



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

ANNA PAULA SANTOS ALMEIDA ROTTA

**DEGRADAÇÃO DE FENOL POR BACTÉRIAS DE DOIS BIOMAS
BRASILEIROS**

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

**Goiânia
2015**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Anna Paula Santos Almeida Rotta		
E-mail:	paulaqi@yahoo.com.br		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	☒ Sim	☐ Não	
Vínculo empregatício do autor	Universidade Federal de Goiás - UFG		
Agência de fomento:	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás	Sigla:	FAPEG
País:	Brasil	UF:	GO
		CNPJ:	08.156.102/0001-02
Título:	DEGRADAÇÃO DE FENOL POR BACTÉRIAS DE DOIS BIOMAS BRASILEIROS.		
Palavras-chave:	biorremediação, xenobióticos, fenol, bactérias degradadoras, cerrado e mangue.		
Título em outra língua:	PHENOL DEGRADATION IN TWO BRAZILIAN BIOMES BACTERIA		
Palavras-chave em outra língua:	bioremediation, xenobiotic, phenol degrading bacteria, savannah and mangrove		
Área de concentração:	Estrutura e Dinâmica Ambiental		
Data defesa:	14/10/2015		
Programa de Pós-Graduação:	Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais		
Orientador (a):	José Daniel Gonçalves Vieira		
E-mail:	Jdgvieira62@gmail.com		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Data: 23 /11 /2015

Assinatura do (a) autor (a)

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

ANNA PAULA SANTOS ALMEIDA ROTTA

**DEGRADAÇÃO DE FENOL POR BACTÉRIAS DE DOIS BIOMAS
BRASILEIROS**

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Goiás, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

**Goiânia
2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Santos Almeida Rotta, Anna Paula
DEGRADAÇÃO DE FENOL POR BACTÉRIAS DE DOIS BIOMAS
BRASILEIROS [manuscrito] / Anna Paula Santos Almeida Rotta. -
2015.
XIV, 57 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. José Daniel JGonçalves Vieira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Pró-reitoria de
Pós-graduação (PRPG) , Programa de Pós-Graduação em Ciências
Ambientais, Goiânia, 2015.

Bibliografia. Apêndice.
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas,
lista de figuras, lista de tabelas.

1. biorremediação. 2. xenobióticos. 3. fenol. 4. bactérias degradadoras.
5. cerrado e mangue.. I. JGonçalves Vieira, José Daniel , orient. II.
Título.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Anna Paula Santos Almeida Rotta

Orientador (a): Drº José Daniel Gonçalves Vieira

Membros:

1. Drº José Daniel Gonçalves Vieira

2. Drª Daniela de Melo e Silva

3. Drª Keili Maria Cardoso de Souza

Data: 14/10/2015

*Ao meu esposo pelo amor constante e infinito,
Aos meus pais pelo carinho, amor e incentivo,
Aos meus irmãos pelo companheirismo e
Á toda família por se fazer tão essencial em minha
Vida*

Dedico.

*“O Sucesso normalmente vem para quem está ocupado demais
para procurar por ele”
(Henry David Thoreau)*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, por estar sempre guiando e iluminando minhas escolhas.

Á Universidade Federal de Goiás (UFG) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (CIAMB), pela oportunidade de realizar este trabalho.

Á Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo apoio financeiro.

Ao Profº. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira pela orientação, e por me ensinar a ser uma pessoa dinâmica, forte e confiante.

Ao Profº. Dr. Dannes Pereira Barbosa, pelo apoio, críticas e sugestões.

As professoras que aceitaram participar desta banca.

Aos amigos que fiz no LAMAB-Goiânia e que ficarão para sempre: Ariana, Aline, Bruno, Marcus, Thaís, Renan, Igor, Petain, Camila, Raylane, Luann, Lia pela força, amizade e constante presença e incentivo.

Ao meu querido marido Maércio Lúcio Rotta pelo carinho, companheirismo, compreensão e pelos nossos momentos vividos ao longo dessa jornada.

Aos meus pais João Aparecido de Almeida e Maria da Glória S. Souza por tornar possível a realização deste sonho e pelo exemplo de vida, força e amor.

Aos meus sogros Luiz Rotta e Maria Aparecida Benatto Rotta por apesar de pouco tempo juntos já são meus segundos pais e pelas vossas orações.

Aos meus irmãos Wallison Neves dos Santos e Fabrício Almeida Leite pelo carinho, torcida e companheirismo.

Á toda minha família, pelo amor e respeito e por se fazerem presentes mesmo distantes.

E a todos que de uma forma ou outra contribuíram com a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3.	REFERÊNCIAS	4
	– CAPÍTULO I –	6
	REVISÃO DA LITERATURA	
1.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1.1	Biomassas	6
1.1.1	Cerrado	6
1.1.2	Manguezal	7
1.2	Xenobióticos	9
1.3	Compostos fenólicos	10
1.3.1	Origem Natural do Fenol	11
1.3.2	Micro-organismos envolvidos na degradação do fenol	13
1.3.3	Principais rotas metabólicas na degradação biológica do fenol	14
1.3.3.1	Rota aeróbia	15
1.3.3.2	Rota anaeróbia	15
1.4	Biorremediação	19
1.4.1	Fatores que afetam a biodegradabilidade dos contaminantes e a problemática da contaminação de solos por fenóis	20
2.	REFERÊNCIAS	25
	– CAPÍTULO II –	31
	DEGRADAÇÃO DE FENOL POR BACTÉRIAS DE DOIS BIOMAS BRASILEIROS	
	(Manuscrito de artigo científico)	
	RESUMO	33
	INTRODUÇÃO	34
	METODOLOGIA	35
	Isolamento dos micro-organismos	35
	Determinação da tolerância e capacidade de utilização do fenol	36

sobre os isolados	
Consumo do fenol e crescimento dos micro-organismos em cultivo estacionário	37
Identificação dos isolados bacterianos	37
Caracterização morfológica dos isolados bacterianos	37
Caracterização molecular dos isolados bacterianos	38
Extração do DNA genômico	38
Amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia de polimerase (PCR)	38
Purificação do produto da PCR e seu sequenciamento	39
RESULTADOS	40
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	46
AGRADECIMENTOS	46
REFERÊNCIAS	47
CONCLUSÕES GERAIS	50
APÊNDICES	51

RESUMO

Rotta, Anna Paula S. Almeida, M.Sc., Universidade Federal de Goiás, outubro de 2015.
DEGRADAÇÃO DE FENOL POR BACTÉRIAS DE DOIS BIOMAS BRASILEIROS.
Orientador: José Daniel Gonçalves Vieira.

Nas últimas décadas, a crescente atividade industrial e a agropecuária têm sido as responsáveis pela contaminação do meio ambiente devido à presença de substâncias orgânicas e inorgânicas. O fenol e seus derivados constituem uma importante classe de contaminantes ambientais pela sua presença em muitos efluentes industriais. A busca por alternativas biológicas para combater a poluição ambiental tem motivado pesquisas por micro-organismos que aliem a capacidade de degradar o fenol com enfoque sustentável. Nesta vertente, bactérias degradadoras de xenobióticos, estão sendo utilizadas como inóculo nos diversos tipos de tratamento biológico para a minimização de contaminação de águas, solos e sedimentos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a biodegradação do fenol por isolados bacterianos de dois biomas brasileiros (Cerrado Goiano e Manguezal de Guarapará, ES), no qual, verificou-se a influência da adaptação bacteriana perante as diferentes concentrações de fenol e a tolerância a esse composto químico. Das bactérias de Cerrado uma foi identificada como *Staphylococcus aureus* (BF 2.5) e a outra somente como bastonete gram-positivo (BF 2.3.2) e entre as bactérias de manguezal uma foi identificada como *Bacillus circulans* (MF-2) e a outra *Bacillus* sp. (MF-1) Todos os isolados consumiram fenol na concentração aproximada de 500mg.L^{-1} quando crescidos em meio de Bushnell-Haas (BH) líquido e em 1.500mg.L^{-1} quando em meio Ágar Nutriente (AN). Quanto à utilização do fenol como fonte única de carbono observamos que o consumo de fenol pelo isolado BF-2.5 foi de 2,78; 4,79 e 0,35% para as concentrações de 100, 200 e 300mg.L^{-1} de fenol, respectivamente. Já para o isolado BF-2.3.2 os resultados foram de 11,04; 19,13 e 16,02%, respectivamente. Para os isolados de manguezal os resultados foram 22,43; 11,52 e 3,33% e 21,54; 20,54 e 28,85% para os isolados MF-1 e MF-2, respectivamente nas mesmas concentrações de fenol testadas. Estes isolados sugerem uma maior capacidade de utilização pelo isolados MF-2 de manguezal.

Palavras-chave: biorremediação, xenobióticos, fenol, bactérias degradadoras, cerrado e mangue.

ABSTRACT

Rotta, Anna Paula S. Almeida, M.Sc., Federal University of Goiás, October 2015. **PHENOL DEGRADATION IN TWO BRAZILIAN BIOMES BACTERIA.** Advisor: José Daniel Gonçalves Vieira.

In recent decades, the growth of industrial activity and agriculture has been responsible for environmental contamination due to the presence of organic and inorganic substances. Phenol and its derivatives are an important class of environmental contaminants by their presence in many industrial effluents. The seeking of biological alternatives to mitigate the environmental pollution has motivated researches to find microorganisms that combine the capacity to degrade phenol with a sustainable focus. Therefore, bacteras capable of degrading xenobiotics are been used in soil, sediment and water treatment. This study has aimed to evaluate the biodegradation of phenol by bacterial isolates isolated from two Brazilian biomes (Cerrado Goiano and Mangrove of Guarapary, ES), whereupon the influence of pre-adaptation of the bacteria was checked, as well as the effects of growth parameters in different concentrations and the tolerance to this chemical compound. One isolated from Cerrado was identified as *Staphylococcus aureus* (BF 2.5), and the other one as a gram-positive rod (BF 2.3.2), and the mangrove bacteria were identified as *Bacillus circulans* (MF-2) and *Bacillus* sp. (MF-1). All of the isolates consumed phenol in the approximated of 500mg.L⁻¹ when cultivated in liquid Busnell-Hass (BH) medium and 1.500mg.L⁻¹ in Nutrient Agar medium (NA). The consumption of phenol as carbon source by BF-2.5 isolated was 2,78; 4,79 and 0,35% for concentrations of 100, 200 and 300 mg.L⁻¹ of phenol, respectively. The isolated BF-2.3.2 results were 11, 04; 19,13 and 16,02%, respectively. For the mangrove isolated the results were 22,43; 11,52 and 3.33% to 21,54; 20;54 and 28.85% for the MF-1 and MF-2 isolates, respectively in the same phenol concentrations tested. These results suggest a higher phenol consumption capacity of MF-2 isolated from mangrove.

Keywords: bioremediation, xenobiotic, phenol degrading bacteria, savannah and mangrove.

LISTA DE TABELAS

– CAPÍTULO I –		
REVISÃO DA LITERATURA		
Tabela 1	Propriedades físicas de alguns compostos fenólicos.	10
Tabela 2	Micro-organismos capazes de degradar fenol pela via anaeróbia	16

– CAPÍTULO II –		
DEGRADAÇÃO DE FENOL POR BACTÉRIAS DE DOIS BIOMAS BRASILEIROS		
(Manuscrito de artigo científico)		
Tabela 1	Caracterização morfológica e origem das bactérias isoladas	40
Tabela 2	Identificação dos isolados com base na comparação da sequência de 16S rDNA obtida com outras depositadas no banco de dados do <i>GenBank</i> (análise BLASTn).	41
Tabela 3	Tolerância e utilização dos isolados nos diferentes meios de cultura e nas diferentes concentrações de fenol.	41

LISTA DE FIGURAS

– CAPÍTULO I –		
REVISÃO DA LITERATURA		
Figura 1	Representação de alguns compostos fenólicos.	10
Figura 2	Representação de parte da estrutura dos taninos: (A) hidrolisáveis e (B) condensados.	12
Figura 3	Esquema da rota metabólica aeróbia da degradação do fenol.	15
Figura 4	Esquema da rota metabólica anaeróbia da degradação do fenol. Representação esquemática da conversão de fenol, através de fenilfosfato e fenolato, de 4-hidroxibenzoato de metilo.	17
Figura 5	Degradação do 4-Hidroxibenzoato.	18
– CAPÍTULO II –		
DEGRADAÇÃO DE FENOL POR BACTÉRIAS DE DOIS BIOMAS BRASILEIROS (Manuscrito de artigo científico)		
Figura 1	Microfotografia dos isolados de Cerrado e Mangue corados pela metodologia de Gram. a) BF-2.3.2; b) BF-2.5; c) MF-1 e d) MF-2.	40
Figura 2	Percentual do consumo de fenol pelas morfo-espécies BF-2.3.2; BF-2.5; MF-1 e MF-2 em relação aos cinco dias de incubação.	42
Figura 3	Crescimento bacteriano das morfo-espécies BF-2.3.2; BF-2.5; MF-1 e MF-2 em relação aos cinco dias de incubação.	42

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AN – ÁGAR NUTRIENTE.

ATP – TRIFOSFATO DE ADENOSINA.

BF – BACTÉRIA DE CERRADO DEGRADADORA DE FENOL.

BH – BUSHNELL-HAAS.

BHI – BRAIN HEART INFUSION.

BLASTn – BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL

BRSS – BACTÉRIAS REDUTORAS DE SULFATO.

BTEX – BENZENO, TOLUENO, ETIL-BENZENO E OS XILENOS (O-XILENO, M-XILENO E P-XILENO).

CO₂ – DIOXIDO DE CARBONO.

CoA – COENZIMA A.

CTAB – BROMETO DE HEXADECILTRIMETILAMÔNIO.

DGGE – ELETROFORESE POR DESNATURAÇÃO EM GEL DE GRADIENTE.

DNA – ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO.

dNTP – Deoxynucleotídeos.

DQO – DEMANDA QUÍMICA DE OXIGÊNIO.

EDTA – ÁCIDO ETILENODIAMINO TETRA-ACÉTICO

FISH – HIDRIDIZAÇÃO POR FLUORESCÊNCIA *IN SITU*.

HCl – ÁCIDO CLORÍDRICO.

HPLC – HIGH PERFORMANCE LIQUIDE CHROMATOGRAPHY

IPTSP – INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA.

K_A – CONSTANTE DE IONIZAÇÃO.

KOH – HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO.

LAMAB – LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL E BIOTECNOLOGIA

LB – LURIA-BERTANI.

MF – BACTÉRIA DE MANGUE DEGRADADORA DE FENOL.

MgCl₂ – CLORETO DE MAGNÉSIO.

NaCl – CLORETO DE SÓDIO.

O₂ – OXIGÊNIO GASOSO.

PCR – REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE.

pH – POTENCIAL HIDROGENIÔNICO.

RNA – ÁCIDO RIBONUCLEICO.

R-RBBR – AZUL BRILHANTE DE REMAZOL.

rRNA – ÁCIDO RIBONUCLEICO RIBOSSÔMICO.

SDS – DIMETIL SULFATO DE SÓDIO.

TBE – SOLUÇÃO TAMPÃO DE TRIS-ÁCIDO BÓRICO.

TE – TRIS-EDTA.

UFG – UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS.

λ – COMPRIMENTO DE ONDA.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a crescente atividade industrial e a agropecuária têm sido as responsáveis pela contaminação do meio ambiente devido à presença de substâncias orgânicas e inorgânicas. Nessa perspectiva é possível observar uma maior preocupação com a conservação dos recursos naturais, principalmente com relação à disponibilidade de água potável e aos altos custos relativos à sua obtenção (LUPETTI; ROCHA, FATIBELLO-FILHO, 2004; ROSATTO et al., 2001). Isto tem levado os órgãos governamentais a estabelecerem limites rígidos e níveis ambientais aceitáveis desses poluentes, exigindo-se assim métodos analíticos ambientalmente seguros e economicamente viáveis que ofereçam alta seletividade e sensibilidade para a identificação e qualificação dessas substâncias (HAITAO; MANCAI, ZUOQUING, 2004; NAMEROFF et al., 2004; SIMÕES et al., 2007).

Os compostos fenólicos estão presentes nas mais diferentes concentrações em efluentes de vários processos industriais, tais como: fabricação de insumos agrícolas, presentes em pesticidas e fungicidas; processo de branqueamento da celulose, no qual se encontram os clorofenóis, indústrias químicas que processam resinas (fenólicas, epóxidas e poliamidas); indústrias farmacêuticas; indústria têxteis; beneficiamento da castanha de caju; processos fotográficos; processo de coqueificação do carvão onde os fenóis são os principais contaminantes, podendo ser encontrados em até algumas gramas por litro; refinarias de petróleo; fabricação de laminados decorativos para o setor moveleiro entre outros (DA SILVA et al., 2006; GATTI et al., 2001; MOLDOVEANU et al., 2007; OHLENBUSCH et al., 2000).

