



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS – UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS – FCBA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

ANA CAROLINE FAGUNDES DOURADO

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE SOLO
DE FLORESTA SEMIDECIDUAL COM POTENCIAL DE
DEGRADAÇÃO DO FENOL E DO XILENO**

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
Março/2017**

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE SOLO DE
FLORESTA SEMIDECIDUAL COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DO
FENOL E DO XILENO**

ANA CAROLINE FAGUNDES DOURADO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Universidade Federal da
Grande Dourados para a obtenção do
título de Bacharel em Biotecnologia.

Profa. Dra. Maricy Raquel Lindenbah
Bonfá

DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
Março/2017

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ROVENIENTES DE SOLO DE
FLORESTA SEMIDECIDUAL COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DO
FENOL E DO XILENO P**

Por:

Ana Caroline Fagundes Dourado

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: / /

Prof^a Dr^a Maricy Raquel Lindenbah Bonfá
Orientadora – UFGD/FCBA

Prof^a. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira
Membro da Banca – UFGD/FCBA

Me. Renata Pires de Araújo – UFGD/FCBA
Membro da Banca – UFGD/FCBA

Dedico primeiramente dedico à Deus.

*Aos meus pais, Joaquina Marques Fagundes
Dourado, em memória, e Ermi Miranda Dourado,
por sempre terem acreditado em mim, e dedicado
suas vidas a me criarem e não medirem esforços
para que eu pudesse concluir essa fase.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde e ter me sustentado até aqui, pela oportunidade, por me dar forças, e nunca me deixar desistir e por ter dado à possibilidade de concluir esta caminhada.

A minha mãe Jô por sempre ter acreditado em mim, por ter vindo cuidar de mim nos momentos de desespero, mesmo estando em tratamento, agradeço a ela que mesmo em memória está ao meu lado e foi por ela que não desisti.

Ao meu pai, obrigada pela paciência, pelo incentivo, pela força e principalmente pelo carinho. Hoje sei que valeu a pena toda distância, todo sofrimento, todas as renúncias. Valeu a pena esperar, pois estamos colhendo os frutos do nosso empenho. Esta vitória é muito mais sua do que minha.

A minha irmã Juliana que mesmo distante sempre esteve ao meu lado, me apoiando, me estimulando a nunca desistir, as minhas outras irmãs Elaine e Cirlei, os meus sobrinhos, Vinicius, Victor Henrique, Gabriel e Artur e dona Julinda por trazerem alegria para a minha vida, e estarem sempre torcendo por mim.

A Universidade Federal da Grande Dourados, em especial ao curso de Biotecnologia.

A todos os professores que fizeram parte de minha jornada acadêmica, e compartilharam seus conhecimentos.

Aos técnicos que trabalham na Universidade, obrigada por me ajudarem a realizar o meu experimento, por todo o ensinamento e por manterem os laboratórios funcionando.

Em especial a minha orientadora Maricy Raquel Lindenhah Bonfá pelo comprometimento, paciência e dedicação. Por compartilhar de seus conhecimentos, pelos puxões de orelha, pelas palavras amigas e apoio, por tudo o que contribuiu em minha vida acadêmica e em meu crescimento pessoal. A senhora meus sinceros agradecimentos e grande admiração. Os momentos partilhados ficarão sempre em minha lembrança.

A professora Kelly Mari Pires de Oliveira por ter me recebido com tanto carinho e respeito no estágio, pela paciência com meu choro e principalmente por todo o aprendizado.

A mestre e técnica Renata por ser uma excelente profissional, pelo empenho que realiza suas atividades, por nunca ter hesitado em me ajudar, por todos os conselhos e por tudo o que contribuiu para este trabalho.

Aos amigos que a faculdade me proporcionou, Priscila, Natany, Pamela, Ademir, Stephanie, Wellinton, Fabiana, Carine, Isabelli, Vander, Vagner, Melina e aos demais amigos que conquistei no estágio, que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes na minha vida.

Aos meus amigos que deixei em Birigui, Wesley, Natiely, Francine, Maikon e Lucas Ferrari, por todas as alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhora tudo o que tenho produzido na vida.

A minha avó Alaíde e minhas tias por terem feito o papel de mães e conselheiras na minha vida, por estarem sempre cuidando e orando por mim.

As minhas primas e primos por toda paciência que tiveram comigo, em me ouvir e aconselhar nos momentos de tribulações.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, e em minha graduação.

