendo 50 mL de meio de cultura liquido mínimo mineral (NH_4Cl 50mg/L, K_2HPO_4 100mg/L, MgSO_4 50mg/L, CaCl_2 20mg/L, FeCl_3 1mg/L) suplementado com 1g/L de peptona, foi inoculado 10^4 UFC da bactéria. (e) A esta cultura foi adicionada também 20 μ L, 40 μ L e 80 μ L, de cada composto em separado, na hora zero, 48 e 96 respectivamente. (f) A cada 48 horas foram retiradas 100 μ L de amostra e foi realizada uma diluição seriada até 10^{-2} para semear em placas contendo meio de cultura TSA e realizar a contagem de UFC. (g) Assim foram selecionadas

como tolerantes somente as bactérias que obtiveram crescimento de 30 UFC a mais na placa nos quatro compostos, após de 96 horas de incubação com os compostos. Com as bactérias selecionadas como tolerantes se realizou um outro teste para determinar a tolerância das bactérias à mistura de BTEX, ao MTBE e ao etanol. Para isto, foi realizado novamente os itens (a), (b), (c), (d), no caso do BTEX, em cada frasco com o meio de cultura e as bactérias foi adicionado na hora zero, 20µL de cada um dos compostos; na hora 48, 40µL de cada um dos compostos; e finalmente na hora 96, 80µL de cada um dos compostos. No caso do MTBE na hora zero, 48, 96 foi adicionado 50µL, 100µL e 150µL de MTBE respectivamente. No caso do etanol em cada frasco com o meio de cultura e bactérias foi adicionado 12,5mL de etanol na hora zero. O crescimento microbiano foi realizado como no item (f) do teste de tolerância. Finalmente, após os ensaios foram selecionadas como tolerantes as bactérias que conseguiram crescer nos três compostos BTEX, MTBE e etanol. E estas bactérias são as que foram utilizadas para o teste de degradação.

4.8 Determinação da Degradação Bacteriana do BTEX na presença de MTBE e Etanol.

4.8.1 Teste de degradação do BTEX.

Com as bactérias selecionadas como tolerantes, foi realizado o teste degradação. O procedimento utilizado foi o mesmo utilizado nos itens (a), (b), (c) e (d) do teste de tolerância. Assim em quatro frascos foi adicionado BTEX (75 µL de cada um B, T, E e X), 50 mL de meio mínimo mineral e as bactérias, em outros quatro frascos foi adicionado BTEX (75 µL de cada um B, T, E e X), 50 µL de MTBE (99,8 % Sigma & Aldrich), 50mL de meio mínimo mineral e as bactérias, em outros quatro foi adicionado BTEX (75 µL de cada um B, T, E e X), 12,5mL de etanol absoluto, 37,5 mL de meio mínimo mineral e as bactérias, em outros dois frascos somente o BTEX(75 µL de cada um B, T, E e X), 50 mL de meio mínimo mineral, sem as bactérias, estes foram utilizados como controle, em outros dois somente o BTEX(75 µL de cada um B, T, E e X), 50

mL de meio mínimo mineral, e MTBE sem as bactérias, em outros dois somente o BTEX(75 µL de cada um B, T, E e X), 37.5 mL de meio mínimo mineral, e 12.5 mL de etanol sem as bactérias e finalmente cada bactéria foi inoculada em dois frascos contendo só 50 mL de MMM. A avaliação do crescimento microbiano foi realizada como no item (f) do teste de tolerância.

4.8.2 Separação em fase solida (SPE)

Com o objetivo de determinar a quantidade de composto capacidade de degradação das bactérias, os compostos BTEX foram extraídos da cultura bacteriana, utilizando-se para isto uma extração em fase solida. Assim, a cada 48 horas foi retirado uma alíquota de 5mL de cada um dos frascos de cultura e colocados em outros frascos de capacidade de 50mL. Estes foram armazenados em geladeira a 4°C, até a realização da extração. A extração foi realizada utilizando Cartucho SPE C18 500mg de 3mL da marca Bond Elut. Os cartuchos foram colocados em uma bomba de vácuo para gerar pressão positiva (Figura 2). A coluna foi ativada com 3mL de metanol e pre-equilibrada com 3mL de água, após as amostras foram carregadas com fluxo de 3mL/min. Posteriormente foi realizado uma lavagem com 2mL de água para finalmente eluir os analitos com duas alíquotas de 1mL de diclorometano.

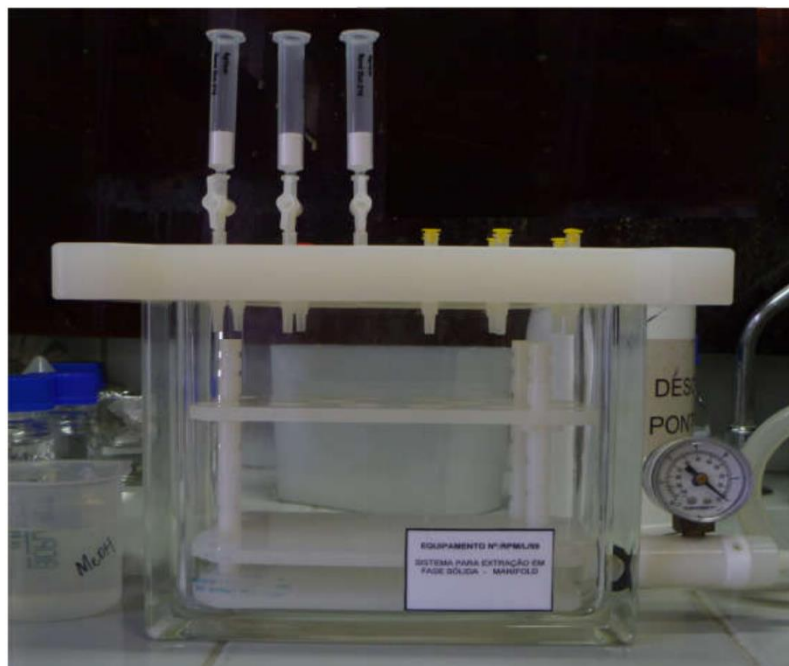


Figura 2: Sistema de extração em fase sólida

4.8.3 Cromatografia gasosa - Detector por ionização de chama (FID)

Para determinar a quantidade de compostos que tem em cada amostra se fez uma cromatografia gasosa utilizando o cromatógrafo gasoso com detector por ionização de chama da marca SHIMADZU GC Solution versão 2.4 (Figura 3).

Assim primeiro foi realizada uma curva de calibração de cada um dos compostos B, T, E, X e MTBE, que relaciona a área do pico formado no cromatógrafo e a concentração do composto, também se obtiveram os tempos de retenção específicos de cada um dos compostos. A curva foi realizada utilizando concentrações conhecidas dos compostos. Estas concentrações foram preparadas diluindo os compostos primeiro com metanol para prepara uma solução de 20000 ppm, e esta solução foi diluída com diclorometano para obter-se as concentrações de 500, 1000 e 1500 ppm.

Depois de calculado o tempo de retenção e a curva de concentração os compostos extraídos no SPE foram analisados no cromatógrafo gasoso. A seguir são apresentadas as condições do cromatógrafo:

Coluna: Elite5MS

Comprimento: 30m

Diâmetro: 0.25mm

Espessura da película: 0.5 μ m

Gás transportador: Hélio

Fluxo total: 2mL/min

Fluxo da coluna: 0.75ml/min

Velocidade linear: 20cm/seg

Temperatura do injetor: 250°C

Volume de injeção: 1 μ L

Jeito de injeção: Split

Rádio do Split:10

Temperatura do detector: 250°C

Tipo de detector: FID



Figura 3: Cromatógrafo de gases SHIMADZU GC Solution versão 2.4

A programação das temperaturas está apresentada na tabela 3.

Tabela 3: Programação da temperatura do forno do cromatografo.

Razão de aquecimento °C/min	Temperatura °C	Tempo de Espera (minutos)
	40	2
10	100	2
30	190	2

4.9 Identificação molecular

Foi realizada a identificação molecular dos isolados bacterianos tolerantes aos quatro compostos.

4.9.1 Extração de DNA cromosomal dos isolados.

A metodologia utilizada na extração de DNA foi a descrita por Sambrook et al (1989) com modificações (apêndice 1). A qualidade do DNA extraído foi avaliada em um nanodrop.

4.9.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para amplificação do 16S rDNA foram empregados os primers 8F e 1544 R. Tabela 4. A amplificação foi realizado em volume final de 25 μ L, em cada reação foi utilizado 15.8 μ L de água miliq, 2,5 μ L de tampão (10X), 1,5 μ L de MgCl₂ (50mM), 1 μ L de BSA (1 mg/mL), 1 μ L de desoxinucleotídeos trifosfatos (1mM), 1 μ L de primer 8F (10 pmol), 1 μ L de primer 1544R (10 pmol) e 0,2 μ L de taq polimerase (5 U/ μ L) e 1 μ L de DNA (50 ng/ μ L). A amplificação foi realizada em um termociclador programado para desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos com: 94°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 5 minutos.

Tabela 4: Primers utilizados para a amplificação do 16S rDNA

Primer	Posição <i>E. coli</i>	Alvo	Sequencia	Referencias
8F	8-27	Universal	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Turner et al. (1999)
1544R	1525- 1544	Universal	AGAAAGGAGGTGATCCAGCC	Dorsch M. and Stackebrandt E. (1992)

Os produtos de amplificação foram purificados utilizando-se o PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen). O seqüenciamento foi realizado na Empresa Ludwig Biotec. Biotecnologia utilizando equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A qualidade das sequencias foram avaliadas utilizando o programa chromas e as sequencias obtidas foram comparadas com sequencias disponíveis no BLAST/NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). As sequencias obtidas da comparação no BLAST/NCBI, foram alinhadas no programa MAFFT versão 7 e editadas manualmente no Bioedit. Com o conjunto de dados obtidos foi gerado uma arvore filogenética utilizando o programa Mega 7. Posteriormente a arvore foi editada com o programa Adobe Illustrator.

4.10 Análise Estatística

As análises estatísticas aplicadas para análise de diversidade alfa e beta foram realizadas no software past. As equações para a construção da curva de crescimento bacteriano, as equações que relacionam a densidade ótica e unidades formadoras de colônia, as equações de calibração do BTEX e os gráficos de concentração de compostos nos três tratamentos BTEX, BTEX/MTBE e BTEX/Etanol, foram realizadas utilizando o software Statistica 13.

Quanto as análises de porcentagem de degradação, elas foram realizadas com o software excel 2010, foram calculados comparando os tratamentos com os respectivos controles.

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento Bacteriano

Um total de 986 colônias bacterianas foram isoladas e agrupadas em 30 diferentes morfotipos. Estes foram denominados de isolado N°1 ao

isolado N°30. Destes isolados, 16 foram obtidos no 10° dia, 11 no 20° dia e três no 30° dia de incubação em condições de enriquecimento com os compostos (B, T, E, X). Utilizando o software Past se fez uma análise da diversidade. Na tabela 5 pode-se observar os índices de diversidades alfa que as amostras apresentaram de acordo com o composto com o qual foi enriquecido (BTEX). Os índices mostram que não houve domínio de um isolado em nenhum dos enriquecimentos. Segundo o índice de Shannon H, no 20° dia de enriquecimento se obteve o maior número de isolados (97 isolados) assim como a maior diversidade (2.48) no controle. No entanto segundo o índice de Simpson quem apresenta uma maior diversidade (2.34) é o controle no 10° dia. O etilbenzeno (2.26), benzeno (2.22) e xileno (1.51) apresentaram maior diversidade 10°, 20° e 30° dia respectivamente.

Utilizando o índice de diversidade beta Wilson e Schmida, que considera, o número médio de espécies e analisa o ganho e a perda das mesmas entre os enriquecimentos. Assim este índice evidencia as mudanças no decorrer dos dias, pois quanto mais próximo de zero, maior é a substituição de espécies e maior seu fluxo. Os resultados obtidos ao realizar-se uma comparação da variação da população bacteriana no decorrer dos dias, nos diferentes tipos de enriquecimento, estão apresentados na tabela 6. O menor valor foi 0.45 (Xileno entre o 20° e 30° dia), o que indicou que no enriquecimento com xileno houve uma troca de espécies no decorrer dos dias, isto é, houve uma maior substituição de espécies. O mesmo padrão aconteceu na presença de tolueno onde o maior valor foi 0.76 (controle entre o 10° e o 30° dia) indicando que no controle não houve uma troca significativa de espécies, por tanto as espécies foram muito similares do 10° ao 30°.

A comparação entre os diferentes tipos de enriquecimento no decorrer dos dias de incubação está apresentada na tabela 7. O menor valor 0.27 (10° dia entre o benzeno e o controle) indica que no 10° dia houve uma maior substituição de espécies entre o enriquecimento com benzeno e o controle, isto é que as espécies isoladas do benzeno foram diferentes das isoladas no controle. O maior valor 0.75 (entre xileno e tolueno, e entre controle

e tolueno) indica que após 30 dias de enriquecimento as espécies que sobreviveram foram muito semelhantes no controle e no xileno, e no controle e o tolueno.

Tabela 5: Índices de Diversidade Alfa nos diferentes tipos de enriquecimento (BTEX)

Índices	Dia 10					Dia 20					Dia 30				
	B	T	E	X	C	B	T	E	X	C	B	T	E	X	C
Taxa S	6	9	11	6	12	13	10	8	4	17	4	3	3	5	5
Indivíduos	74	111	116	44	130	85	69	57	23	97	31	22	35	20	72
Dominância	0.22	0.13	0.11	0.19	0.10	0.13	0.14	0.21	0.28	0.11	0.29	0.58	0.53	0.24	0.26
Simpson1D	0.78	0.87	0.89	0.81	0.90	0.87	0.86	0.79	0.72	0.89	0.71	0.42	0.47	0.76	0.74
ShannonH	1.58	2.09	2.26	1.73	2.34	2.22	2.09	1.74	1.34	2.48	1.31	0.71	0.74	1.51	1.42
Margalef	1.16	1.70	2.10	1.32	2.26	2.70	2.13	1.73	0.96	3.50	0.87	0.65	0.56	1.34	0.94
Equitabilit.J	0.88	0.95	0.94	0.96	0.94	0.87	0.91	0.84	0.96	0.88	0.95	0.65	0.67	0.94	0.88

Tabela 6: Índice de diversidade Beta na comparação entre os dias de Isolamento (10°, 20° e 30° dia) nos diferentes compostos de enriquecimento. Índice de Wilson & Schmida.

	Benzeno			Tolueno			Etilbenzeno			Xileno			Controle		
	10°	20°	30°	10°	20°	30°	10°	20°	30°	10°	20°	30°	10°	20°	30°
10°	0.00	0.68	0.60	0.00	0.47	0.64	0.00	0.58	1.00	0.00	1.00	0.45	0.00	0.59	0.76
20°	0.68	0.00	0.53	0.47	0.00	0.67	0.58	0.00	0.64	1.00	0.00	0.56	0.59	0.00	0.64
30°	0.60	0.53	0.00	0.64	0.67	0.00	1.00	0.64	0.00	0.45	0.56	0.00	0.76	0.64	0.00

Tabela 7: Índice de diversidade Beta na comparação entre os diferentes tipos de enriquecimento (BTEX) no decorrer dos dias. Índice de Wilson & Schmida.

	10° Dia					20° Dia					30° Dia				
	B	T	E	X	C	B	T	E	X	C	B	T	E	X	C
B	0.00	0.47	0.41	0.33	0.44	0.00	0.48	0.43	0.53	0.27	0.00	0.71	0.71	0.56	0.56
T	0.47	0.00	0.50	0.60	0.43	0.48	0.00	0.67	0.57	0.41	0.71	0.00	0.67	0.75	0.75
E	0.41	0.50	0.00	0.41	0.48	0.43	0.67	0.00	0.33	0.60	0.71	0.67	0.00	0.50	1.00
X	0.33	0.60	0.41	0.00	0.44	0.53	0.57	0.33	0.00	0.71	0.56	0.75	0.50	0.00	1.00
C	0.44	0.43	0.48	0.44	0.00	0.27	0.41	0.60	0.71	0.00	0.56	0.75	1.00	1.00	0.00

5.2 Identificação bioquímica dos Isolados

Os isolados foram avaliados de acordo as características morfológicas da colônia (Figura 4, 5, 6, 7 e 8) e submetidas a diferentes testes bioquímicos. Nas características morfológicas das colônias observou-se diversidade quanto à textura das mesmas, forma, cor e comprimento. Quanto a avaliação da célula bacteriana, 25 bactérias foram Gram positivas, 16 bactérias apresentaram formação de endósporo, 15 bactérias apresentaram capsula.

Os resultados das características bioquímicas encontram-se na tabela 8, e estes foram submetidas à chave de classificação conforme o Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology. Onze isolados foram identificados como sendo do gênero *Bacillus*, cinco do gênero *Enterococcus*, três do gênero *Staphylococcus*, três do gênero *Corynebacterium*, dois do gênero *Neisseria*, dois do gênero *Streptococcus*, dois do gênero *Pseudomonas*, um do gênero *Lysinobacterium*, e um do gênero *Leucobacter*. No entanto, não foi possível classificar as bactérias até nível de espécie devido à complexidade destes gêneros. Todos os resultados são apresentados na tabela 9.

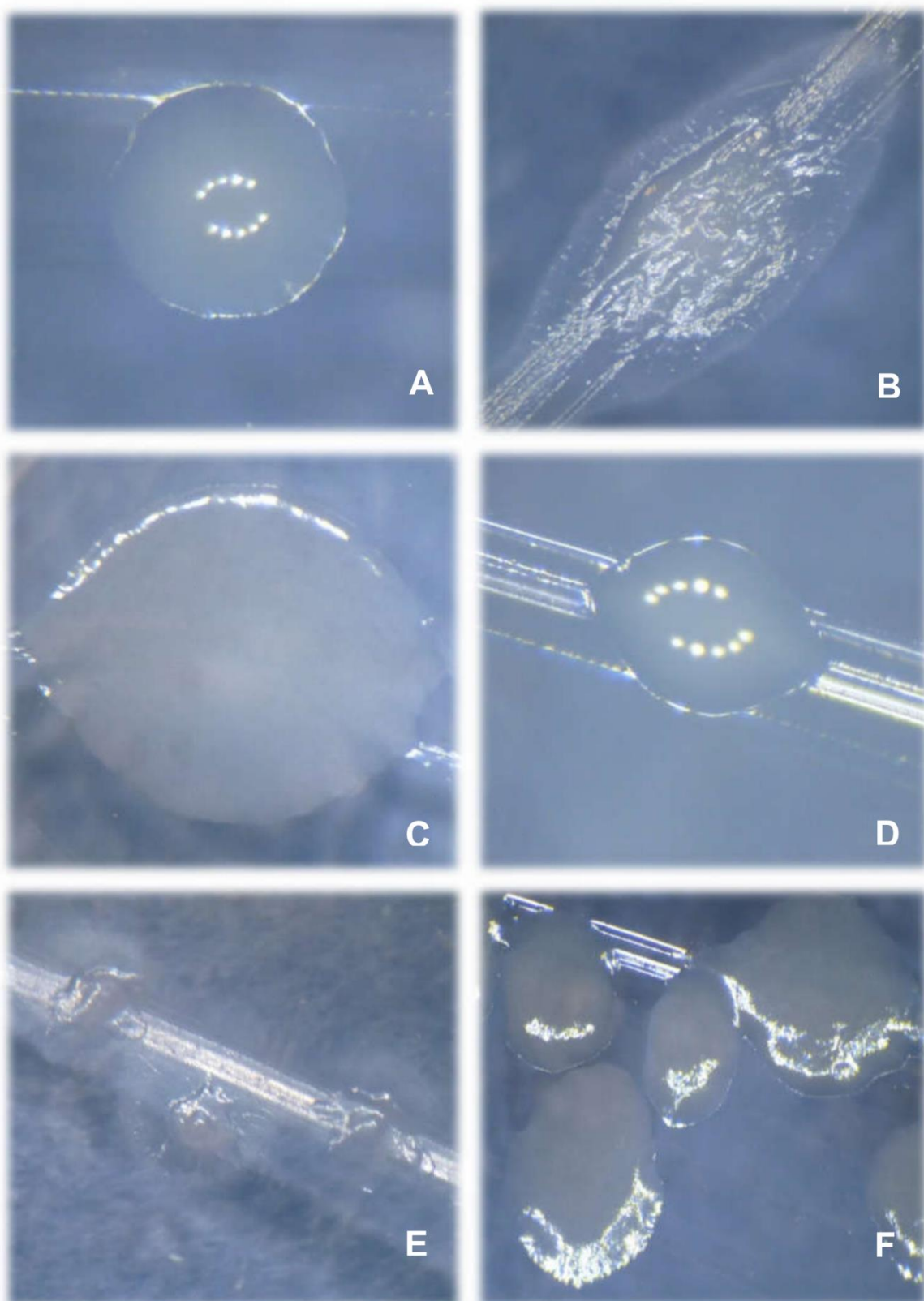


Figura 4- Morfologia das colônias bacterianas: A, Isolado N°1; B, Isolado N°2; C, Isolado N°3; D, Isolado N°4; E, Isolado N°5; F, Isolado N°6.