De acordo com a resolução CONAMA, número 20 no seu artigo 21 (Brasil 1986), o limite máximo de concentração de fenóis para as classes de rios 1 e 2 (águas destinadas à conservação da vida aquática e ao abastecimento público) é de $0,001\text{mg.L}^{-1}$. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedeçam às seguintes condições: concentrações de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de fenol. Na Portaria nº 518 (2004) do ministério da Saúde e complementada pela Portaria nº 2.914 (2011) são estipuladas nas águas de abastecimento concentrações máximas apenas para compostos derivados do fenol, tais como pentaclorofenol ($0,009\text{mg.L}^{-1}$) e 2,4,6-triclorofenol ($0,2\text{mg.L}^{-1}$).

O Instituto Nacional Norte Americano para Saúde e Segurança Ocupacional, estabeleceu como limite de $2,3\text{mg.L}^{-1}$ para isômeros de cresol (EATON et al., 1995).

O fenol e seus derivados constituem uma importante classe de contaminantes ambientais pela sua presença em muitos efluentes industriais (SANTOS; LINARDI, 2004).

Embora sendo biodegradável tanto na via aeróbia como na anaeróbia o fenol e seus derivados são tóxicos para a maioria dos micro-organismos, principalmente não aclimatados, em concentração de apenas 10mg.L^{-1} , podendo ser inibidor do crescimento mesmo para as espécies que o utilizam como substrato, causando problemas em estações de tratamento de efluentes (SANCINETTI et al; 2003).

A bioaumentação por micro-organismos autóctones selecionados constitui uma boa alternativa para a biodegradação do fenol. Diversos autores têm mencionado o uso de micro-organismos visando à remoção de fenol em efluentes industriais como, por exemplo, *Penicillium* (SANTOS; LINARDI, 2004), *Candida* (YAN et al.; 2005) & (CHEN et al.; 2002), *Pseudomonas* (GONZÁLEZ et al., 2001) e *Rhodococcus* (HIDALGO et al., 2002) dentre outros. No entanto, a prospecção de novas linhagens degradadoras, adaptadas a condições ambientais locais, e sua caracterização quanto à capacidade biodegradativa e tolerância à toxicidade constituem aspectos importantes a serem ainda explorados. Para a avaliação da toxicidade e biodegradabilidade, os ensaios em escala laboratorial como o crescimento e resistência dos isolados nos diferentes meios de cultura e nas diferentes concentrações de fenol são úteis para testar variáveis importantes, verificando seus efeitos no desempenho do micro-organismo durante o processo biodegradativo *in vitro*.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a biodegradação do fenol por isolados bacterianos recuperados de dois biomas brasileiros, verificando a influência da bactéria aos efeitos de crescimento em diferentes concentrações, assim como a tolerância da exposição dos micro-organismos a esse composto químico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Isolar e caracterizar bactérias, de dois biomas brasileiros, com potencial de degradação de compostos fenólicos;

2.2 Objetivos específicos

- Isolar micro-organismos (bactérias) degradadores de compostos fenólicos de amostras de manguezal do Estado do Espírito Santo, Brasil e de solo de Cerrado brasileiro contaminado com combustíveis;
- Determinar a tolerância à ação inibitória do fenol sobre os isolados;
- Caracterizar morfológicamente os isolados bacterianos detentores da capacidade de biodegradação fenólica;
- Identificar molecularmente as morfo-espécies em estudo;

3. REFERÊNCIAS

- BRASIL. Resolução CONAMA nº 20, de 18 de junho de 1986. Estabelece a classificação de águas doces, salobras e salinas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p. 11.356, 30 jul. 1986.
- CHEN, K. C.; LIN, Y. H.; CHEN, W. H.; LIU, Y. C. Degradation of phenol by PAA-immobilized *Candida tropicalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 2, p. 490-497, 2002.
- DA SILVA, M. C. E; DA SILVA, L. H.M.; PAGGIOLI, F. J.; COIMBRA, J. C. R.; MINIM, L. A. Sistema aquoso bifásico: uma alternativa eficiente para extração de íons. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1332-1339, 2006.
- EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E.; *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 19th ed., American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation: Washington, 1995.
- GATTI, R.; GIOIA, M. G.; DI PIETRA, A. M.; CAVRINI, V. Analysis of phenols in pharmaceuticals by liquid chromatography after pre-column labelling and on-line post-column photochemical derivatization. **Analítica Chimica Acta**, v. 447, p. 89-99, 2001.
- HAITAO, L.; MANCAI, X.; ZUOQING, B. H. Isotherm analysis of phenol adsorption. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 271, p. 47-53, 2004.
- LUPETTI, K. O.; ROCHA, F. R. R.; FATIBELLO-FILHO, O. An improved flow system for phenols determination exploiting multicommutation and long pathlength spectrophotometry. **Talanta**, v. 62, p. 463-467, 2004.
- MOLDOVEANU, S. C.; KISER, M. Gas chromatography/mass spectrometry versus liquid chromatography/fluorescence detection in the analysis of phenols in mainstream cigarette smoke. **Journal of Chromatography** v. 1141, p. 90-97, 2007.
- NAMEROFF, T. J.; GARANT, R. J.; ALBERT, M. B. Adoption of green chemistry: an analysis based on US patents. **Research Policy**, v. 33, n. 6-7, p. 959-974, 2004.
- OHLENBUSCH, G.; KUMKE, M. U. FRIMMEL, F. H. Sorption of phenols to dissolved organic matter investigated by solid phase microextraction. **Science of Total Environment**, v. 253, p. 63-74, 2000.
- PORTARIA MS Nº 518/2004. **Série E. Legislação Saúde**, Ministério da Saúde, Brasília (2005).
- PORTARIA MS Nº 2.914/2011. **Série E. Legislação Saúde**, Ministério da Saúde, Brasília (2012).
- ROSATTO S. S.; FREIRE, R. S.; DURAN, N. KUBOTA L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, p. 77-86, 2001.

SANCINETTI, S. T.; FÉLIX, J. P. L.; NETO, M. A. F.; *Anais do XIV Simpósio Nacional de Bioprocessos*, Florianópolis, Brasil, 2003.

SANTOS, V. L.; LINARDI, V. R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents-identification and degradation potential. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 8, p. 1001-1006, 2004.

SIMÕES, N. G.; CARDOSO, V. V.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, J.; ALMEIDA, C. M. M. Experimental and statistical validation of SPME-GC-MS analysis of phenol and chlorophenols in raw and treated samples. **Chemosphere**, v. 68, p. 501-510, 2007.

YAN, J.; JIANPING, W.; HANGMEI, L.; SOLIANG, Y.; TONGDING, H.; The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 243-247, 2005.

– CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Biomas

1.1.1 Cerrado

O território brasileiro é constituído por diversos biomas: Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal, recifes de corais, manguezais, ambientes oceânicos e costeiros. Esta característica faz com que o Brasil seja considerado um país de uma alta biodiversidade. Um exemplo que comprova essa alta diversidade é que aproximadamente 20% do número total de seres vivos descritos no planeta estão no Brasil (MITTERMEIER et al., 2004).

O bioma Cerrado brasileiro possui uma diversidade genética que tem sido foco de discussão devido sua localização, extensão e posição central. O referido bioma possui uma posição estratégica em relação aos demais por estar localizado, em maior porção, na região central do país. É importante destacar ainda outro ponto a favor desse bioma, nas suas áreas periféricas existem transições com os biomas Amazônia, Mata Atlântica e Caatinga, fazendo com que ocorra compartilhamento de espécies com os outros biomas e, conseqüentemente, favorecendo a sua diversificação (CASTRO, 2010).

O termo Cerrado significa “vegetação densa”. Esta expressão explica a característica geral da vegetação arbustivo-herbácea densa que ocorre na formação savânica deste bioma. O Cerrado é caracterizado por apresentar uma vegetação rasteira, formada principalmente por gramíneas, coexistindo com árvores e arbustos esparsos. Sua extensão abrange cerca de dois milhões de quilômetros quadrados, sendo o segundo maior bioma brasileiro. Esta grande extensão territorial consiste em um mosaico de diferentes tipos fisionômicos que compreendem desde a formação florestal, savânicas e campestres (RIBEIRO et al., 1998). Os tipos fisionômicos têm como principais fatores determinantes a fertilidade e os teores de alumínio disponíveis no solo, a profundidade, o grau de saturação hídrica das camadas superficial e sub-superficial do solo bem como o clima da região (EITEN, 1994).

A fim de entender as conseqüências destas mudanças na diversidade de comunidades microbianas presentes nos solos do bioma Cerrado é preciso primeiro avaliar a comunidade de bactérias, que são o maior número de espécies de organismos presentes na Terra,

principalmente na litosfera (CHU et al., 2010; LAUBER et al., 2009; TIEDJE et al., 2001; TORSVIK et al., 2002; TYSON et al., 2004).

Em amostras de solo podem-se detectar bactérias que são tidas como generalistas, por que são capazes de colonizar diferentes ambientes ou mesmo bactérias especialistas por serem encontradas unicamente em um ambiente. Em estudo recente, Nemergut e colaboradores (2011) examinaram a distribuição global do gene do 16S rRNA a partir de uma grande variedade de ambientes. Os dados demonstraram que, as bactérias mais abundantes podem ser confinadas em ambientes específicos, e que uma fração significativa da variação encontrada na distribuição de bactérias pode ser relacionada com o tipo do ambiente analisado.

Nos últimos anos, estudos realizados no bioma Cerrado sobre a composição da comunidade bacteriana dos solos têm avançado consideravelmente. Quirino e colaboradores (2009) demonstraram que áreas nativas de uma das fitofisionomias do bioma, o Cerrado *sensu stricto*, apresentam maior diversidade em relação à área de Cerrado *sensu stricto* convertido para pastagem. Bresolin e colaboradores (2010), comparando a comunidade bacteriana do solo de uma área de Cerrado nativa com uma área de Cerrado convertida à plantação de soja, demonstram que a comunidade microbiana do solo pode ser afetada devido à modificação na cobertura original do solo e/ou ao desenvolvimento da cultura de soja.

Devido seu alto poder de diversidade, os solos do Cerrado vêm sendo atualmente analisados por técnicas de sequenciamento mais refinadas como o pirosequenciamento (ARAÚJO et al., 2012; SILVA, 2012). A tecnologia do pirosequenciamento gera quantidades de dados sem precedentes, fornecendo novas oportunidades de abordagens para descrever, analisar e comparar a comunidade microbiana presente nos solos do bioma Cerrado.

1.1.2 Manguezal

O ecossistema manguezal geralmente está associado às margens de baías, enseadas, barras, desembocaduras de rios, lagunas e reentrâncias costeiras, onde haja encontro de águas de rios com a água do mar, ou diretamente expostos à linha da costa. São sistemas funcionalmente complexos, altamente resilientes e resistentes e, portanto, estáveis. A cobertura vegetal, ao contrário do que acontece nas praias arenosas e nas dunas, se instala em substratos de vasa de formação recente, de pequena declividade, sob a ação diária das marés de água salgada ou, pelo menos salobra (CIMA, 1991).

O manguezal é um sistema ecológico tropical, dominado por espécies vegetais típicas, às quais se associam outros componentes microscópicos e macroscópicos da flora e da fauna, adaptados a um substrato periodicamente inundado pelas marés, com grandes variações de salinidade. Os limites verticais do manguezal, no médio litoral, são estabelecidos pelo nível médio das preamares de quadratura e pelo nível das preamares de sizígia (MACIEL, 1991).

A riqueza biológica dos ecossistemas costeiros faz com essas áreas sejam os grandes “berçários” naturais, tanto para as espécies características desses ambientes, como para peixes anádromos e catádromos e outros animais que migram para as áreas costeiras durante, pelo menos, uma fase do ciclo de vida (COSTA & DAVY, 1992). Nas latitudes tropicais de manguezais podem existir tanto ambientes naturais quanto os modificados por ação antrópica (COSTA & DAVY, 1992).

Segundo Pereira Filho e Alves (1999) o manguezal desempenha diferentes funções naturais com muita importância ecológica e econômica, dentre as quais se destacam as seguintes:

- Proteção da linha de costa – a vegetação desempenha a função de uma barreira, atuando contra a ação erosiva das ondas e marés, assim como em relação aos ventos.
- Retenção de sedimentos carregados pelos rios – em virtude do baixo hidrodinamismo das áreas de manguezais, as partículas carregadas precipitam-se e somam-se ao substrato. Tal sedimentação possibilita a ocupação e a propagação da vegetação, o que viabiliza a estabilização da vasa lodosa a partir do sistema radicular dos mangues.
- Ação depuradora – o ecossistema funciona como um filtro biológico em que bactérias aeróbias e anaeróbias trabalham a matéria orgânica e a lama promovendo a fixação e a inertização de partículas contaminantes, como os metais pesados.
- Área de concentração de nutrientes – localizados em zonas estuarinas, os manguezais recebem águas ricas em nutrientes oriundos dos rios, principalmente, e do mar. Aliado a este favorecimento de localização, a vegetação apresenta uma produtividade elevada, sendo considerada como a principal fonte de carbono do ecossistema. Por isso mesmo, as áreas de manguezais são ricas em nutrientes.
- Renovação da biomassa costeira – como áreas de águas calmas, rasas e ricas em alimento, os manguezais apresentam condições ideais para reprodução e desenvolvimento de formas jovens de várias espécies, inclusive de interesse

econômico, principalmente crustáceos e peixes. Funcionam, portanto, como verdadeiros berçários naturais.

- Áreas de alimentação, abrigo, nidificação e repouso de aves – as espécies que ocorrem neste ambiente podem ser endêmicas, estreitamente ligadas ao sistema, visitantes e migratórias, onde os manguezais atuam como importantes mantenedores da diversidade biológica (PEREIRA FILHO, 2001).

1.2 Xenobióticos

Os xenobióticos são compostos químicos sintetizados pelo homem e incluem plásticos, solventes, lubrificantes, detergentes, agrotóxicos, bem como uma ampla variedade de subprodutos da indústria química, abrangendo, portanto, um grande número de moléculas com diferentes modos de ação e toxicidade. Incluem também os numerosos poluentes ambientais, isto é, compostos orgânicos que não participam realmente dos ciclos globais do carbono, nitrogênio ou enxofre, e quando entram no ecossistema natural em grandes quantidades, exibem efeitos tóxicos ou outros efeitos não desejados pelos organismos vivos (SILVA et al., 1996).

Muitos xenobióticos, introduzidos para uso industrial, são importantes ambientalmente, sendo eles: agrotóxicos, plásticos, solventes e desengraxantes. Estes compostos são halogenados e o seu grau de saturação frequentemente está associado a sua persistência (NEILSON et al., 1985). Além disso, há um grande número de compostos carbonados (C) que são poluentes, incluindo óxido de carbono (CO), cianidas (CN⁻) e metanos halogenados (CH₃X) (NEILSON et al., 1985).

O sistema metabólico que tem-se mostrado mais eficiente para biodegradar moléculas xenobióticas recalcitrantes nos processos de biorremediação é o microbiano, uma vez que os micro-organismos desempenham a tarefa de reciclar a maior parte das moléculas da biosfera, participando ativamente dos principais ciclos biogeoquímicos e, representando, portanto, o suporte de manutenção da vida na Terra. Esta extraordinária diversidade metabólica é devida à combinação do potencial genético individual das diferentes espécies microbianas em um sistema natural, com enzimas e vias metabólicas que evoluíram ao longo de bilhões de anos, e a capacidade de metabolismo integrado apresentada pela comunidade microbiana em conjunto. Muitos fatores ambientais de natureza física, química e biológica influenciam na capacidade de um sistema microbiano de biodegradar uma molécula (GAYLARDE et al., 2005).

1.3 Compostos fenólicos

Segundo Monteiro (1998), as estruturas e propriedades dos compostos fenólicos, abreviadamente designados por fenóis se apresentam com um grupo hidróxido ligado diretamente a um anel aromático (Figura 1). Os fenóis são compostos orgânicos aromáticos e foram isolados pela primeira vez a partir de alcatrão de carvão pelo químico alemão Friedlieb Ferdinand Runge (1795-1867), em 1842, e na grande maioria das vezes são sólidos cristalinos incolores. Possuem odor característico, baixo ponto de fusão (Tabela 1) e, em soluções aquosas, possuem uma baixa constante de ionização, K_a , (Tabela 1) e por esta razão são caracterizados como ácidos fracos.

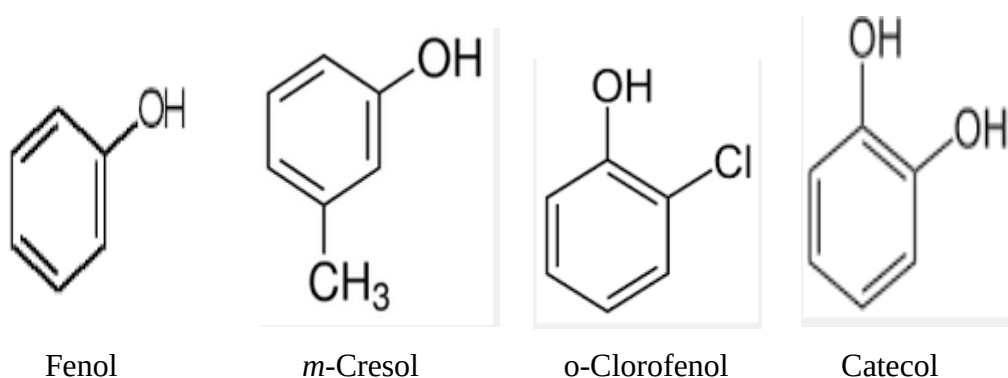
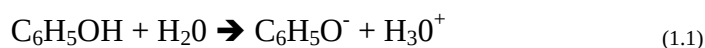


Figura 1. Representação de alguns compostos fenólicos, segundo Monteiro (1998).

