

# A IMPORTÂNCIA DA BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS EM ÁREAS CONTAMINADAS COM PRODUTOS DERIVADOS DO PETRÓLEO

**Gabriela Cristina Barbosa Brito\***

**Daniela Boaneres de Souza\*\***

**Fernanda Carla Wasner Vasconcelos\*\*\***

**Letícia da Conceição Braga\*\*\*\***

**RESUMO:** A notável contribuição do setor petrolífero para a economia mundial provoca uma demanda que exige grande estruturação da cadeia produtiva deste setor. Com isso as preocupações relacionadas ao potencial de contaminação ambiental por petroderivados vêm crescendo. A poluição do solo, dos mananciais de água e do ambiente marinho gerada pelos hidrocarbonetos do petróleo gera graves problemas na saúde humana, vegetal e animal. Esta revisão bibliográfica tem como objetivo apresentar as características destes poluentes, os processos envolvidos na contaminação do solo, destacando o mecanismo de biodegradação, e a bioprospecção de microrganismos capazes de realizar este processo. A capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo é apresentada por diversos grupos microbianos. O processo biológico de remediação, conhecido como biorremediação, é propiciado por meio de um estímulo na biodegradação natural do ambiente. A bioprospecção de organismos selecionados naturalmente em áreas contaminadas por petroderivados representa uma estratégia importante, a fim de obter agentes para a biorremediação destas áreas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biodegradação; Hidrocarbonetos; Contaminação Ambiental.

---

\* Bióloga graduada pelo Centro Universitário Una - UNA. E-mail: gabrielacbrito@gmail.com

\*\* Bióloga graduada pelo Centro Universitário Una - UNA. E-mail: daniboaneres@yahoo.com.br

\*\*\* Bióloga; Doutora em Ciências; Docente de Graduação e Mestrado do Centro Universitário Una - UNA. E-mail: fernanda.wasner@prof.una.br

\*\*\*\* Bióloga; Mestre em Genética; Docente de Genética e Biologia Molecular do Centro Universitário Una - UNA. E-mail: leticiacb@prof.una.br

## **THE IMPORTANCE OF BIOPROSPECTING OF MICROORGANISMS IN AREAS CONTAMINATED BY PETROLEUM-DERIVED PRODUCTS**

**ABSTRACT:** The remarkable contribution of the oil sector to world economy leads to a demand that requires more structuring of the sector's production. Concerns related to environmental contamination possibility by petroleum products are on the increase. Pollution of soil, fresh water sources and sea environments caused by petroleum hydrocarbons causes severe problems to human, animal and vegetation health. Current bibliographical revision presents the characteristics of these pollutants, the processes involved in soil contamination, with special reference to biodegradation mechanism, and the bioprospecting of microorganisms capable of such processes. Degrading petroleum hydrocarbons is the property of several microorganism groups. The biological process of remediation, known as bioremediation, is caused by a stimulus in the environment's natural biodegradation. Bioprospecting of naturally selected organisms in areas contaminated by petroleum-derived substances represents an important strategy for the areas' bioremediation.

**KEYWORDS:** Biodegradation; Hydrocarbons; Environmental Contamination.

### **INTRODUÇÃO**

Durante todo o século XX, notável foi a contribuição do setor petrolífero para a economia mundial. A indústria petrolífera ainda constitui a principal fonte energética mundial e toda essa demanda exige grande estruturação da cadeia produtiva desse setor (SCHIRMER, 2004). Neste aspecto, diante desta estrutura observam-se com muita preocupação os casos de contaminação do solo e águas por hidrocarbonetos derivados de petróleo.

Em 2008, segundo a Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2009), foram produzidos no mundo 81.820.000 barris/dia de petróleo e consumidos 83.880.000 barris/dia. No Brasil, a produção total de produtos derivados do petróleo foi de 663.275.000 barris, sendo produzidos 1.899.000 barris/dia e consumidos 1.821.000 barris/dia. Na infra-estrutura de produção e movimentação de petró-

leo e derivados, existiam aproximadamente 14 refinarias, 51 terminais aquaviários e 26 terminais terrestres, 508 bases de distribuição, 161 distribuidoras, 35.000 postos de revenda.

Com a alta demanda da produção e comercialização do petróleo e de seus derivados, as preocupações relacionadas ao potencial de contaminação de solos e águas subterrâneas, principalmente por vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneos em postos de combustíveis, vêm crescendo (FATORELLI, 2005). Segundo a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), em 2008 os vazamentos em postos de combustíveis foram responsáveis por 78% dos casos de áreas contaminadas no Estado de São Paulo, o que corresponde a 1953 áreas (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2009). Em 2009, no Estado de Minas Gerais foram listadas 413 áreas contaminadas; destas, aproximadamente 365 estão relacionadas ao segmento de postos de combustíveis (FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE, 2009).

A Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 237/1997 dispõe sobre a revisão e complementação dos procedimentos e critérios utilizados para o licenciamento ambiental. Devido ao intenso potencial poluidor de postos de combustíveis, foi criada, em 2000, a Resolução 273 do CONAMA, a qual dispõe especificamente sobre a instalação, ampliação e operação de postos de combustíveis. A Resolução 273/2000 considera que toda instalação e sistemas de armazenamento de derivados de petróleo configuram-se como empreendimentos potencialmente ou parcialmente poluidores e geradores de acidentes ambientais. Para tal, considera que os vazamentos de derivados de petróleo e outros combustíveis podem causar contaminação de corpos d'água subterrâneos e superficiais, do solo e do ar e considera os riscos de incêndio e explosões, decorrentes desses vazamentos, entre outros (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2009).