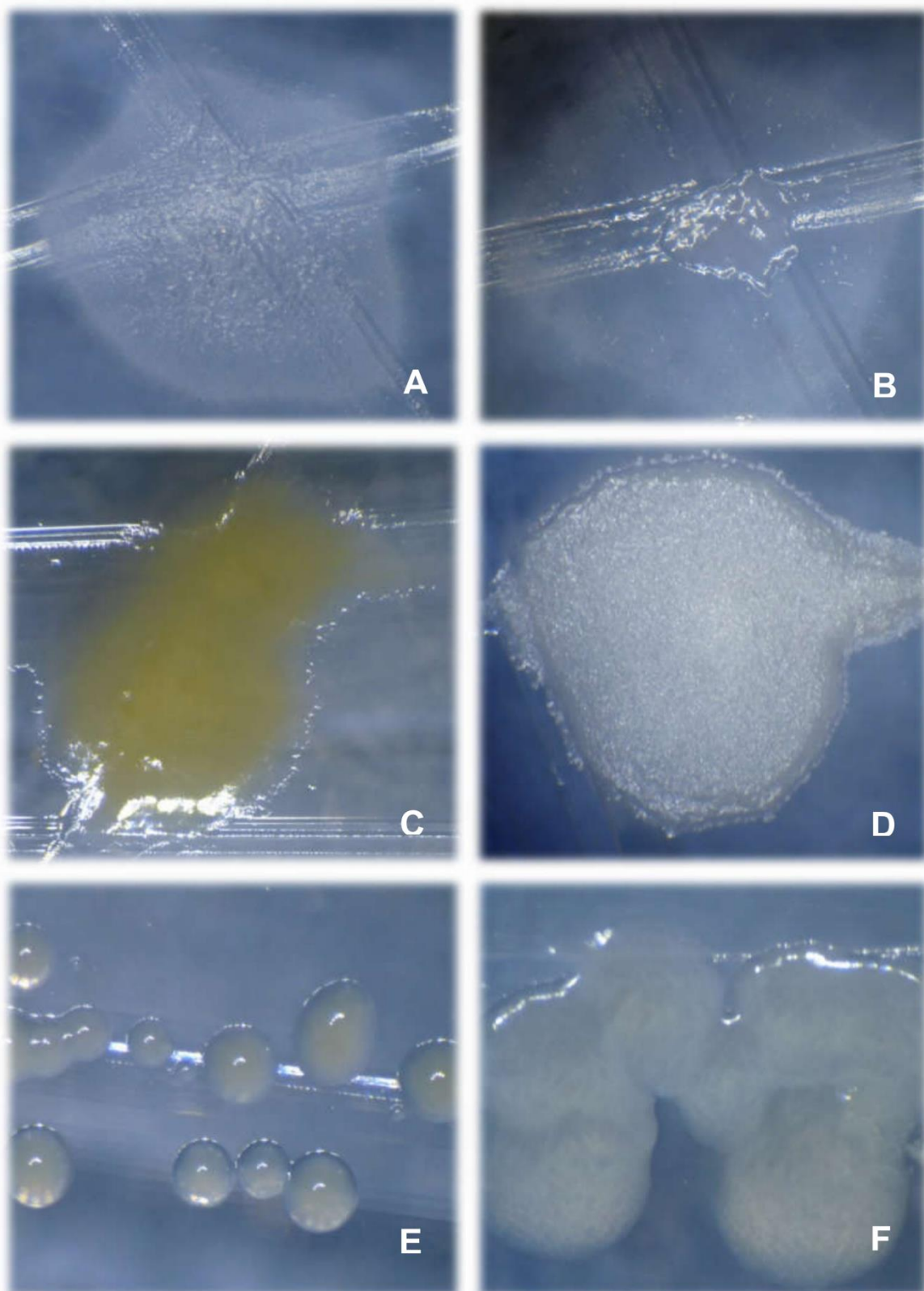


Figura 5- Morfologia das colônias bacterianas: A, Isolado N°7; B, Isolado N°8; C, Isolado N°9; D, Isolado N°10; E, Isolado N°11; F, Isolado N°12.

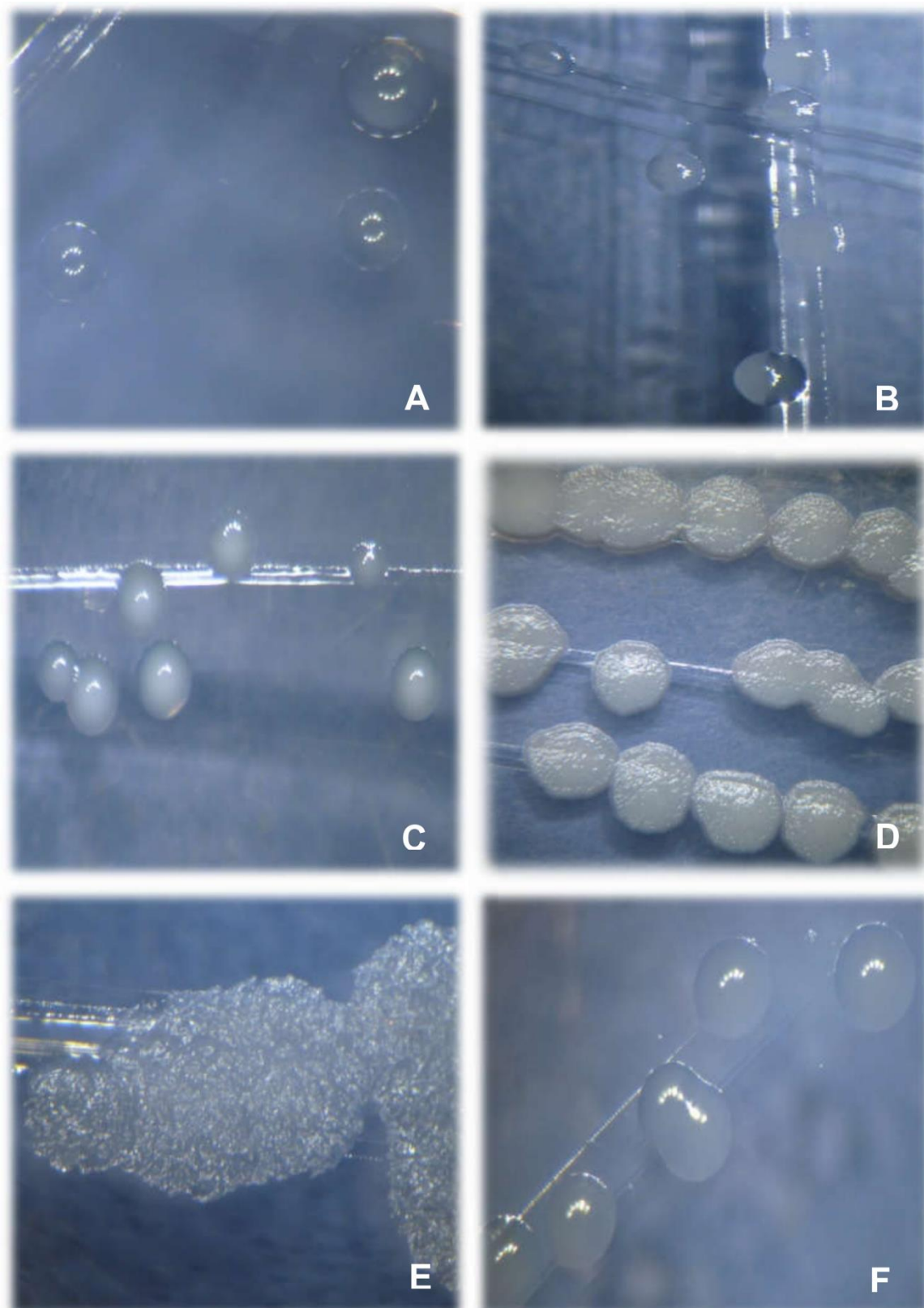


Figura 6- Morfologia das colônias bacterianas: A, Isolado N°13; B, Isolado N°14; C, Isolado N°15; D, Isolado N°16; E, Isolado N°17; F, Isolado N°18.

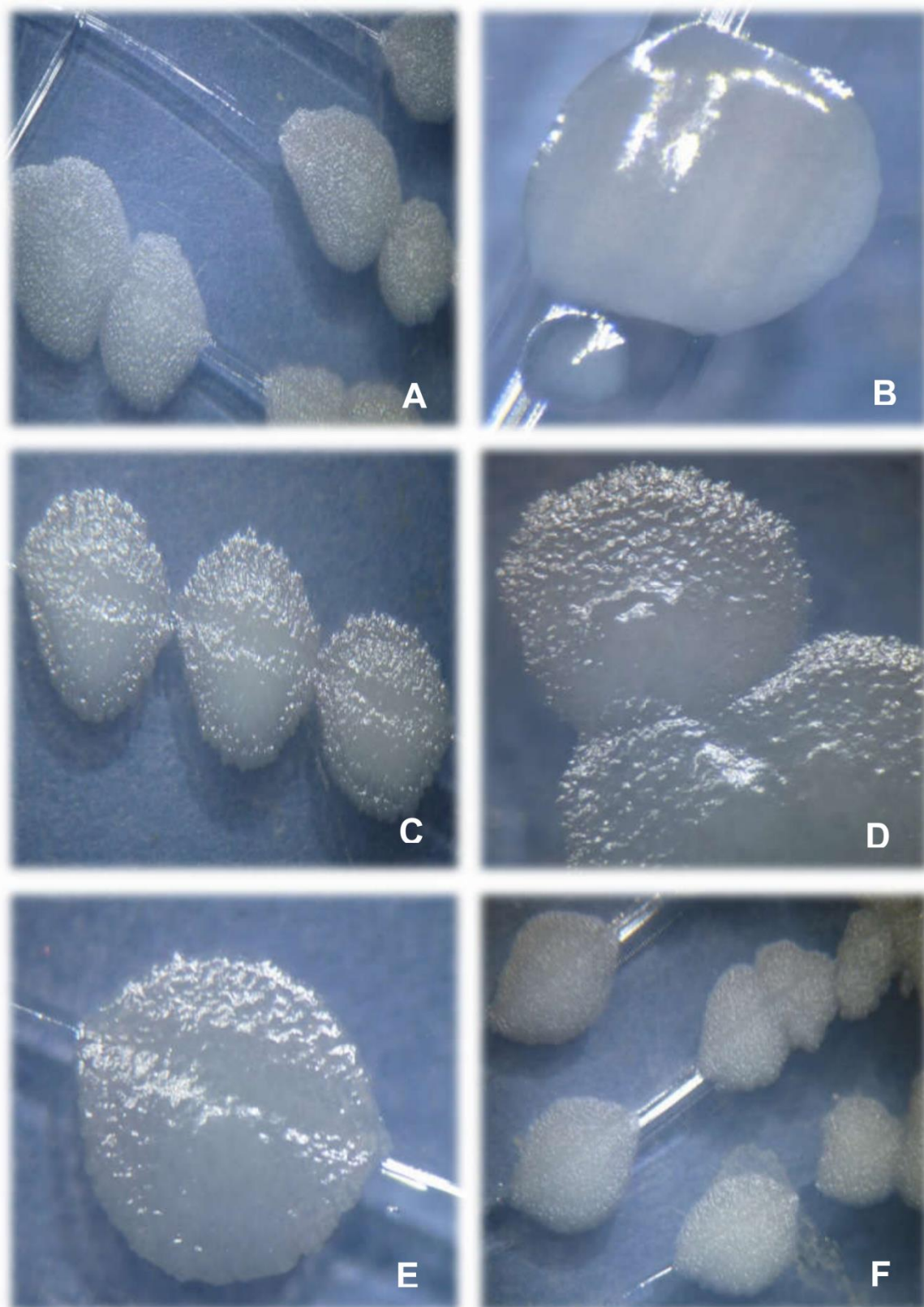


Figura 7- Morfologia das colônias bacterianas: A, Isolado N°19; B, Isolado N°20; C, Isolado N°21; D, Isolado N°22; E, Isolado N°23; F, Isolado N°24.

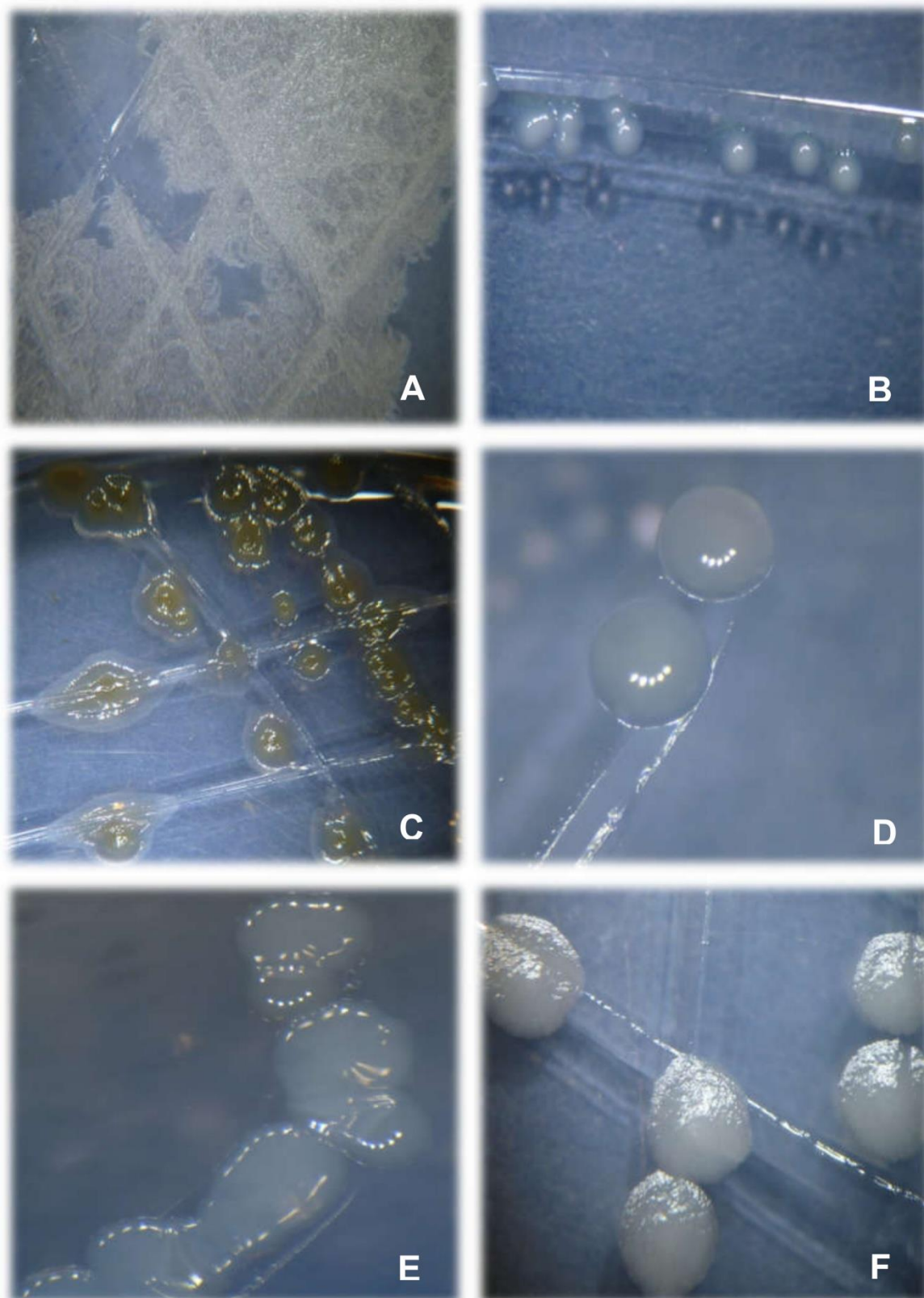


Figura 8- Morfologia das colônias bacterianas: A, Isolado N°25; B, Isolado N°26; C, Isolado N°27; D, Isolado N°28; E, Isolado N°29; F, Isolado N°30.

Tabela 8: Caracterização morfológica e bioquímica dos 30 Isolados realizados do enriquecimento.

Isolado	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5	N°6	N°7	N°8	N°9	N°10
Forma	Circular	Circular	Circular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Filamentoso	Irregular
Elevação	Elevado	Convexo	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Elevado	Umbilicado
Margem	Inteira	Inteira	Inteira	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Espiral	Ondulado	Irregular	Ondulado
Diâmetro	0,05cm	0,3cm	0,2cm	0,2cm	0,3cm	0,3cm	0,2cm	0,3cm	0,6cm	0,5cm
Cor	Transparente	Branco	Castanho	Marrom	Perola	Cinza	Cinza claro	Cinza claro	Amarelo	Branco
Forma da Célula	Cocobacilo	Coco	Bacilo	Bacilo	Coco	Bacilo	Cocobacilo	Cocobacilo	Bacilo	Bacilo
Endósporo	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
Capsula	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Gram	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
KOH3%	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Catalase	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
Oxidação/ Fermentação (O/F)	Oxidação	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidade	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Citrato	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Nitrato	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
VM/VP	-/+	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
NaCl 7%	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Egg Yolk	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Esculina	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-

*Positivo:+, Negativo:-, Vermelho de metila/ Voges-Proskauer:VM/VP.

Continuação da tabela 8

Isolado	Nº11	Nº12	Nº13	Nº14	Nº15	Nº16	Nº17	Nº18	Nº19	Nº20
Forma	Circular	Circular	Circular	Irregular	Circular	Circular	Irregular	Circular	Irregular	Irregular
Elevação	Convexo	Elevado	Convexo	Convexo	Convexo	Elevado	Elevado	Convexo	Plana	Plana
Margem	Inteira	Ondulado	Inteira	Inteira	Inteiro	Inteiro	Dentado	Inteiro	Dentada	Inteiro
Diâmetro	0,05cm	0,3cm	0,1cm	0,07cm	0,05cm	0,5cm	0,8cm	0,1cm	0,8cm	0,4cm
Cor	Amarelo	Cinza	Branco	Cinza	Bege	Branco	Branco	Transparente	Branco	Cinza
Forma da Célula	Coco	Cocobacilo	Coco	Coco	Coco	Bacilo	Bacilo	Cocobacilo	Bacilo	Bacilo
Endosporo	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
Capsula	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
Gram	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
KOH3%	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
Oxidase	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Oxidação/ Fermentação(O/F)	-	-	-	-	O/F	-	Fermentação	O/F	-	Fermentação
Motilidade	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-
Citrato	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Nitrato	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
MR/VP	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+	+/-	-/-	+/+	-/-
Gelatina	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
NaCl 7%	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Amido	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Egg Yolk	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
Esculina	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-

*Positivo:+, Negativo:-, Vermelho de metila/ Voges-Proskauer:VM/VP.

Continuação da tabela 8

Isolado	N°20	N°21	N°22	N°23	N°24	N°25	N°26	N°27	N°28	N°29	N°30
Forma	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Irregular	Rizoide	Circular	Irregular	Circular	Circular	Irregular
Elevação	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Plana	Convexo	Umbilicado	Convexo	Plano	Plano
Margem	Inteiro	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Ondulado	Filamentoso	Inteiro	Ondulado	Inteiro	Inteiro	Ondulado
Diâmetro	0,4cm	0,7cm	0,7cm	0,7cm	0,7cm	0,6cm	0,08cm	0,9cm	0,08cm	0,5cm	0,7cm
Cor	Cinza	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco	Transparente	Amarelo	Branco	Branco	Cinza
Forma da Célula	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Coco	Coco	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Endosporo	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Capsula	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+
Gram	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
KOH3%	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Oxidase	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Oxidação/ Fermentação(O/F)	Fermentação	Fermentação	-	Oxidação	-	-	O/F	-	-	-	Fermentação
Motilidade	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
MR/VP	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
Gelatina	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
NaCl 7%	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Amido	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Egg Yolk	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-

*Positivo:+, Negativo:-, Vermelho de metila/ Voges-Proskauer:VM/VP.

Tabela 9: Identificação Bioquímica dos 30 Isolados

Isolado	Identificação Bioquímica
Isolado N°1	<i>Enterococcus sp.</i>
Isolado N°2	<i>Staphylococcus sp.</i>
Isolado N°3	<i>Bacillus sp.</i>
Isolado N°4	<i>Bacillus sp.</i>
Isolado N°5	<i>Streptococcus sp.</i>
Isolado N°6	<i>Enterococcus sp.</i>
Isolado N°7	<i>Pseudomona sp.</i>
Isolado N°8	<i>Pseudomona sp.</i>
Isolado N°9	<i>Bacillus sp.</i>
Isolado N°10	<i>Bacillus sp.</i>
Isolado N°11	<i>Streptococcus sp.</i>
Isolado N°12	<i>Lysinobacterium sp.</i>
Isolado N°13	<i>Neisseria sp.</i>
Isolado N°14	<i>Staphylococcus sp.</i>
Isolado N°15	<i>Enterococcus sp.</i>
Isolado N°16	<i>Bacillus sp.</i>
Isolado N°17	<i>Corynobacterium sp.</i>
Isolado N°18	<i>Staphylococcus sp.</i>
Isolado N°19	<i>Bacillus sp.</i>
Isolado N°20	<i>Enterococcus sp.</i>
Isolado N°21	<i>Bacillus sp.</i>
Isolado N°22	<i>Bacillus sp.</i>
Isolado N°23	<i>Corynobacterium sp.</i>
Isolado N°24	<i>Bacillus sp.</i>
Isolado N°25	<i>Bacillus sp.</i>
Isolado N°26	<i>Enterococcus sp.</i>
Isolado N°27	<i>Neisseria sp.</i>
Isolado N°28	<i>Bacillus sp.</i>
Isolado N°29	<i>Leucobacter sp.</i>
Isolado N°30	<i>Corynobacteirum sp.</i>

5.3 Curva de crescimento

Com o auxílio do software Statística 13, foram realizadas as curvas de crescimento para cada uma dos isolados baseado nos dados resultantes dos ensaios. A maioria dos isolados atingiu a fase exponencial entre as 12 e 24 horas de crescimento, e todas elas alcançaram a fase estacionária após de 48

horas. No entanto, observou-se após 96 horas de cultivo que as bactérias ainda não atingiram a fase de morte. A densidade ótica (DO) foi utilizada para determinar a concentração bacteriana a ser inoculada nos testes de tolerância. As equações da reta entre a DO e as UFC estão apresentadas na tabela 10. Nas figuras 9 a 13 encontram-se as curvas de crescimento. Pode-se observar que os isolados 18, 23, 26, 27 apresentaram maior taxa de crescimento enquanto que os isolados 9, 17 e 25 apresentaram a menor taxa de crescimento.