Tabela 1. Propriedades físicas de alguns compostos fenólicos (MONTEIRO, 1998).

Composto	Ponto de Fusão °C	Ponto de Ebulição °C	Solubilidade (g/100g H ₂ O, 25°C)	$K_a \cdot 10^{10}$
Fenol	41	182	9,3	1,1
<i>m</i> -Cresol	11	201	2,6	0,63
<i>o</i> -Clorofenol	9	173	2,8	77
Catecol	104	246	45	1

Sua dissociação em água ocorre, conforme a reação:



Entretanto, sua dissociação ocorre em pequeno volume, atendendo ao baixo valor de K_a . A sua dissolução é mais fácil numa solução de hidróxido de sódio do que em água, a partir da formação do sal sódico:



Monteiro (1998) relatou que os fenóis são ácidos mais fracos que o ácido carbônico. Devido a esta característica peculiar é possível verificar se determinado composto é fenólico procedendo ao seguinte teste: se for pouco solúvel em água e for solubilizado em uma solução aquosa de hidróxido de sódio, mas não numa solução aquosa de bicarbonato, esse composto é, com grande probabilidade, um composto fenólico. Uma característica particular do fenol é que este reage com o cloreto de ferro III, formando um complexo de coloração violeta. Além disto, o fenol (hidroxi-benzeno) é ao mesmo tempo um composto aromático sintético e natural (BASHA et al., 2010).

Possui uma grande aplicação na produção de resinas sintéticas, as poliamidas fenólicas (materiais de construção para automóveis e eletrodomésticos) e epóxicas (adesivos, policarbonatos para a fabricação de vasilhames de refrigerantes) (ROJAS, 2001). Está entre os 50 produtos químicos mais produzidos em grande escala, nos Estados Unidos da América (ATSDR, 2006). Em geral, suas concentrações em efluentes industriais está situado entre 10 e $17 \times 10^3 \text{ mg.L}^{-1}$, variando, principalmente, de acordo com o tipo de indústria. Na grande maioria, a contribuição da Demanda Química de Oxigênio (DQO) dos compostos fenólicos nestes efluentes está na faixa de 40% a 80% da DQO total (VEREESH; KUMAR; MEHROTRA, 2005).

Uma característica geral do fenol é ser tóxico. Esta toxidade se torna prejudicial aos micro-organismos, podendo causar a morte celular (HEIPIEPER et al., 1992), pois possui habilidade de romper a membrana lipídica, sendo esta uma barreira responsável pela integridade osmótica da célula microbiana (VAN SCHIE; YOUNG, 2000).

Diante disto, a eliminação dos compostos fenólicos pode ser feita através de diversos processos físico-químicos, tais como: adsorção com carvão ativado, extração por solventes, oxidação química, tratamentos enzimáticos (THOMAS et al., 2002). No entanto, processos biológicos são preferíveis em função da economia e da baixa probabilidade de formação de subprodutos perigosos (BAI et al., 2007).

1.3.1 Origem natural do fenol

A presença de anéis fenólicos no tanino torna possível a sua utilização na preparação de resinas fenólicas e por esta razão pesquisadores são motivados a buscar componentes de origem vegetal (BISANDA et al., 2003; MYALSKI; SLEZIONE, 2005; NITZ et al., 2001). Os taninos são produtos naturais presentes em várias plantas, algas e fungos. Podem ser encontrados em determinados tecidos vegetais, como: casca, madeira e frutos, sendo retirados

por meio de extração com água. Por possuir grande quantidade de anéis fenólicos em sua constituição química são considerados polifenóis (HOIANACK, 1994).

A indústria do couro é a principal atividade econômica responsável pela utilização dos taninos no curtimento do mesmo em larga escala, pois, o tanino interage via forte ligação de hidrogênio com proteínas, principalmente com colágeno, tornando-as insolúveis, melhorando a estabilidade dimensional do material, e diminuindo a suscetibilidade frente a ataques biológicos (PIZZI, 2004).

Os taninos são divididos em dois grupos: hidrolisáveis e condensados (Figura 2). Os primeiros são passíveis de hidrólise pela ação de ácidos minerais diluídos, álcalis e certas enzimas, devido à presença de ligações éster, originando glucose e ácido gálico e seus derivados (ácidos fenolcarboxílicos). Também apresentam anéis do tipo *D*-glucose no centro da estrutura, sendo que as hidroxilas destas unidades de açúcar são parcial ou totalmente esterificadas, tendo anéis fenólicos ligados às carbonilas (PIZZI, 2004; NDAZI et al., 2006).

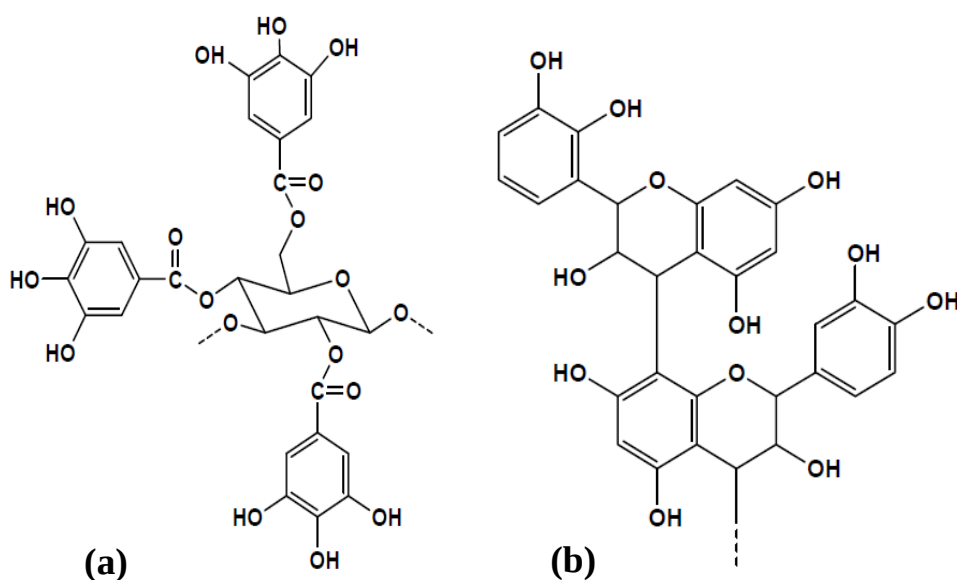


Figura 2. Representação de parte da estrutura dos taninos: **(a)** hidrolisáveis e **(b)** condensados (adaptado de OLIVEIRA, 2008).

Com relação aos taninos condensados são caracterizados por apresentar unidades flavonóides com vários graus de condensação (NDAZI et al., 2006). Estes taninos não têm ligações éster (Figura 2b), o que faz com estes não sejam hidrolisáveis, como ocorre com o outro tipo (Figura 2a). O comportamento químico dos taninos condensados é similar ao fenol e outros compostos polifenólicos. Esta similaridade sugere que os taninos condensados possam ser usados como substituintes parciais de fenol, na preparação de resinas, como de

fato o são em algumas aplicações industriais, como na formulação de adesivos (SOTO et al., 2005).

1.3.2 Micro-organismos envolvidos na degradação do fenol

Os micro-organismos degradadores de fenóis estão distribuídos em diferentes tipos fisiológicos tais como: aeróbios, anaeróbios (fermentativos, metanogênicos, redutores de sulfato), quimiolitotróficos e organismos fotossintéticos. Os resíduos de fenol podem ser degradados por uma única espécie de micro-organismo ou por mais de uma espécie. A biodegradação de um complexo de moléculas normalmente envolve o efeito interativo das comunidades mistas e conta com a versatilidade metabólica das bactérias denominadas hidrocarbonoclásticas que fazem parte da microbiota presente no solo, água e sedimento. Quando estes ambientes são contaminados, ocorre a adaptação de certas populações microbianas, que passam a reconhecer os componentes de fenol como fonte de carbono (ALEXANDER, 1999; MASTER; MOHN, 1998).

O fenol está presente em grande parte dos solos e sedimentos, e existem poucos micro-organismos isolados e caracterizados capazes de degradá-lo. Os micro-organismos aeróbios têm sido descritos desde 1908, porém, apenas em 1986 foi encontrado o primeiro relato de bactéria, *Desulfobacterium phenolicum*, responsável pela degradação do fenol em ambiente estritamente anaeróbio (VAN SCHIE; YOUNG, 1998).

Boopathy (1995) utilizando fenol como única fonte de carbono e energia, fez o isolamento de Bactérias Redutoras de Sulfato (BRSs). Durante o metabolismo do fenol, o produto final foi ácido acético, no qual para cada mol de fenol degradado dois moles de ácido foram produzidos. Como o ácido acético não foi totalmente degradado para CO₂, o autor concluiu que as BRSs não tinham habilidade de degradar completamente compostos aromáticos como fenol, utilizando sulfato como aceptor final de elétrons.

Sabe-se que diversas espécies de micro-organismos são capazes de fazer a redução do íon férrico, sendo a maioria das subclasses γ e δ *Proteobacteria*. Após o isolamento da *Geobacter metallireducens* estudos sugerem que o processo de oxidação para o fenol, tolueno, p-cresol, aldeídos aromáticos, álcoois e benzoato, esta associado a redução de Fe³⁺ para Fe²⁺ (HEIDER; FUCHS, 1997).

Zhang et al. (2005) utilizando técnicas como: Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), Eletroforese por Desnaturação em Gel de Gradiente (DGGE), clonagem, sequenciamento de DNA e Hibridização por Fluorescência *in Situ* (FISH) realizaram a

caracterização microbiológica da comunidade degradadora de fenol. Observou-se uma população constituída de $26 \pm 6\%$ de *Eubacteria* e $74 \pm 9\%$ de bactérias metanogênicas, as quais, $54 \pm 6\%$ eram acetotróficas, *Methanosaetaceae*, $14 \pm 3\%$ e $3 \pm 2\%$ foram hidrogenotróficas sendo, *Methanomicrobiales* e *Methanobacteriaceae*, respectivamente.

O primeiro relato sobre o isolamento de micro-organismos responsáveis pela degradação de fenol sob condições desnitrificantes foi apresentado por Bakker (1977), que obteve um crescimento mínimo da biomassa utilizando fenol como única fonte de carbono.

Tschech e Fuchs (1987) obtiveram sucesso no isolamento das *Pseudomonas sp.* K172 e S100 responsáveis pela degradação anaeróbia do fenol, utilizando nitrato como acceptor final de elétrons. Tais pesquisadores observaram que havia um aumento na velocidade de consumo do substrato com adição de bicarbonato. O processo foi inibido em condições de aerobiose.

Van Schie e Young (1998) obtiveram cultura pura através do isolamento de micro-organismos de sedimentos anaeróbios situados em três localidades geográficas distintas, utilizando fenol como fonte de carbono e energia sob condições desnitrificantes. Foram identificados três bactérias do gênero *Azoarcus*, PH002, CR23 e FL05, reconhecidas anteriormente pela habilidade de fixar nitrogênio.

1.3.3 Principais rotas metabólicas na degradação biológica do fenol

Tratamentos biológicos aeróbios têm sido empregados tradicionalmente no tratamento de compostos fenólicos em águas residuárias, entretanto, estes métodos necessitam de grande quantidade de energia e são caracterizados por alta produção de lodo. A via anaeróbia torna-se, então, uma boa opção, pois apresenta resultados satisfatórios, embora, como desvantagens, tenha processos metabólicos mais lentos e de maneira geral, atinjam eficiências de remoção menores que os aeróbios (SARFARAZ et al., 2004).

O metabolismo aeróbio é caracterizado pelo uso extensivo de oxigênio molecular que é essencial para hidroxilação e para clivagem do anel aromático. O anaeróbio requer compostos aromáticos solúveis, com baixo peso molecular, utilizando assim, uma rota completamente diferente do aeróbio, pois, na maioria dos casos o composto é reduzido e, posteriormente, o anel é quebrado hidroliticamente (HARWOOD et al., 1998).

1.3.3.1 Rota aeróbia

A rota metabólica aeróbia da degradação do fenol inicia-se com a utilização do oxigênio molecular, pela enzima hidroxilase, para formação de um segundo grupo hidroxil na orto-posição. É formado então o catecol (1,2-dihidroxilbenzeno) que, por sua vez, pode ser degradado por duas rotas distintas (orto ou meta) a depender do micro-organismo envolvido no processo (VAN SCHIE; YOUNG, 2000).

Na rota orto, ocorre a clivagem do anel entre os dois grupos hidroxilas, através do catecol 1,2-dihidrogenase formando o ácido *cis, cis* mucônico. Já pela rota meta, a quebra do anel ocorre adjacente aos grupos hidroxilas. A enzima catecol 2,3-dihidroxigenase transforma o catecol para 2-hidroximucônico. Os produtos finais formados (Figura 3) em ambas as rotas são, posteriormente, metabolizados no ciclo de Krebs (VAN SCHIE; YOUNG, 2000).

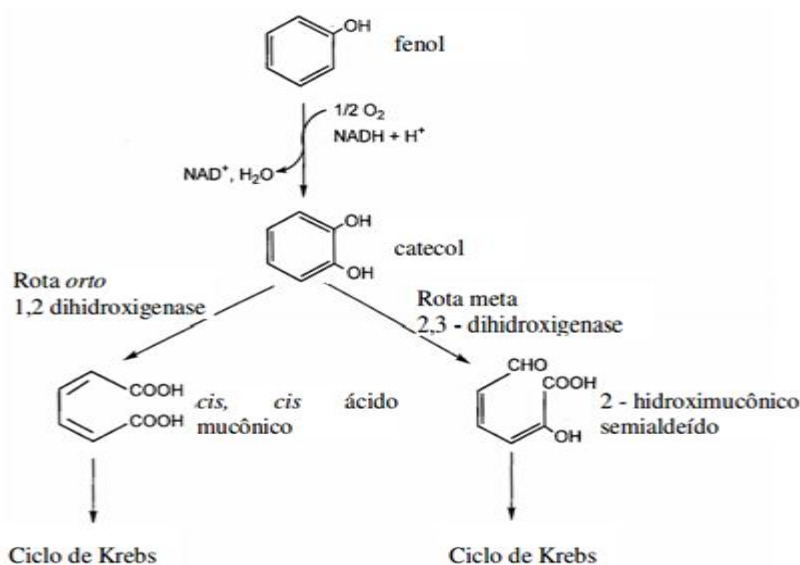


Figura 3. Esquema da rota metabólica aeróbia da degradação do fenol (adaptado de SCHIE; YOUNG, 2000).

1.3.3.2 Rota anaeróbia

Na degradação anaeróbia de compostos aromáticos, a estratégia a ser seguida, para ativação e clivagem do anel, dependerá, essencialmente, se o processo é realizado por micro-organismos anaeróbios fermentativos ou fototróficos (Tabela 2), que utilizam nitrato, íon férrico, sulfato ou carbonato como aceptores de elétrons, sendo os micro-organismos desnitrificantes os mais estudados. Dependendo do potencial redox do aceptor de elétrons

mais ou menos energia poderá ser conservada na respiração anaeróbia. Isto causa uma forte hierarquia, além de um gradiente espacial de organismos que competem pelo aceptor de elétrons que tem maior potencial redox. O oxigênio é o aceptor inorgânico com maior potencial (+818mV) porém não utilizado nesta rota. Em seguida encontra-se o nitrato (+433mV), estendendo-se para, íons metálicos oxidados, como Fe^{3+} ou Mn^{4+} (+200mV), até sulfato (-200mV) (HEIDER; FUCHS, 1997).

Tabela 2. Micro-organismos capazes de degradar fenol pela via anaeróbia (adaptado de VAN SCHIE; YOUNG, 2000).

Tipo do micro-organismo	Espécies e linhagens microbianas
Redutor de nitrato	<i>Thauera aromática</i> K172 e S100
Redutor de nitrato	<i>Azoarcus</i> sp. PbN1, ToN1
Redutor de nitrato	<i>Azoarcus</i> sp. PHOO2, CR23, FLO5
Redutor de sulfato	<i>Desulfobacterium phenolicum</i>
Redutor de sulfato	<i>Desulfobacterium</i> sp. Groll
Redutor de sulfato	<i>Desulfovibrio</i> sp.
Redutor de ferro	<i>Geobacter metallireducens</i> GS15

A primeira medida para a degradação do fenol utilizando nitrato como aceptor final de elétrons é a carboxilação na posição *para*, produzindo 4-hidroxibenzoato (Tschech; Fuchs, 1987). O processo é realizado por uma enzima denominada de “fenol carboxilase” (VAN SCHIE; YOUNG, 2000).

No entanto, Lack e Fuchs (1994) observaram que a enzima fenol carboxilase responsável pela carboxilação do fenol foi inativa, constatando que apenas o fenilfosfato (ácido fosfórico monofenil éster) foi realmente carboxilado. Os autores demonstraram que o primeiro produto formado detectado através do fenol foi o fenilfosfato e que, concomitante ao consumo deste, havia formação de 4-hidroxibenzoato (4-OHBz). O experimento foi realizado *in vitro*, sob condições desnitrificantes, utilizando *Pseudomonas* (Figura 4).