Deixo aqui registrada minha gratidão a todos vocês.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o
melhor, mas lutei para que o melhor fosse
feito. Não sou o que deveria ser, mas
Graças a Deus, não sou o que era antes”.*
(Marthin Luther King)

RESUMO

O fenol (C_6H_6O) e o xileno (C_8H_{10}) são compostos tóxicos presentes em diversos poluentes industriais, que podem causar tanto intoxicações agudas, crônicas e câncer. Compostos fenólicos estão também presentes na matéria orgânica de galhos de árvores, cascas, como a lignina. Na decomposição dessa matéria orgânica, vários micro-organismos estão relacionados, entre eles os que degradam os compostos fenólicos. Sendo assim, este trabalho visa a bioprospecção e o estudo de micro-organismos, a partir de amostras de solos de uma floresta semidecidual da região de Dourados-MS com potencial de degradação de fenol. O solo foi previamente enriquecido em cultivo líquido com fenol e para o isolamento usou-se o meio sólido Bushnell e Haas (BH), fenol na concentração de $650 \mu L.L^{-1}$ como única fonte de carbono e como indicador de atividade metabólica usou-se neste meio o composto DCPIP (2,6-dichlorophenol-indophenol). Os isolados foram identificados pelo método morfotintorial de Gram e testes bioquímicos como catalase e oxidase. Neste trabalho isolou-se 16 bactérias, sendo 5 cocos Gram-positivos e catalase positiva e 11 bastonetes Gram-negativos oxidase positiva que foram testados em meio BH líquido, com o indicador DCPIP e uma fonte de carbono, fenol ou xileno. Verificou-se a transformação da cor (oxidação) do DCPIP de azul para incolor por 87,3% das bactérias em ambas as fontes de carbono. Com os mesmos isolados, testou-se o corante alaranjado de metila. Diante dos resultados apresentados verificou-se que é possível observar o potencial para degradação do fenol e xileno, visto que a atividade metabólica dos micro-organismos transformou a coloração do DCPIP mesmo que este ambiente não tenha sido previamente contaminado com poluentes (industriais), como fenol ou xileno, mostrando assim que a capacidade de utilização de compostos tóxicos por micro-organismos ocorre devido à semelhança destes a compostos naturais.

Palavras chaves: Compostos fenólicos, biodegradação, hidrocarbonetos, lignina.

Lista de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Representação da molécula de lignina. Fonte: CARVALHO, 2005..... | 12 |
| Figura 2 - Representação da molécula de fenol. Fonte SOLOMONS, 2009. | 14 |
| Figura 3 - Representação da molécula de xileno. Fonte SOLOMONS, 2009. | 14 |
| Figura 4 - Padrão qualitativo para avaliação do crescimento das bactérias estudadas em fenol ou xileno como única fonte de carbono com indicador DCPIP. (-) sem oxidação do DCPIP (controle sem bactéria); (+) oxidação sutil do indicador DCPIP; (++) oxidação razoável do indicador DCPIP; (+++) oxidação ótima do indicador DCPIP demonstrando que a fonte de carbono foi metabolizada | 27 |
| Figura 5 - Foto mostrando a não capacidade de crescimento das bactérias estudadas em alaranjado de metila. | 30 |

Lista de tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Identificação morfológica das bactérias isoladas e perfil de crescimento das bactérias em fenol e xileno como única fonte de carbono e energia. | 26 |
|---|----|

Lista de siglas e abreviações

| | |
|---------------------------------|--|
| BH | Bunshnell Hass |
| CaCl ₂ | Cloreto de cálcio |
| DCPIP | 2,6-Dichlorophenolindophenol |
| FeCl ₃ | Cloreto de ferro III |
| H ₂ O | Água |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| HPA's | Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos |
| K ₂ HPO ₄ | Fosfato de potássio dibásico Anidro P.A. ACS |
| KH ₂ PO ₄ | Fosfato de potássio monobásico P.A. ACS Anidro |
| MgSO ₄ | Sulfato de amônio |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| NH ₄ NO ₃ | Nitrato de amônio |
| RPM | Rotações por minuto |