Tabela 10: Equação das retas que relacionam a densidade ótica e o número de UFC para cada uma dos Isolados. Y=Densidade ótica, X= Unidades formadoras de colônias

Isolado	Equação da reta	Confiabilidade
Isolado N°1	$y = (10^7) x - 6(10^6)$	$R^2 = 0.9194$
Isolado N°2	$y = 8(10^7) x - 6(10^6)$	$R^2 = 0.7295$
Isolado N°3	$y = (10^8) x - 4(10^6)$	$R^2 = 0.8612$
Isolado N°4	$y = 1(10^8) x - 9(10^6)$	$R^2 = 0.7057$
Isolado N°5	$y = 2(10^7) x - 2(10^6)$	$R^2 = 0.8439$
Isolado N°6	$y = 8(10^7) x - (10^6)$	$R^2 = 0.9735$
Isolado N°7	$y = 8(10^7) x - 4(10^6)$	$R^2 = 0.9701$
Isolado N°8	$y = 3(10^7) x - 2(10^6)$	$R^2 = 0.9781$
Isolado N°9	$y = (10^6) x - 21820$	$R^2 = 0.97$
Isolado N°10	$y = 5(10^7) x - 5(10^6)$	$R^2 = 0.8594$
Isolado N°11	$y = 6(10^7) x - (10^6)$	$R^2 = 0.9546$
Isolado N°12	$y = 6(10^8) x - (10^7)$	$R^2 = 0.7856$
Isolado N°13	$y = (10^8) x - 5(10^6)$	$R^2 = 0.9482$
Isolado N°14	$y = 3(10^7) x - (10^6)$	$R^2 = 0.9589$
Isolado N°15	$y = 3(10^8) x - (10^7)$	$R^2 = 0.9405$
Isolado N°16	$y = 2(10^8) x - (10^7)$	$R^2 = 0.8957$
Isolado N°17	$y = 9(10^6) x - 404939$	$R^2 = 0.9437$
Isolado N°18	$y = 2(10^8) x - (10^7)$	$R^2 = 0.954$
Isolado N°19	$y = (10^8) x - 632474$	$R^2 = 0.9869$
Isolado N°20	$y = 2(10^8) x - 3(10^6)$	$R^2 = 0.9523$
Isolado N°21	$y = 2(10^8) x - 3(10^6)$	$R^2 = 0.9606$
Isolado N°22	$y = (10^8) x - 412390$	$R^2 = 0.9912$
Isolado N°23	$y = 4(10^8) x - 2(10^7)$	$R^2 = 0.9593$
Isolado N°24	$y = 2(10^8) x - 4(10^6)$	$R^2 = 0.9685$
Isolado N°25	$y = (10^7) x - 109375$	$R^2 = 0.928$
Isolado N°26	$y = 6(10^8) x + 234868$	$R^2 = 0.9042$
Isolado N°27	$y = (10^9) x - 3(10^7)$	$R^2 = 0.9742$
Isolado N°28	$y = 3(10^8) x - 10^6$	$R^2 = 0.9846$
Isolado N°29	$y = 2(10^8) x - 565180$	$R^2 = 0.9721$
Isolado N°30	$y = 9(10^7) x - 917443$	$R^2 = 0.9884$

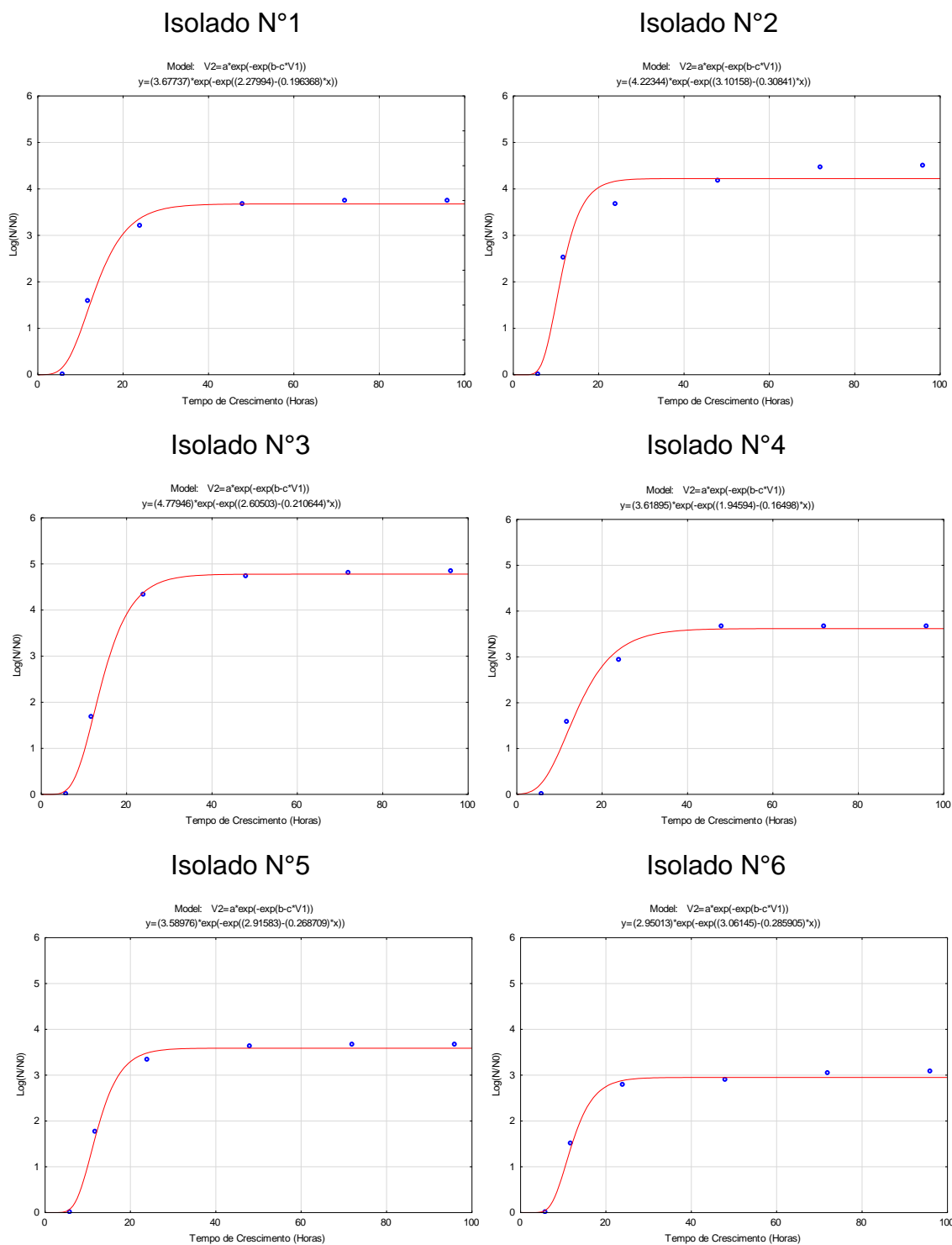


Figura 9: Curva de crescimento dos Isolados 1- 6, cultivados em meio TSB, sob agitação de 120ppm e incubação a 25 °C. Após 96 horas de crescimento.

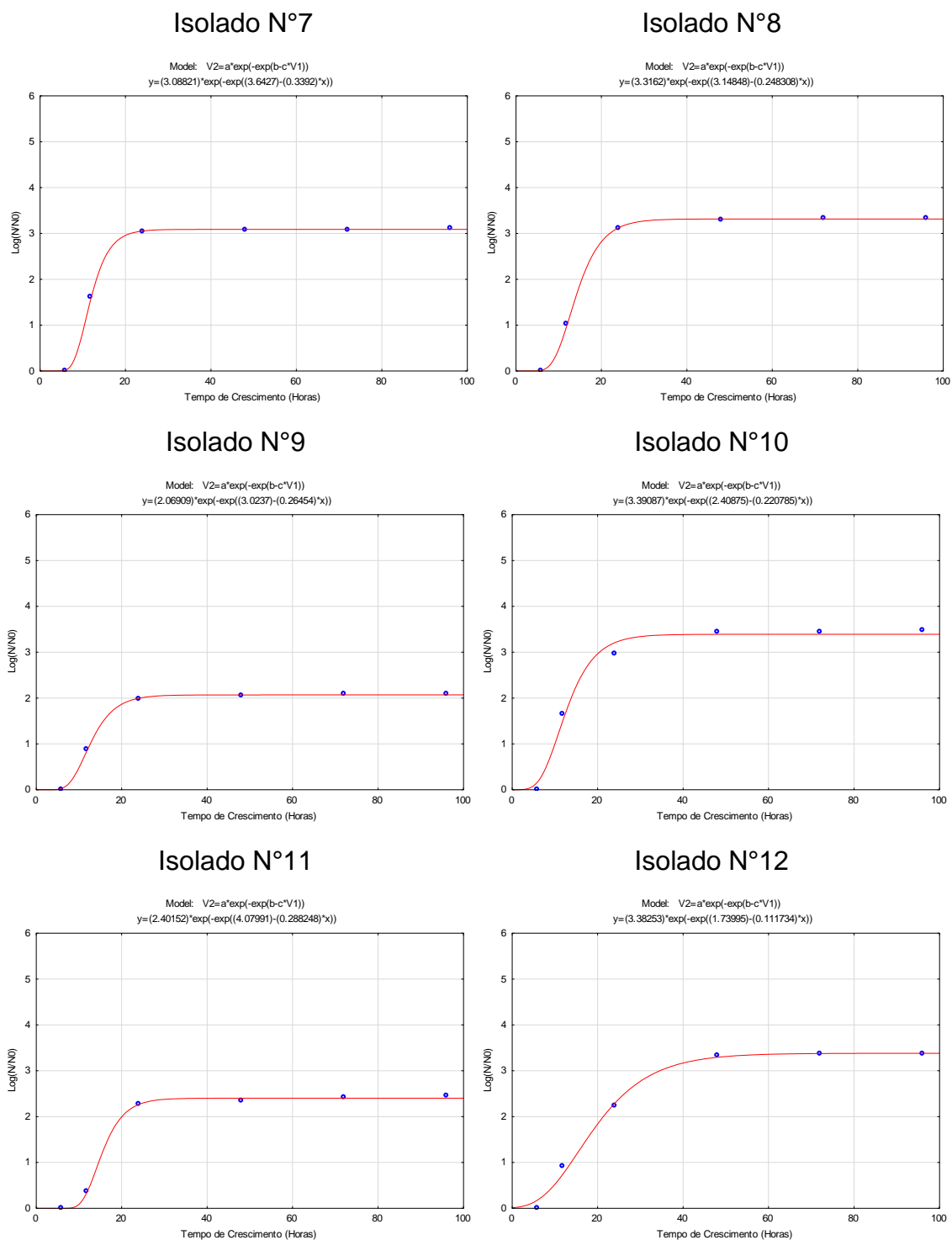


Figura 10: Curva de crescimento dos Isolados 7- 12, cultivados em meio TSB, sob agitação de 120ppm e incubação a 25 °C. Após 96 horas de crescimento.

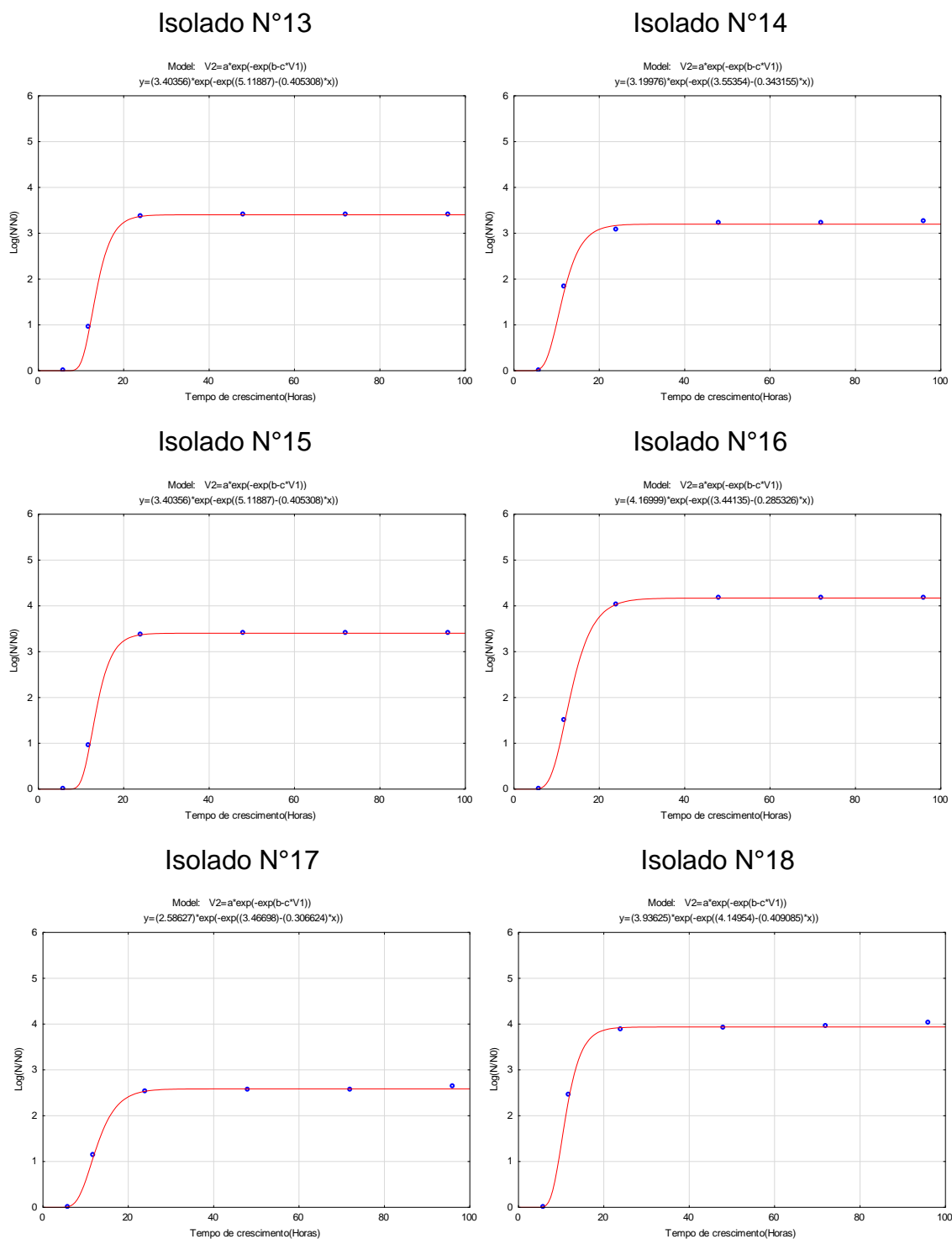


Figura 11: Curva de crescimento dos Isolados 13- 18, cultivados em meio TSB, sob agitação de 120ppm e incubação a 25 °C. Após 96 horas de crescimento.

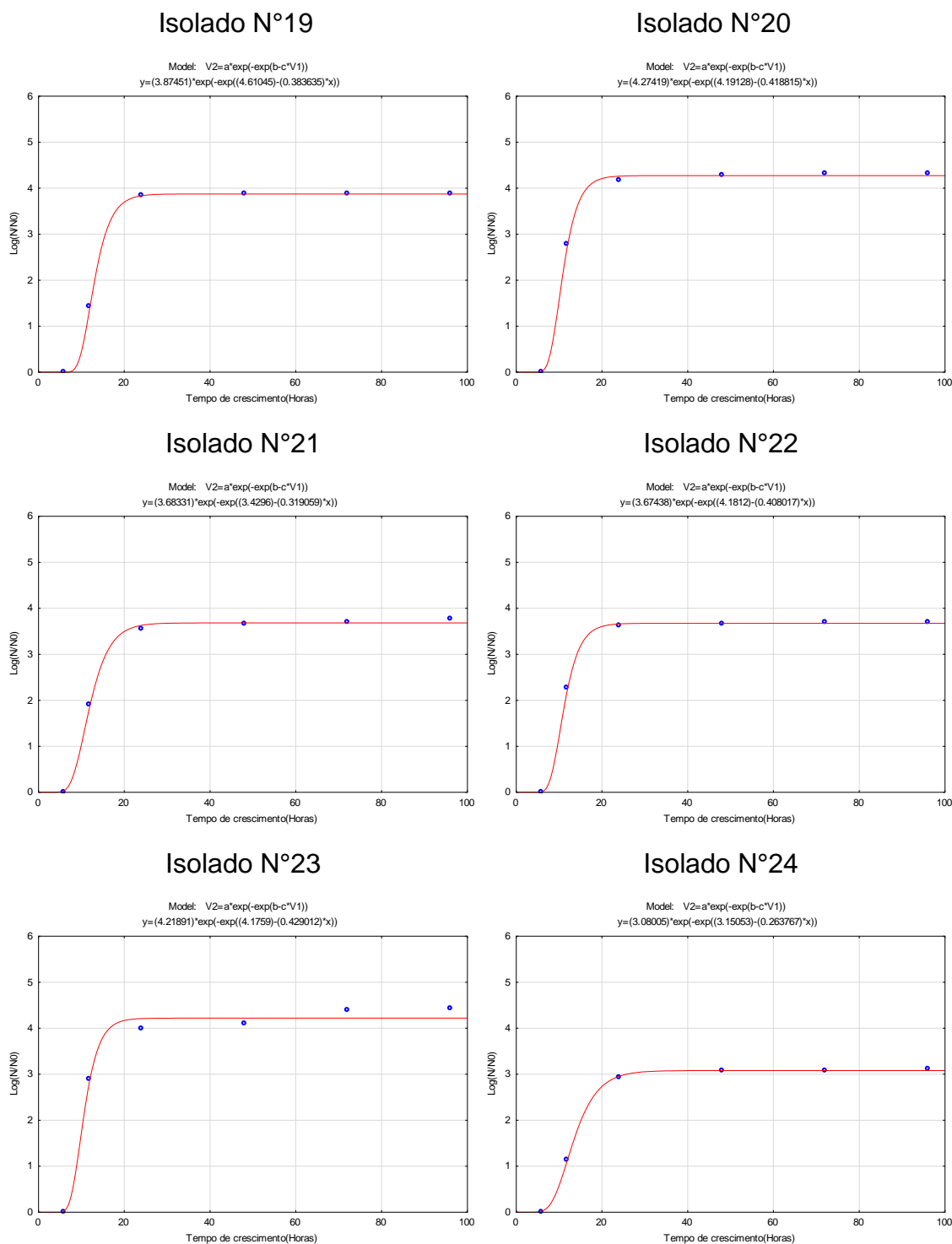


Figura 12: Curva de crescimento dos Isolados 19- 24, cultivados em meio TSB, sob agitação de 120ppm e incubação a 25 °C. Após 96 horas de crescimento.

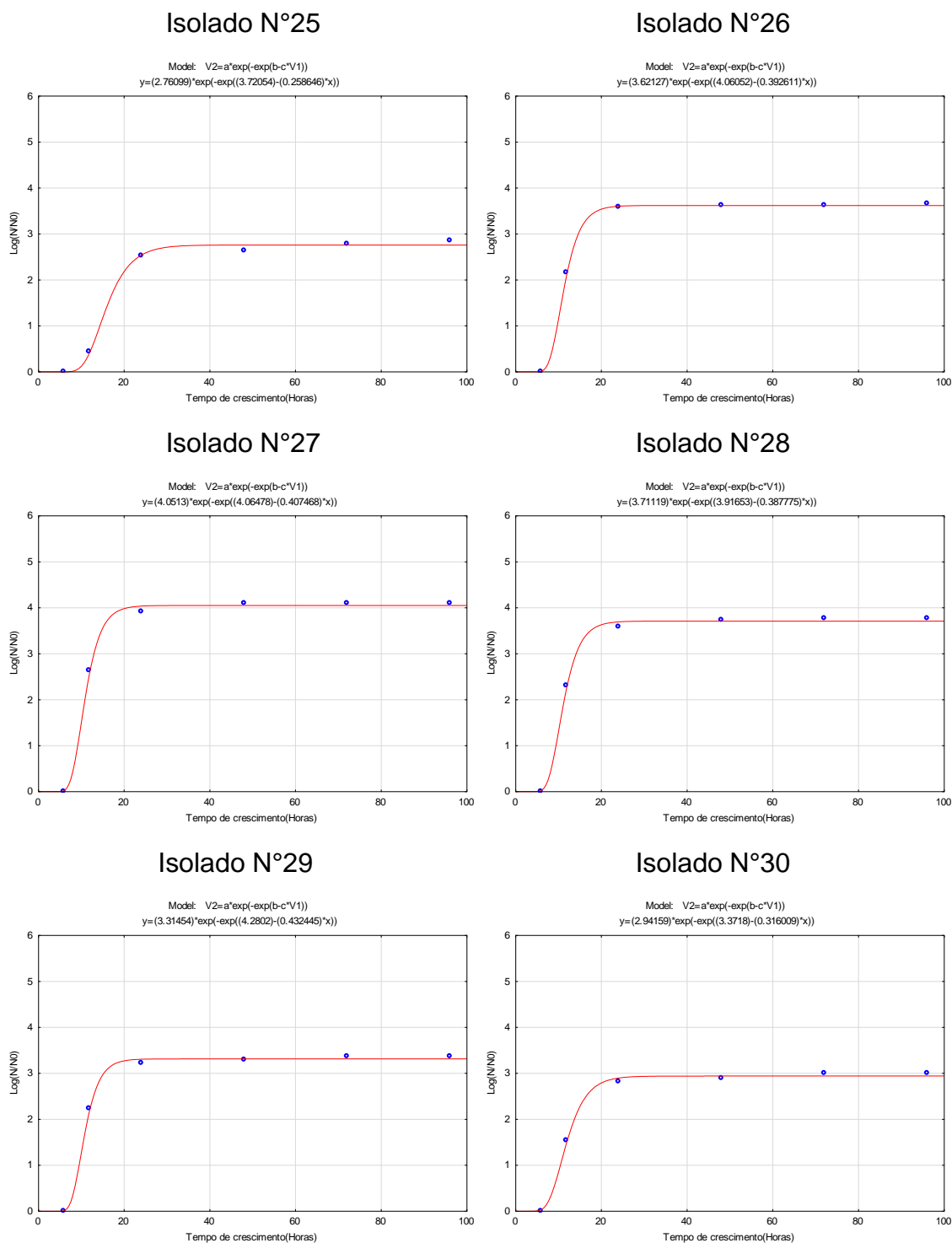


Figura 13: Curva de crescimento dos Isolados 25- 30, cultivados em meio TSB, sob agitação de 120ppm e incubação a 25 °C. Após 96 horas de crescimento.