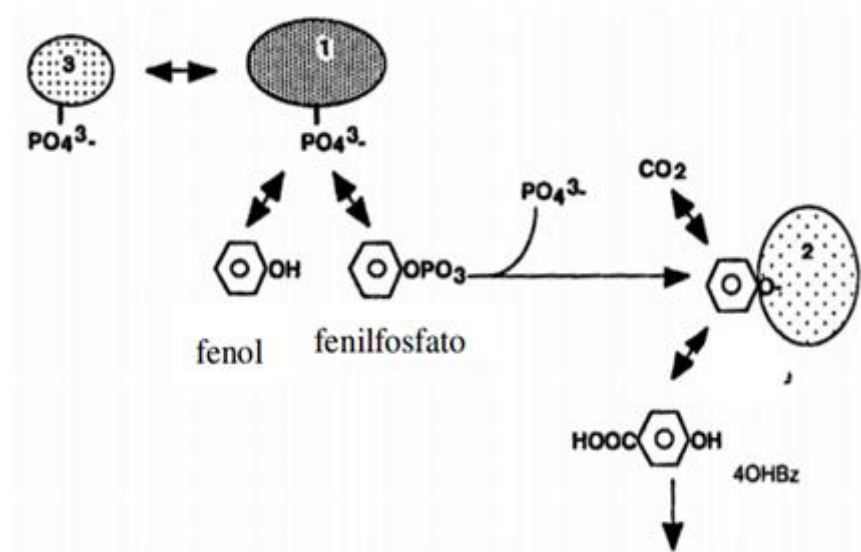


Figura 4. Esquema da rota metabólica anaeróbica da degradação do fenol. Representação esquemática da conversão de fenol, através de fenilfosfato e fenolato, de 4-hidroxibenzoato de metilo. Todas as reações ocorrem no meio intracelular. (1) Putativo fenol quinase, (2) Fenol carboxilase e (3) doador de fosfato desconhecido (adaptado de Lack et al., 1991;. Lack e Fuchs, 1994).

Os principais intermediários produzidos pela maioria dos substratos aromáticos são: benzoil-CoA, resorcinol e floruglucinol. Assim, após a carboxilação do fenol, através da ativação da coenzima A, é iniciada a eliminação redutiva do hidróxi – substituinte para a forma de benzoil-CoA (REINEKE, 2001). A rota da degradação do benzoato (Figura 5), segue basicamente cinco fases: (1) tioesterificação da CoA, (2) hidratação/desoxigenação, (3) redução do anel, (4) quebra do anel e (5) β -oxidação da abertura do anel para acetil-CoA (VAN SCHIE; YOUNG, 2000).

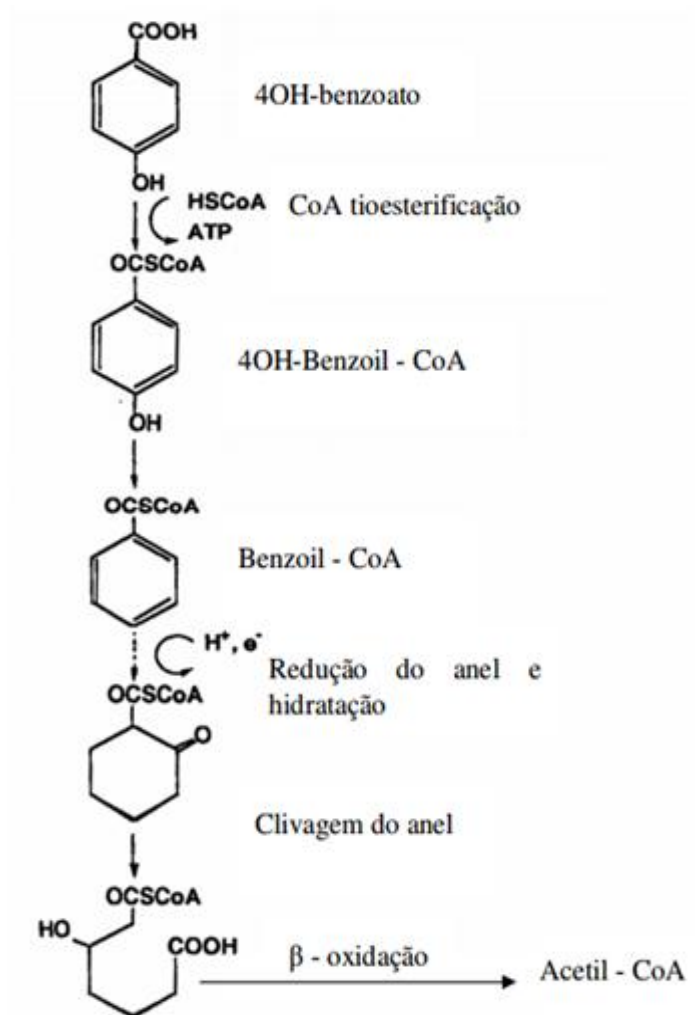


Figura 5. Degradação do 4-Hidroxi benzoato (adaptado de VAN SCHIE; YOUNG, 2000).

Em síntese, a tioesterificação do grupo carboxil é um mecanismo muito importante como ponto de entrada e transferência de elétrons. Contudo, ainda que a redução do benzoil-CoA seja facilitada pela tioesterização da CoA, o processo requer introdução de energia através de duas moléculas de ATP, uma para cada elétron introduzido. Os micro-organismos redutores de nitrato podem recuperar energia através da ativação do substrato e pela redução do anel aromático favorecendo a clivagem do anel, o qual pode ser totalmente oxidado a CO_2 (REINEKE, 2001).

1.4 Biorremediação

A biorremediação é uma técnica importante e mundialmente difundida que utiliza micro-organismos de ocorrência natural (nativos) ou cultivada, para degradar ou imobilizar contaminantes em água subterrâneas e em solos. Neste caso, geralmente, os micro-organismos utilizados são bactérias, fungos filamentosos e leveduras que possuem a habilidade natural dos organismos em mineralizar, transformar e até mesmo combinar compostos poluentes com outras moléculas. Quando utilizam micro-organismos, seu isolamento e caracterização são pré-requisitos fundamentais para melhor conhecimento e otimização do processo (ALEXANDER, 1999). Em síntese, os micro-organismos metabolizam as substâncias orgânicas, das quais se obtêm nutrientes e energia. Sendo necessário para isso, que estes micro-organismos estejam ativos para desempenharem a sua tarefa de biodegradação. Destes, as bactérias são as mais empregadas e, por conseguinte, são consideradas como o elemento principal em trabalhos que envolvem a biodegradação de contaminantes. São definidas como qualquer classe de micro-organismos unicelulares, geralmente agregados em colônias, que vivem em compartimentos ambientais diversos. São importantes, em função de seus efeitos bioquímicos e por destruírem ou transformarem os contaminantes considerados potencialmente perigosos em compostos menos danosos ao ser humano e ao meio ambiente (NRC, 1993).

Genericamente, os micro-organismos nativos da subsuperfície podem desenvolver a capacidade de degradar contaminantes após um período constante e longo de exposição. Normalmente, estes seres microscópicos se adaptam em baixas concentrações de contaminantes e se localizam nas regiões externas à pluma de contaminação e, muito dificilmente, estarão presentes na fase livre (fase orgânica concentrada). Os compostos orgânicos são metabolizados por fermentação, respiração ou co-metabolismo (CETESB, 2004). Portanto, o processo de biorremediação pode ser aeróbico ou anaeróbico, requerendo oxigênio ou hidrogênio, respectivamente. Na maioria dos locais, a subsuperfície é carente dessas espécies (oxigênio ou hidrogênio), o que impede os micro-organismos de se reproduzirem e degradarem completamente o contaminante alvo. Além desses dois processos, a biorremediação também pode ocorrer de forma co-metabólica (VIDALI, 2001). Na “biorremediação aeróbica”, que necessita de um meio oxidante, o oxigênio atua como receptor de elétrons e os contaminantes são utilizados pelos micro-organismos como fontes de carbono (doador de elétrons), necessárias para manter as suas funções metabólicas, incluindo

o crescimento e a reprodução. Por exemplo, os compostos de benzeno, tolueno, etil-benzeno e xilenos (BTEX) cumprem essa função como doadores de elétrons, caso haja receptores suficientes (oxigênio dissolvido) para que a reação ocorra. Quando o oxigênio é totalmente consumido, os micro-organismos passam a utilizar outros receptores naturais de elétrons disponíveis no solo, sendo que esse consumo ocorre na seguinte ordem de preferência: nitrato (reação de desnitrificação), manganês, ferro, sulfato e dióxido de carbono, sendo este, convertido em ácidos orgânicos para gerar o metano (AELION & BRADLEY, 1991). A “biorremediação anaeróbica”, que requer um meio redutor, ocorre pela ação de espécies doadoras de elétrons, responsáveis pela degradação, principalmente, dos poluentes halogênicos. Trata-se de um fenômeno pelo qual os micro-organismos, ao metabolizarem fontes alternativas de carbono (que não sejam os contaminantes de interesse), liberam compostos inorgânicos hidrogenados, hidretos (H^-), que reagem com as moléculas do contaminante e substituem um átomo de Cloro (hidrogenólise) ou removem simultaneamente dois átomos de cloro adjacentes originando uma ligação dupla entre os átomos de carbono. A biorremediação anaeróbica *in-situ* é ideal para ser utilizada em locais contaminados por compostos organoclorados, como o percloroetileno (PCE), uma vez que a fonte de carbono estimula nas bactérias a reação denominada halo-respiração ou halo-eliminação. Embora esse princípio, também denominado de descloração redutiva, seja aparentemente simples, a dificuldade da técnica está em criar um modelo ideal de fonte de carbono para um determinado micro-organismo. Esta fonte de carbono deve conter compostos que sejam preferencialmente e facilmente metabolizados pelos micro-organismos na presença dos contaminantes (ACTON & BARKER, 1992). Apesar do tratamento anaeróbico ser menos comum que o aeróbico, existe atualmente uma tendência de se promover a biorremediação anaeróbica, utilizando como fontes de carbono, melaço de cana, ácido láctico, proteínas do leite e metanol. Considerando o melaço de cana (caso incipiente brasileiro, subproduto da indústria sucroalcooleira), é importante ressaltar a necessidade de estudos mais avançados e detalhados, envolvendo, principalmente, a ocorrência de diferentes tipos de fermentações. Normalmente, têm-se observado que determinados processos de fermentações podem aumentar consideravelmente os riscos operacionais. Isto ocorre, especialmente, em virtude da metanogênese (etapa final no processo global da degradação anaeróbica de compostos orgânicos, efetuada pelas *Archaeobacterias* metanogênicas, tendo como subprodutos o metano e o dióxido de carbono), que pode resultar em alguns inconvenientes, como alterações do potencial redox (Eh) da matriz estudada, o que pode provocar a solubilização indesejável de metais e, conseqüentemente, a contaminação do local por estas espécies (NAKAGAWA &

ANDRÉA, 2006). A “biorremediação co-metabólica” é aquela na qual a degradação ocorre pela ação de enzimas produzidas por micro-organismos para outros fins. É uma técnica praticamente idêntica às anteriores, sendo que, do ponto de vista bioquímico, rege o princípio das reações de óxido-redução. No caso específico do co-metabolismo, caso não haja o substrato principal, ou seja, fontes preferenciais de carbono, a degradação mediada pelos micro-organismos não ocorre para um dado componente, definido como “contaminante co-metabolizado”. Por outro lado, neste caso específico, na presença de uma fonte de carbono, a metabolização do substrato primário poderá gerar enzimas capazes de atuar na degradação do contaminante de interesse (GARNIER et al., 2000). Não obstante, em poucos casos as condições naturais do local contaminado fornecem todas as substâncias essenciais, em quantidades suficientes, para que a biorremediação possa ocorrer sem a intervenção humana. Esse processo natural também é conhecido como “biorremediação intrínseca” e é utilizada, com sucesso, em alguns trabalhos (BOROLE ET AL. 1997; CHEN ET AL., 2006; TROQUEST ET AL., 2003). Todavia, mesmo quando o meio é totalmente acondicionado ao cultivo dos micro-organismos, a biodegradação pode ser afetada, principalmente, devido à capacidade intrínseca de cada micro-organismo de metabolizar uma substância qualquer. Por exemplo, de acordo com Embar et al. (2006), alguns micro-organismos sobrevivem em condições ambientais extremamente adversas. Adicionalmente, pesquisas comprovam que diferentes micro-organismos podem degradar diferentes substâncias, dentre estas, substâncias recalcitrantes, como os hidrocarbonetos de petróleo, em especial o fenol. Em alguns casos, certos micro-organismos são mais especializados em degradarem contaminantes específicos. Por exemplo, para uma mesma classe de substâncias, como os compostos organoclorados, alguns micro-organismos podem degradar contaminantes como o dicloroetano e o cloreto de vinila, porém, no mesmo local não conseguem degradar o tricloroetano. Contudo, pesquisas sugerem que devido à elevada diversidade de compostos em solos contaminados por petróleo e derivados, estudos preliminares à biorremediação são de extrema importância para o tratamento dessas matrizes ambientais (EMBAR et al., 2006). Salienta-se que, a princípio, o fator crítico para definir se a biorremediação é a técnica mais apropriada para o tratamento do local contaminado é a biodegradabilidade do contaminante. Por isso, o estudo detalhado de cada parâmetro que afeta a biodegradação deve ser feito cautelosamente pelos responsáveis do projeto de remediação.

Alexander (1999), Allard e Neilson (1997), e Boopathy (2000) mostraram a importância de conhecer certos parâmetros em relação à biorremediação: 1) a existência de micro-organismos que tenham a atividade catabólica necessária; 2) estes organismos devem

ter a capacidade de transformar os compostos a uma taxa razoável e baixar suas concentrações a níveis que estejam dentro de normas estabelecidas; 3) não devem gerar produtos ainda mais tóxicos durante a remediação; 4) o local não deve apresentar concentrações ou combinações de químicos notoriamente inibitórios às espécies biodegradantes, ou existir meios de diluição; 5) os componentes alvos devem estar disponíveis aos micro-organismos; 6) condições locais de campo devem ser criadas para conduzir o crescimento microbiano ou sua atividade como, por exemplo, um suplemento adequado de nutrientes inorgânicos, O_2 suficiente ou outro aceptor de elétrons, umidade favorável, temperatura estável e uma fonte de carbono e energia para o crescimento caso o poluente seja cometabolizado; 7) os custos desta tecnologia devem ser menores ou, pelo menos não mais caras que outras tecnologias que possam também destruir os químicos. Nenhum destes critérios é trivial. Dificuldades em se entender qualquer um destes itens pode resultar em falhas nos processos de biodegradação de compostos aromáticos.

A biodegradação tem sido um dos aspectos do catabolismo microbiano mais explorado recentemente. As tendências na biodegradação de compostos aromáticos em ambientes salinos ou não consiste no isolamento de novas linhagens capazes de metabolizar, a exemplo de compostos fenólicos e a identificação de vias metabólicas alternativas, bem como a clonagem molecular dos genes envolvidos nesse processo (FAIRLEY et al., 2002). Além disso, o conhecimento da microbiota pode auxiliar quando necessário o uso da melhor técnica de biodegradação do ambiente.

O objetivo da biorremediação não é de início a diminuição da concentração de poluentes abaixo dos valores limites, mas sim a redução do potencial de risco de maneira eficaz e com custos economicamente viáveis (HOFFMANN; VIEDT, 1998).

1.4.1 Fatores que afetam a biodegradabilidade dos contaminantes e a problemática da contaminação de solos por fenóis

Nair et al. (2008) relata que a biodegradação é um processo multifacetado que envolve vários fatores bióticos e abióticos. Neste sentido, Gaylarde et al. (2005) e Koning (2002) ressaltaram a importância dos fatores: físicos, químicos e biológicos como essenciais para o sucesso da biorremediação.

Os principais parâmetros físicos que influenciam na degradabilidade são: natureza física da matriz, onde o composto é encontrado (solo, água, sedimento), temperatura e luz.

Embora vários contaminantes possam ser metabolizados por micro-organismos, alguns são mais facilmente biodegradados do que outros. No caso dos fenóis e seus derivados, por exemplo, muitas áreas contaminadas possuem uma mistura complexa de compostos orgânicos, sendo que a maioria destas substâncias, certamente, não é metabolizada na mesma velocidade. Nas regiões temperadas do globo terrestre, a atividade metabólica de micro-organismos pode ser reduzida em função das baixas temperaturas médias anuais, reduzindo, conseqüentemente, a taxa de degradação de poluentes (GAYLARDE et al., 2005).