No Brasil, a maioria dos tanques de armazenamento de combustível foram construídos na década de 70, devido ao grande desenvolvimento econômico e, conseqüentemente, ao aumento na quantidade de postos revendedores de combustíveis. Como a vida média de um tanque de armazenamento é estimada em 20 anos, pode-se concluir que, a partir dos anos 90, começou a existir uma preocupação maior com relação aos vazamentos e os riscos envolvidos na contaminação de solos e águas subterrâneas (CUNHA et al., 2008). Grande parte dos tanques de armazenamento encontra-se alocados no subsolo, dificultando o monitoramento e o controle de vazamentos que, quando ocorrem, requerem medidas mitigadoras imediatas para evitar a contaminação do solo e das águas subterrâneas.

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo apresentar as características

dos petroderivados, os processos envolvidos na contaminação do solo, destacando o mecanismo de biodegradação e a bioprospecção de microrganismos capazes de realizar este processo.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 HIDROCARBONETOS DERIVADOS DO PETRÓLEO**

O petróleo é constituído por uma mistura complexa de compostos orgânicos, na maior parte alcanos e hidrocarbonetos aromáticos, com pequenas quantidades de compostos como oxigênio, nitrogênio e enxofre, e possui alto conteúdo energético (*AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE*, 2001). Há atualmente mais de 100 hidrocarbonetos reconhecidos pela *International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC*. Apesar disso, somente 16 tipos são considerados em função de sua importância industrial, ambiental e toxicológica, como o antraceno, o naf-taleno, o pireno, entre outros (POTIN et al., 2004).

A gasolina é uma mistura complexa de vários compostos, sendo constituída por uma extensa composição de hidrocarbonetos relativamente voláteis, com a maior parte dos seus constituintes classificados como cadeias ramificadas de parafinas, cicloparafinas (compostos alifáticos) que incluem constituintes como butano, pentano, hexano e octano e compostos aromáticos, com destaque para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (conhecidos como BTEX) (ANDRADE, 2008). O comportamento da gasolina é determinado por suas características físico-químicas e de seus constituintes no ambiente. A gasolina comercializada no Brasil atualmente é misturada com 24% de álcool (etanol). Este procedimento provoca consequências no processo de biodegradação e deslocamento dos compostos no solo (CORSEUIL; FERNANDES, 1999; ANDRADE, 2008).

Os hidrocarbonetos monocromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) são altamente tóxicos e seus constituintes têm maior solubilidade em água, portanto, são os poluentes com maior potencial de poluir o lençol freático. Entre os BTEX, o benzeno é considerado o mais agressivo (MARIANO, 2006). Estes compostos são conhecidos como poluentes ambientais primários, pois são substâncias depressoras do sistema nervoso central, mutagênicas e carcinogênicas.

Os compostos orgânicos voláteis (COV) incluem a maioria dos combustíveis, em geral, solventes e lubrificantes, sendo constantemente emitidos por indústrias químicas e petroquímicas. De modo geral, são definidos como compostos orgânicos de elevada pressão de vapor e facilmente vaporizados às condições de temperatura e pressão ambiente. A maioria dos hidrocarbonetos, incluindo

orgânicos nitrogenados, clorados e sulfurados, é designada como COV (CHU et al., 2001). Os COVs representam o total de emissões gasosas provenientes de um derramamento ou contaminação por um derivado de petróleo.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), também presentes em derivados de petróleo, constituem uma classe de poluentes orgânicos de importância ambiental e interesse toxicológico por apresentarem propriedades mutagênicas e carcinogênicas. A maior fonte de contaminação de HPA (naftaleno, antraceno, fenantreno, etc.) no ambiente é devido aos afloramentos de petróleo, à combustão de automóveis e aos acidentes ambientais envolvendo petróleo e derivados (BIAZATI, 2009).

A presença dos hidrocarbonetos aromáticos, em geral, no ambiente é um perigo para a saúde pública e para o ecossistema, devido a sua toxicidade e habilidade de bioacumular ao longo da cadeia alimentar (TIBURTIUS et al., 2004).

## 2.2 CONTAMINAÇÃO DO SOLO

Em uma área contaminada, os poluentes ou contaminantes podem concentrar-se em subsuperfície nos diferentes compartimentos do solo, nas zonas não saturada e saturada (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2009). Isso pode causar mudanças prejudiciais à qualidade do solo ou outros perigos para a população (RODRIGUES; DUARTE, 2003).

No momento em que um contaminante ou poluente atinge a superfície do solo, vários mecanismos estão envolvidos, dentre eles a adsorção, a fixação química, a precipitação, a oxidação, a troca iônica, a neutralização, ou o poluente pode ser arrastado pelas águas através do escoamento superficial, ou lixiviado pelas águas de infiltração, passando para as camadas inferiores e atingindo as águas subterrâneas. Uma vez atingindo as águas subterrâneas, esse poluente será então carregado para outras regiões, através do fluxo dessas águas (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2009).