5.4 Tolerância das bactérias ao BTEX, MTBE e Etanol.

Dos 30 isolados testados, 15 isolados foram tolerantes aos compostos, de estes, oito foram tolerantes para o crescimento em benzeno, nove foram tolerantes para o crescimento na presença de tolueno, quatro para o crescimento em etilbenzeno, três foram tolerantes para o crescimento em xileno. Todas as bactérias cresceram na concentração de 400 ppm de benzeno e de tolueno, no entanto nessa mesma concentração de etilbenzeno e xileno somente nove e 11 isolados respectivamente conseguiram crescer. Somente os isolados N°22 (*Bacillus* sp.) e N°26 (*Enterococcus* sp.) conseguiram crescer nos quatro compostos e em todas as concentrações testadas. Na figura 14 se observa o crescimento em unidades formadoras de colônia das bactérias que foram tolerantes nas diferentes concentrações testadas.

Dos 15 isolados selecionados como tolerantes somente seis foram tolerantes para a mistura do BTEX, sete foram tolerantes para o MTBE e dois isolados cresceram na presença de etanol 25%. Sendo que o Isolado N°16 (*Bacillus* sp.) e o Isolado N°25 (*Bacillus* sp.) foram tolerantes para crescimento em BTEX, MTBE e etanol. Na figura 15 se observa o crescimento microbiano em UFC dos 15 isolados testados na presença de BTEX, MTBE e etanol.

Crescimento microbiano dos Isolados tolerantes ao B, T, E e X

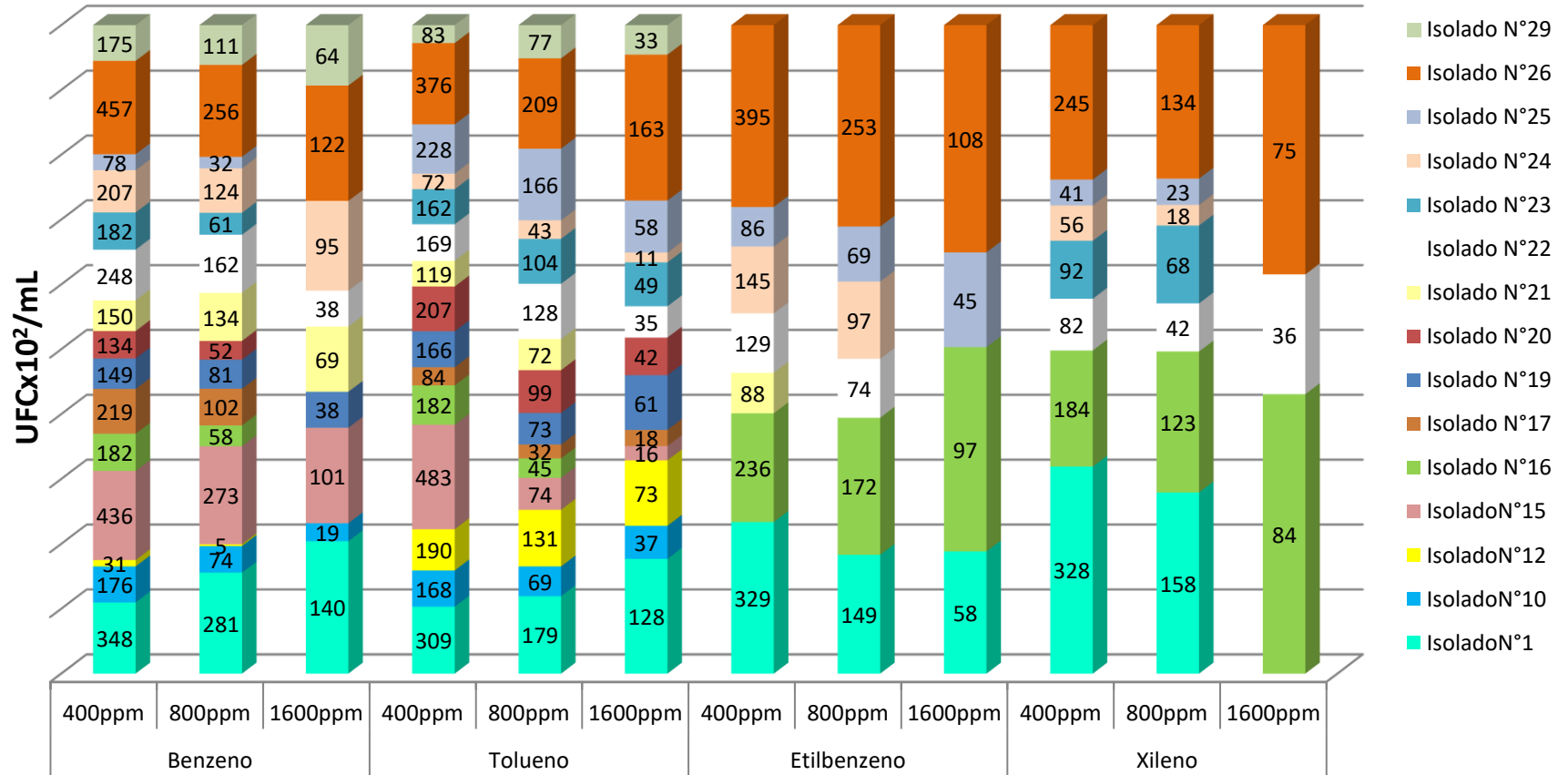


Figura 14-Crescimento microbiano em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) dos isolados tolerantes ao B, T, E e X, nas três concentrações testadas em Meio mínimo mineral.

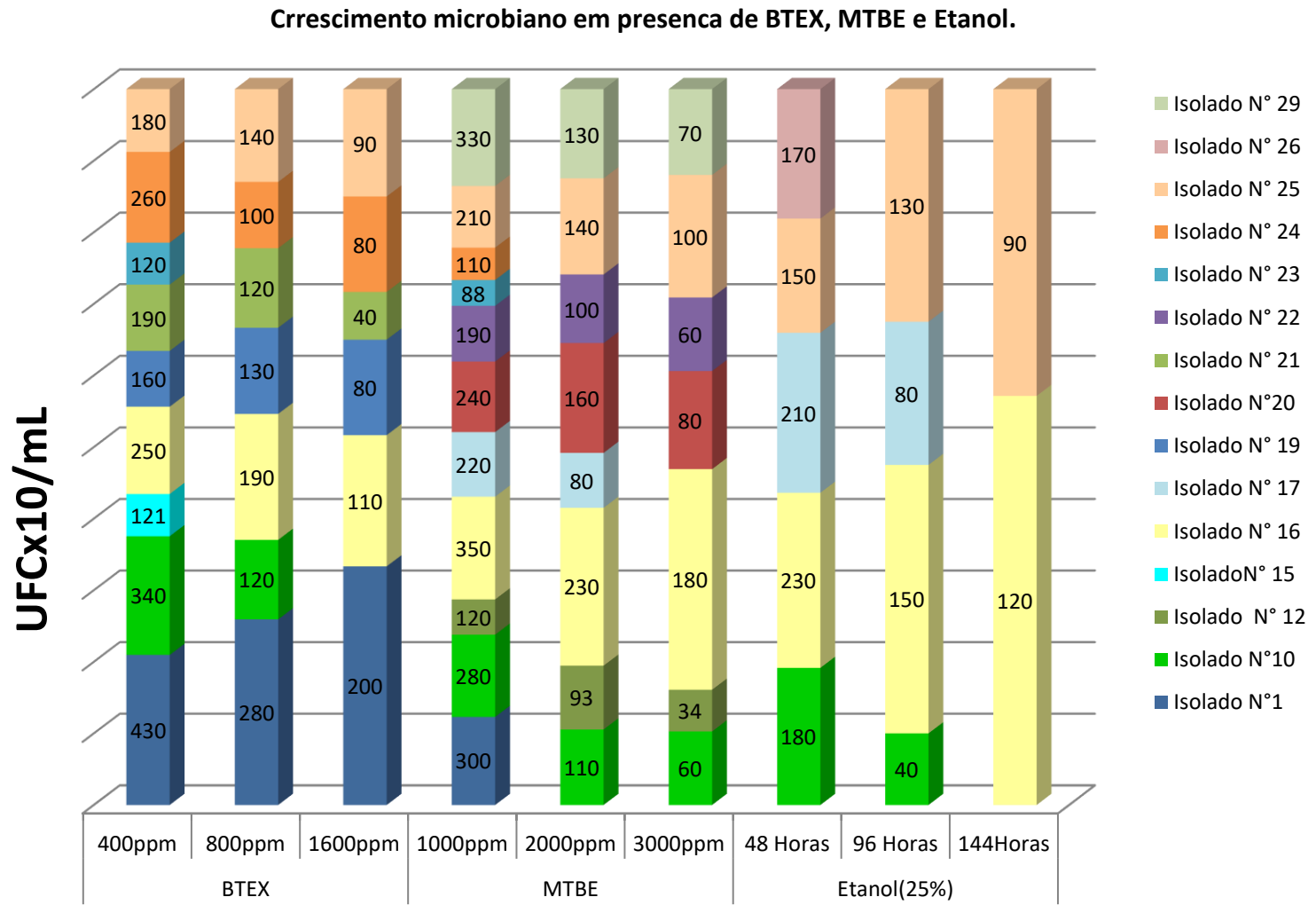


Figura 15-Crescimento microbiano em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) dos 15 isolados em BTEX, MTBE e Etanol no meio mínimo mineral.

5.5 Identificação Molecular

Na análise filogenética baseada no fragmento 16S do gene de RNA ribossômico dos 15 isolados, juntamente com 50 sequências recuperadas das bases de dados (NCBI), foram formados quatro clados (*Bacillus*, *Enterococcus*, *Lysinibacillus* e *Leucobacter*). Todos esses clados apresentaram um valor de bootstrap de 100%, com exceção do gênero *Bacillus* (93%). Figura 16 mostra a árvore filogenética construída com um total de 65 sequências de 351pb utilizando o algoritmo de Neighbor-joining com 1000 pseudoréplicas de bootstrap (valores inferiores a 50% não estão representados). Nomes científicos estão seguidos pelo código do isolado que estão depositadas no GenBank. O isolado NBRC 102203 foi utilizado como fora do grupo. Barra indica 0,05 substituições por sítio.

Quando comparado com as sequências homologas depositadas no Gen Bank, os isolados 10, 19, 21, 22 e 23 ficaram dentro do clado de *B. cereus* com 100% de identidade. O isolado 25 ficou próximo de *B. mycoides* com 99% de identidade. Os isolados 16, 17 e 24 ficaram entre os clados de *B. toyonensis* e *B. thuringiensis* com uma identidade de 100% para ambas as espécies. Por outro lado, a Isolado 1 agrupou-se com a espécie *Enterococcus gallinarum* com 98% de identidade. Nesse mesmo gênero, os Isolados 15, 26 e 20 ficaram entre *E. lactis* e *E. faecium* com 99 e 100% de identidade respectivamente. Já o isolado 12 ficou próximo de *Lysinibacillus macroides* com 99% de identidade. Finalmente a Isolado 29 ficou dentro do gênero *Leucobacter* próximo das espécies *L. salsicius* e *L. chromiireducens* com uma identidade de 96% para ambos os casos.

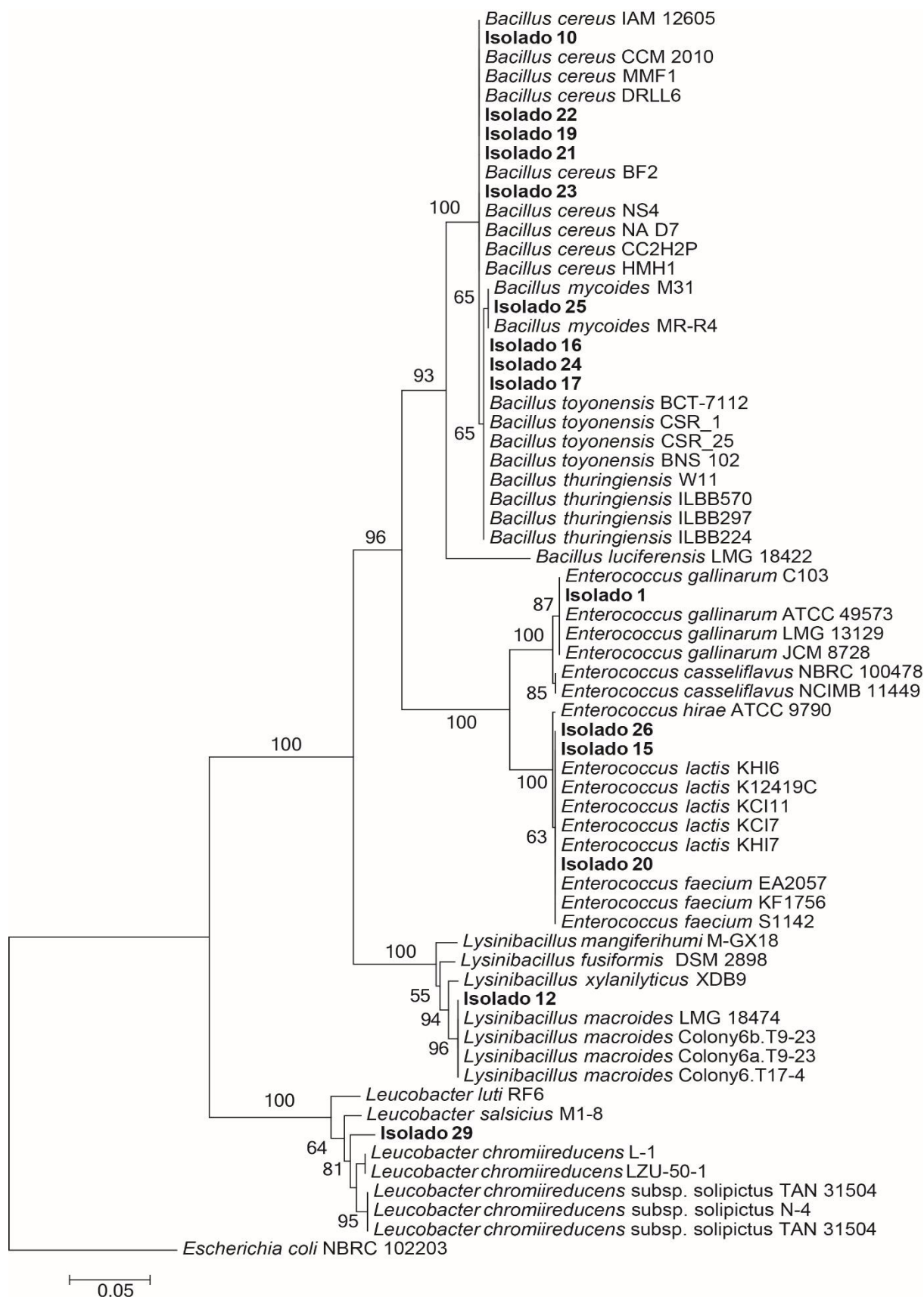


Figura 16- Posição filogenética dos 15 isolados do trabalho (negrito). Análise baseada no fragmento 16S do gene de RNA ribossômico.

5.6 Determinação da degradação bacteriana do BTEX em presença de MTBE e etanol

A equação da curva de calibração gerada para cada um dos compostos se apresenta na tabela 11. Estas equações foram utilizadas para calcular as concentrações dos compostos nos testes de degradação. As concentrações que resultaram em valores menores que zero não foram consideradas. A figura 18 mostra as concentrações dos compostos nos diferentes tratamentos testados no decorrer das 144 horas de cultivo.

Na figura 18, ao compararmos os isolados com o controle, no ensaio usando BTEX observa-se que nas primeiras 48 horas o isolado N° 25 obteve uma maior porcentagem de degradação; depois de 96 horas o etilbenzeno e o xileno obtiveram degradação entre 72 e 96% com ambos isolados, e às 144 horas o isolado N°16 obteve as maiores porcentagens de degradação chegando até 96% de degradação do xileno. No tratamento com BTEX/MTBE, nas primeiras 48 horas o isolado N°25 apresentou valores de 70% e 90% de degradação do etilbenzeno e xilenos respectivamente, às 96 horas o etilbenzeno apresentou valores de 50% e 67% de degradação com o isolado N°25 e o isolado N°16 respectivamente, o m-xileno obteve 69% de degradação como o isolado N°25 e o m-xileno 40% com o isolado N°16. Nas 144 horas as porcentagens de degradação foram abaixo de 30% para todos os compostos. Ainda cabe mencionar que a porcentagem de degradação do MTBE nas primeiras 48 horas ficou abaixo de 30% para ambos isolados, às 96 horas foi de 23 e 79%, e às 144 horas obteve valores de 23 e 79% de degradação com os isolados N°16 e N°25 respectivamente. No tratamento de BTEX/Etanol, as primeiras 48 horas para os xilenos observou-se uma degradação de entre 55% e 75% de degradação, enquanto que para o etilbenzeno obteve-se valores ao redor de 50% com ambos isolados; às 96 horas a degradação do m-

xileno foi 44% e 34% com os isolados N°16 e N°25 respectivamente; e às 144 horas a degradação foi 47% e 68% com os isolados N°16 e N°25 respectivamente. As figuras 19-36 mostram os cromatogramas gerados no cromatógrafo de gases. Nos cromatogramas pode-se observar que o primeiro pico é o do solvente diclorometano, cuja temperatura de ebulição é de 39,8°C, por isso é o primeiro em ser detectado. Os tempos de retenção dos compostos são 4,6; 6,3; 8,1; 8,3; 8,8 minutos para o benzeno, tolueno, etilbenzeno, m-xileno, e o-xileno respectivamente. Fatores de interferência foram descartados devido à ausência de picos em outros tempos assim determinados para os compostos. Nos cromatogramas do tratamento BTEX/Etanol, se apresentam picos de produtos não identificados, estes picos não foram considerados nas análises.

Com os dados gerados de crescimento microbiano realizou-se uma curva de crescimento do $\log(N/N_0)$ comparando os três tratamentos testados o crescimento em MMM para ambos isolados, a figura 16 mostra as curvas de crescimento geradas, onde pode se observar que o isolado N°16 obteve maior crescimento no MMM seguido pelo tratamento com BTEX, BTEX/Etanol e BTEX/MTBE, nessa ordem. O isolado N°25 obteve maior crescimento no BTEX/etanol seguido por o MMM, BTEX, e BTEX/MTBE, nessa ordem.

Tabela 11- Equações da curva de calibração com padrões do Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno, Xilenos e MTBE em concentrações de 500, 1000 e 1500ppm.

Composto	Tempo de Retenção (min)	Concentração (ppm)	Área	Equação da Reta
Benzeno	4.624	500	6966.5	$y = 288.29x - 170212$ $R^2 = 0.8639$
		1000	52005.3	
		1500	295253.6	
Tolueno	6.356	500	68920.9	$y = 227.97x - 72975$ $R^2 = 0.8475$
		1000	99172.3	
		1500	296890.7	
Etilbenzeno	8.165	500	48665.1	$y = 109.47x + 4367.9$ $R^2 = 0.9016$
		1000	134721.3	
		1500	158139	
m-Xileno	8.344	500	39630	$y = 86.32x - 5568.9$ $R^2 = 0.9934$
		1000	76674.2	
		1500	125950.4	
o-Xileno	8.833	500	16928	$y = 25.17x + 2336.7$ $R^2 = 0.9292$
		1000	23494.2	
		1500	42098.1	
MTBE	3.641	500	3674	$y = 114.96x - 53214$ $R^2 = 0.9997$
		1000	12923.9	
		1500	118631.1	

Y=Área do pico, X= concentração.

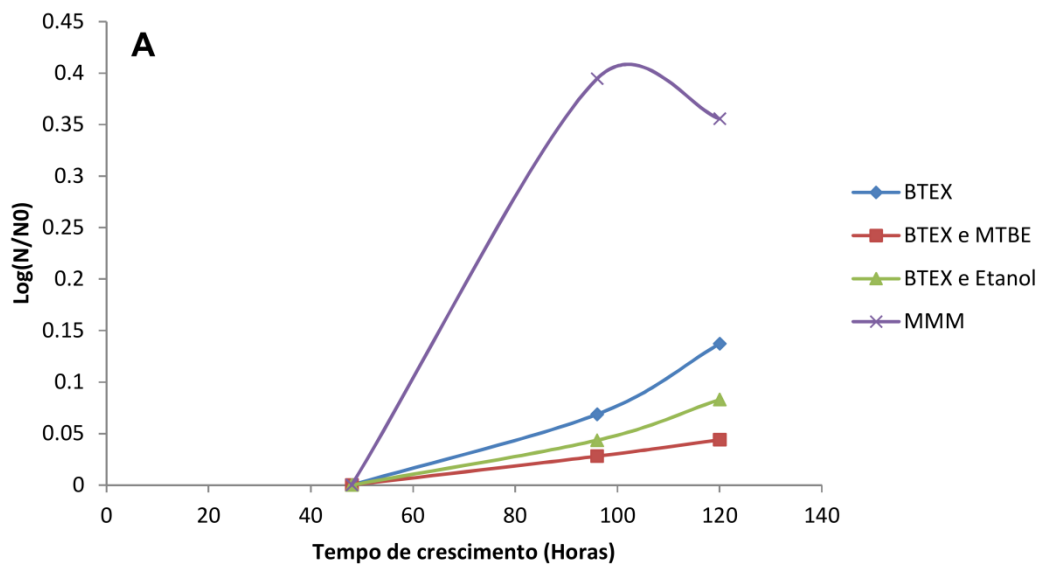
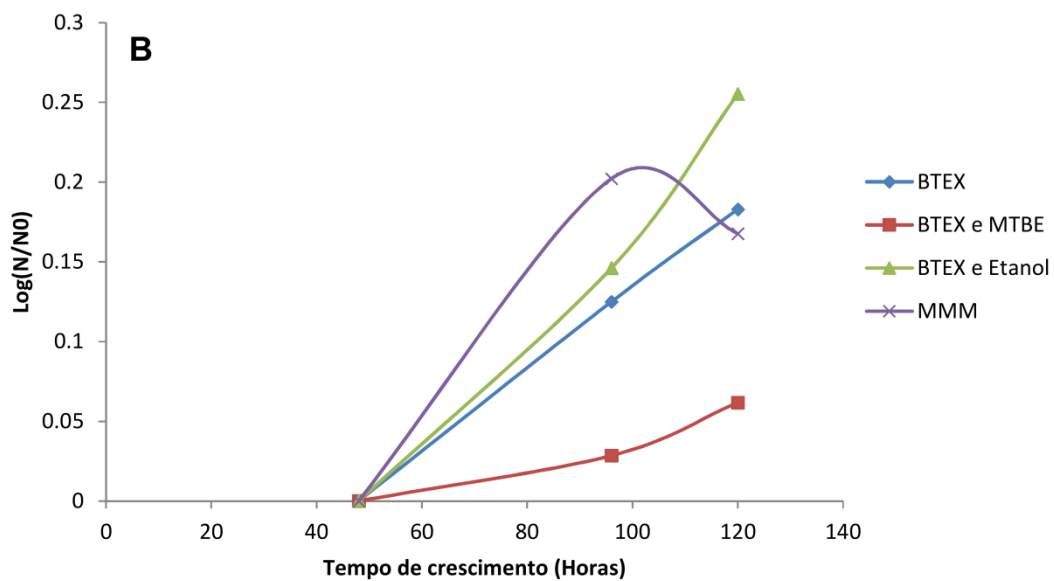
Crescimento Microbiano do Isolado N° 16 nos três tratamentos**Crescimento Microbiano do Isolado N° 25 nos três tratamentos**

Figura 17- Curva de crescimento dos Isolados nos três tratamentos testados em meio mínimo mineral: A, isolado N°16; B, isolado N°25.