As taxas de degradação dos diversos compostos que são metabolizados são diferentes e dependentes de vários fatores. Em especial, a velocidade de degradação é comumente dependente da concentração do contaminante e da quantidade de espécies catalisadoras, como as enzimas geradas *on-site* pelos micro-organismos. Nesse contexto, a quantidade de catalisador presente, de certa forma, representa o número de micro-organismos hábeis em metabolizar o contaminante, bem como a quantidade de enzimas produzidas por cada célula. Então, qualquer fator que afeta a concentração do contaminante, o número de micro-organismos presentes ou a quantidade de enzimas específicas, pode aumentar ou diminuir a velocidade da biodegradação do contaminante. Em suma, as medidas corretivas a serem adotadas em quaisquer projetos que envolvam a biorremediação dependem de vários fatores, dentre eles, pode-se citar: a composição química da matriz ambiental, que define a capacidade nutritiva, o pH, umidade, teor de oxigênio dissolvido, o potencial redox do meio e a composição e estrutura química do poluente. Metais pesados, quando presentes, podem interagir com enzimas produzidas pelos micro-organismos, inibindo a sua atividade e, por conseguinte, a capacidade degradativa destes. Por outro lado, concentrações adequadas de metais que têm ação de cofatores enzimáticos podem melhorar a capacidade degradativa do meio. A presença de outros compostos xenobióticos de estrutura simples pode também dificultar o metabolismo de moléculas mais complexas, pois a comunidade microbiana se direcionaria seu metabolismo para degradar, preferencialmente, os menos complexos (NAIR et al., 2008).

Os fatores biológicos estão relacionados à biodegradação de um composto químico no meio ambiente que depende, sobretudo, da presença de uma população de micro-organismos capaz de metabolizar a molécula original e seus produtos de degradação. Na biosfera atual não existem rotas enzimáticas catabólicas capazes de degradar todos os compostos novos que a ação antrópica sintetizou durante os últimos 100 anos. É sabido que alguns xenobióticos podem ser biodegradados por micro-organismos que possuam enzimas capazes de catabolizar moléculas específicas, ou mesmo pela ação conjunta de consórcios

microbianos, em que cada micro-organismo atua individualmente sobre diferentes etapas do processo de biodegradação. Essa é mais provável quando a estrutura química do xenobiótico é semelhante à estrutura de moléculas naturais. Por exemplo, existe uma grande diversidade de moléculas naturais com estruturas complexas, tais como a lignina, rica em anéis benzênicos (estrutura molecular natural abundante na biosfera depois da glicose), os esteróides, os terpenos e compostos halogenados naturais, que ocorrem em grande abundância e são normalmente metabolizados por micro-organismos no ambiente (GAYLARDE et al. 2005).

Assim, o isolamento, identificação, crescimento e tolerância as diferentes concentrações de fenol por micro-organismos adequados às condições ambientais brasileiras como o Cerrado e Manguezal, são importantes para estudos posteriores de utilização em processos de biodegradação de determinados poluentes, como o fenol e seus derivados.

2. REFERÊNCIAS

- ACTON, D. W.; BARKER, J. F. In situ biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in anaerobic groundwaters. *J. Contam. Hydrol.*, 9:325-352, 1992.
- AELION, C. M.; BRADLEY, P. M. Aerobic biodegradation potential of subsurface microorganisms from a jet fuel-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:57-63, 1991.
- ALEXANDER, M. Bioremediation Technologies: *In Situ* and Solid Phase *In: Biodegradation and Bioremediation*. 2nd Ed.; Academic Press: San Diego, USA; pp. 325-353, ch.16, 1999. 453p.
- ALLARD, A.-S., A.H. Bioremediation of organic wastes sites: a critical review of microbiological aspects. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 39, n. 4, p. 253-285, 1997.
- ARAUJO, J. F.; DE CASTRO, A. P.; COSTA, M. M.; TOGAWA, R. C.; JUNIOR, G. J.; QUIRINO, B. F.; BUSTAMANTE, M. M.; WILLIAMSON, L.; HANDELSMAN, J.; KRUGER, R. H. Characterization of soil bacterial assemblies in Brazilian Savanna-like vegetation reveals Acidobacteria dominance. **Microbial Ecology**, v. 64, n. 3, p. 760-770, 2012.
- ATSDR, 2006. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**. Acesso em: 09 de Março de 2015. Disponível em: < <http://www.atsdr.cdc.gov/>>.
- BAI, J.; WEN, J.; LI, H.; JIANG, Y. Kinetic modeling of growth and biodegradation of phenol and m-cresol using *Alcaligenes faecalis*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 510-517, 2007.
- BAKKER, G. Anaerobic degradation of aromatic compounds in the presence of nitrate. **FEMS Microbiology Letters**, v. 1, n. 2, p.103-107, 1977.
- BASHA, M. K.; RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Recent advances in the biodegradation of phenol: a review. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, v. 1, n. 2, p. 219-234, 2010.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v.74, n. 1, p. 63-67, 2000.
- BOOPATHY, R. Isolation and characterization of a phenol-degrading, sulfate-reducing bacterium from swine manure. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 1, p. 29-33, 1995.
- BOROLE, A. P.; SUBLETTE, K. L.; RATERMAN, K. T.; JAVANMARDIAN, M.; FISHER, J. B. The potential for intrinsic bioremediation of BTEX hydrocarbons in soil/ground water contaminated with gas condensate. *Appl. Biochem. Biotech.*, 63-65:719-730, 1997.
- BRESOLIN, J. D.; BUSTAMANTE, M. M. C.; KRÜGER, R. H.; SILVA, M. R. S. S.; PEREZ, K. S. Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under

soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 391-403, 2010.

BUSTAMANTE, M. M.; NARDOTO, G. B.; PINTO, A. S.; RESENDE, J. C.; TAKAHASHI, F. S.; VIEIRA, L. C. Potential impacts of climate change on biogeochemical functioning of Cerrado ecosystems. **Brazilian Journal Biology**, v. 72, n. 3, p. 655-671, 2012.

CASTRO, A. P.; ARAUJO, S. D., JR.; REIS, A. M.; MOURA, R. L.; FRANCINI-FILHO, R. B.; PAPPAS, G., JR.; RODRIGUES, T. B.; THOMPSON, F. L.; KRUGER, R. H. Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from eastern Brazil. **Microbial Ecology**, v. 59, n. 4, p. 658-667, 2010.

CETESB: COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Manual de gerenciamento de áreas contaminadas. Capítulo X – Investigação para Biorremediação, 2004. 77p.

CHEN, K. F.; KAO, C. M.; CHEN, T. Y.; WENG, C. H.; TSAI, C. T. Intrinsic bioremediation of MTBE-contaminated groundwater at a petroleum-hydrocarbon spill site. *Environ. Geol.*, 50:439-445, 2006.

CHU, H.; FIERER, N.; LAUBER, C. L.; CAPORASO, J. G.; KNIGHT, R.; GROGAN, P. Soil bacterial diversity in the Arctic is not fundamentally different from that found in other biomes. **Environ Microbiol**, v. 12, n. 11, p. 2998–3006, 2010.

CIMA, **1991**. Subsídios técnicos para elaboração do *relatório nacional do Brasil para a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento*. Brasília, Comissão Interministerial para a preparação da preparação a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, 172p.

CONAMA, 2001. Acesso em: 06 de setembro de 2015. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/conama> >.

COSTA, C.S.B. & DAVY, A.J. Coastal saltmarsh communities of Latin America.. In: U. Seeliger (ed.), *Coastal Plant Communities of Latin America*. San Diego, California, Academic Press, Inc, Cap. 12: 179-199, 1992.

EITEN, G. Vegetação do Cerrado. In: Novaes-Pinto, M. (ed.). *Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas*. Brasília: Editora Universidade de Brasília, p. 17-73, 1994.

EMBAR, K.; FORGACS, C.; SIVAN, A. The role of indigenous bacterial and fungal soil populations in the biodegradation of crude oil in a desert soil. *Biodegradation*, 17:369-377, 2006.

FAIRLEY, D. J.; BOYD, D. R.; SHARMA, N. D.; ALLEN, C. C. R.; MORGAN, P. LARKIN, M. J. Aerobic metabolism of 4-hydroxybenzoic acid in Archaea via an usual pathway involving an intramolecular migration shift (NIH shift). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6246-6255, 2002.

GARNIER, P. M.; AURIA, R.; AUGUR, C.; REVAH, S. Metabolic degradation of methyl tert-butyl ether by a soil consortium: effect of components present in gasoline. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 46:79-84, 2000.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P.; **BIORREMEDIAÇÃO**. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* n.34 – janeiro/junho 2005.

HAITAIO, L.; MANCAI, X.; ZUOQING, B. H. Isotherm analysis of phenol adsorption. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 271, p. 47-53, 2004.

HARWOOD, C. S.; BURCHHARDT, G.; HERRMANN, H.; FUCHS, G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds via benzoyl-CoA pathway. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, n. 5, p.439-458, 1999.

HEIDER, J.; FUCHS, G. Microbial anaerobic aromatic metabolism. **Anaerobe**, v. 3, n. 1, p.1-22, 1997.

HEIPIEPER, H. J.; DIEFENBACH, R.; KEWELOH H. Conversion of *cis*-unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the rotection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1847-1852, 1992.

HOFFMANN, J.; VIEDT, H. **Biologische Bodenreinigung: ein Leitfaden für die Praxis**. Berlin: Springer, 1998.

HOINACHI, E.; MOREIRA, M.; VERGÍLIO, K. C. G. Manual Básico de Processamento de Couro, p. 356-364, 1994.

KONING, M. **Optimierung in der biologischen ex situ Bodensanierun**. Stuttgart: Abfall Aktuell, 2002.

LACK, A.; FUCHS. Evidence that phenol phosphorylation to phenyphosphate is the first step in anaerobic phenol metabolism in a denitrifying *Pseudomonas* sp. **Archives of Microbiology**, v. 161, n. 2, p. 132-139, 1994.

LACK, A.; TOMASSI I.; ARESTA M.; FUCHS G. Catalytic Properties of Phenol Carboxylase. In Vitro Study of CO₂: 4-Hydroxybenzoate Isotope Exchange Reaction. *Eur. J. Biochem.* 197:473-479, 1991.

LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 15, p. 5111-5120, 2009.

MACIEL, N.C. **1991**. Alguns aspectos da ecologia do manguezal.. In: CPRH, 1991. *Alternativas de uso e proteção dos manguezais do Nordeste*. Recife, Companhia Pernambucana de Controle da Poluição Ambiental e de Administração dos Recursos Hídricos. Série Publicações Técnicas, Nº 003, 9- 37.

MASTER, E. R.; MOHN, W. W. Psychrotolerant bacteria isolated from arctic soil that degrade polychlorinated biphenyls at low temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4823-4829, 1998.

MATSUMIYA, Y.; WAKITA, D.; KIMURA, A.; SANPA, S.; KUBO, M. Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-containing wastewater treatment. **Journal of Bioscience Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 325-330, 2007.

MITTERMEIER, R. A.; ROBLESIL, P.; HOFFMANN, M.; PILGRIM, J. D.; BROOKS, T. M.; MITTERMEIER, C. G.; LAMOREUX, J. L.; FONSECA, G. Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX, Mexico City, 2004.

MONTEIRO, A. A. M. G. **Degradação biológica de fenol com bactérias imobilizadoras num suporte de poros largos**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Portugal, 1998.

NAIR, C. I.; JAYACHANDRAN, K.; SHASHIDHAR, S. Biodegradation of phenol. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 25, p. 4951-4958, 2008.

NAKAGAWA, L. E.; ANDRÉA, M. M. Efeito de alterações nas características do solo sobre a degradação de hexaclorobenzeno. *Rev. Bras. Ciên. Solo*, 30:575-582, 2006.

NDAZI, B.; TESH, J. V.; KARLSSON, S.; BISANDA, E. T. N. Production of rice husks composites with *Acacia mimosa* tannin-based resin. **Journal of Materials Science**, v. 41, p. 6978-6983, 2006.

NEILSON, A. H.; ALLARD, A. S.; REMBERGER, M. Biodegradations and transformations of recalcitrant compounds. In: HUTZINGER, O. (Ed.). **The Handbook of Environmental Chemistry**. Berlin: Springer, v. 2, part C, p. 29-86, 1985.

NEMERGUT, D. R.; COSTELLO, E. K.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; JIANG, L.; SCHMIDT, S. K.; FIERER, N.; TOWNSEND, A. R.; CLEVELAND, C. C.; STANISH, L.; KNIGHT, R. Global patterns in the biogeography of bacterial taxa. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 135-144, 2011.

NITZ, H.; SEMKE, H.; MÜLHAUPT, R. Influence of lignin type on the mechanical properties of lignin-based compounds. **Macromolecular of Materials Engineering**, v. 286, N. 12, p. 737-743, 2001.

NRC: NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *In Situ Bioremediation: When Does It Work?* Washington, DC, National Academy Press, 1993.

OLIVEIRA, F. B. **Utilização de matéria-prima obtida de fonte renovável na preparação de compósitos de matriz do tipo fenólica**. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo: Instituto de Química de São Carlos, Brasil, 2008.

PASSOS, C. T.; MICHELON, M.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Biodegradation of phenol by free and encapsulated cells of a new *Aspergillus* sp. isolated from a contaminated site in southern Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 40, p. 6716-6720, 2010.

PEREIRA FILHO, O. & ALVES, J.R.P. **1999**. *Conhecendo o manguezal*. Apostila técnica, Grupo Mundo da Lama, RJ. 4ª ed. 10p.

PEREIRA FILHO, O. **2001**. *O homem do caranguejo*. Trabalho final da disciplina de Sociedade e Meio Ambiente. Programa de Pós-Graduação em Ciência Ambiental. UFF. 6p.

PIZZI, A.; OROVAN, E.; CAMERON, F. A. The development of weather-and-proof phenol-resorcinol-furfural colde-setting adhesives. **Holtzals Roh-und Werkstoff**, v. 42, p.467-472, 2004.

REINEKE, W. Aerobic and Anaerobic Biodegradation Potentials of Microorganisms. **The Handbook of Environmental Chemistry**, v. 1, ed. B. Beek, Biodegradation and Persistence, 2001.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: Sano, S. M. e Almeida, S. P. (ed.). *Cerrado: ambiente e flora*. Planaltina-DF: EMBRAPACAPAC, 1998, p.89-166.

ROJAS, M. L. B. **Tratamento de fenol em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) sob condições mesofílicas**. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2001.

ROSATTO S. S.; FREIRE, R. S.; DURAN, N. KUBOTA L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, p. 77-86, 2001.

SARFARAZ, S. THOMAS, S; MISHRA, L. C.; IYENGAR L. Degradation of phenol and compounds by a defined denitrifying bacterial culture. **World Journal Microbiology & Biotechnology**. v. 18, p.57-63, 2002.

SARFARAZ, S.; THOMAS, S.; TEWARI, U. K.; IYENGAR, L. Anoxic treatment of phenolic wastewater in sequencing batch reactor. **Water Research**, v. 38, p. 965 – 971, 2004.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; MELO, I. S. Degradação do fungicida carbendazim por *Phanerochaeta chrysosporium*. **Fitopatologia Brasileira, Brasília**, v. 21, p. 496-498, 1996.

SILVA, F. V. **Aplicação da fotocatalise Heterogênea para Degradação de Benzeno e Fenol em um Reator contínuo do tipo Labirinto**. Tese (Mestrado) – Escola de Engenharia do Rio Grande do Sul, Universidade Federal, 2007.

SOTO, R.; FREER, J.; BAEZA, J. Evidence of chemical reactions between di-and polyglycidyl ether resins and tannis isolated from *Pinus radiata* D. Don bark. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 95-101, 2005.

TIEDJE, J. M.; CHO, J. C.; MURRAY, A.; TREVES, D.; XIA, B.; ZHOU, J. Soil teeming with life: new frontiers for soil science.: CAB International, 2001. 393-412 p. (Sustainable Management of Soil Organic Matter).

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, n. 3, p. 240-245, 2002.

TROQUEST, J.; LARROCHE, C.; DUSSAP, C. G. Evidence for the occurrence of an oxygen limitation during soil bioremediation by solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.*, 13:103-112, 2003.

TSCHIECH, A.; FUCHS, G. Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying *Pseudomonads*. **Archives of Microbiology**, v. 148, p. 213-217, 1987.

TYSON, G. W.; CHAPMAN, J.; HUGENHOLTZ, P.; ALLEN, E. E.; RAM, R. J.; RICHARDSON, P. M.; SOLOVYEV, V. V.; RUBIN, E. M.; ROKHSAR, D. S.; BANFIELD, J. F. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. **Nature**, v. 428, n. 6978, p. 37-43, 2004.

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

VAN SCHIE, P. M.; YOUNG, L. Y. Isolation and characterization of phenol-degrading denitrifying bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 2432-2438, 1998.

VEERESH, G. S., KUMAR, P.; MEHROTRA, I. Treatment of phenol and cresols in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) process: a review. **Water Research**, v. 39, p. 154-170, 2005.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.*, 73:1163-1172, 2001.

ZHANG, T.; KE, S. Z.; LIU, Y.; FANG, H. P. Microbial characteristics of a methanogenic phenol-degrading sludge. **Water Science & Technology**, v. 52, n. 1-2, p. 73 -78, 2005.