A persistência de um contaminante no solo depende de suas propriedades físico-químicas, das propriedades do solo, da interação com o solo e mudanças estruturais as quais determinam sua degradação (LAVORENTI, 1996). Sabaté e colaboradores (2004) observaram que os solos possuem diferenças nas atividades metabólicas dos microrganismos naturais, afetadas pela sua estrutura, composição e características.

## 2.3 BIODEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS DERIVADOS DO PETRÓLEO

Dentre os tratamentos para remoção de contaminantes ou torná-los inofensivos ao ambiente, os processos biológicos têm se destacado, por serem fundamentados em métodos naturais e relativamente simples, menos agressivos e mais adequados para manutenção do equilíbrio ecológico, além do baixo custo quando comparados às alternativas físicas e físico-químicas. E, com isso, várias pesquisas indicam como principal mecanismo para a eliminação das características tóxicas de poluentes a degradação biológica (BORÉM; SANTOS, 2004; BENTO et al., 2005).

Dentre os processos biológicos, destaca-se a biorremediação, que pode ser definida, segundo a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA, 1990) como o “processo de tratamento que utiliza a ocorrência natural de microrganismos para degradar substâncias toxicamente perigosas transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas”. O princípio de todos os processos de biorremediação é propiciar um aumento na biodegradação, provocar um estímulo da atividade microbiana degradadora, por diferentes mecanismos (NAKAGAWA; ANDRÉA, 2006). Portanto, é necessário criar condições favoráveis à degradação, imobilização ou extração do contaminante do solo (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000).

Para efetuar a biorremediação microbiana, uma das etapas consiste na seleção dos microrganismos adequados, sejam estes autóctones ou alóctones. Para a determinação dos microrganismos indígenas, os primeiros indícios podem ser obtidos através do estudo das colônias que habitam os ambientes contaminados. Logicamente, se um grupo de organismos consegue proliferar em um local com altas concentrações de uma espécie poluente, existe uma maior probabilidade de que possua um sistema que lhe permita metabolizar esse contaminante. Assim, a bioprospecção de organismos selecionados naturalmente em áreas contaminadas por óleos combustíveis representa uma estratégia importante, a fim de obter agentes para processos de biorremediação dessas áreas (MARTINS et al., 2003).

Zobell (1946) demonstrou a capacidade de certos microrganismos utilizarem hidrocarbonetos como fonte de carbono. Mostrou que esses microrganismos eram amplamente distribuídos na natureza e que a utilização de hidrocarbonetos era altamente variável de acordo com a natureza química do composto na mistura do petróleo e com as condições ambientais.

Estudos realizados em laboratório e no campo têm mostrado que as frações do petróleo diferem em relação à susceptibilidade ao ataque microbiano (TAPAJÓS et al., 2008). A fração saturada compreende os n-alcanos, os alcanos ramificados e os cicloalcanos, sendo essa fração considerada a mais facilmente degradável. Na fração aromática, compostos com até 3 anéis aromáticos são degradados facilmente e, tipicamente, a degradação envolve a ação de oxigenases. Em relação

às resinas e asfaltenos pouco se sabe sobre a degradabilidade e supõe-se que sejam inertes para a biodegradação (ROSATO, 1997).

A biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo depende de fatores tais como as condições físicas e a natureza do contaminante, bem como sua própria concentração (SEABRA, 2001). As taxas em que as classes estruturais dos hidrocarbonetos se encontram, a disponibilidade do contaminante para os microrganismos e as características biológicas do sistema devem ser levadas em consideração na avaliação da efetividade da biodegradação.

A presença de oxigênio propicia uma rápida oxidação dos hidrocarbonetos e outros compostos do petróleo. A biodegradação em condições anaeróbicas é mais lenta e, normalmente, efetuada por bactérias sulfato-redutoras (BAIRD, 2002). A temperatura influencia a biodegradação pelo efeito na natureza física e química do petróleo bem como pela alteração na população microbiana. A biodegradação dos hidrocarbonetos pode ocorrer numa faixa de temperatura relativamente grande de 0°C a 70°C (SORKHOH et al., 1993). A maioria das bactérias e fungos apresenta um melhor desenvolvimento em pH neutro, podendo ocorrer o dobro da taxa de biodegradação, com a correção do pH do solo. A umidade do solo também é um fator ambiental crítico na biodegradação, pois uma alta atividade microbiana somente ocorrerá se houver adequada disponibilidade de água aos microrganismos (HAIDER, 1999).

### 2.3.1 Bioprospecção Microbiana

A capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo é apresentada por diversos gêneros microbianos, principalmente bactérias, fungos e leveduras; entretanto, cianobactérias, algas e mesmo protozoários também possuem essa capacidade (ROSATO, 1997). Esses microrganismos podem ser encontrados no solo, em ambientes marinhos e de água doce.

Segundo Bushnell e Haas (1941), um dos pesquisadores pioneiros nos estudos da utilização de hidrocarbonetos por microrganismos foi Stormer (1908), capaz de isolar a bactéria *Bacillus hexabovorum*, que apresentou capacidade de crescer aerobiamente em meio contendo tolueno e xileno. Também segundo os autores, o pesquisador Sohngen em 1913 relatou que gêneros microbianos como *Mycobacterium* e *Pseudomonas* poderiam oxidar o petróleo a CO<sub>2</sub>, água e traços de ácidos orgânicos. E os estudiosos Gray e Thornton em 1928 isolaram vários organismos capazes de decompor compostos aromáticos, principalmente dos gêneros *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Bacterium* e *Bacillus*.