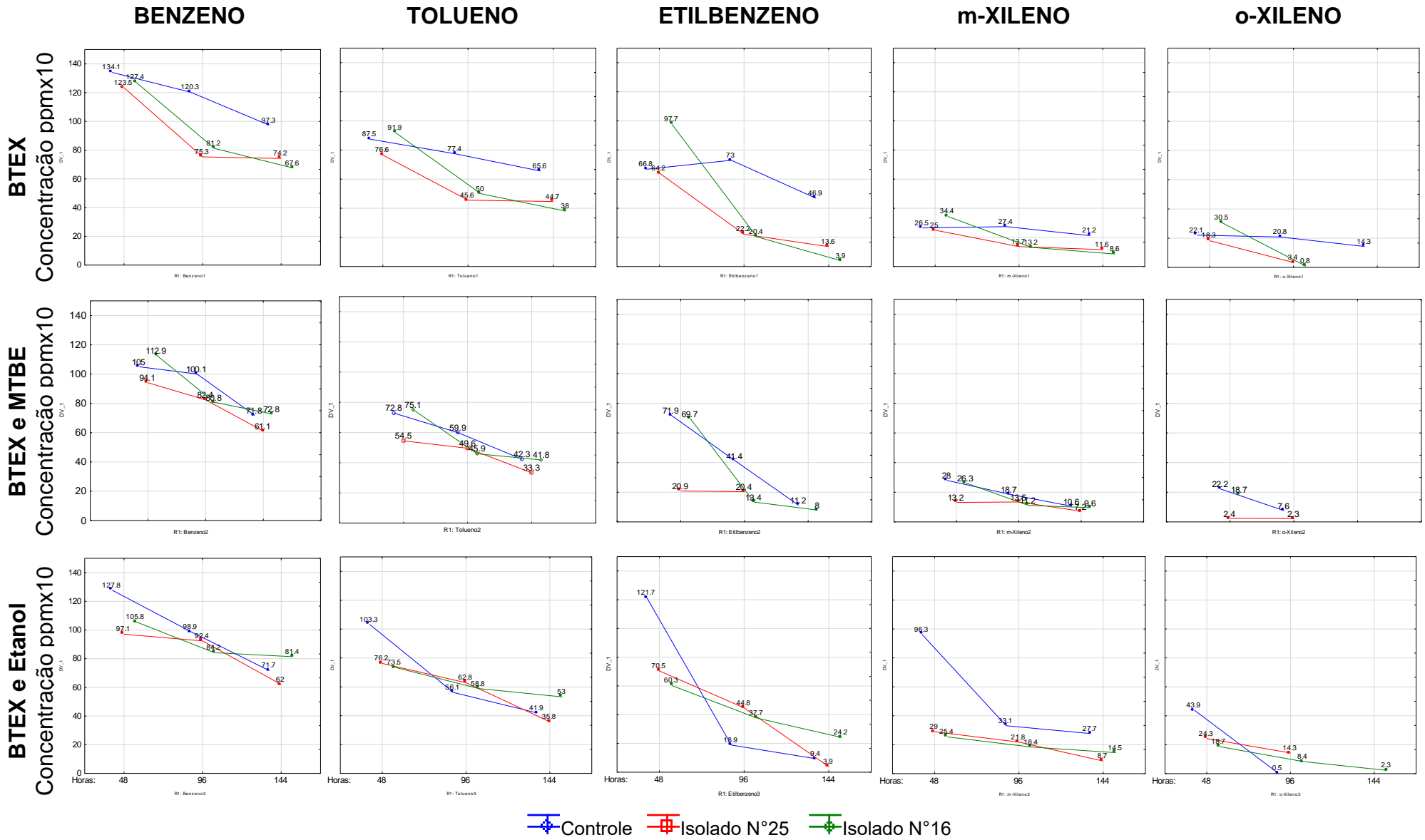
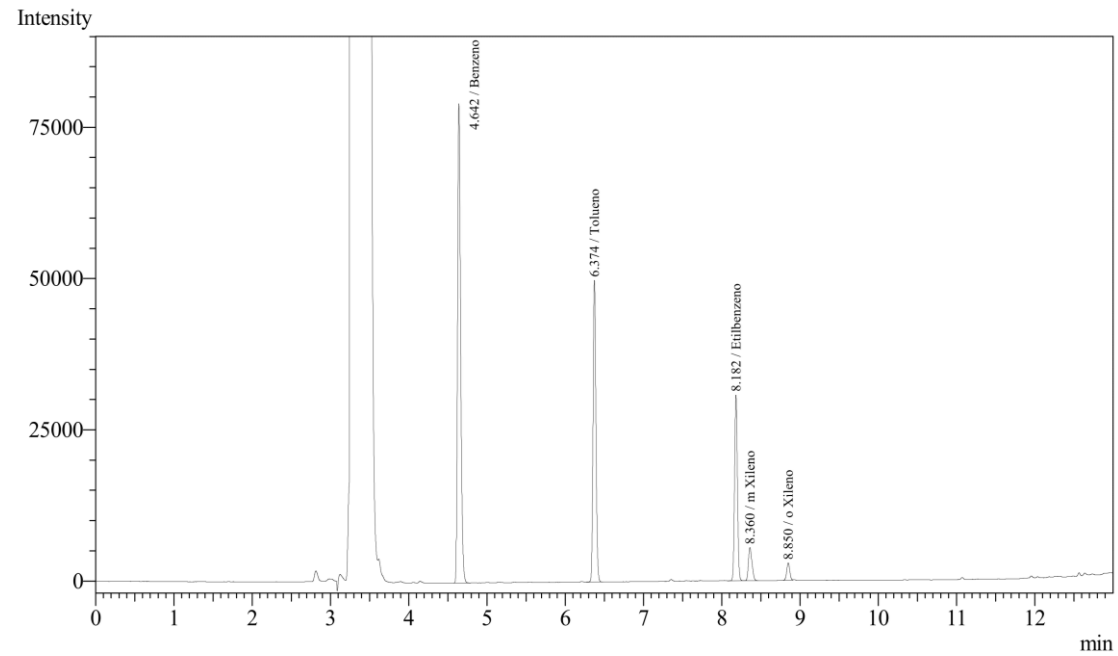


Figura 18: Concentração do B, T, E, X nos três tratamentos testados, na hora 48, 96 e 144, com inoculação dos isolados N°16 e N°25.



Composto	Tempo de retenção (min)	Área	Altura do Pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
Benzeno	4.642	216484	78879.6	1341
Tolueno	6.374	126557.3	49605.5	875
Etilbenzeno	8.182	77494.2	30524	668
m Xileno	8.36	17329.3	5471.3	265
o Xileno	8.85	7900.2	2876.7	221

Figura 19- Cromatograma do Tratamento com BTEX 48 horas de incubação: Controle

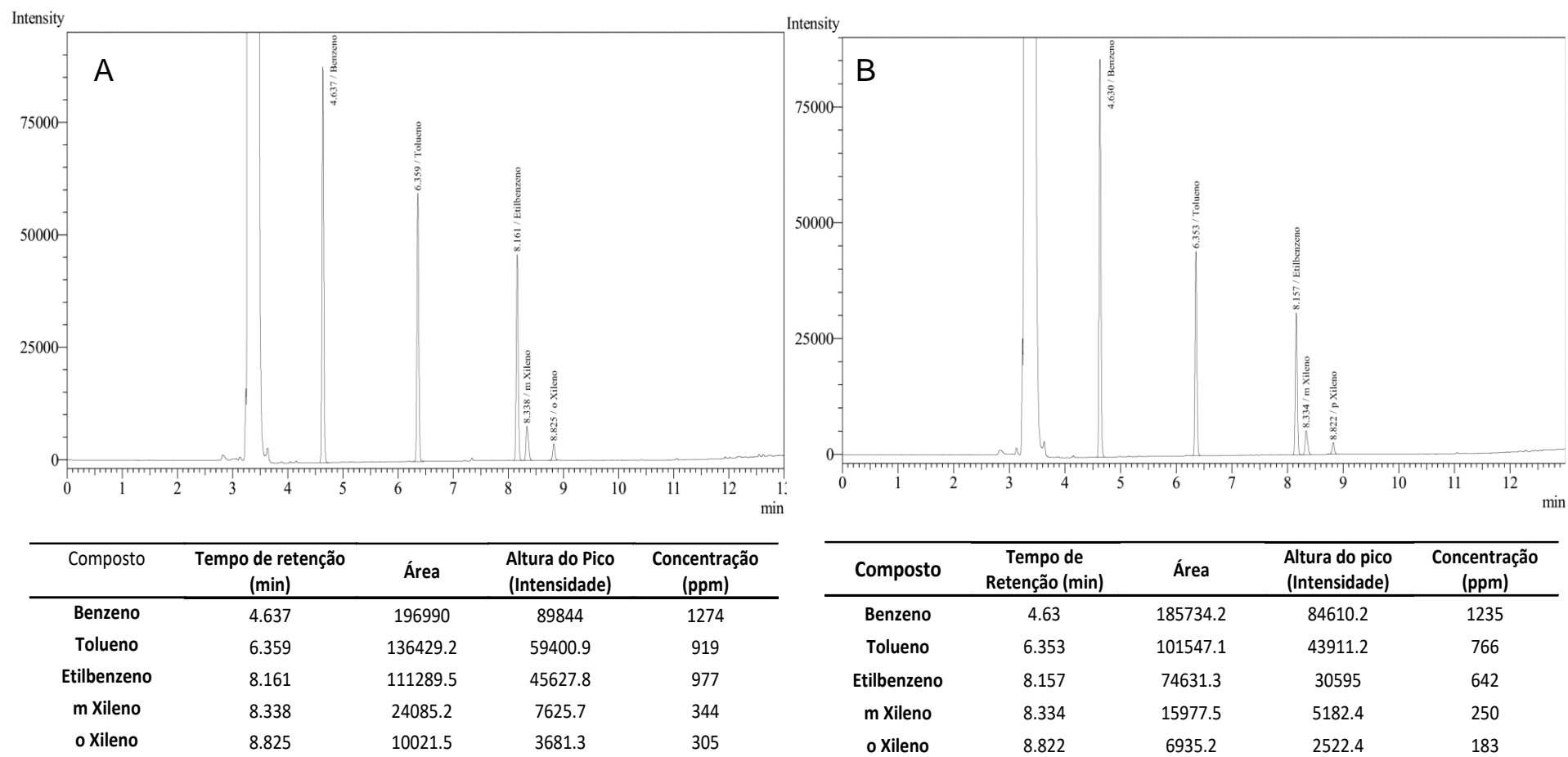
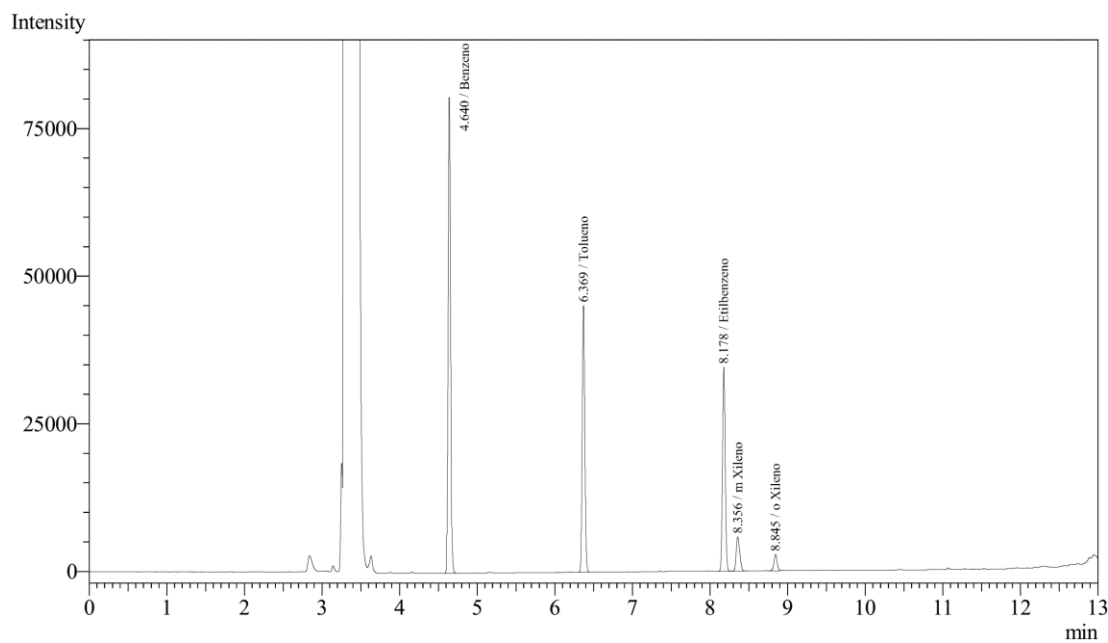
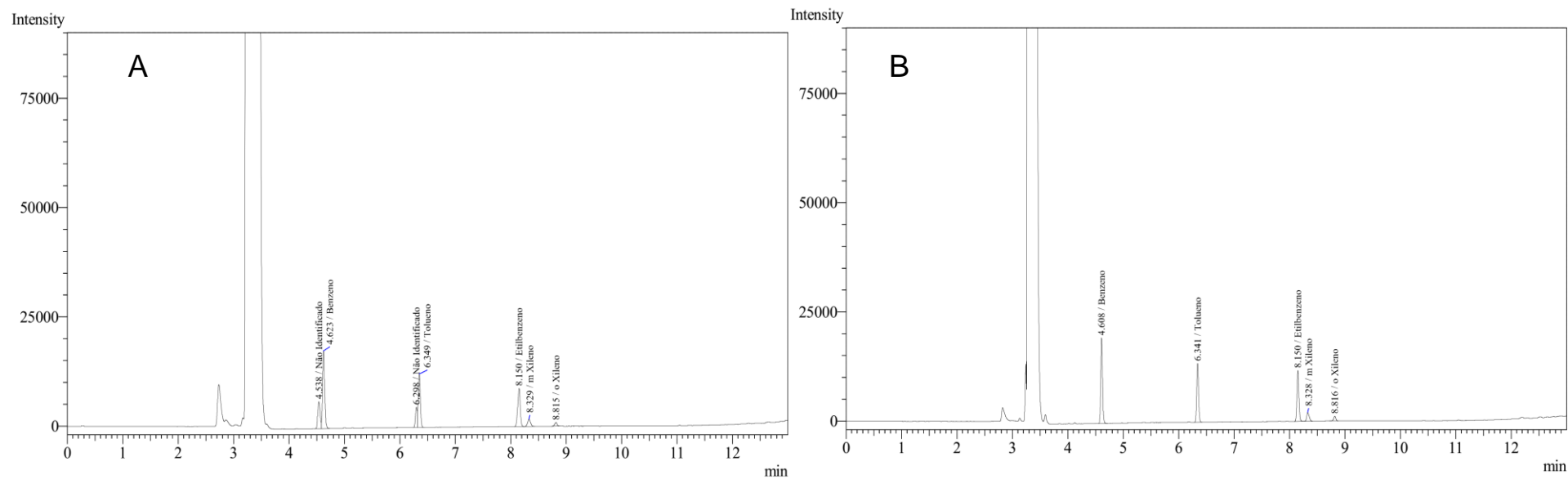


Figura 20- Cromatograma do Tratamento com BTEX 48 horas de incubação: A, Isolado N°16; B, Isolado N°25.



Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
Benzeno	4.64	176668.1	79703	1203
Tolueno	6.369	103495.5	44963.2	774
Etilbenzeno	8.178	84250.6	34279.1	730
m Xileno	8.356	18102.2	5764.8	274
o Xileno	8.845	7559.8	2737.7	208

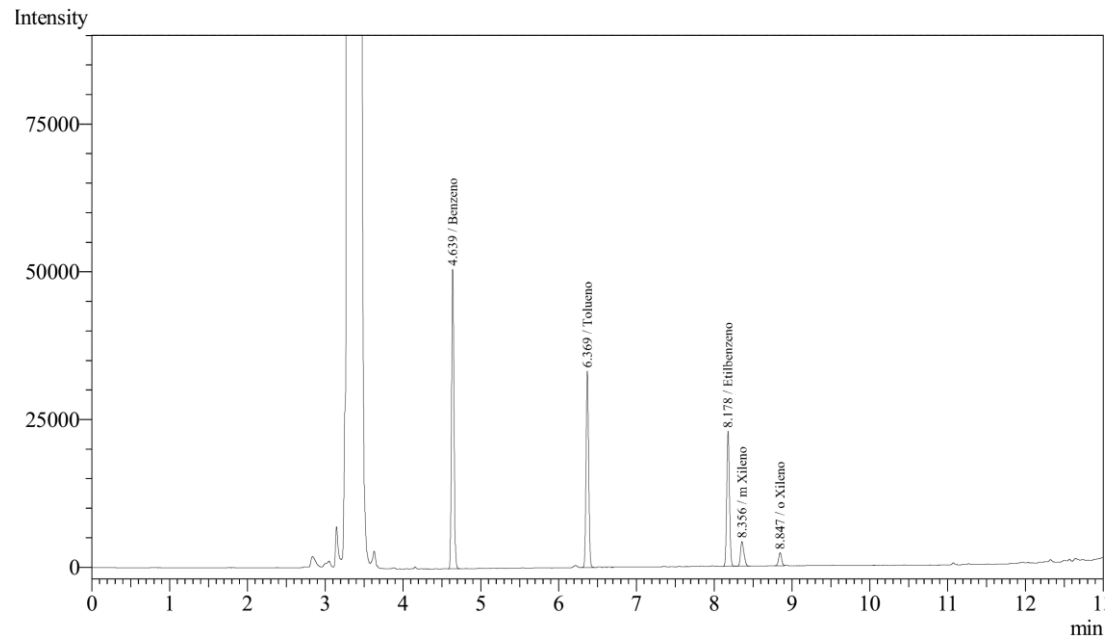
Figura 21- Cromatograma do Tratamento com BTEX 96 horas de incubação: Controle



Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
Benzeno	4.577	63943.3	19605.2	812
Tolueno	6.334	41060	14722.5	500
Etilbenzeno	8.162	26652.3	10098.1	204
m-Xileno	8.343	5805.7	1779.7	132
o-Xileno	8.835	2542.4	924.2	8

Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
Benzeno	4.608	43586.7	19480.1	753
Tolueno	6.341	31024.9	13402.2	456
Etilbenzeno	8.15	28656.1	11584.8	222
m-Xileno	8.328	6295.4	1997.7	137
o-Xileno	8.816	3197.8	1112.4	34

Figura 22- Cromatograma do Tratamento com BTEX 96 horas de incubação: A, Isolado N°16; B, Isolado N°25.



Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
Benzeno	4.639	110353	50008.9	973
Tolueno	6.369	76597.7	33114.5	656
Etilbenzeno	8.178	55654.7	22701.2	469
m-Xileno	8.356	12703.9	4145.4	212
o-Xileno	8.847	5934	2217.8	143

Figura 23-Cromatograma do Tratamento com BTEX 144 Horas de incubação: Controle.