– CAPÍTULO II –
DEGRADAÇÃO DE FENOL POR BACTÉRIAS DE DOIS BIOMAS BRASILEIROS
(Manuscrito de artigo científico)

A ser publicado na revista: African Journal of Microbiology Research (Qualis B2 - Ciências Ambientais)

DEGRADAÇÃO DE FENOL POR BACTÉRIAS DE DOIS BIOMAS BRASILEIROS

Almeida, A. P. S.¹; Oliveira, B.F.R.¹; Rodrigues, A.A.¹; Ribeiro, I. D. A. ¹; Barbosa, D. P.³ Soares, R. S. ¹; Vieira, M.M.²; Vieira, J. D. G.^{1*}

¹Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia (LAMAB), Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Rua 235 s/n Setor Universitário, CEP: 74605-050, Goiânia, Goiás, Brasil.

²Laboratório de Microbiologia Marinha (MicroMar), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus Experimental do Litoral Paulista. Praça Infante Dom Henrique s/nº Bairro Parque Bitaru, CEP11330-900, CEP 11380-972, Caixa Postal 73601, São Vicente, São Paulo, Brasil.

³Laboratório de Química, Instituto de Química (IQ), Instituto Federal de Goiás (IFG), Câmpus Goiânia, Rua 75, nº46. Centro, CEP 74055-110, Goiânia, Goiás, Brasil.

* e-mail: jdgvieira62@gmail.com

RESUMO

Nas últimas décadas, a crescente atividade industrial e a agropecuária têm sido as responsáveis pela contaminação do meio ambiente devido à presença de substâncias orgânicas e inorgânicas. O fenol e seus derivados constituem uma importante classe de contaminantes ambientais pela sua presença em muitos efluentes industriais. A busca por alternativas biológicas para combater a poluição ambiental tem motivado pesquisas por micro-organismos que aliem a capacidade de degradar o fenol com enfoque sustentável. Nesta vertente, bactérias degradadoras de xenobióticos, estão sendo utilizadas como inóculo nos diversos tipos de tratamento biológico para a minimização de contaminação de águas, solos e sedimentos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a biodegradação do fenol por isolados bacterianos de dois biomas brasileiros (Cerrado Goiano e Manguezal de Guarapará, ES), no qual, verificou-se a influência da adaptação bacteriana perante as diferentes concentrações de fenol e a tolerância a esse composto químico. Das bactérias de Cerrado uma foi identificada como *Staphylococcus aureus* (BF 2.5) e a outra somente como bastonete gram-positivo (BF 2.3.2) e entre as bactérias de manguezal uma foi identificada como *Bacillus circulans* (MF-2) e a outra *Bacillus* sp. (MF-1) Todos os isolados consumiram fenol na concentração aproximada de 500mg.L⁻¹ quando crescidos em meio de Bushnell-Haas (BH) líquido e em 1.500mg.L⁻¹ quando em meio Ágar Nutriente (AN). Quanto à utilização do fenol como fonte única de carbono observamos que o consumo de fenol pelo isolado BF-2.5 foi de 2,78; 4,79 e 0,35% para as concentrações de 100, 200 e 300mg.L⁻¹ de fenol, respectivamente. Já para o isolado BF-2.3.2 os resultados foram de 11,04; 19,13 e 16,02%, respectivamente. Para os isolados de manguezal os resultados foram 22,43; 11,52 e 3,33% e 21,54; 20,54 e 28,85% para os isolados MF-1 e MF-2, respectivamente nas mesmas concentrações de fenol testadas. Estes isolados sugerem uma maior capacidade de utilização pelo isolados MF-2 de manguezal.

Palavras-chave: biorremediação, xenobióticos, fenol, bactérias degradadoras, cerrado e mangue.

INTRODUÇÃO

Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (LEE et al., 2005). Existem cerca de 8.000 diferentes compostos fenólicos, que de acordo com sua estrutura química são divididos em classes: ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e taninos (BALASUNDRAM, SUNDRAM e SAMMAN, 2006).

O fenol e demais compostos fenólicos são reconhecidos como uma das principais causas de contaminação do solo e águas subterrâneas em áreas industrializadas, estando presente em um terço das áreas contaminadas nos Estados Unidos da América (USEPA, 2009). Resíduos de refinarias de petróleo, indústrias cerâmicas, fábricas de resinas e plásticos, dentre outras, têm sido reportados como fontes potenciais da contaminação. Considerando os efeitos toxicológicos do fenol, sua concentração na água subterrânea é limitada em $0,14\text{mg.L}^{-1}$ e 5, 10 e 15mg.kg^{-1} em solos de áreas agrícolas, residenciais e industriais, respectivamente (CETESB, 2005).

Os fenóis são responsáveis por graves problemas ambientais e consequentemente a saúde humana tendo sido relatado casos de morte por ingestão de concentrações variando de 1,5 a 33g (Prpich; Daugulis, 2005). Essas substâncias são venenosas e perigosas em pequenas concentrações. Quando presentes em águas industriais dificultam o processo de tratamento biológico provocando sua contaminação. Assim, é necessária sua redução a níveis satisfatórios a fim de tornar estas águas menos impactante ao meio ambiente (Silva, 2007; Awan et al., 2013). Sua toxicidade pode ser prejudicial aos micro-organismos, podendo causar a morte celular (Heipieper et al., 1992), pois possui habilidade de romper a membrana lipídica, sendo esta uma barreira responsável pela integridade osmótica da célula microbiana (Van Schie & Young, 2000).

A velocidade de degradação de um poluente químico está diretamente relacionada à pré-exposição do contaminante, à indução de enzimas específicas dos micro-organismos presentes, ao aumento da população degradadora ou, a mudança da população microbiana (Racke, 1990; Hofrichter et al., 1993). Este processo tem sido chamado de adaptação, o qual pode ser resultado de mudanças genéticas, fisiológicas ou ecológicas da comunidade de micro-organismos. A adaptação microbiana a pesticidas, por exemplo, é bastante estudada e evidenciada em solos que receberam repetidas aplicações dessas substâncias, tendo sido comprovada para diferentes poluentes industriais (Racke, 1990; Hofrichter et al., 1993).

Os micro-organismos degradadores de fenóis estão distribuídos em diferentes tipos fisiológicos; tais como: aeróbios, anaeróbios (fermentativos, metanogênicos, redutores de sulfato), quimiolitotróficos, e organismos fotossintéticos. Os resíduos de fenol podem ser degradados por um simples micro-organismo ou por conjunto dos mesmos. A biodegradação de um complexo de moléculas normalmente envolve o efeito interativo das comunidades mistas e conta com a versatilidade metabólica das bactérias denominadas hidrocarbonoclássicas que fazem parte da microbiota presente no solo, água e sedimento. Quando esses ambientes são contaminados, ocorre a adaptação de certas populações microbianas, que passam a reconhecer os componentes de fenol como fonte de carbono (Alexander, 1999; Master & Mohn, 1998).

O presente estudo tem como principal objetivo o isolamento de bactérias de dois biomas brasileiros com capacidade de degradação fenólica, determinação de sua tolerância a diferentes concentrações de fenol, afim de sua aplicação para biorremediação de ambientes contaminados por esse poluente.

METODOLOGIA

Isolamento dos micro-organismos

Para o isolamento de bactérias do bioma Cerrado goiano cinco amostras, de pontos diferentes, contendo 250g de solo de um determinado de um único posto de combustível foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos estéreis e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (LAMAB/IPTSP/UFG).

Dez gramas de cada uma das amostras foram homogeneizadas e, posteriormente sub-amostras de 10g foram tomadas e inoculadas em frascos tipo Erlemneyer de 250mL, contendo 90mL de meio líquido de Busnell-Haas (BH) constituído de (g.L⁻¹): KH₂PO₄, 1,0 g; K₂HPO₄, 1,0g; NH₄NO₃, 1,0g; MgSO₄, 0,2g; CaCl₂, 0,2g; FeCl₃, 0,05g e suplementado com fenol na concentração final de 300mg.L⁻¹. Os frascos foram incubados sob agitação em “shaker” a 30°C e 130rpm. A cada 72h de incubação uma amostra de 10mL do crescimento era coletada e inoculada em novo frasco do tipo Erlemneyer de 250mL, contendo 90mL de meio líquido BH acrescido de 300mg.L⁻¹ de fenol. Este procedimento foi repetido por cinco vezes. Após o quinto repique alíquotas foram diluídas, até 10⁻¹⁰, em tampão fosfato e

inoculadas em meio BH solidificado contendo $1,0\text{g.L}^{-1}$ de glucose. As placas foram incubadas a 30°C por 24/48h.

As colônias crescidas foram isoladas segundo sua morfologia, purificadas com cinco repiques sucessivos. Após a purificação, os isolados foram crescidos em caldo Brain Heart Infusion BD[®] (BHI) constituído de: Cérebro-coração, infusão de sólidos, Hidrolisado péptico de tecido animal, Hidrolisado pancreático de caseína, Cloreto de sódio, Glucose, Fosfato dissódico de hidrogênio e Ágar à 30°C por 24 horas e, em seguida preservadas em glicerol a 15% em freezer a -20°C .

Para o isolamento de bactérias de manguezal, quatro amostras de 250g de sedimento de manguezal foram coletadas em janeiro de 2013, na cidade de Guarapari ($20^{\circ}39'56.5''\text{S}$, $40^{\circ}30'02.3''\text{W}$, erro de 10 metros), ES. As amostras foram mantidas em sacos plásticos estéreis e enviadas ao (LAMAB/IPTSP/UFG). Os procedimentos de isolamento e demais experimentos para as bactérias de manguezal foram os mesmos das amostras de Cerrado, exceto pela adição ao meio de cultura de 1,8% de sal marinho em meio BHI.

Determinação da tolerância e da capacidade de utilização do fenol sobre os isolados

A tolerância ao fenol tanto para as bactérias isoladas do Cerrado quanto de manguezal, foi determinada cultivando-se os micro-organismos isolados em meio BHI, contendo concentrações crescentes de fenol variando de 0 a 1.600mg.L^{-1} (m/v). Os micro-organismos foram previamente cultivados em caldo BHI por 48h a 30°C . Após este tempo alíquotas de $100\mu\text{L}$ de cada um dos isolados foram transferidos para poços de um inoculador de Steers (Steers, Foltz, Graves 1959). Com o auxílio deste inoculador, o material foi inoculado sobre as placas contendo as diferentes concentrações de fenol e as mesmas foram incubadas a 30°C por 24/48h e verificado a determinação do crescimento.

A capacidade de utilização do fenol foi determinada de modo semelhante à capacidade de tolerância, entretanto, neste caso o meio BHI foi substituído por ágar BH, com as mesmas concentrações crescentes de fenol. Na concentração de 0mg.L^{-1} de fenol foi adicionado glucose a 1,0%. As placas de Petri foram incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente e o crescimento determinado.

Consumo do fenol e crescimento dos micro-organismos em cultivo estacionário

O consumo do fenol foi determinado cultivando-se inicialmente anaerobicamente os isolados em caldo BH contendo 1,0% de glucose por 48h afim das células ficarem em condição de *starvation*. Após o crescimento, um inóculo correspondente a 10% do volume total do meio BH de 50mL contidos em erlenmeyers de 250mL. As concentrações verificadas foram de 100mg.L⁻¹, 200mg.L⁻¹ e 300mg.L⁻¹ de fenol, respectivamente. Os erlenmeyers foram incubados a 30°C e alíquotas de 5mL do volume total foram retiradas no tempo zero e com 96h de incubação a 30°C. Essas amostras foram utilizadas para a determinação do crescimento microbiano e para a determinação do consumo do fenol. O crescimento foi determinado pela absorbância em espectrofotômetro da marca BIO-RAD/Smart Spec PLUS a 600nm.

Para a determinação da concentração inicial e final do fenol a amostras foram centrifugadas a 4.000rpm/15min/4°C. O sobrenadante foi separado e a concentração de fenol determinada por cromatografia líquida de alta performance da marca YL9100 HPLC – SYSTEM. A análise por HPLC foi realizada com phenonmenex coluna C-8 com metanol e água 70:30 (v/v) como fase móvel, e o fluxo de 1,0mL.min⁻¹. Os compostos de biotransformação formados por fenol foram monitorados pela YOUNLIN INSTRUMENTO MODELO NO-acme 9000. O fenol foi analisado em um detector de UV-VIS no comprimento de onda de 264nm.

Identificação dos isolados bacterianos

Caracterização morfológica dos isolados bacterianos

As bactérias isoladas foram inicialmente caracterizadas pelo aspecto das colônias e a morfologia celular pela coloração de Gram e pela reação de Ryu (1938; 1940).

A reação de Ryu consiste em inocular uma colônia previamente crescida por 12-24h sobre uma lâmina de vidro contendo uma gota de uma solução de KOH a 3M. Os resultados foram interpretados como sendo gram-positivos quando não há o desenvolvimento de viscosidade no material, e gram-negativos quando ocorre a formação de viscosidade. Este fato é devido a lise celular pelo hidróxido de potássio (KOH) nas bactérias gram-negativas.

Caracterização molecular dos isolados bacterianos

A caracterização molecular das amostras bacterianas em estudo foram realizadas pela amplificação e sequenciamento da região do 16S rRNA.

Extração do DNA genômico

A extração de DNA seguiu a metodologia proposta por Van Soolingen et al. (1994) com modificações. Inicialmente os micro-organismos foram cultivados em caldo Luria Bertani (LB) constituído de (g.L⁻¹): caseína enzimática hidrolisada - 10,0g; extrato de levedura I – 5,0g extrato de levedura II – 10,0g por 16h, e então 1,5mL da cultura bacteriana foram transferidas para um tubo do tipo eppendorf. O material foi centrifugado por 5min. à 6000g a 10°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 400µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 7,4). Acrescentou-se 40µL de lisozima e incubou-se em banho-maria por 30min. à 37°C. Em seguida, acresceu-se ao sistema 70µL de SDS a 10% e 6µL de proteinase K a 10mg.mL⁻¹ e o incubou a 56°C por 10 minutos.

Após incubação, adicionou-se 100µL de NaCl a 5M seguidos de 80µL de solução CTAB/NaCl (10% CTAB; 0,73M de NaCl), a solução foi agitada em vórtex até se tornar leitosa e incubada por 10 minutos à 65°C. Transferiu-se 600µL de solução clorofórmio/álcool isoamílico (24:1, v/v) e homogeneizou-se por 30 segundos (por inversão). Na sequência fez-se a centrifugação por 15 minutos à 12.000g. Posteriormente, transferiu-se o sobrenadante (500µL) para outro micro tubo. Então, precipitou-se o material utilizando 0,6 volumes de isopropanol e o incubou a -20°C overnight. Feito isso, centrifugou-se o material à 4°C por 20 minutos em uma rotação de 12.000g e a amostra foi lavada com 1,0mL de etanol 70% gelado e centrifugou-se à 4°C por 5 minutos em rotação de 12.000g. O DNA foi seco à temperatura ambiente e ressuspensão em 40µL de água ultra pura. A análise da qualidade do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

As amostras foram submetidas à corrida eletroforética em gel de agarose a 1% (m/v) em tampão TBE (Tris-Ácido Bórico) por 80 minutos à 100V. A confirmação da extração do material genético foi efetuada pela exposição do gel em transiluminador - UV (HOEFER®) após a eletroforese. O material foi então estocado em freezer a -20°C.

Amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia de polimerase (PCR)

Na sequência, a região de codificação do DNA para o gene 16S rRNA foi amplificado pela reação em PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores 27F (5'-

AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1541r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991). Para tal utilizou-se um termociclador *Mastercycler® Gradient* (Eppendorf).

Utilizou-se um volume final de 50µL, contendo 35,5µL de água, 5µL de tampão 10X para a enzima Taq polimerase (INVITROGEN®), 1,5µL de cloreto de magnésio (MgCl₂ - 50mM) (INVITROGEN®), 1µL de cada oligonucleotídeo iniciador com uma solução inicial de 10M, 4µL de solução de dNTP (2,5mM) (INVITROGEN®), 1µL de Taq polimerase (5U) (INVITROGEN®) e 1µL de DNA extraído. Os parâmetros da reação de PCR foram: 3 minutos de desnaturação inicial a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturação com a 94°C durante 1minuto, anelamento a 55°C durante 30s, extensão a 72°C durante 30s e extensão final a 72°C durante 10 minutos. (Garcia, 2006). Uma alíquota de 5µL do produto de PCR foi analisado em gel de agarose a 1%, utilizando-se o padrão de peso molecular (INVITROGEN®).

Purificação do produto da PCR e sequenciamento

Para a purificação completou-se o volume do produto de PCR para 100µL com água ultra-pura autoclavada. Na sequência, o material genético foi transferido para um micro tubo de capacidade volumétrica de 1mL e adicionou-se dois volumes de isopropanol a 65% (200µL - MERCK®), e centrifugando-se a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado por inversão. Em seguida, adicionou-se dois volumes de etanol a 70% (200µL) e novamente a amostra foi centrifugada à 13000 rpm por 15 min à 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e o precipitado foi seco sobre o papel de filtro. Feito isso, ressuspendeu-se o material seco em 200µL de água MiliQ e observou-se a qualidade do produto de PCR em gel de agarose 1,2% (m/v).

O sequenciamento foi realizado no laboratório de Biotecnologia da pós-graduação em Ciências Genéticas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília (Brasília, Distrito Federal, Brasil).