Em 1946, Zobell, em uma extensa revisão, descreveu mais de 100 espécies, representando 30 gêneros diferentes. Komagata e colaboradores (1964) isolaram

56 espécies de leveduras capazes de utilizarem hidrocarbonetos, sendo que a maioria delas pertencem ao gênero *Candida*. Ahearn, Meyers e Standard (1971) isolaram espécies de *Cândida* sp, *Rhodospiridium* sp, *Rhodotorula* sp, *Sacharomyces* sp, *Sporobolomyces* sp e *Trichosporom* sp, todas capazes de metabolizar hidrocarbonetos.

Floodgate (1984) listou 25 gêneros de bactérias e 27 de fungos isolados de ambientes marinhos. No solo foram registrados 22 gêneros de bactérias e 31 de fungos (BOSSET; BARTHA, 1984). Ridgway e colaboradores (1990) isolaram aproximadamente 300 bactérias de poços subterrâneos com a capacidade de degradar compostos de gasolina. Entre os gêneros encontrados estão *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, e *Micrococcus*, sendo que as *Pseudomonas* sp perfazem 86,9% das espécies identificadas.

Araújo e colaboradores (2002) realizaram o isolamento e identificação de fungos filamentosos com capacidade de degradação do petróleo. A partir de um solo contaminado com petróleo foram obtidas 80 linhagens, das quais 60 apresentaram capacidade para degradar hidrocarbonetos de petróleo. Dentre estas, foram identificados quatro gêneros fúngicos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Fusarium*.

Segundo a literatura, os gêneros mais comuns de bactérias tanto no ambiente terrestre como no ambiente aquático são: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Bacillus* e *Aeromonas*. As linhagens de *Vibrio* são limitadas ao ambiente marinho (LEAHY; COWELL, 1990). *Pseudomonas* sp, *Micrococcus* sp e *Nocardia* sp perfazem 95% dos isolados (SHINODA et al., 2004; SHIM et al., 2005).

Entre os fungos, os gêneros: *Candida*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Mortierella*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Fusarium*, *Rhodospiridium*, *Sacharomyces*, *Trichosporon*, *Cladosporium*, *Mucor* e *Rhizopus* são os isolados mais comuns nestes ambientes (SANTOS; LINARDI, 2004; LOVAGLIO et al., 2005; LIMA et al., 2006).

A complexidade dos processos metabólicos necessários à degradação de hidrocarbonetos pode levar à formação de consórcios, com bactérias de diferentes gêneros e espécies, cada uma especializada em degradar uma ou várias frações do contaminante (CRAPEZ et al., 2002).

Richard e Vogel (1999) analisaram a cinética de degradação do óleo diesel. Obtiveram um consórcio bacteriano através do processo de enriquecimento do solo utilizando o óleo diesel como fonte de carbono. Foram isoladas sete espécies de bactérias e apenas três apresentaram potencial de degradação, duas linhagens de *Pseudomonas fluorescens* degradaram aproximadamente 11% dos hidrocarbonetos ao final de 50 dias de experimento.



Chaillan e colaboradores (2004) isolaram 61 linhagens, sendo 31 bactérias, 26 fungos filamentosos totais e quatro leveduras de solos poluídos por petróleo na Indonésia. Foram identificadas cepas bacterianas pertencentes aos gêneros *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia* e *Mycobacterium*, além de quatro espécies novas e ainda não descritas. Já os fungos foram identificados os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Talaromyces* e *Graphium*. As leveduras foram *Candida* sp, *Pichia* sp e *Yarrowia* sp. Todas as cepas foram cultivadas em uma solução, onde o petróleo era a única fonte de carbono e energia. As cepas foram avaliadas com relação ao potencial de biodegradação. Foi observada uma degradação máxima nos hidrocarbonetos saturados e uma menor degradação nos hidrocarbonetos aromáticos.

Teixeira e Bento (2007) isolaram e caracterizaram 37 bactérias de solos contaminados com gasolina. Foi determinada a degradação do etanol e do BTEX na gasolina comercial, por meio de cromatografia gasosa, bem como a produção de surfactantes para cinco destes isolados. Estes foram identificados como *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas aeruginosa*, através do sequenciamento do gene do RNA ribossomal 16S. Os isolados apresentaram diferentes capacidades de degradação aos derivados da gasolina e produziram biosurfactantes durante este processo.

Makiko e colaboradores (2006) isolaram bactérias degradadoras de alcanos, a partir de amostras de solo contaminado com petróleo. As bactérias do gênero *Rhodococcus* se mostraram capazes de degradar alcanos normais (C10-C36 alcanos) e alcanos ramificados (pristano, fitano).

Costa (2006) selecionou duas linhagens com maior potencial para degradar n-hexadecano, as quais foram identificadas como *Bacillus pumilus* e *Ocrobacterium anthropi*. Os resultados, obtidos nos ensaios de biodegradação em 1% de n-hexadecano com células livres e imobilizadas de *B. pumilus*, mostraram uma degradação, em seis dias, de cerca de 98,4% e 90,8%, respectivamente. O n-hexadecano é um dos principais compostos do óleo diesel e é considerado um composto modelo para a biodegradação de hidrocarbonetos de cadeia longa.