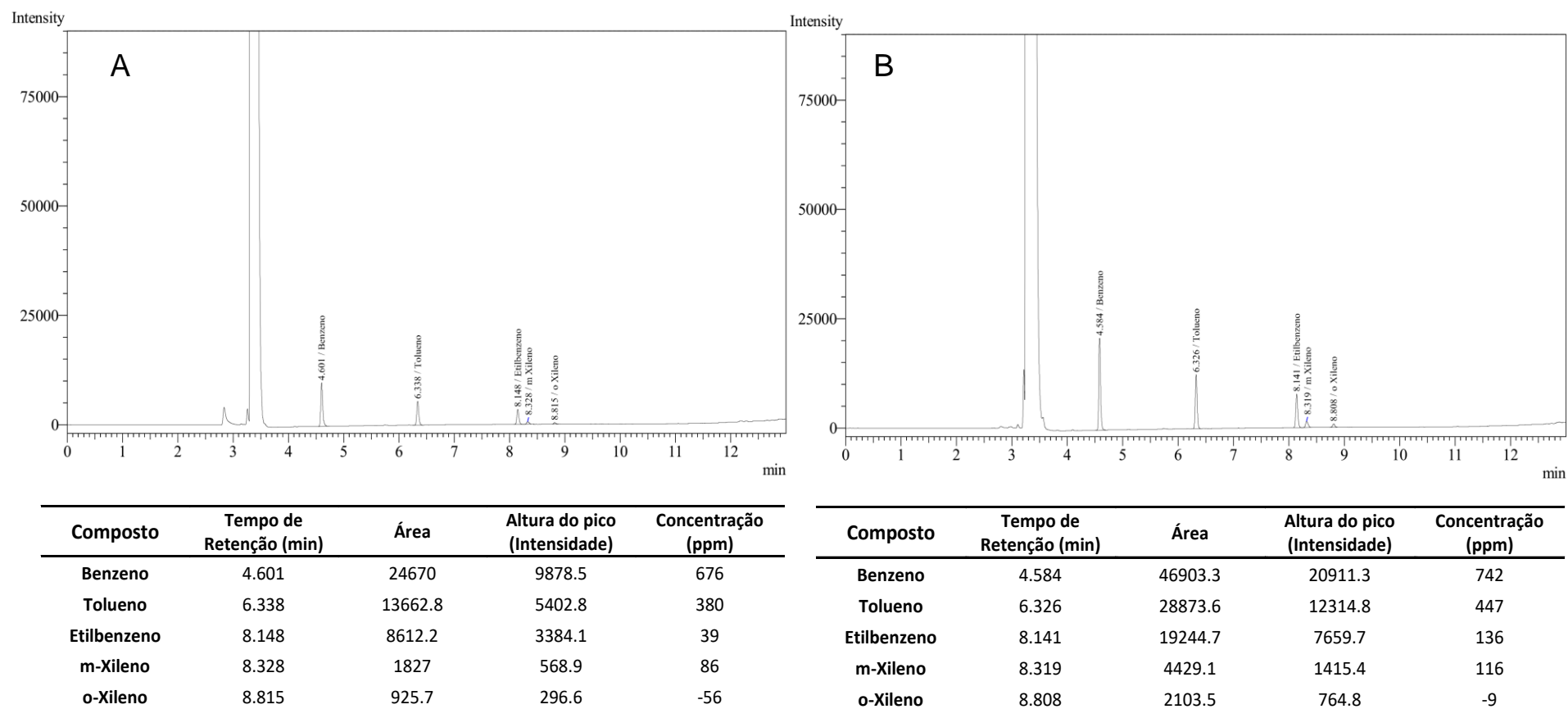
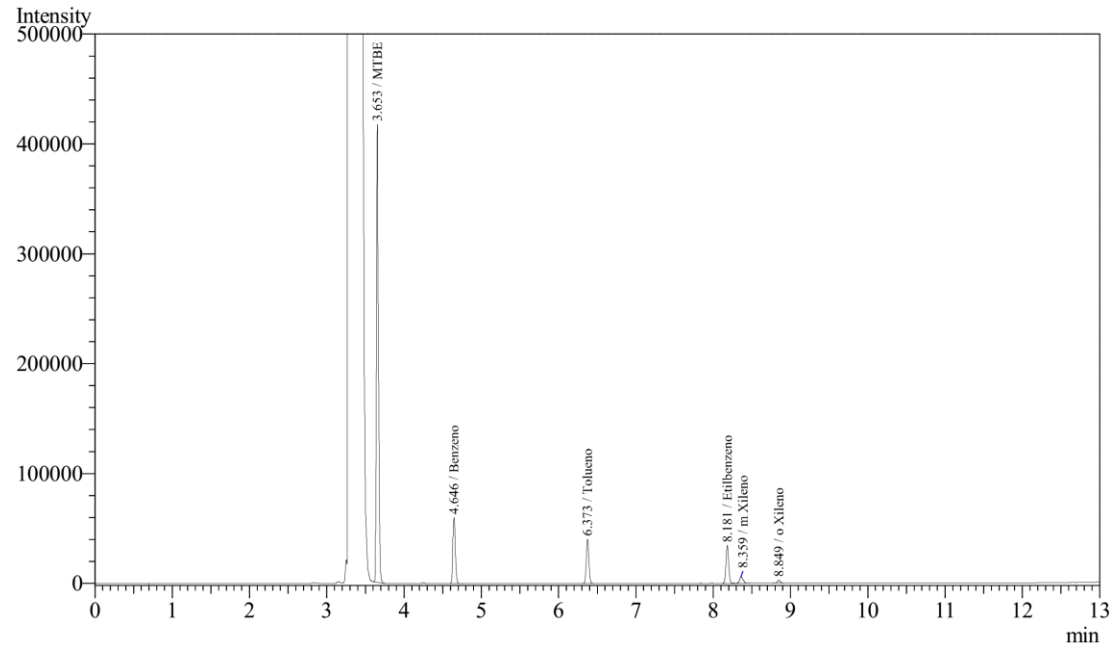
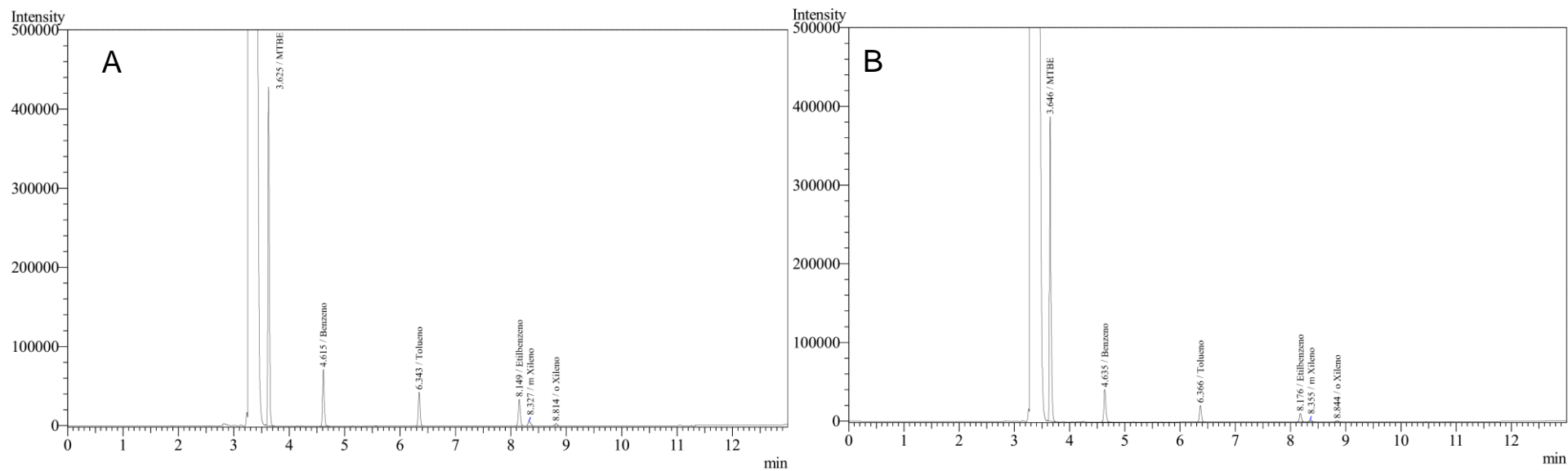


Figura 24- Cromatograma do Tratamento com BTEX 144 horas de incubação: A, Isolado N°16; B, Isolado N°25.



Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
MTBE	3.646	764386	379996.6	7170
Benzeno	4.635	101024	40740.6	1050
Tolueno	6.366	51344.1	20840.1	728
Etilbenzeno	8.176	27257.5	10652.4	719
m-Xileno	8.355	5805.9	1844.7	280
o-Xileno	8.844	2951.8	1050.8	222

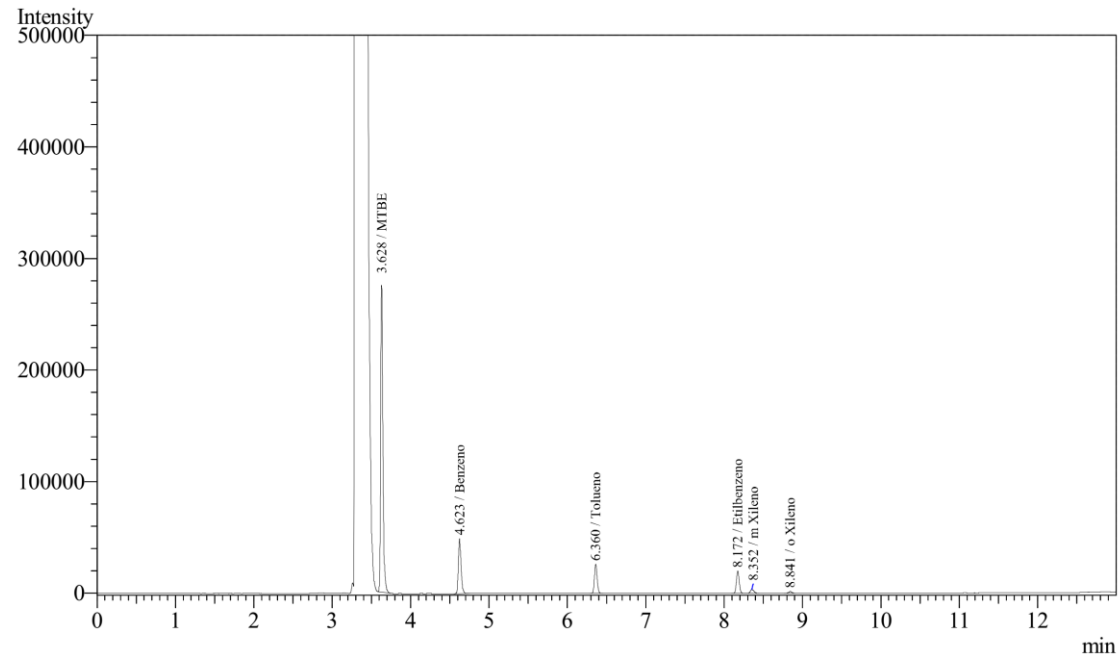
Figura 25-Cromatograma do Tratamento BTEX e MTBE 48 Horas de Incubação: Controle



Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
MTBE	3.625	782460	426586.1	7269
Benzeno	4.615	155295.3	71129.2	1129
Tolueno	6.343	98323.2	42091.1	751
Etilbenzeno	8.149	80691.2	32995.1	697
m-Xileno	8.327	17167.1	5495.7	263
o-Xileno	8.814	7040.8	2588.8	187

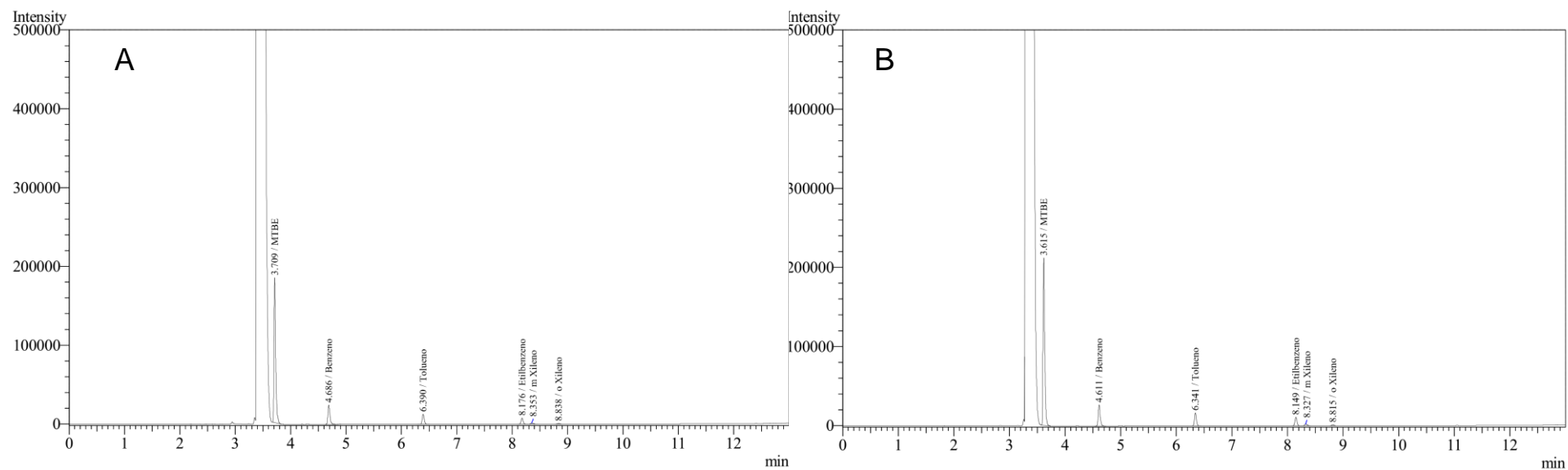
Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
MTBE	3.646	764386	379996.6	7112
Benzeno	4.635	101024	40740.6	941
Tolueno	6.366	51344.1	20840.1	545
Etilbenzeno	8.176	27257.5	10652.4	209
m-Xileno	8.355	5805.9	1844.7	132
o-Xileno	8.844	2951.8	1050.8	24

Figura 26-Cromatograma do Tratamento BTEX e MTBE 48 horas de incubação: A, Isolado N°16; B, Isolado N°25.



Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
MTBE	3.615	439981.6	210276.9	5296
Benzeno	4.611	67297.6	26487.2	1001
Tolueno	6.341	40137.5	16372.2	599
Etilbenzeno	8.149	26752.9	10547.6	414
m-Xileno	8.327	6065.9	1996.3	187
o-Xileno	8.815	2914	1090.7	76

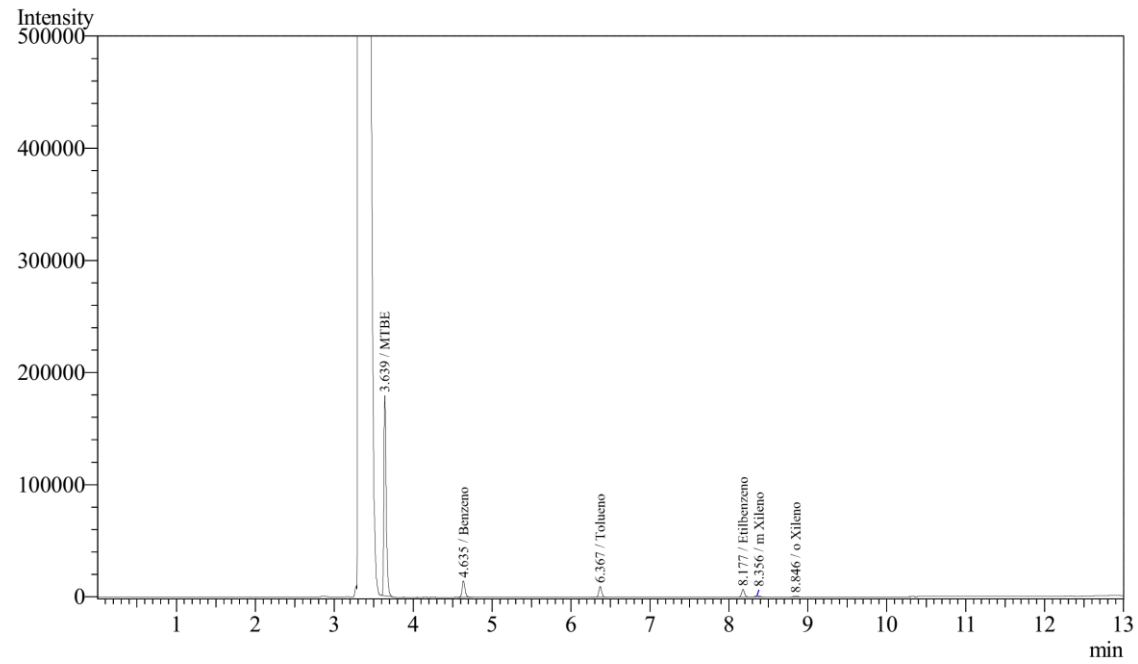
Figura 27- Cromatograma do Tratamento BTEX e MTBE 96 horas de incubação: Controle



Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
MTBE	3.709	388152.4	182696.7	3839
Benzeno	4.686	62687.9	24303.1	808
Tolueno	6.39	31742	12618.7	459
Etilbenzeno	8.176	19019.2	7599.6	134
m-Xileno	8.353	4084.9	1263.8	112
o-Xileno	8.838	1816.6	682.1	-21

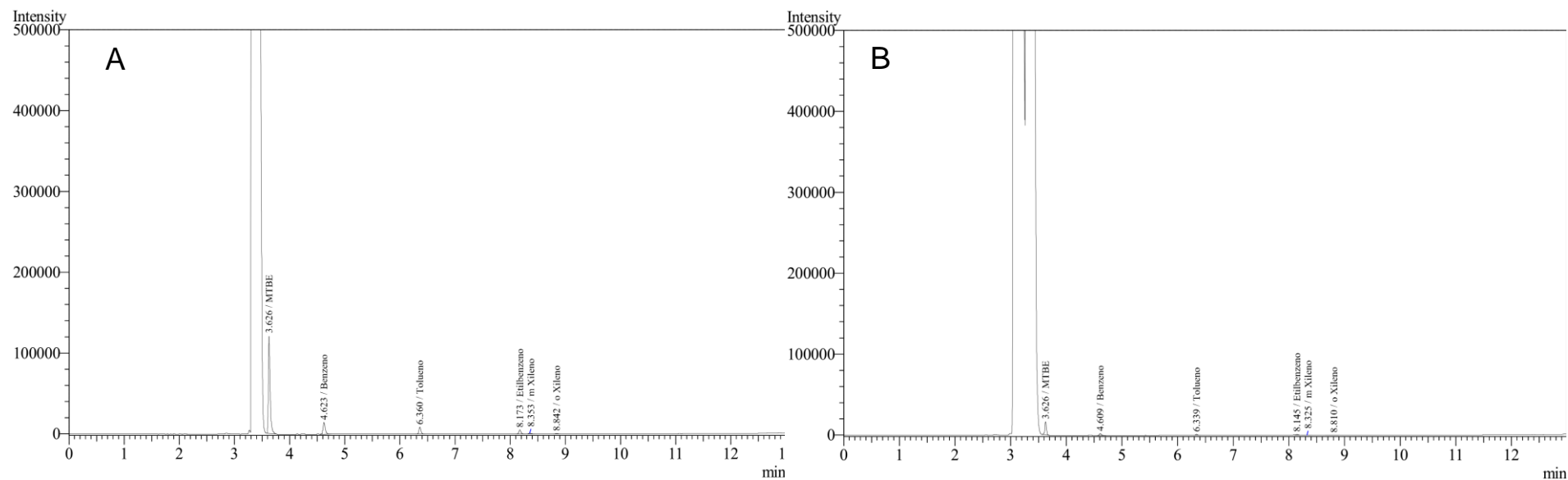
Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
MTBE	3.615	439981.6	210276.9	4290
Benzeno	4.611	67297.6	26487.2	824
Tolueno	6.341	40137.5	16372.2	496
Etilbenzeno	8.149	26752.9	10547.6	204
m-Xileno	8.327	6065.9	1996.3	135
o-Xileno	8.815	2914	1090.7	23

Figura 28- Cromatograma do Tratamento BTEX e MTBE 96 horas de incubação: A, Isolado N°16; B, Isolado N°25.



Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
MTBE	3.626	34959.8	16428.7	3683
Benzeno	4.609	5797.3	2364.9	718
Tolueno	6.339	2950.2	1251.1	423
Etilbenzeno	8.145	2202.3	928	112
m-Xileno	8.325	689.3	178.4	106
o-Xileno	8.81	177	65.4	-30

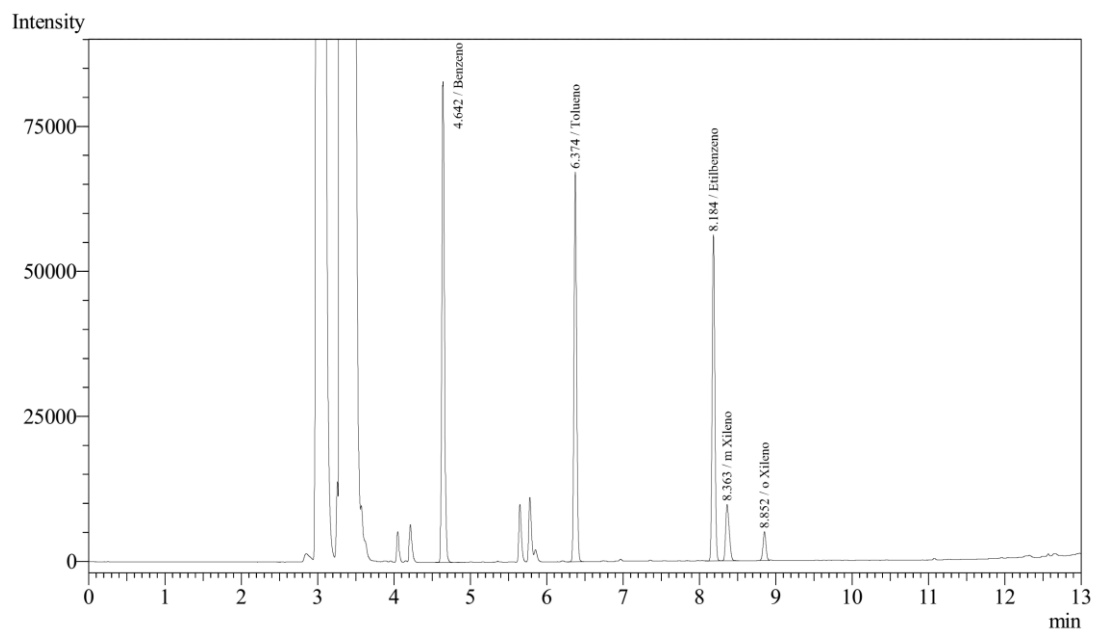
Figura 29- Cromatograma do Tratamento BTEX e MTBE 144 horas de incubação: Controle



Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
MTBE	3.626	271253.9	120045.9	2822
Benzeno	4.623	39786.6	14650.3	728
Tolueno	6.36	22309.4	8630.6	418
Etilbenzeno	8.173	13174.6	5017.3	80
m-Xileno	8.353	2752.4	864.4	96
o-Xileno	8.842	1270.4	482	-42

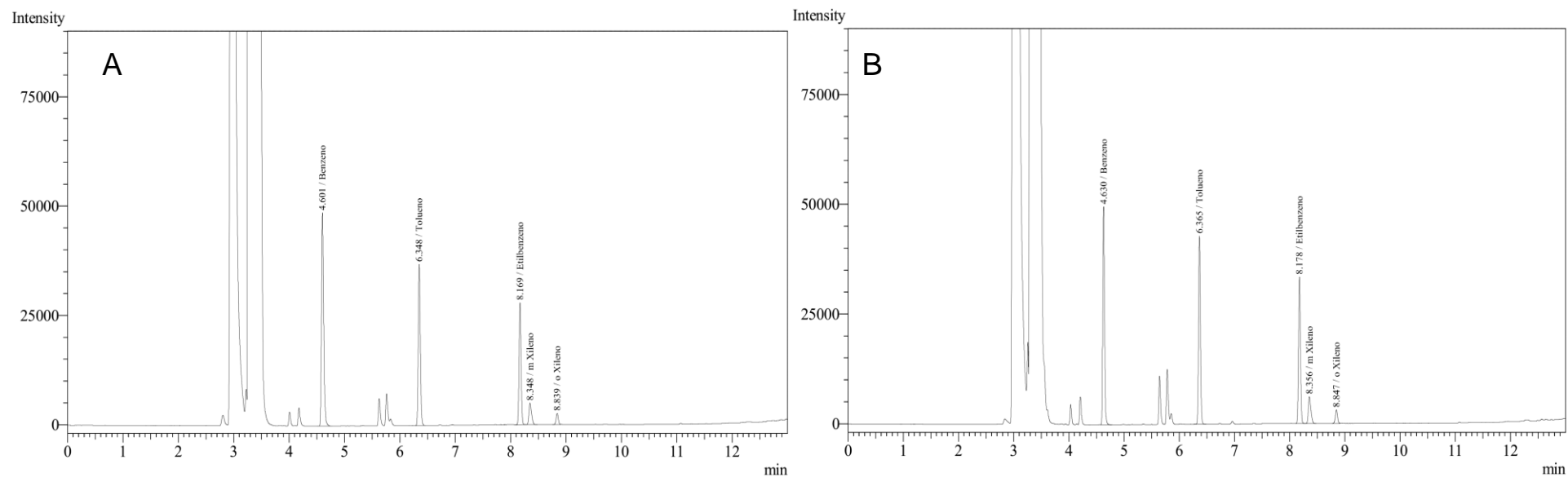
Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
MTBE	3.626	34959.8	16428.7	767
Benzeno	4.609	5797.3	2364.9	611
Tolueno	6.339	2950.2	1251.1	333
Etilbenzeno	8.145	2202.3	928	-20
m-Xileno	8.325	689.3	178.4	72
o-Xileno	8.81	177	65.4	-86

Figura 30- Cromatograma do Tratamento BTEX e MTBE 144 horas de incubação: A, Isolado N°16; B, Isolado N°25.



Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
Benzeno	4.642	198151.7	82590.3	1278
Tolueno	6.374	162449.4	66984.2	1033
Etilbenzeno	8.184	137546.6	56026.6	1217
m-Xileno	8.363	31554.9	9687.8	963
o-Xileno	8.852	13375.7	4944.4	439

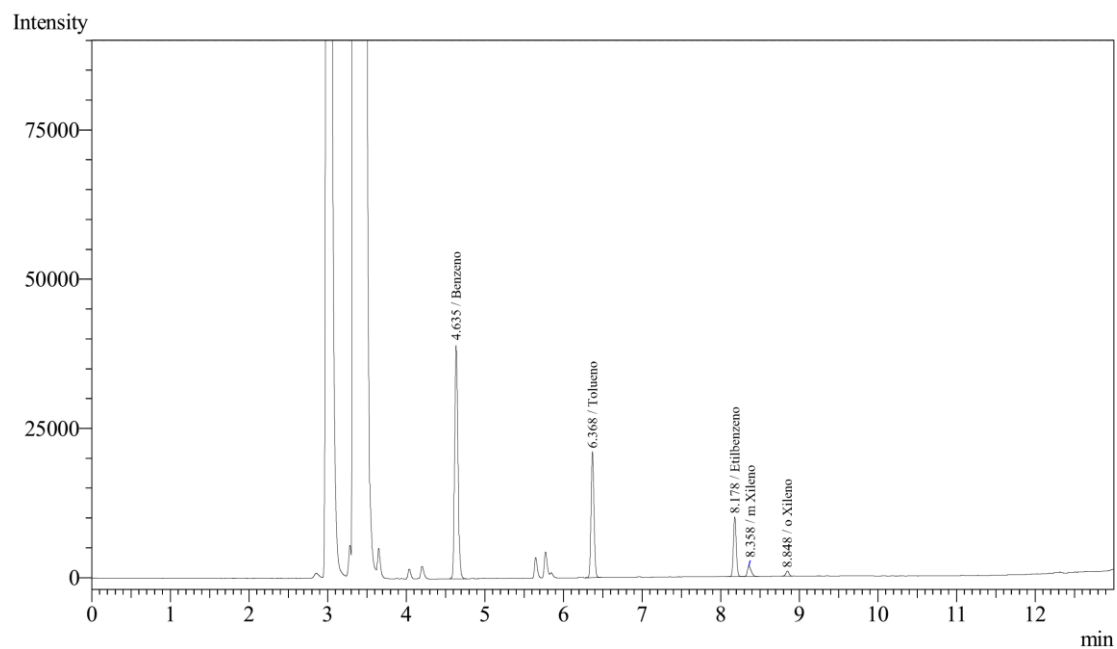
Figura 31- Cromatograma do Tratamento BTEX e Etanol 48 horas de incubação: Controle.



Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
Benzeno	4.601	134733.7	48340.6	1058
Tolueno	6.348	94645.7	36624.1	735
Etilbenzeno	8.169	70382.7	27849.1	603
m-Xileno	8.348	16357	4946.6	254
o-Xileno	8.839	7034.5	2543.3	187

Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
Benzeno	4.63	109672.9	49011.5	971
Tolueno	6.365	100740.1	42547.4	762
Etilbenzeno	8.178	81561.1	33134.9	705
m-Xileno	8.356	19484.7	6111.6	290
o-Xileno	8.847	8465	3097.6	243

Figura 32- Cromatograma do Tratamento BTEX e Etanol 48 horas de incubação: A, Isolado 16; B, Isolado 25.



Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
Benzeno	4.635	114840.3	39109.9	989
Tolueno	6.368	54807.7	21048.8	561
Etilbenzeno	8.178	25106.1	9956.1	189
m-Xileno	8.358	5701.6	1712.5	331
o-Xileno	8.848	2458.1	878.4	5

Figura 33- Cromatograma do Tratamento BTEX e Etanol 96 horas de incubação: Controle.

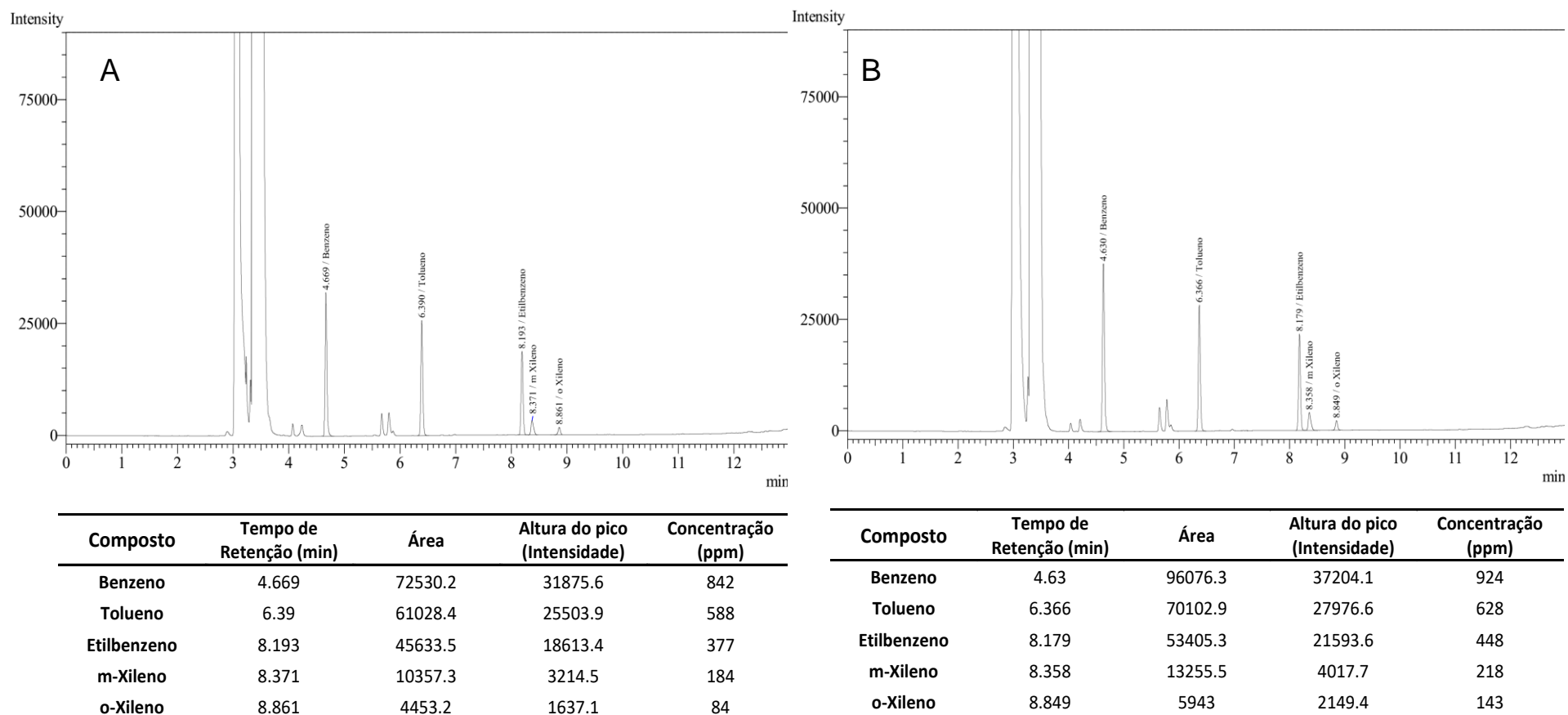
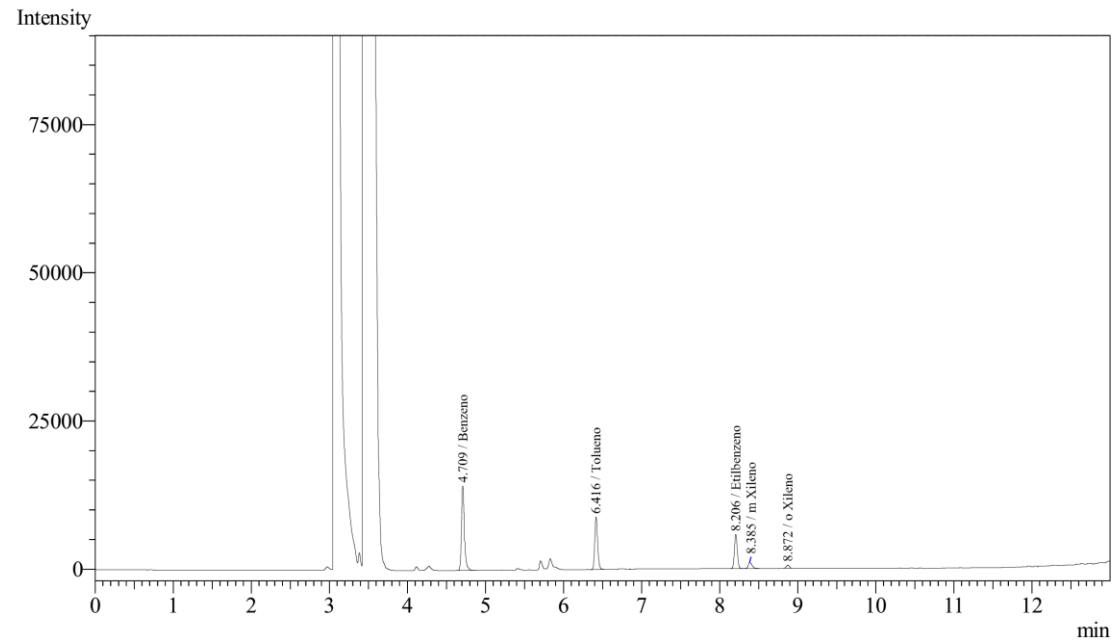


Figura 34- Cromatograma do Tratamento BTEX e Etanol 96 horas de incubação: A, Isolado 16; B, Isolado 25.



Composto	Tempo de Retenção (min)	Área	Altura do pico (Intensidade)	Concentração (ppm)
Benzeno	4.709	36624.7	14124.4	717
Tolueno	6.416	22557.9	8790	419
Etilbenzeno	8.206	14683.5	5717.5	94
m-Xileno	8.385	3465.1	1013.3	277
o-Xileno	8.872	1410.9	523	-37

Figura 35- Cromatograma do Tratamento BTEX e Etanol 144 horas de incubação: Controle.

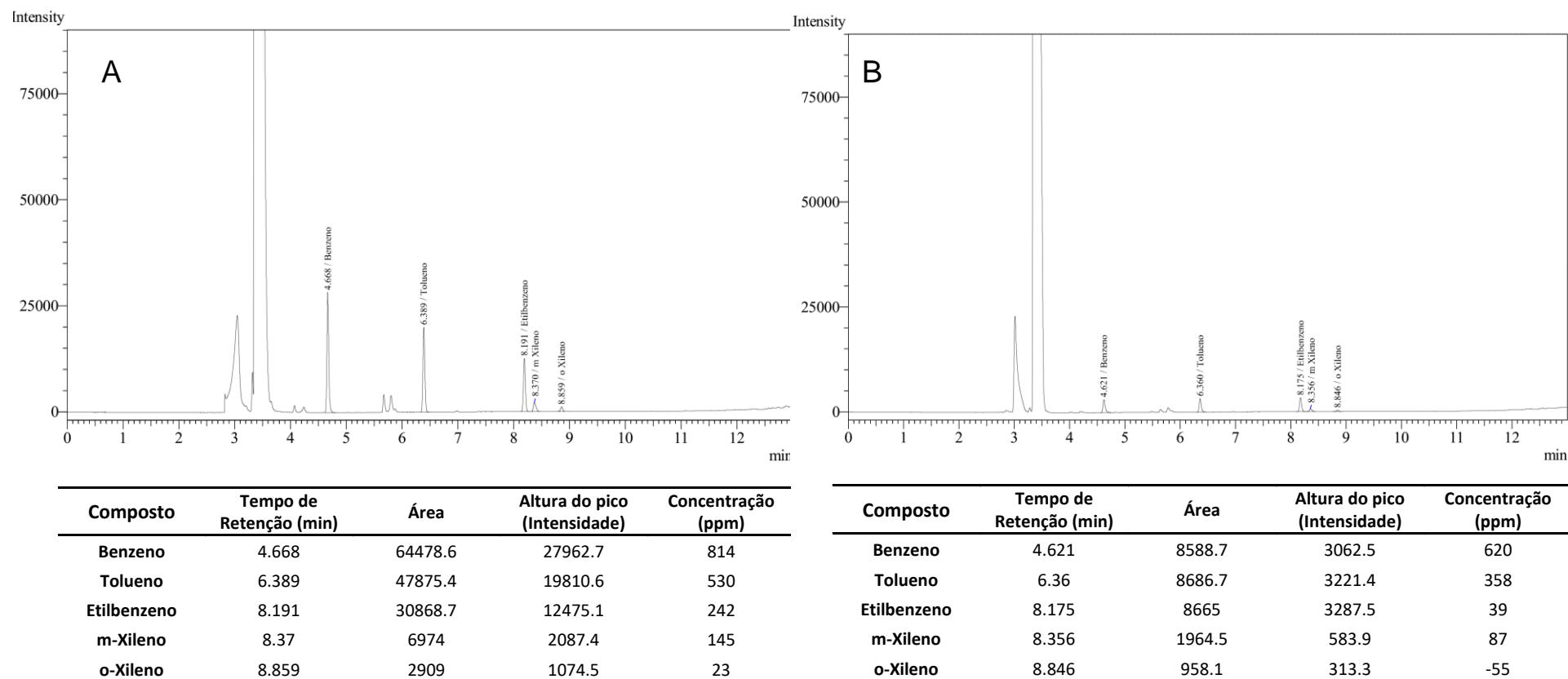


Figura 36- Cromatograma do Tratamento BTEX e Etanol 144 horas de incubação: A, Isolado 16; B, Isolado 25.

6. DISCUSSÃO

Segundo Maier et al (2009) a população bacteriana com potencial de degradação de hidrocarbonetos frequentemente se encontra em pequenas quantidades no meio ambiente. Isto muitas vezes dificulta o isolamento da população bacteriana, portanto a etapa de enriquecimento favorece o crescimento das bactérias que apresentam o fenótipo desejado (Barton et al, 2010). No presente trabalho as amostras coletadas foram enriquecidas com cada um dos compostos (B, T, E, X) este enriquecimento funcionou como um fator seletivo da população bacteriana tolerante ao BTEX. A seletividade foi evidenciada pelos índices alfa e beta realizado com os dados obtidos onde foi possível observar que na medida que foi aumentada as concentrações dos compostos a diversidade bacteriana aumentavam e, portanto, mudando no decorrer dos dias. No 10º dia de enriquecimento houve uma menor diversidade de bactérias, o que poderia indicar que as bactérias estariam se adaptando as novas condições, já no 20º dia a diversidade bacteriana aumentou isto poderia indicar que a população bacteriana, que utiliza o BTEX, foi favorecida o que fez com que a população presente em menor concentração aumentou. Assim, foi possível isolar um maior número de bactérias. No entanto, no 30º dia, quando a concentração do composto foi maior a diversidade bacteriana diminuiu consideravelmente, sugerindo que a concentração dos compostos atingiu limite máximo para a tolerância das bactérias presentes nas amostras.

A identificação bioquímica mostrou que a maioria dos isolados pertence ao gênero *Bacillus*. Este gênero produz endósporos o que lhes confere resistência a diferentes condições ambientais extremas, e por esta razão frequentemente isolado de ambientes contaminados (De Vos et al. 2009). Outro gênero identificado foi o *Enterococcus* que já foi isolado de ambientes contaminados com petróleo bruto (Majed et al. 2015). O gênero *Staphylococcus* também já foi isolado de ambientes contaminados com produtos petrolíferos (Dunyu and Chu, 2014). O gênero *Corynebacterium* foi isolado de águas residuais de indústrias de refino (Aouad and Abbouni, 2012). Devido à complexidade destes gêneros não foi possível identificar os isolados

em nível de espécie utilizando somente as provas bioquímicas. Por outro lado com as análises moleculares do gene 16S RNA se conseguiu construir uma árvore filogenética que nos permite ter uma ideia mais próxima sobre a identificação destes isolados. Assim a análise filogenética nos mostra que os 15 isolados tolerantes ao BTEX se agrupam dentro dos clados *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lysinibacillus* e *Leucobacter*. Alguns dos isolados ficaram próximos de algumas espécies como *B. cereus*, *B. mycooides*, *E. gallinarum* e *L. macroides*. A identificação das espécies ficou difícil de ser confirmada devido ao tamanho da sequência de DNA que foi analisada (351pb), embora, nesta região, encontram-se regiões de variabilidade entre as espécies que permitem, em algumas situações, a identificação das espécies bacterianas. É importante assinalar que o isolado 25 ficou muito próximo de *B. mycooides* e *B. thuringensis*. Estas duas espécies pertencem ao complexo de *B. cereus* e encontram-se muito próximas umas das outras (De Vos, 2009). No entanto ao observamos as características morfológicas do isolado 25, este possui uma colônia com características rizoides, o que é muito particular do *Bacillus mycooides*. O isolado 16 ficou próximo de *B. thuringensis* e *B. toyonensis*, este último é uma nova espécie classificada também dentro do grupo de *B. cereus* (Jimenez et al., 2013). Por outro lado, quando comparado com as sequências homologas a maioria dos isolados teve a mesma identidade com mais de uma espécie, isto se deve a que o gene 16S ou a sequência deste utilizada não é suficientemente interespecífico para algumas espécies. Desta forma se precisaria de outro marcador molecular para separar as espécies. Uma análise multilocus poderia ser uma melhor alternativa para chegar até o nível de espécie.

O crescimento dos isolados mostrou ter uma curva de crescimento prolongada onde a fase exponencial começa em 12 horas e vai até 24 horas na maioria das bactérias, e a fase estacionária se prolonga até mais das 144 horas, isto pode se dever a que elas foram isoladas de ambientes contaminados onde as condições ambientais são adversas, por tanto elas precisam ativar mecanismos de resistência para sobreviver, e quando se

encontram em condições favoráveis elas conseguem se desenvolver favoravelmente. Embora a taxa de crescimento do isolado 25 (*Bacillus* sp.) tenha sido baixo comparado com os outros isolados, este isolado foi o que apresentou tolerância para todos os compostos.

Os testes de tolerância realizados neste trabalho mostraram que algumas bactérias conseguiram crescer em altas concentrações de B, T, E, e X, o que indica que elas têm um potencial de degradação do BTEX. No teste de tolerância aos xilenos (m, p, o-xileno) foi possível observar que o número de bactérias que conseguiram crescer foi muito menor do que para os outros compostos testados. Irshaid e Jacob (2015) mencionam que algumas poucas espécies bacterianas, tais como *Nocardia* tem capacidade para degradar o-xileno e utilizá-lo como única fonte de carbono e energia. Com os resultados obtidos pode se deduzir que o nível limitante de crescimento microbiano dos compostos fica na ordem de xileno, etilbenzeno, benzeno e tolueno. No teste de tolerância ao BTEX (mistura) somente seis bactérias conseguiram crescer. Algumas destas bactérias que cresceram em BTEX não tinham crescido em etilbenzeno e xileno, isto poderia indicar que existe uma interação entre os compostos. Mi-Seon et al. (2008) relata que o tolueno na mistura do BTEX facilita o acesso dos outros compostos para as bactérias.

Por outro lado, a degradação aeróbica de MTBE por culturas mistas ou consórcios têm sido relatados por muito trabalhos que assinalam que gêneros como *Methylobacterium* sp., *Rhodococcus* sp., *Arthrobacter* sp. podem crescer em altas concentrações de MTBE (Mo et al., 1997; Bradley et al., 1999; Kane et al., 2001). O teste de tolerância ao MTBE realizado neste trabalho mostrou que na medida em que se aumentava a concentração de MTBE, o número de bactérias que conseguiram sobreviver diminuía. Assim, somente sete bactérias conseguiram crescer na maior concentração de MTBE. Quanto aos testes com etanol 25% somente duas bactérias conseguiram crescer isto mostrou que nessa concentração o etanol é um limitante no crescimento bacteriano. Este resultado também foi observado por Powers et al (2002) que

afirmam que em concentrações maiores a 100,000 mg/L o etanol inibe o crescimento dos microrganismos.