Após a comparação e correção das sequências procedeu-se à obtenção da sequência Consenso, isto é, aquela resultante da sobreposição das sequências das fitas *Forward* e *Reverse* corrigidas. Para a obtenção da sequência Consenso do gene do 16S rRNA foi utilizado o software *Codon Code Aligner*, e comparadas com as sequências depositadas no banco de dados do NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

RESULTADOS

As quatro morfo-espécies isoladas e identificadas como BF 2.3.2; BF 2.5; MF-1 e MF-2 foram caracterizadas pela coloração de Gram e reação de Ryu conforme consta nos resultados na Tabela 1 e Figura 1.

Tabela 1. Caracterização morfológica e origem das bactérias isoladas.

Isolados bacterianos	Origem	Morfologia	Coloração de Gram	Reação de Ryu
BF 2.3.2	Cerrado	Bacilo	+	+
BF 2.5	Cerrado	Coco	+	+
MF-1	Manguezal	Bacilo	+	+
MF-2	Manguezal	Bacilo	+	+

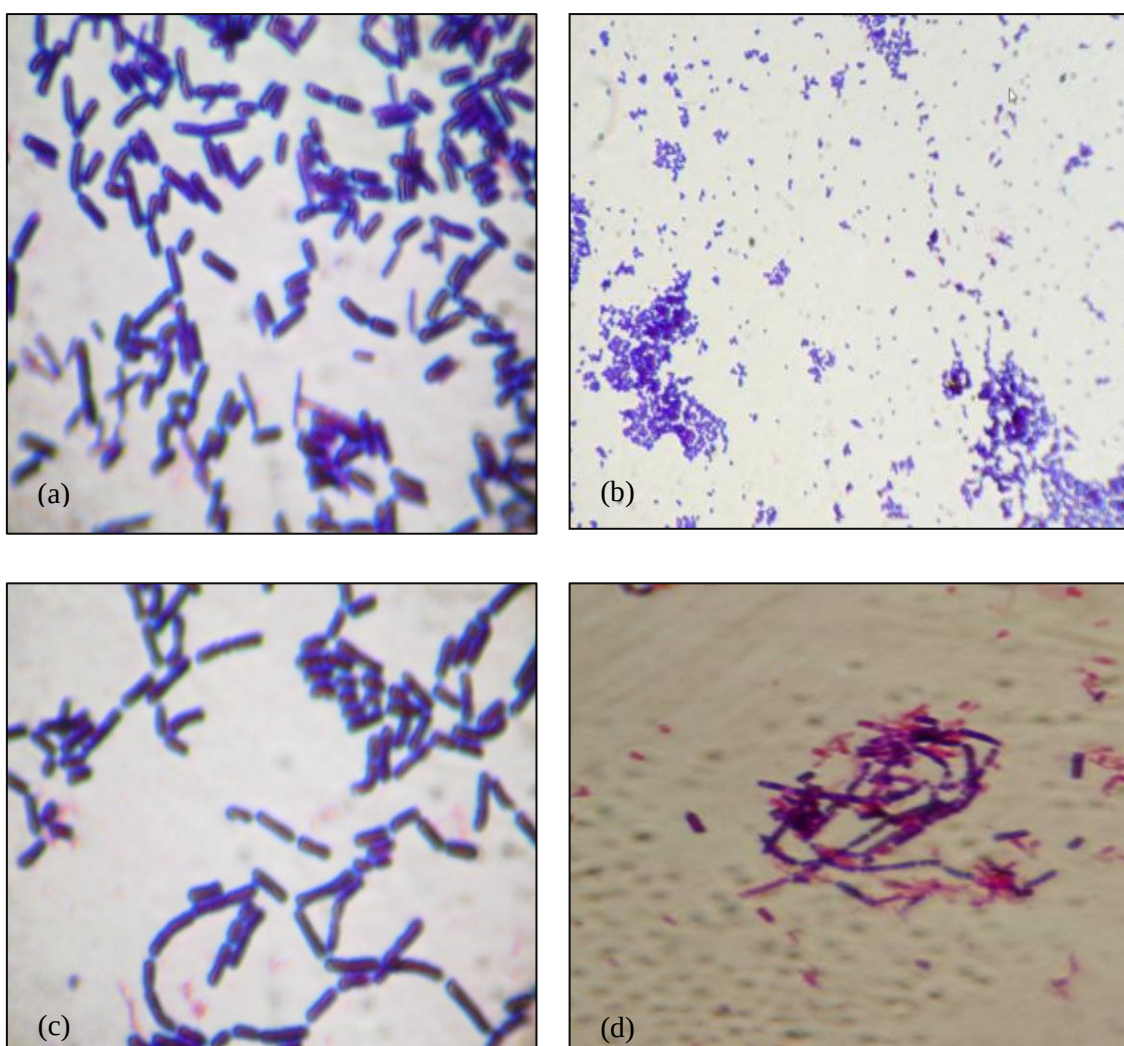


Figura 1. Microfotografia dos isolados de Cerrado e Mangue corados pela metodologia de Gram. a) BF 2.3.2, b) BF 2.5., c) MF-1 e d) MF-2. Aumento de 1.000X.

Na Tabela 2 observamos a identificação molecular dos isolados. O isolado BF 2.5 foi identificado como *Staphylococcus aureus* com 100% de similaridade. Para o isolado BF 2.3.2 não foi possível a identificação devido à baixa qualidade das sequências amplificadas. Os isolados de manguezal foram identificados como *Bacillus* sp. MF-1 e MF-2 como *Bacillus circulans* com 84 e 99% de similaridade, respectivamente.

Tabela 2. Identificação dos isolados com base na comparação da sequência de 16S rDNA obtida com outras depositadas no banco de dados do *GenBank* (análise BLASTn).

Isolados	Resultado BLASTn	Identidade (%)	Número de acesso
BF 2.3.2	NI	-	-
BF 2.5	<i>S. aureus</i>	100	HK3KJ1B3016
MF-1	<i>Bacillus</i> sp.	84	YEKJZMAX015
MF-2	<i>Bacillus circulans</i>	99	YEKTEDYU014

NI: não identificado.

Na Tabela 3 e Figuras 2 e 3 observamos o crescimento dos diferentes isolados nos diferentes meios de cultivo suplementados com diferentes concentrações de fenol.

Tabela 3. Tolerância e utilização dos isolados nos diferentes meios de cultura e nas diferentes concentrações de fenol.

Concentração de fenol (mg.L ⁻¹)	Isolados bacterianos							
	BF 2.3..2		BF 2.5		MF – 1		MF – 2	
	AN	BH	AN	BH	AN*	BH*	AN*	BH*
0	+	+	+	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+	+	+	+
200	+	+	+	+	+	+	+	+
300	+	+	+	+	+	+	+	+
400	+	+	+	+	+	+	+	+
500	+	+	+	+	+	+	+	+
600	+	-	+	-	+	+	+	+
700	+	-	+	-	+	-	+	-
800	+	-	+	-	+	-	+	-
900	+	-	+	-	+	-	+	-
1000	+	-	+	-	+	-	+	-
1100	+	-	+	-	+	-	+	-
1200	+	-	+	-	+	-	+	-
1300	+	-	+	-	+	-	+	-
1400	+	-	+	-	+	-	+	-
1500	+	-	+	-	+	-	+	-
1600	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: * meio de cultura acrescido 1,8% (m/v) de NaCl (m/v).

O consumo nas três concentrações diferentes de fenol 100, 200 e 300mg.L⁻¹ (m/v) estudadas e o crescimento com 96 horas a 30°C podem ser observados nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

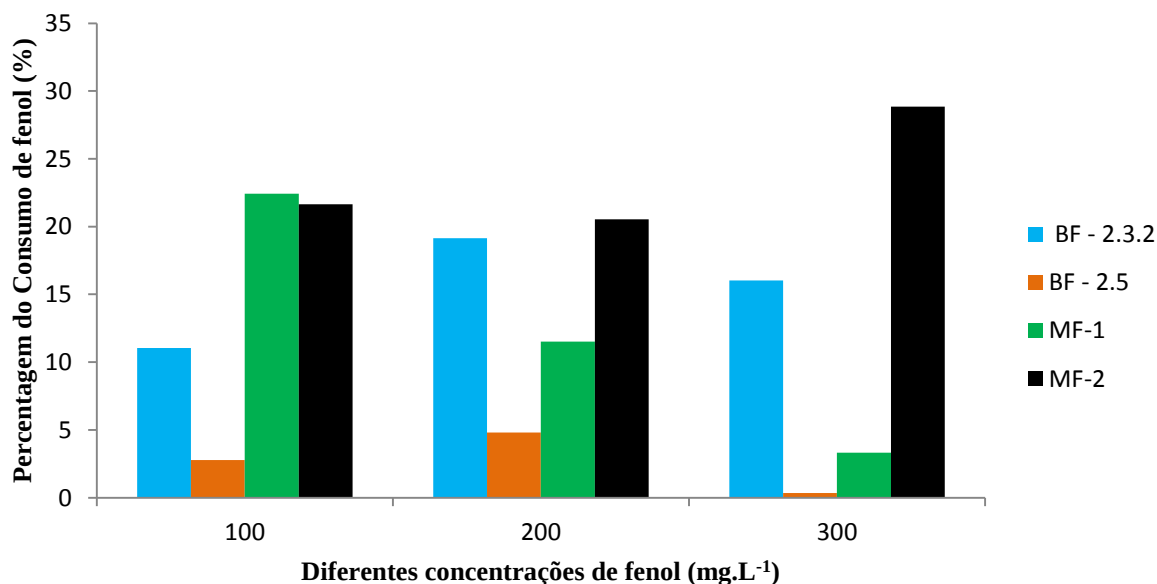


Figura 2. Percentual do consumo de fenol pelas morfo-espécies BF-2.3.2; BF-2.5; MF-1 e MF-2 em relação aos cinco dias de incubação.

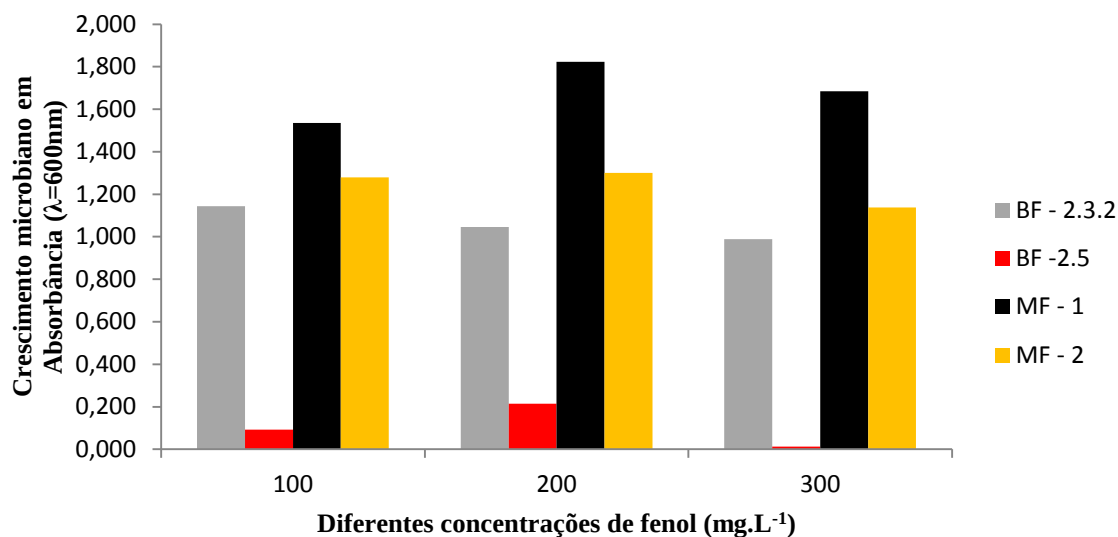


Figura 3. Crescimento bacteriano das morfo-espécies BF-2.3.2; BF-2.5; MF-1 e MF-2 em relação aos cinco dias de incubação.

DISCUSSÃO

No presente estudo foram obtidos quatro isolados de amostras de solo de Cerrado e sedimento de manguezal três bactérias do gênero *Bacillus* e uma do gênero *Staphylococcus* (Tabela 2 e Figura 1). Observa-se que estes isolados podem crescer em fenol como fonte única de carbono.

Estudos de degradação do fenol e de outros compostos xenobióticos concentram-se na utilização da bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (Nair et al., 2008) entretanto, vários outros micro-organismos são frequentemente relatados como degradadores de fenol. Entre eles podemos destacar as bactérias *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *Arthobacter* sp., *Cyanobacterium synechococcus*, *Klebsiella oxytoca*, *Streptomyces* sp., *Burkholderia cepacia* e *Bacillus* sp.. Em ambientes halofílicos observa-se o isolamento de *Halomonas organivorans*, *Arhodomonas aquaeolei* e *Modicisalibacter tunisiensis* (Bonfá et al., 2013). Os fungos filamentosos *Fusarium* sp., *Graphium* sp., *Aspergillus awamori*, além das leveduras, *Candida tropicalis*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodotorula creatinivora*, *Sphingomonas chlorophenolica*, *Trichosporon* sp. (Basha et al., 2010, Nair et al., 2008) também são isolados de diferentes habitats. Sendo a alga *Ochromonas danica* (Semple & Cain, 1996) representante de organismos eucariotas.

Bactérias do gênero *Staphylococcus* e *Micrococcus* já foram descritas como degradadoras de naftaleno (Roy et al., 2002). Páliz (2012) estudando a otimização da biorremediação de águas da indústria de cortiça em Sevilha, Espanha, relatou o isolamento de *Staphylococcus saprophyticus* além de *Acinetobacter*, duas espécies de *Mycobacterium* e um *Bacillus*. Naresh e colaboradores (2012) isolaram *Staphylococcus aureus* de um solo indiano contaminado com fenol com capacidade de degradação 1,0 gramo do mesmo.

Em um estudo de isolamento de bactérias degradadoras de fenol presentes em solos contaminados com óleo de uma região industrial indiana, Mohite e colaboradores (2010) detectaram um isolado de *Streptococcus epidermis* com capacidade de degradar fenol. Entretanto, é possível que na verdade o autor tenha isolado um *Staphylococcus epidermidis* ou outro *Streptococcus*, pois não encontramos na literatura nenhuma citação da existência desta espécie. Estes resultados sugerem que é comum o isolamento de bactérias do gênero *Staphylococcus* em ambientes contaminados.

Na determinação da tolerância ao fenol, tabela 3 observou-se, para todos os isolados, a capacidade em crescer na concentração de até 1.500mg.L⁻¹. Na avaliação da

tolerância e utilização do fenol, observou-se que os dois isolados de Cerrado utilizaram o fenol como fonte única de carbono até a concentração de 500mg.L^{-1} , enquanto que os isolados de manguezal até a concentração de 600mg.L^{-1} (Tabela 3). Passos e colaboradores (2009) e Monteiro (1998) ao estudarem fungos e bactérias adquiridos de diferentes coleções de culturas, quanto à suas potencialidades de utilização em processos de degradação de fenol, sugerem como etapa inicial os estudos em meio de cultura completo e mínimo. Estes estudos visam uma seleção primária dos mais capacitados para esta finalidade quanto a sua tolerância e capacidade de crescimento.

Barros e colaboradores (2013) observaram que a utilização de um lodo de uma refinaria de petróleo não adaptado às condições de remediação de fenol na própria refinaria apresentou um baixo rendimento. Os ensaios de inibição pelo fenol nos micro-organismos presentes neste lodo chegaram a 50% com uma concentração de fenol de 60mg.L^{-1} . Este fato sugere o isolamento de micro-organismos mais resistentes e eficientes para concentrações elevadas de fenol. A empresa dinamarquesa NOVOZYMES (2015) oferece o produto BioRemove 2500[®] o qual é constituído, segundo a mesma, de micro-organismos selecionados segundo sua habilidade de degradar fenol e também resistir a altas concentrações do mesmo. Assim, a etapa de caracterização da capacidade de resistir e crescer em altas concentrações de fenol sugere que os isolados de sedimento de manguezal sejam mais adaptados a maiores concentrações de fenol.

O maior crescimento pelos isolados de sedimento de manguezal pode ser observado em comparação com isolados de solo de cerrado (Figura 5). Nas condições de crescimento em meio líquido BH com 100, 200 e 300mg.L^{-1} de fenol observamos que os isolados de solo de Cerrado, quando comparados entre si, têm uma redução de crescimento a 200mg.L^{-1} de fenol, em relação à concentração de 100mg.L^{-1} . O crescimento tem um ligeiro aumento a 300mg.L^{-1} , entretanto, este é sempre menor que quando comparados à concentração inicial.

Os isolados de sedimento de manguezal demonstraram um maior crescimento quando comparado com as de solo de Cerrado (Figura 5). O isolado MF-1 apresentou um maior crescimento na concentração de 200mg.L^{-1} e um decréscimo a 300mg.L^{-1} , entretanto este ainda era maior que a 100mg.L^{-1} para este isolado.

Kafilzadeh e colaboradores (2010) comparando o crescimento de *Enterobacter* e *Shigella* isoladas de um lago do Irã observaram que as mesmas tinham um crescimento

máximo a 200mg.L^{-1} e $200/300\text{mg.L}^{-1}$ para *Shigella* e após esta concentração ocorria um decréscimo do mesmo.