Kang e colaboradores (2005) isolaram bactérias capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos do solo rizosférico de cana na Baía de Sunchon pela cultura de enriquecimento usando o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) como única fonte de carbono. A identificação dos isolados com base no sequenciamento do gene 16S rRNA revelou duas linhagens capazes de catabolizar o BTEX, *Microbacterium* sp. e *Rhodococcus* sp.

Na tentativa de inventar uma cultura mista de um consórcio estável, Cao, Nagarajan e Loh (2009) testaram o potencial de biodegradação de três culturas puras (*Pseudomonas putida*, *Rhodococcus zopfii* e *Pseudomonas stutzeri*) e também, combinadas. O objetivo era verificar se as três espécies combinadas em uma cultura

mista poderiam biodegradar mais eficazmente o BTEX. Estes pesquisadores detectaram no sistema de substrato misto uma hierarquia de biodegradação, sendo o tolueno o composto mais facilmente degradado, seguido pelo benzeno, etilbenzeno e o-xileno.

Nikolova e Nenov (2005) estudaram o potencial de degradação de BTEX por fungos. Os fungos foram isolados de locais contaminados com gasolina e foram identificados como pertencentes aos gêneros *Cladophialophora* e *Cladosporium*. A capacidade do fungo filamentosso *Paecilomyces variotii* de degradar BTEX foi avaliada por García-Peña e colaboradores (2008). Neste estudo, o *P. variotii* utilizou de forma diferenciada o BTEX. O tolueno foi completamente degradado, seguido de etilbenzeno, o benzeno foi assimilado parcialmente (45%), semelhante ao *m*- e *p*-xileno, enquanto *o*-xileno foi metabolizado apenas 30%.

O benzeno, assim como os outros BTEX, é facilmente degradado sob condição aeróbia, mas a degradação persiste na condição de baixo oxigênio dissolvido. Riser-Roberts (1998) relatou que apenas 0,5% dos organismos do solo poderiam usar o benzeno como única fonte de carbono. *Pseudomonas rhodochrous*, *P. aeruginosa*, *P. putida* e o fungo *Phanerochaete chrysosporium* estão entre esses organismos. Para o autor, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Achromobacter* sp., entre outros, podem degradar o tolueno e o fungo *Phanerochaete chrysosporium* degrada esse composto e qualquer outro BTEX, sob condições de cultura em meio rico em nitrogênio. A capacidade de oxidação dos isômeros do xileno foi verificada em *Pseudomonas* sp., em uma espécie de *Nocardia* sp. e em outros microrganismos que são capazes de degradar BTEX.

Mollea e colaboradores (2005) utilizaram linhagens fúngicas puras na otimização da biodegradação de HPAs. Os resultados mostraram que *Phanerochaete chrysosporium* biodegradou os HPAs até aproximadamente 600 mg/kg de solo. Ravelet e colaboradores (2000) identificaram várias espécies de fungos com capacidade para degradar pireno. Os isolados pertenciam aos gêneros *Mucor*, *Gliocadium*, *Penicillium*, *Phialophora*, *Trichoderma*, *Scopulariopsis* e *Coniothyrium*.

Para a efetuação de processos de biorremediação é imprescindível a detecção da capacidade de biodegradação de derivados do petróleo por microrganismos isolados de solos contaminados por este óleo. A cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) têm sido duas técnicas utilizadas por diversos autores para a análise de biodegradação de hidrocarbonetos (BARROS et al., 2005; CORAL; KARAGOZ, 2005; TEIXEIRA; BENTO, 2007). A técnica cromatográfica permite um grau maior de resolução e uma separação completa dos componentes da gasolina.

### 2.3.2 Adaptação microbiana

O aumento na capacidade de biodegradação dos hidrocarbonetos que ocorrem em algumas populações de microrganismos nativas, em ambientes poluídos por óleo, é chamado de adaptação (SPAIN et al., 1980). Segundo Leahy e Colwell (1990), há três mecanismos inter-relacionados que podem contribuir para a adaptação: Indução e/ou desrepressão de enzimas específicas, mudanças genéticas que resultam na aquisição de novas atividades metabólicas e enriquecimento seletivo de organismos capazes de transformar os compostos. Essa adaptação resulta em um aumento da proporção de degradação de hidrocarbonetos.

Em alguns casos há enriquecimento primário por microrganismos capazes de utilizar os hidrocarbonetos e, secundariamente, por microrganismos capazes de utilizar os metabólitos produzidos pelos organismos primários. Pode também ocorrer o aumento de um número restrito de microrganismos ou mesmo de espécies únicas (LEAHY; COLWELL, 1990). Bloqueios bioquímicos em vias naturais que impedem a degradação de novos substratos, como os hidrocarbonetos, podem ser superados por meio da transferência de genes adequados.

O gênero *Pseudomonas* apresenta um leque de genes com capacidade biodegradativa, o que confere a grande vantagem seletiva em diferentes habitats. A estirpe *Pseudomonas* sp B13, por exemplo, foi propagada horizontalmente pela transferência do plasmídeo TOL pWWO de *P. putida* MT-2 (JEENES et al., 1982). Os plasmídeos TOL estão envolvidos com a degradação do tolueno, devido à produção da enzima toluate dioxigenase (VAN DER MEER et al., 1992).