A degradação do BTEX por microrganismos tem sido reportada em outros trabalhos, algumas das bactérias reportadas são *Ralstonia*, *Microbacterium*, *Mycrobacterium*, *Azoarcus*, *Thauera*, *Burkholderia* e *Sphingomonas* (Wang *et al.*, 2008). Os resultados deste trabalho mostram que a bactéria que apresentou maior porcentagem de degradação no teste do BTEX foi o isolado 16 classificado como pertencente aos clados *B. toyonensis* e *B. thuringensis* foi quem apresentou maior porcentagem de degradação em todos os compostos comparado com o isolado 25. O *B. thuringensis* foi reportado como degradador de hidrocarbonetos derivados do petróleo (Celio, 2015). Quanto o teste de BTEX/MTBE e BTEX/Etanol o isolado 25 classificado próximo do clado *B. mycooides*, foi quem apresentou maior porcentagem de degradação. Esta espécie já tem sido utilizada na biorremediação de solos contaminados com resíduos de petróleo (Yudono, 2009).

Comparando-se os três tratamentos BTEX, BTEX/MTBE, BTEX/Etanol, o tratamento que apresentou maior porcentagem de degradação foi o BTEX seguido pelo tratamento BTEX/MTBE e finalmente BTEX/Etanol. No ensaio com BTEX onde se observou maior porcentagem de degradação dos compostos pode se afirmar que a única fonte de carbono foram os compostos, portanto as bactérias foram obrigadas a usa-los como fonte de energia. Já nos tratamentos BTEX/MTBE e BTEX/Etanol, as bactérias tinham também disponível outra fonte de carbono (MTBE e Etanol) que poderiam ser utilizadas como fonte mais simples de carbono.

O tratamento BTEX/MTBE obteve maior porcentagem de degradação do que BTEX/Etanol, isto se pode dever a que o MTBE não interaço com nenhum dos compostos do BTEX então a degradação de este não é afetada. No entanto, como o MTBE é facilmente metabolizado pelas bactérias (Pruden e Suidan, 2004) estas podem preferir utilizar o MTBE e não o

BTEX. Por outro lado, o etanol em altas concentrações funciona como um agente inibidor do crescimento microbiano, portanto a população bacteriana vai ser afetada de maneira negativa e como consequência a degradação vai diminuir de maneira significativa. Cabe ressaltar que os cromatogramas de BTEX/Etanol apresentaram picos de compostos desconhecidos, estes picos podem pertencer a metabolitos secundários formados pela interação do BTEX e o Etanol, estes picos também estiveram presentes no controle onde não tinha nenhuma bactéria.

Outros fatores que puderam afetar os resultados da degradação do BTEX são a concentração dos compostos, a concentração de biomassa ativa, temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes inorgânicos, receptores de elétrons, e adaptação microbiana (Alvarez and Vogel, 1991). Estes outros fatores poderiam explicar o porquê que a concentração do xileno nos três tratamentos mostrou resultados tão diferentes.

7. CONCLUSÕES

- Nas águas residuais da indústria petroquímica existe uma população bacteriana que tem potencial de degradação de hidrocarbonetos.
- O gênero *Bacillus* foi mais predominante nas águas residuais da indústria petroquímica em estudo.
- Dentro do gênero *Bacillus* existem espécies que podem utilizar o BTEX como fonte energia.
- A degradação do BTEX é afetada de maneira negativa pela presença de aditivos oxigenados.
- Na presença de Etanol 25% a degradação do BTEX diminui.
- O MTBE não tem um efeito significativo na degradação do BTEX.
- A cromatografia de gases com FID é uma tecnologia eficiente na quantificação do BTEX.

8. REFERENCIAS

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). 2007. Toxicological Profile for Benzene. U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. 2010. TOXICOLOGICAL PROFILE FOR ETHYLBENZENE. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, Public Health Service. 341pp.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. 2015. DRAFT TOXICOLOGICAL PROFILE FOR TOLUENE. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES Public Health Service.
- ALVAREZ PEDRO J. J. AND VOGEL TIMOTHY M. 1991. Substrate Interactions of Benzene, Toluene, and para-Xylene during Microbial Degradation by Pure Cultures and Mixed Culture Aquifer Slurries. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY. p. 2981-2985
- AOUAD LINDA AND ABBOUNI BOUZIANE.2012. Petroleum-Oil Biodegradation by *Corynebacterium aquaticum* and *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from the Industrial Rejection of the Refinery of ARZEW-Algeria. World Applied Sciences Journal 18 (8): 1119-1123.
- ASCE (American Society of Civil Engineers) (2004) Natural Attenuation of Hazardous Wastes. ASCE, Reston, VA.
- ATLAS, R.M., HAZEN, T.C. 2011. Oil biodegradation and bioremediation: a tale of the two worst spills in U.S. history. Environment Science Technology . V. 45, p. 6709–6715.
- BARTON LARRY L., MANDL MARTIN, ALEXANDER LOY. 2010. **Geomicrobiology: Molecular and Environmental Perspective**. 445pp.
- BRADLEY, P. M., LANDMEYER, J. E., CHAPELLE, F. H. 1999. Aerobic mineralization of MTBE and tert-butyl alcohol by stream-bed sediment microorganisms. Environment Science Technology. 33, 1877–1879.
- CÉLIO F. F. ANGOLINI, EDUARDO J. PILAU, PATRÍCIA F. LOPES OLIVEIRA, ISABEL N. S. GARCIA, FÁBIO C. GOZZO, VALÉRIA M. DE OLIVEIRA, ANITA J. MARSAIOLI. 2015. Classification and Identification of Petroleum Microorganisms by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Journal of the Brazilian Chemical Society. 26(3).
- CHEN CS, HSEU YC, LIANG SH, KUO J, CHEN SC. 2008. Assessment of genotoxicity of methylert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay. J Hazard Mater. V. 153, p. 351–356.
- CHEVRON PHILLIPS CHEMICAL COMPANY, THE DOW CHEMICAL COMPANY, GE PLASTICS, INEOS STYRENICS (formerly BP Amoco Chemical Company), LYONDELL CHEMICAL COMPANY, NOVA CHEMICALS INC, STERLING CHEMICALS, INC, TOTAL PETROCHEMICALS USA, INC. (Formerly ATOFINA Petrochemicals, Inc). 2007. VOLUNTARY CHILDREN'S CHEMICAL EVALUATION PROGRAM (VCCEP) TIER 1 PILOT SUBMISSION FOR

- ETHYLBENZENE. 308pp.
- CHEVRON PHILLIPS CHEMICAL LP, EXXONMOBIL CHEMICAL COMPANY, FLINT HILLS RESOURCES, LP, MARATHON PETROLEUM LLC, SHELL CHEMICAL LP, SUNOCO, INC, TOTAL PETROCHEMICALS U.S.A. 2005. Voluntary Children's Chemical Evaluation Program (VCCEP) Tier 1 Pilot Submission American Chemistry Council Benzene, Toluene, and Xylenes VCCEP Consortium. 186pp.
- COKGOR, E.U. AND COKGOR, K. 1998. Respirometric analysis of activated sludge behaviour. Assessment of the readily biodegradable substrate. Water Resources Research. 461-475 pp.
- DE VOS PAUL, GEORGE M. GARRITY, DOROTHY JONES, NOEL R. KRIEG, WOLFGANG LUDWIG, FRED A. RAINEY, KARL-HEINZ SCHLEIFER AND WILLIAM B. WHITMAN. 2009. **BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**, Volume Three, The Firmicutes. Second Edition. 1476pp.
- DEAN, B.J. 1985. Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology. V. 145. 153–181 pp.
- DONALD A. MCQUARRIE, PETER A. ROCK, ETHAN B. GALLOGLY. 2010. **General Chemistry**. Fourth Edition. 1022 pp.
- DORSCH M. E STACKEBRANDT E. 1992 Some modifications in the procedure of direct sequencing of PCR amplified 16srDNA . Journal of Microbiological Methods. 16: 271-279
- DUNYU LV AND CHU YU. 2014. Experimental Study on Micro-Biological Degradation of 1,3,5-TMB in Groundwater. Journal of Clean Energy Technologies, Vol. 2, No. 2.
- DWORKIN MARTIN, FALKOW STANLEY, ROSENBERG EUGENE, KARL-HEINZ SCHLEIFER, ERKO STACKEBRANDT. 2006. **The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria**. Volume 1: Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology. Third Edition. 1000pp.
- ELDON R. RENE, MI-SEON JO, SOO-HONG KIM, HUNG-SUCK PARK. 2006. Batch studies for the biodegradation of BTEX mixtures under aerobic conditions. International Forum on Strategic Technology. 533-540.
- EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. 2008. Cadernos de Energia EPE PERSPECTIVAS PARA O ETANOL NO BRASIL.
- EPA. 1989. Locating and estimating air emissions from sources of 1,3-butadiene. Office of Air Quality Planning and Standards, Research Triangle Park, NC. Report no. EPA-450/2-89-021.
- FATEHIFAR E, D. KAHFOROSHAN, L. KHAZINI, J.S. SOLTANMOHAMMADZADEH, H.R. SATTAR. 2008. Estimation of VOC emission from wastewater treatment unit in a petrochemical plant using emission factors, in: WSEAS Conferences Cantabria, Spain, Santander.
- GAVASKAR AR. 1999. Design and construction techniques for permeable reactive barriers. J Hazard Mater 68:41–71
- GIBSON DT, SUBRAMANIAN V. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. Gibson DT. Microbial degradation of organic compounds.

- New York: Marcel Dekker. p. 181–252
- GOPINATH M. and DHANASEKAR R. 2012. Microbial degradation of toluene. African Journal of Biotechnology Vol. 11(96), pp. 16210-16219.
- GUIDELINES FOR DRINKING-WATER QUALITY. 2004. Toluene in Drinking-water Background document for development of WHO.
- GUILLERMO JIMÉNEZ, MERCEDES URDIAINB, ANA CIFUENTES, ARÁNZAZU LÓPEZ-LÓPEZ, ANICET R. BLANCH, JAVIER TAMAMES, PETER KÄMPFER, ANNE-BRIT KOLSTØ, DANIEL RAMÓNG, JUAN F. MARTÍNEZ, FRANCISCO M. CODONER, RAMON ROSSELLÓ-MÓRA. 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. Systematic and Applied Microbiology 36: 383–391
- HODGSON AT, RUDD AF, BEAL D. 2000. Volatile organic compound concentrations and emission rates in new manufactures and site-built houses. Indoor Air 10:178-192.
- IRSHAID FAWZI I. AND JACOB JACOB H. 2015. Screening and Characterization of Aerobic Xylene-Degrading Bacteria from Gasoline Contaminated Soil Sites Around Gas Stations in Northern Jordan. Journal of Biological Sciences 15 (4): 167-176.
- IRWIN R. E. A. 1997. Fuel oil number 2–heating oil entry. Environmental Contaminants Encyclopedia. Fort Collins, CO, National Park Service, p.80525.
- JOHN WILEY E SONS. 2003. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. 6th edition. Volume 12. 30080pp.
- KANE, S. R. BELLER, H. R., LEGLER, T. C., KOESTER, C. J., PINKART, H. C., HALDEN, R. U., HAPPEL, A. M. 2001. Aerobic biodegradation of methyl tert-butyl ether by aquifer bacteria from leaking underground storage tank sites. Appl. Environ. Microbiol, 67, 5824–5829.
- KATHLEEN M. BURNS E RONALD L. MELNICK. 2012. MTBE: Recent Carcinogenicity Studies. International Journal of Occupational and Environmental Health. 18:1.
- LAKSANA LAOKIAT, PONGTANAWAT KHEMTHONG, NURAK GRISDANURAK, PAIBOON SREEARUNOTHAI, WANWISA PATTANASIRIWISAWA, AND WANTANA KLYSUBUN. 2012. Photocatalytic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) using transition metal-doped titanium dioxide immobilized on fiberglass cloth. Korean J. Chem. Eng., 29(3), 377-383.
- MAIER RAINA M., PEPPER IAN L., GERBA CHARLES P. 2009. **Environmental Microbiology**. Second Edition.580pp.
- MAJED ALBOKARI, IBRAHIM MASHHOUR, MOHAMMED ALSHEHRI, CHRIS BOOTHMAN & MOUSA AL-ENEZI. 2015. Characterization of microbial communities in heavy crude oil from Saudi Arabia. Ann Microbiol. 65:95–104.
- MALTONI C, BELPOGGI F, SOFFRITTI M AND MINARDI F. 1999. Comprehensive long-term experimental project of carcinogenicity bioassays on gasoline oxygenated additives: plan and first report of results from the study on ethyl-tertiary-butyl ether (ETBE). Eur. J. Oncol.,

- vol. 4, n. 5, pp. 493-508.
- MARTIN DWORKIN, STANLEY FALKOW, EUGENE ROSENBERG, KARL-HEINZ SCHLEIFER, ERKO STACKEBRANDT. 2006. **The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria** Third Edition Volume 1: Symbiotic Associations, Biotechnology, Applied Microbiology
- MATERA L, SPERBB R M, MADUREIRAALAS, ROSINB A P, CORREAB A X R, RADETSKI C M. 2006. Proposal of a sequential treatment methodology for the safe reuse of oil sludge contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, V. 136, n° 3, p. 967–971.
- MATHURA K, e C. B. MAJUMDER. 2010. Kinetics Modelling of the Biodegradation of Benzene, Toluene and Phenol as Single Substrate and Mixed Substrate by Using *Pseudomonas putida*. *Biotechnology and Bioengineering*. V. 69, n° 4, p. 385–400.
- MAZZEO, D.E.C., LEVY, C.E., DE ANGELIS, D.F., MARIN-MORALES, M.A. 2010. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *Sci. Total Environ*. V.,408, p. 4334–4340.
- MCMURRY JOHN E.. 2012. **Organic Chemistry**, 8th Edition. 1376pp.
- MI-SEON JO, ELDON R. RENE, SOO-HONG KIM, HUNG-SUCK PARK. 2008. An analysis of synergistic and antagonistic behavior during BTEX removal in batch system using response surface methodology. *Journal of Hazardous Materials* 152. 1276–1284.
- MO, K., LORA, C. O., WANKEN, A. E., JAVANMARDIAN, M., YANG, X., KULPA, C. F. 1997. Biodegradation of methyl t-butyl ether by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 69–72
- MUFTAH H. EL-NAAS, JANICE A. ACIO, AYAT E. EL TELIB. 2014. Aerobic biodegradation of BTEX: Progresses and Prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2.1104–1122.
- NAKHLA G. 2003. Biokinetic modeling of in situ bioremediation of BTX compounds—impact of process variable and scaleup implications. *Water Research*. V. 37, n° 6, p. 1296–1307.
- NIGEL J.K. SIMPSON. 2000. **Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications**. 528pp.
- POWERS SUSAN E.,. HUNT, CRAIG S., HEERMANN STEPHEN E., CORSEUIL HENRY X., DAVID RICE, AND PEDRO J. J. ALVAREZ. 2001. The Transport and Fate of Ethanol and BTEX in Groundwater Contaminated by Gasohol. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*.
- POWERS SUSANE, BRENDANDO OHER, DAVID RICE, ALVAREZ PEDRO. 2002. Will Ethanol-Blended Gasoline Affect Groundwater Quality?
- REUSSER DE, ISTOK JD, BELLER HR, FIELD JA. 2002. In situ transformation of deuterated toluene and xylene to benzylsuccinic acid analogues in BTEX-contaminated aquifers. *Environ Sci Technol*; V. 36, n° 19, p. 4127–4134. 2002.
- RUBERTO L, VAZQUEZ SC, MAC CORMACK WP. 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *Int Biodeterior Biodegrad* 52:115–125 12.
- SAARI, Eija; PERÄMÄKI, Paavo; JALONEN, Jorma. 2010. Evaluating the

- impact of GC operating settings on GC–FID performance for total petroleum hydrocarbon (TPH) determination. *Microchemical Journal*. p. 73-78.
- SHREE NATH SINGH, 2012 **Microbial Degradation of Xenobiotics**. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. 483pp.
- SKOOG, Douglas; HOLLER, James; NIEMAN Timothy. 2008. *Principios de análisis instrumental*. Ed. 6. Madrid. Editorial Mcgraw-hill.
- SNYDER ROBERT. 2012. Leukemia and Benzene. *International Journal Environment Res Public Health*. 9(8): 2875–2893.
- STALLWOOD B, SHEARS J, WILLIAMS PA, HUGHES KA. 2005. Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica. *J Appl Microbiol* 99:794–802
- TOVAR-LEÓN F, GRAJALES-LEONIDES M.C, PÉREZ-GARCÍA M.A. Biodegradabilidad de aguas residuales de una refinería de petróleo mexicana mediante lodos activados.
- TRINDADE POV, SOBRAL LG, RIZZO ACL, LEITE SGF, SORIANO AU. 2005 Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere* 58:515–522
- TURNER, S., PRYER, K.M., MIAO V. P. W., PALMER J. D. 1999 Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46(4): 327–338.
- U.S. DEPARTMENT OF ENERGY, OFFICE OF ENERGY. 2016. *Handbook for Handling, Storing, and Dispensing E85 and Other Ethanol-Gasoline Blends*
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1991. Methyl tert-butyl ether (MTBE); CASRN 1634-04-4. National Center for Environmental Assessment. Integrated Risk Information System (IRIS).
- UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA DE AÇÚCAR. 2007. *Produção e uso do etanol combustível no Brasil RESPOSTAS ÀS QUESTÕES MAIS FREQUENTES*.
- VIDAL, C. M. S.; CAMPOS, J. R. 2009. Coagulação associada à microfiltração para o tratamento avançado de esgoto sanitário. *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, v. 5, n. 1
- WANG LIN, NAN QIAO, FENGQIN SUN, ZONGZE SHAO. 2008. Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. *Extremophiles*. 12:335–342
- WHO GUIDELINES FOR DRINKING-WATER QUALITY. 2005. Methyl tertiary-Butyl Ether (MTBE) in Drinking-water.
- WHO REGIONAL OFFICE FOR EUROPE, 2000 *Air Quality Guidelines - Second Edition* Copenhagen, Denmark.
- XU, Z.H., MULCHANDANI, A., CHEN, W. 2003. Detection of benzene, toluene, ethyl benzene, and xylenes (BTEX) using toluene dioxygenase–peroxidase coupling reactions. *Biotechnol. Prog.* V. 19, p. 1812–1815.
- YOUNGNAM YOU, JAEHONG SHIM, CHOA-HYOUNG CHO, MOON-HEE RYU, PATRICK J. SHEA, SERALATHAN KAMALA-KANNAN, JONG-

- CHAN CHAE AND BYUNG-TAEK OH. 2012. Biodegradation of BTEX mixture by *Pseudomonas putida* YNS1 isolated from oil-contaminated soil. Issue Journal of Basic Microbiology. V. 53, n° 5, p. 469–475.
- YUDONO BAMBANG, SAID M., HAKSTEGE POL, SURYADI F. X. 2009. Kinetics of Indigenous Isolated Bacteria *Bacillus mycoides* Used for Ex-Situ Bioremediation of Petroleum Contaminated Soil in PT Pertamina Sungai Lilin South Sumatera. Journal of Sustainable Development. 2(3).
- ZOGORSKI JS, MORDUCHOWITZ A, BAEHR AL, BAUMAN BJ, CONRAD DL, DREW RT, KORTE NE, LAPHAM WW, PANKOV JF. 1997 Fuel oxygenates and water quality: current understanding of sources, occurrence in natural waters, environmental behavior, fate, and significance, chapter 2. Interagency assessment of oxygenated fuels. Office of Science and Technology Policy, Exec. Office of the President, Washington, DC.
- ZOGORSKI JS, MORDUCHOWITZ A, BAEHR AL, BAUMAN BJ, CONRAD DL, DREW RT, KORTE NE, LAPHAM WW, PANKOV JF. 1997. Fuel oxygenates and water quality: current understanding of sources, occurrence in natural waters, environmental behavior, fate, and significance, chapter 2. Interagency assessment of oxygenated fuels. Office of Science and Technology Policy, Exec. Office of the President, Washington, DC.
- ŻWIR-FERENC A. E BIZIUK M. 2006 Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. Polish J. of Environ. Stud. 15: 5, 677-690.

Internet:

Hazardous Substances Data Bank (HSDB). **Ethylbenzene**. 2016. Disponível em: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>. Acesso em: 10.fev.2016

9. APENDICE

9.1 Apêndice 1: Protocolo de extração de DNA

- 1) Centrifugar 4ml de meio com cultura de 14 horas a 10000rpm por 5 minutos
- 2) Lavar 2 vezes com 1 mL TE centrifugar por 5 minutos a 10000rpm
- 3) Resuspender as células em 700uL de SET
- 4) Adicionar 50 uL de lisozima 20mg/L
- 5) Homogeneizar
- 6) Incubar em banho maria durante 1 hora a 37°C
- 7) Adicionar 75uL 10% do volume de trabalho de SDS 10%
- 8) Homogeneizar
- 9) Adicionar 12,5ul de RNase 4mg/L
- 10) Homogeneizar
- 11) Incubar por 1 hora a 37°C
- 12) Adicionar 20uL proteinase K
- 13) Homogeneizar
- 14) Incubar em banho maria durante 2 horas a 55°C
- 15) Adicionar 207ul de NaCl 5M fazer o processo em gelo e deixar por 15 minutos
- 16) Completar o volume com clorofórmio ate 1,5ml
- 17) Homogeneizar
- 18) Centrifugar a 13000 rpm por 7 minutos a 4°C
- 19) Transferir o sobrenadante para um tubo novo
- 20) Adicionar fenol a razão 1:1
- 21) Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C
- 22) Transferir o sobrenadante para um tubo novo
- 23) Adicionar fenol/clorofórmio a razão 1:1
- 24) Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C
- 25) Transferir o sobrenadante para um tubo novo
- 26) Adicionar fenol/clorofórmio a razão 1:1
- 27) Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C
- 28) Transferir o sobrenadante para um tubo novo

- 29) Adicionar clorofórmio/álcool isoamilico a razão 1:1
- 30) Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C
- 31) Transferir o sobrenadante para um tubo novo
- 32) Adicionar Alcool isopropilico 2,5 vezes o volumem
- 33) Incubar a -20°C por 18 horas
- 34) Centrifugar a 13000 rpm por 20 minutos
- 35) Desprezar o sobrenadante
- 36) Adicionar álcool 500ul etílico ao 70%
- 37) Centrifugar a 13000 rpm por 20 minutos
- 38) Desprezar o sobrenadante
- 39) Deixar secar
- 40) Resuspender o DNA em 100ul de TE ou água miliQ