Quanto ao consumo do fenol depois de decorrido 96h de crescimento (Figura 4) podemos observar que para o isolado BF-2.5 foi de 2,78, 4,79 e 0,35% para as concentrações de 100, 200 e 300mg.L^{-1} de fenol, respectivamente. Já para o isolado BF-2.3.2 os resultados foram de 11,04, 19,13 e 16,02%, respectivamente. Para os isolados de manguezal os resultados foram 22,43, 11,52 e 3,33% e 21,54, 20,54 e 28,85% para os isolados MF-1 e MF-2, respectivamente nas mesmas concentrações de fenol testadas.

Observamos pelos dados obtidos que os isolados de mangue consomem mais o fenol como fonte única de carbono com uma maior vantagem pelo isolado MF-2. Este isolado utilizou 28, 85% do fenol na concentração de 300mg.L^{-1} após 96h.

Existem estudos avaliando-se diferentes micro-organismos e condições de degradação de fenol tais como lodo ativado, pH, aerobiose e anaerobiose, *Aspergillus niger*, *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Candida* sp., etc (Awan et al., 2013, Duan, 2011, Koutny et al., 2003, Lakshmi & Sridevi, 2009, Passos et al, 2009, Pinheiro et al, 2010; Rodrigues et. al, 2007, Tambekar et al., 2012). Nestes estudos observou-se o efeito de diferentes concentrações glucose, de fenol, regimes ou não de aeração, tempos de incubação, além da temperatura e pH ideais para a degradação do fenol. Em geral, nos são relatados resultados de 6% até 100% de remoção de fenol com tempos de 6 - 17 dias, porém em todos os experimentos havia glucose além do fenol como fonte de carbono. Nestes estudos a influência da glucose era sempre positiva quanto à redução do tempo quanto o aumento da concentração de fenol presente no meio. Quando comparados aos nossos resultados observamos que eles se encontram dentro dos valores descritos na literatura, entretanto, estes resultados podem ser melhorados, por exemplo, testado concentrações de glucose no meio uma vez que a mesma não estava presente.

CONCLUSÕES

Observamos que as bactérias presentes em sedimentos de manguezais aqui isoladas foram melhores tanto na capacidade de consumo do fenol quanto na tolerância ao mesmo. Estudos posteriores de utilização com essas bactérias são sugeridos para o desenvolvimento de processo laboratorial em biorremediação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais (PPGCIAMB) da Universidade Federal de Goiás (UFG) pela oportunidade de realização do Mestrado e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pela concessão da bolsa de estudos a Almeida-Rotta, APS que permitiu a realização do mesmo.

REFERÊNCIAS

- Alexander, M. Bioremediation Technologies: *In Situ* and Solid Phase *In: Biodegradation and Bioremediation*. 2nd Ed.; Academic Press: San Diego, USA; pp. 325-353, ch.16 1999. 453p.
- Awan ZUR, Shah AH, Amjad M (2013). Microbial degradation of phenol by locally isolated soil bacteria. *GARJM* 2: 72-79.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, v. 99, p. 191-203.
- Barros-Júnior LM, Barros LPRC, Macedo GR, Netto WS (2013). Phenol Removal of Wastewater from oil Refinery. *Revista Eletronica de Petroleo e Gas*. Ano I, n. 2, 15-22.
- Basha MK, Rajendran A, Thangavelu V (2010). Recent advances in the biodegradation of phenol: a review. *Asian J Exp Biol Sci* 1: 219-234.
- Bonfá MRL, Grossman MJ, Mellado FPE, Durrant LR (2013). Phenol degradation by halophilic bacteria isolated from hypersaline environments. *Biodegrad*. 24: 699-709.
- Carvalho W, Canilha L, Ferraz A, Milagres AMF (2009). Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. *Quim. Nova* 32: 2191-2195.
- CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. DECISÃO DE DIRETORIA Nº 195-2005-E, de 23 de novembro de 2005. Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo, 2005, em substituição aos Valores Orientadores de 2001, e dá outras providências. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf.
- Duan Z (2011). Microbial degradation of phenol by activated sludge in a batch reactor. *EPE* 37: 53-63.
- Garcia, CE (2006). Isolamento e identificação de actinobactérias em solos de terra preta antropogênica (TPA) da Amazônia Central por ARDRA e seqüenciamento do gene 16S rRNA. Campinas, SP: [s.n.].
- Heipieper HJ, Diefenbach R, Keweloh H (1992). Conversion of *cis*-unsaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 from substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbial*. 58: 1847-1852.
- Hill GA, Robinson CW (1975). Substrate inhibition kinetics: phenol degradation by *Pseudomonas putida*. *Biotechnol. Bioeng*. 17: 1599-1615.
- Hofrichter M, Gunther T, Fritsche W (1993). Metabolism of phenol, choro- and nitrophenols by the *Penicillium* strain Bi 712 isolated from a contaminated soil. *Biodegrad*. 3: 415-421.
- Kafilzadeh F, Farhangdoost MS, Tahery Y (2010). Isolation and identification of phenol degrading bacteria from Lake Parishan and their growth kinetic assay. *Afr. J. Biotech*. 9: 6721-6726.

Kirk T, Semple and Ronald B, Cain. Biodegradation of Phenols by the Alga *Ochromonas danica*. *Applied and Environmental Microbiology*, Apr. 1996, p. 1265–1273 Vol. 62, Nº. 4.

Koutny M, Ruzicka J, Chlachula J. (2003). Screening for phenol-degrading bacteria in the pristine soils of south Siberia. *Appl. Soil Ecol.* 23: 79-83.

Lakshmi MVVC, Sridevi V. (2009). Effect of pH and inoculum size on phenol degradation by *Pseudomonas aeruginosa* (NCIM 2074). *Int. J. Chem. Sci.* 7: 2246-2252.

Lee SJ, Umano K, Shibamoto T, Lee KG (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum*) and thyme leaves (*Thymes vulgaris L.*) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, v. 91, n. 1, p. 131-137.

Master ER, Mohn WW (1998). Psychrotolerant bacteria isolated from arctic soil that degrade polychlorinated biphenyls at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4823-4829.

Mohite R; Bhavna V; Jalgaonwala SP; Morankar A (2010). Isolation and characterization of phenol degrading bacteria from oil contaminated soil. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 7, n. 9, p. 61-65.

Monteiro AAMG (1998). Degradação biológica de fenol com bactérias imobilizadoras num suporte de poros largos. PhD, UFG.

Nair CI, Jayachandran K, Shashidhar S (2008). Biodegradation of phenol. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 4951-4958.

Naresh B, Honey P, Vaishali S. (2012). Biodegradation of phenol by a bacterial strain isolated from a phenol-contaminated site in India. *Res J Environ Sci* 1: 46-49.

NOVOZYMES. Acesso em: 01 de março de 2015. Disponível em: < <http://www.novozymes.com/en/solutions/wastewater-solutions/applications/Biological-phenol-degradation-wastewater-treatment/Pages/default.aspx>. >.

Páliz KP (2012). Optimización de la auto-biorremediación de aguas residuales procedentes de la industria del corcho. Máster en Genética Molecular y Biotecnología. Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. 34p.

Passos CT, Burkert JFM, Kalil SJ, Burkert CAV (2009). Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. *Quim. Nova* 32: 950-954.

Pinheiro ZB, Rodrigues K, Pessoa-Wanderley CR, Araújo RS, Marinho G (2010). Biological removal of phenol by use of continuous reactor with *Aspergillus niger* inoculum. *Eng Sanit Ambient.* 15: 47-52.

Prpich GP, Daugulis AJ (2005). Enhanced biodegradation of phenol by a microbial consortium in a solid-liquid two-phase partitioning bioreactor. *Biodegrad.* 16: 329-339.

Racke DK (1990). Implications of enhanced biodegradation for the use and study of pesticides in the soil environment. In: RACKE, D. K. & COATS, J. R., eds. Enhanced

biodegradation of pesticides in the environment. Washington, DC, ACS. p. 269-282. (ACS Symposium Series, 426).

Rodrigues KA, Sampaio GMMS, Zaiat M, Santaella ST (2007). The influence of glucose on the phenol consumption by *Aspergillus niger* AN 400 in batch reactors. Eng Sanit Ambient. 12: 222-228.

Roy S, Hens D, Biswas D, Kumar R (2002). Survey of petroleum degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. World J. Microbiol. Biotechnol. 18: 575-581.

Ryu E (1938). On the Gram-differentiation of bacteria by the simplest method. J. Jpn. Soc. Vet. Sci. 17, p.31

Ryu E (1940). A simple method of differentiation between gram-positive and gram-negative organisms without staining. Kitasato Arch. Exp. Med. 17: 58-63.

Semple KT, Cain RB (1996). Biodegradation of phenols by the alga *Ochromonas danica*. Applied and Environmental Microbiology, vol 62, n. 4, pp. 1265-1273.

Silva FV (2007). Aplicação da fotocatalise Heterogênea para Degradação de Benzeno e Fenol em um Reator contínuo do tipo Labirinto. M.Sc., UFRGS.

Steers E, Foltz EL, Graves BS (1959). An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiot Chemother. 9:307-11.

Tambekar, DH, Bhorse PS, Gadakh, PV (2012). Biodegradation of phenol by native microorganisms isolated from Lonar lake in Maharashtra state (India). IJLPR 2: 26-30.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. National Priorities List (NPL) Web Site (2015). Disponível em: <http://www.epa.gov/superfund/sites/npl/index.htm>.

Van Schie PM, Young LY (2000). Biodegradation of phenol: mechanisms and applications. Bioremediation Journal 4: 1-18.

Van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD (1994). DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. Methods Enzymol 235: 196-205.

CONCLUSÕES GERAIS

- O isolamento e caracterização mostraram-se efetivos na obtenção de bactérias degradadoras do fenol;
- Os isolados demonstraram tolerância e consumiram fenol nas concentrações de até 1.500mg.L^{-1} para os biomas estudados e consumiram o fenol nas respectivas concentrações de 500mg.L^{-1} para os isolados de cerrado e na concentração de 600mg.L^{-1} para os isolados de manguezal;
- Os isolados tanto de manguezal como de cerrado foram caracterizados como sendo 3 bastonetes gram-positivos, 2 do gênero *Bacillus* e 1 ainda não identificado e 1 coco gram-positivo do gênero *Staphylococcus*;
- As quatro morfo-espécies exibiram capacidade de degradar fenol como fonte única de carbono, sendo o isolado MF-2 o que obteve melhores percentuais de degradação nos parâmetros testados.

APÊNDICES

A. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MEIOS DE CULTURA E REAGENTES

1. Ágar Nutriente (Composição g.L⁻¹)

Peptona de carne	5,0
Extrato de levedura	1,5
Extrato de carne bovina	1,5
NaCl	5,0
Ágar	5,0

pH final: 7,4± 0,2

2. Ágar BHI (Brain Heart Infusion BD[®]) – Fórmula grama por Litro de água purificada

Cérebro-coração, infusão de (sólidos)	8,0
Hidrolisado péptico de tecido animal	5,0
Hidrolisado pancreático de caseína	16,0
Cloreto de sódio	5,0
Glucose	2,0
Fosfato dissódico de hidrogênio	2,5
Ágar	13,5

pH final: 7,4± 0,2

3. Meio mínimo de Bushnell-Haas (Difco™) – Composição em g.L⁻¹

KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄	1,0
NH ₄ NO ₃	1,0
MgSO ₄	0,2
CaCl ₂	0,2
FeCl ₃	0,05

pH final: 7,0 ± 0,2

4. Caldo Luria Bertani, Miller (LB) – Composição em g.L⁻¹

Caseína enzimtica hidrolisada	10,0
Extrato de levedura	5,0
Extrato de levedura	10,0

pH Final (a 25°C): 7,5 ± 0,2

5. Tris-HCl

Tris-base	121,1g
H ₂ O pura q.s.p.	121,1g

6. Solução de EDTA 0,5M pH – 8

EDTA	9,3g
NaOH	1,0g
H ₂ O pura q.s.p.	50mL
Ajustar o pH para 8,0 com NaOH.	

7. Tampão TE

Tris-HCl 10mM	1mL
EDTA 1mM	200µL
H ₂ O pura q.s.p.	100mL

8. SDS 10% (duodecil sulfato de sódio)

SDS	10g
H ₂ O pura q.s.p.	100mL

Dissolver o SDS em 80mL de água aquecida. Após o resfriamento, completar o volume para 100mL e estocar em temperatura ambiente.

9. Solução CTAB/ NaCl

A solução CTAB/NaCl é feita utilizando 10% CTAB acrescido a 0,73M de NaCl.

10. Clorofil

A solução clorofila é feita a partir de clorofórmio e álcool isoamílico, na proporção de 24:1 (v/v).

11. Tampão TBE 10X (Tris-Ácido Bórico)

Tris-base	54g
Ácido Bórico	27,5g
Solução EDTA 0,5M – pH: 8,0	20mL
H ₂ O pura q.s.p.	500mL

12. Gel de agarose 1%

Agarose	2,0g
Tampão TBE 1X	200mL

B. NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DO AFRICAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY RESEARCH

Introduction

Authors should read the editorial policy and publication ethics before submitting their manuscripts. Authors should also use the appropriate reporting guidelines in preparing their manuscripts.

Research Ethics

Studies involving human subjects should be conducted according to the World Medical Association (WMA) **Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects**.

Studies involving non-human animals should follow appropriate ethical guidelines such as the **Animal Welfare Act, The Animals (Scientific Procedures) Act (Amendment) Order 1993, The EU parliament directive on the protection of animals used for scientific purposes, ARRPP policies and guidelines**, etc.

Reporting guideline

Responsible reporting of research studies, which includes a complete, transparent, accurate and timely account of what was done and what was found during a research study, is an integral part of good research and publication practice and not an optional extra.

See additional **guidelines for reporting of health research**.

Preparing your manuscript

The type of article should determine the manuscript structure. However, the general structure for articles should follow the **IMRAD structure**.

Title

The title phrase should be brief.

List authors' full names (first-name, middle-name, and last-name).

Affiliations of authors (department and institution).

Emails and phone numbers

Abstract

The abstract should be less than 300 words. Abstract may be presented either in **unstructured or structured format**. The keywords should be less than 10.

Abbreviations

Abbreviation should be used only for non standard and very long terms.

The Introduction

The statement of the problem should be stated in the introduction in a clear and concise manner.

Materials and methods

Materials and methods should be clearly presented to allow the reproduction of the experiments.

Results and discussion

Results and discussion maybe combined into a single section. Results and discussion may also be presented separately if necessary.

Disclosure of conflict of interest

Authors should disclose all financial/relevant interest that may have influenced the study.

Acknowledgments

Acknowledgement of people, funds etc. should be brief.

Tables and figures

Tables should be kept to a minimum.

Tables should have a short descriptive title.

The unit of measurement used in a table should be stated.

Tables should be numbered consecutively.

Tables should be organized in Microsoft Word or Excel spreadsheet.

Figures/Graphics should be prepared in GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint.

Tables and Figures should be appropriately cited in the manuscript.

References

References should be listed in an alphabetical order at the end of the paper. DOIs, PubMed IDs and links to referenced articles should be stated wherever available.

Examples:

Baumert J, Kunter M, Blum W, Brunner M, Voss T, Jordan A, Klusmann U, Krauss S, Neubrand M, Tsai YM (2010). Teachers` mathematical knowledge, cognitive activation in the classroom, and student progress. *Am. Educ. Res. J.* 47(1):133-180.

<http://dx.doi.org/10.3102/0002831209345157>

Christopoulos DK, Tsionas EG (2004). "Finacial Development and Economic Growth: Evidence from Panel Unit Root and Cointegration Tests" *J. Dev.Econ.* pp.55-74.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdeveco.2003.03.002>

Goren A, Laufer J, Yativ N, Kuint J, Ben Ackon M, Rubinshtein M, Paret G, Augarten A (2001). Transillumination of the palm for venipuncture in infants. *Pediatric. Emerg. Care* 17:130-131.

<http://dx.doi.org/10.1097/00006565-200104000-00013> PMID:11334094

Mishra A, Mishra SC (2001). Cost-effective diagnostic nasal endoscopy with modified otoscope. *J. Laryngol. Otol.* 115:648-649.

<http://dx.doi.org/10.1258/0022215011908739> PMID:11535147

Acceptance Certificate

Authors are issued an Acceptance Certificate for manuscripts that have been reviewed and accepted for publication by an editor.

Payment of manuscript handling fee

Once a manuscript has been accepted, the corresponding author will be contacted to make the necessary payment of the manuscript handling fee. Kindly note that on the **manuscript management system**, the payment option is only enabled for manuscripts that have been accepted for publication.

Proofs

Prior to publication, a proof is sent to the corresponding author. Authors are advised to read the proof and correct minor typographical or grammatical errors. Authors should promptly return proofs to the editorial office.

Publication

Once proofs are received at the editorial office, the manuscripts are usually included in the next issue of the journal. The article will thereafter be published on the journal's website

Publication Notification

After the article is made available on the journal's website, a publication notice is sent to the corresponding author with links to the issue and article.

We welcome manuscripts edited by the following organizations:

JOURNALS CONSORTIUM (www.journalsconsortium.org)

EDITAGE (www.editage.com)

BIOEDIT (www.bioedit.co.uk)

NARVAN (www.banarvan.com)