Coral e Karagoz (2005) isolaram 50 cepas pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, a partir de um solo contaminado com petróleo bruto de uma refinaria de Mersin, na Turquia. Duas destas que cresceram melhor em meio mineral apropriado acrescido de fenantreno, foram selecionadas para testes de biodegradação evidenciados por cromatografia líquida de alta eficiência. A capacidade de degradar o fenantreno, mediada pelo plasmídeo pARP1, foi comprovada por meio de experimentos de cura plasmidial.

Vasudevan e colaboradores (2007) avaliaram o papel do plasmídeo envolvido na degradação do hexadecano em *Pseudomonas fluorescens*, isolada de um solo contaminado com petróleo. Essa bactéria foi capaz de utilizar o hexadecano como única fonte de carbono e abrigava um plasmídeo de aproximadamente 1,8 Kb. Os experimentos de cura plasmidial e posterior transformação deste DNA em *E. coli* confirmaram o envolvimento desse plasmídeo na degradação do hexadecano, pois as estirpes de *E. coli* transformadas degradaram 92% do hexadecano em 120 horas, enquanto *P. fluorescens* degradou 95% no mesmo período de tempo.

## 2.4 METAGENÔMICA

Com o grande avanço tecnológico dos últimos anos, baseado na evolução das metodologias de biologia molecular aplicada ao estudo do meio ambiente, foi possível verificar que o conhecimento acerca da biodiversidade existente no planeta é praticamente insignificante. Sabe-se atualmente que apenas uma pequena parcela dos microrganismos presentes no meio ambiente (<10% em solos e <1% em ambientes aquáticos) pode ser cultivada em laboratório por técnicas padrões de cultivo (OLIVEIRA; MANFIO, 2006; COUTINHO et al., 2001).

Essas técnicas tornaram possível a caracterização de comunidades microbianas mistas em determinados ecossistemas, revelando os grupos atuantes, muitos destes até então desconhecidos (ROSADO et al., 1997). A metagenômica é a análise genômica da comunidade de microrganismos de um determinado ambiente por técnicas independentes de cultivo e contém muito mais informação genética do que aquela verificada na diversidade microbiana cultivada. Essa análise pode permitir o acesso a 100% do material genético de toda biodiversidade encontrada no ambiente (OLIVEIRA; MANFIO, 2006).

Margesin e colaboradores (2003) verificaram a prevalência de linhagens de *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter spp.*, *Rhodococcus spp.* e *Mycobacterium sp.* em 12 solos contaminados com petróleo e em oito solos intactos de Tirol (Áustria) pelas análises de PCR hibridização do DNA total da comunidade do solo, utilizando sondas de DNA e oligonucleotídeos específicos para cada genótipo. Genes envolvidos na degradação de hidrocarbonetos foram detectados em bactérias gram-negativas (*P. putida* e *Acinetobacter*) em uma porcentagem significativamente maior nos solos contaminados do que nos intactos, indicando que estes organismos tinham sido enriquecidos em solo após a contaminação.

Os resultados obtidos com estas técnicas possibilitam definir com maior precisão qual o melhor processo de biorremediação a ser implementado, visando à utilização máxima de um determinado grupo presente na comunidade microbiana. A presença de uma grande quantidade de cópias de um gene catabólico em uma área contaminada pode ser um indicativo de que esteja ocorrendo um processo de biodegradação natural ou que a estratégia de tratamento empregada seja eficiente (CUNHA et al., 2008).

Atualmente, no Brasil, um projeto em desenvolvimento na linha de metagenômica, aplicada à biodegradação de petróleo e derivados, tem chamado atenção. Um convênio firmado entre a PETROBRAS/ UNICAMP/ FUNCAMP e o CPQBA, em 2006, objetiva a prospecção da atividade de degradação de hidrocarbonetos aromáticos em metagenoma microbiano originado de efluente de refinaria de petróleo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2009).

Outro projeto financiado pela FAPESP (Processo #2004/01794-1), vinculado ao projeto PROSET/CT-PETRO/CNPq e concluído em 2008, teve como tema a prospecção de genes associados à biodegradação e biotransformação de hidrocarbonetos em metagenoma de petróleo bruto (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2007).

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta revisão foi demonstrada a possibilidade de contaminação ambiental pelos hidrocarbonetos derivados do petróleo. Foram apresentadas as características dos poluentes e os processos envolvidos na contaminação do solo, destacando o mecanismo de biodegradação, bem como a importância da bioprospecção de microrganismos capazes de realizar este processo para a biorremediação de locais contaminados com compostos petroderivados. Porém, ainda são necessários novos estudos envolvendo este tema, com técnicas mais esclarecedoras, como a metagenômica. Finalmente, o conhecimento da biodiversidade e da bioprospecção de novos microrganismos torna-se um dos focos principais da era biotecnológica e vem auxiliando positivamente nos programas relacionados à gestão de áreas contaminadas.

### REFERÊNCIAS

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 1, p. 299-352, 2000.

AHEARN, D. G.; MEYERS, S. P.; STANDARD, P. G. The role of yeasts in the decomposition of oils in marine environments. **Developments in Industrial Microbiology**, v. 12, p. 126-134, 1971.

ANDRADE, D. M. **Avaliação de bactérias provenientes de um biofiltro de tratamento de vapores de gasolina**. 2008. 96p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental na área de Poluição Atmosférica) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEL - ANP. Disponível em: <www.anp.com.br> Acesso em: 05 jun. 2009.

AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE - API. **Risk-Based Methodologies**

**for Evaluating Petroleum Hydrocarbon Impacts at Oil and Natural Gas E&P Sites.** [S. l.]: API Publishing Services, 2001. (API Publication Number 4709).

ARAÚJO, F. S. M. et al. Isolamento e identificação de fungos degradadores de petróleo. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10, 2002. **Anais...** [S. l.]: CENTRO DE TECNOLOGIA MINERAL – CETEM/MCT, 2002.

BAIRD, C. **Química Ambiental.** Tradução de M. A. L. Recio e L. C. M. Carrera. 2. ed. Porto Alegre, RS: Bookman, 2002.

BARROS, C. A. et al. Estudo da degradação de petróleo em solo arenoargiloso com bioaumento fúngico utilizando casca de coco como material estruturante. In: MEETING OF THE SOUTHERN HEMISPHERE ON MINERAL TECHNOLOGY; ENCONTRO NACIONAL DE TRATAMENTO DE MINÉRIOS E METALURGIA EXTRATIVA, 7, 22, 2005. **Anais...** [S. l.]: [S. n.], 2005.

BENTO, F. M. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1049-1055, 2005.

BIAZATI, L. B. **Estudo da degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos a partir da reação de Fenton utilizando magnetitas dopadas com cobalto.** 2009. Dissertação (Mestrado em Química e Recursos Naturais) - Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.

BORÉM, A.; SANTOS, F. R. Biorremediação. In: BORÉM, A.; SANTOS, F. R. (Eds.) **Biotecnologia Simplificada.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. p. 179-187.

BOSSET, I.; BARTHA, R. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: ATLAS, R. M. **Petroleum Microbiology.** New York: Macmillan, 1984. p. 434.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 41, p. 653-673, 1941.

CAO, B.; NAGARAJAN, K.; LOH, K. C. Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. **Applied**

**Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 207-228, 2009.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. Disponível em:<<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 13 jan. 2009.

CHAILLAN, F. et al. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 587-595, 2004.

CHU, H. et al. Catalytic incineration of  $C_2H_5SH$  and its mixture with  $CH_3SH$  over a  $Pt/Al_2O_3$  catalyst. **Journal of Environmental Engineering**, v. 127, p. 438-447, 2001.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Disponível em:<[www.conama.com.br](http://www.conama.com.br)>. Acesso em: 15 ago. 2009.

CORAL, G.; KARAGOZ, S. Isolation and characterization of phenanthrene-degrading bacteria from a petroleum refinery soil. **Anal. of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 255-259, 2005.

CORSEUIL, H. X.; FERNANDES, M. Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 4, n. 1, p. 71-75, 1999.

COSTA, S. P. **Biodegradabilidade de n-hexadecano por bactérias livres e imobilizadas em quitosana**. 2006. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) - Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

COUTINHO, H. L. C. et al. Diversidade microbiana em amostras ambientais. In: GARAY, I.; DIAS, B. (Eds.). **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais**. [S. l.]: Vozes, 2001. p. 215-232.

CRAPEZ, M. A. C. et al. Biorremediação para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v. 30, p. 32-37, 2002.

CUNHA, C. D. et al. **Biorremediação de água subterrânea contaminada com gasolina e análise molecular da comunidade bacteriana presente**. Rio de Janeiro, RJ: CETEM/MCT, 2008.

FATORELLI, L. **Proposta de avaliação de risco ecológico para contaminações de petróleo e derivados – estudo de caso**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE – FEAM. Disponível em: <[www.feam.com.br](http://www.feam.com.br)>. Acesso em: 18 dez. 2009.

FLOODGATE, G. D. The fate of petroleum in marine ecosystem. In: ATLAS, R. M. **Petroleum Microbiology**. New York: MacMillan, 1984. p. 355-397.

GARCIA-PEÑA, I. et al. Biofiltration of BTEX by the fungus *Paecilomyces variotii*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 4, p. 442-447, 2008.

HAIDER, K. Microbe-soil-organic contaminant interactions. In: ADRIANO, D. C. et al. (Ed.). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p. 33-51.

JEENES, D. J. et al. TOL plasmid pWW0 in constructed halobenzoate-degrading *Pseudomonas* strains: enzyme regulation and DNA structure. **Journal of Bacteriology**, v. 150, n. 1, p. 180-187, 1982.

KANG, S. et al. Physiological characterization of BTEX degrading bacteria *Microbacterium* sp. EMB-1 and *Rhodococcus* sp. EMB-2 isolated from reed rhizosphere of suncheon bay. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 169-177, 2005.

KOMAGATA. K. T. et al. Assimilation of hydrocarbons by yeasts: preliminary screening. **Journal of General Microbiology**, v. 10, p. 313-321, 1964.

LAVORENTI, A. Comportamento dos herbicidas no meio ambiente. In: CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE MONITORAMENTO E AVALIAÇÃO DE IMPACTO AMBIENTAL. **Anais do Workshop sobre Degradação**. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPMA, 1996. v. 1. p. 81-115.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 305-315, 1990.

LIMA, M. et al. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação de resíduos



de petróleo e óleo vegetal. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA EM ENGENHARIA - CRicTE, 21, 2006. **Anais...** [S. l.]: [S. n.], 2006.

LOVAGLIO, R. B. et al. Biodegradação da gasolina por leveduras isoladas da região portuária de Suape - PE. SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 15, 2005, Recife. **Anais...** Recife, PE: [S. n.], 2005.

MAKIKO, K. et al. Identification of alkane degrading bacteria in petroleum hydrocarbon-contaminated soil. **Journal of Japan Society on Water Environment**, v. 29, n. 1, p. 37-43, 2006.

MARGESIN, R. et al. Characterization of hydrocarbon-degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3085-3092, 2003.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 162p. Tese (Doutorado em Geociências e Ciências Exatas) - Universidade Estadual Paulista, 2006.

MARTINS, A. et al. Biorremediação. **III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas**, 3, 2003, Rio Claro, SP. **Anais Eletrônico...** Rio Claro, SP: Ceset, 2005. Disponível em: <[www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/3fec2401](http://www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/3fec2401)>. Acesso em: 20 ago. 2009.

MOLLEA, C. et al. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. **Chemosphere**, v. 60, n. 5, p. 636-643, 2005.

NAKAGAWA, L. E.; ANDRÉA, M. M. Efeito de alterações nas características do solo sobre a degradação de hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 575-582, 2006.

NIKOLOVA, N.; NENOV, V. BTEX degradation by fungi. **Water Science & Technology**, v. 51, n. 11, p. 87-93, 2005.

OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P. Molecular approaches for the screening of novel enzymes. In: REYMOND, Jean-Louis (Ed.). **Enzyme Assays: High-throughput screening, genetic selection and fingerprinting**. Berne, Switzerland: University of Berne, Department of Chemistry & Biochemistry, 2006. p. 221-

238.

POTIN, O. et al. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, n. 1, p. 45-52, 2004.

RAVELET, C. et al. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. **Chemosphere**, v. 40, p. 557-563, 2000.

RICHARD, J. Y.; VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 44, p. 93-100, 1999.

RIDGWAY, H. et al. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3565-3575, 1990.

RISER-ROBERTS, E. **Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical and chemical processes**. [S. l.]: Lewis Publishers, 1998. RODRIGUES, S.; DUARTE, A. C. Poluição do solo: revisão generalista dos principais problemas. In: CASTRO, A.; DUARTE, A.; SANTOS, T. (Ed.). **O Ambiente e a Saúde**. Lisboa: Instituto Piaget, 2003. p. 136-176.

ROSADO, A. S. et al. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, v. 28, p. 135-147, 1997.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do petróleo. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPMA, 1997. p. 307-334.

SABATÉ, J. et al. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon contaminated soils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, n. 1, p. 19-25, 2004.

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

SCHIRMER, W. N. **Amostragem, análise e proposta de tratamento de com-**

**postos orgânicos voláteis (COV) e odorantes em estação de despejos industriais de refinaria de petróleo.** 2004. 140p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

SEABRA, P. N. Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria de petróleo. In: WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO, 2, 2001, Campinas, SP. **Anais...** Campinas, SP: [S. n.], 2001.

SHIM, H. et al. Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. **Biodegradation**, v. 16, n. 4, p. 319-327, 2005.

SHINODA, Y. et al. Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. Strain DNT-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1385-1392, 2004.

SORKHOH, N. A. et al. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environments in Kuwait. **Environmental Pollution**, v. 65, n. 1, p. 1-17, 1993.

SPAIN, J. C. et al. Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 40, p. 726-734, 1980.

TAPAJÓS, P. B. A. et al. **Estudo da mobilidade e da biodegradação de um óleo mineral em solos.** 2008. 205p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2008.

TEIXEIRA, A. S.; BENTO, F. M. **Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial.** 2007. Dissertação (Mestrado em faculdade de Agronomia) - Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2007.

TIBURTIUS, E. R. L. et al. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v. 27, p. 441-446, 2004.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP. *Secretaria Geral.* Disponível em: <[www.sg.unicamp.br/pautas/convenios/pauta213cepe\\_item42.pdf](http://www.sg.unicamp.br/pautas/convenios/pauta213cepe_item42.pdf)>. Acesso em: 10 maio 2009.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP. **Anuário de Pesquisa 2007**. Campinas, SP, 2007. Disponível em:<<http://www.unicamp.br/anuario/2007/centronucleo/CPQBA-projetos.html>>. Acesso em: 10 maio 2009.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA – U.S. **Assessing UST corrective action technologies: early screenig of clean-up technologies for the saturated zone**. [S. l.]: USEPA, 1990. (EPA/600/2-90/027).

VAN DER MEER, J. R. et al. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 56, n. 4, p. 677-694, 1992.

VASUDEVAN, N. et al. Role of plasmid in the degradation of petroleum hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* NS1. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 42, n. 8, p. 1141-1146, 2007.

ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Archive of Bacteriological Reviews**, v. 10, p. 1-49, 1946.

*Recebido em: 30 Março 2010*

*Aceito em: 16 Agosto 2010*