SUMÁRIO

| | | |
|-----|--|----|
| 1 | REVISÃO DA LITERATURA..... | 11 |
| 1.1 | Ciclagem de nutrientes no ambiente | 11 |
| 1.2 | Contaminação ambiental por compostos aromáticos | 13 |
| 1.3 | Tratamentos de efluentes contaminados com compostos tóxicos fenol, xileno (BTEX) e os corantes | 15 |
| 1.4 | Micro-organismos descritos como degradadores de fenol, xileno e azo-corantes | 16 |
| 2 | OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 | Gerais | 19 |
| 2.2 | Específicos | 19 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 | Coleta de amostra..... | 20 |
| 3.2 | Bioprospecção das bactérias..... | 20 |
| 3.3 | Enriquecimento do solo com fenol..... | 21 |
| 3.4 | Identificação morfológica e bioquímica dos isolados | 21 |
| 3.5 | Preservação dos isolados em tubos inclinados | 22 |
| 3.6 | Padronização de Pré-inóculo das bactérias | 22 |
| 3.7 | Crescimento das bactérias isoladas em fenol e xileno como únicas fontes de carbono e energia | 23 |
| 3.8 | Potencial de crescimento das bactérias isoladas em corante alaranjado de metila como única fonte de carbono e energia..... | 23 |
| 4 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 25 |
| 4.1 | Bioprospecção de bactérias com potencial de degradação do fenol..... | 25 |
| 4.2 | Crescimento das bactérias isoladas em fenol e xileno como únicas fontes de carbono e energia..... | 26 |
| 4.3 | Potencial de crescimento das bactérias isoladas em corante alaranjado de metila como única fonte de carbono e energia..... | 29 |
| | CONCLUSÃO | 31 |
| | REFERÊNCIAS:..... | 32 |

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Ciclagem de nutrientes no ambiente

A ciclagem de nutrientes é um processo que ocorre naturalmente na natureza, e é de extrema importância para o equilíbrio ecológico e a sustentabilidade das florestas naturais (MORAES et al., 1999). O estudo da ciclagem de nutrientes é primordial para que seja possível estudar e conhecer a estrutura e funcionamento dos ecossistemas florestais (VITAL et al., 2004).

As florestas, em sua maioria, estão localizadas em solos com deficiência em nutrientes, o que faz com haja a necessidade de ocorrerem os ciclos bioquímicos para o equilíbrio de nutrientes. Assim, os nutrientes são transferidos do meio biótico para o abiótico, esse processo é chamado de equilíbrio dinâmico (SELLE, 2007).

Com a preocupante devastação das florestas esse ciclo é interrompido, isso faz com que haja a alteração da quantidade de matéria orgânica no solo (SANTOS, 1999). Diminuindo assim a atividade da biomassa microbiana, principal responsável pela ciclagem de nutrientes e pelo ciclo de energia no solo, e que tem influência na mudança da matéria orgânica para estocar carbono e minerais, ou seja, na liberação e na imobilização de nutrientes (SWITZER, 1972).

O ciclo bioquímico refere-se ao processo que acontece na natureza que garante a ciclagem dos elementos biológicos e químicos presentes no meio, dentre eles o nitrogênio, oxigênio e carbono. Esses ciclos são fortemente dependentes do ambiente microbiano em que se encontra, o qual é influenciado pela temperatura do solo, a umidade, e a vegetação (MÖLLER et al., 2002).

A matéria orgânica presente nos solos é obtida da decomposição de resíduos de origem animal e, principalmente vegetal, sendo assim, não tem relação com o material de origem do solo. Os resíduos animais e vegetais sofrem a decomposição parcial pela mesofauna, que é composta da fauna de tamanho intermediário e, depois, pela microbiota decompositora. Grande quantidade do carbono presente nos resíduos é liberada para a atmosfera como CO₂ e o restante fará parte da matéria orgânica como um componente do solo. (SANTOS, 1999)

A matéria orgânica pode ser classificada em compostos humificados e compostos não humificados. Os compostos não humificados são os carboidratos, aminoácidos, proteínas, lipídios e lignina, estes compostos são produzidos ou adicionados quando

os tecidos animais e vegetais são decompostos no solo. Estes compostos participam diretamente na síntese de outras substâncias, que são chamadas de compostos humificados, através do processo de humificação, são denominados ácidos húmicos, fúlvicos e humina (TAN, 1994).

Dentre os compostos não humificados encontra-se a lignina, que é de suma importância no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo ela a responsável por dar a resistência mecânica aos vegetais, além de proteger os tecidos contra o ataque de micro-organismos. (FENGEL; WEGENER, 1984).

A lignina é uma substância amorfa, de natureza aromática e muito complexa. Ela se decompõe mais lentamente devido à complexidade de sua estrutura, representando uma fração recalcitrante no solo (MÖLLER et al., 2002). É uma macromolécula formada pela polimerização de três alcoóis precursores que dão origem às unidades fenil-propanóides e tem semelhança com diversos compostos fenólicos, devido à presença de moléculas de fenol na sua estrutura (Figura 1) (MÖLLER et al., 2002).

Devido às altas concentrações da lignina, ela se encontra na lamela média onde serve como um “cimento” entre as fibras da madeira, presente também nas camadas da parede celular, principalmente na parede secundária. Formando, juntamente com a hemicelulose, uma matriz amorfa em que as fibras da celulose são envolvidas e protegidas contra a biodegradação (FENGEL; WEGENER, 1984).

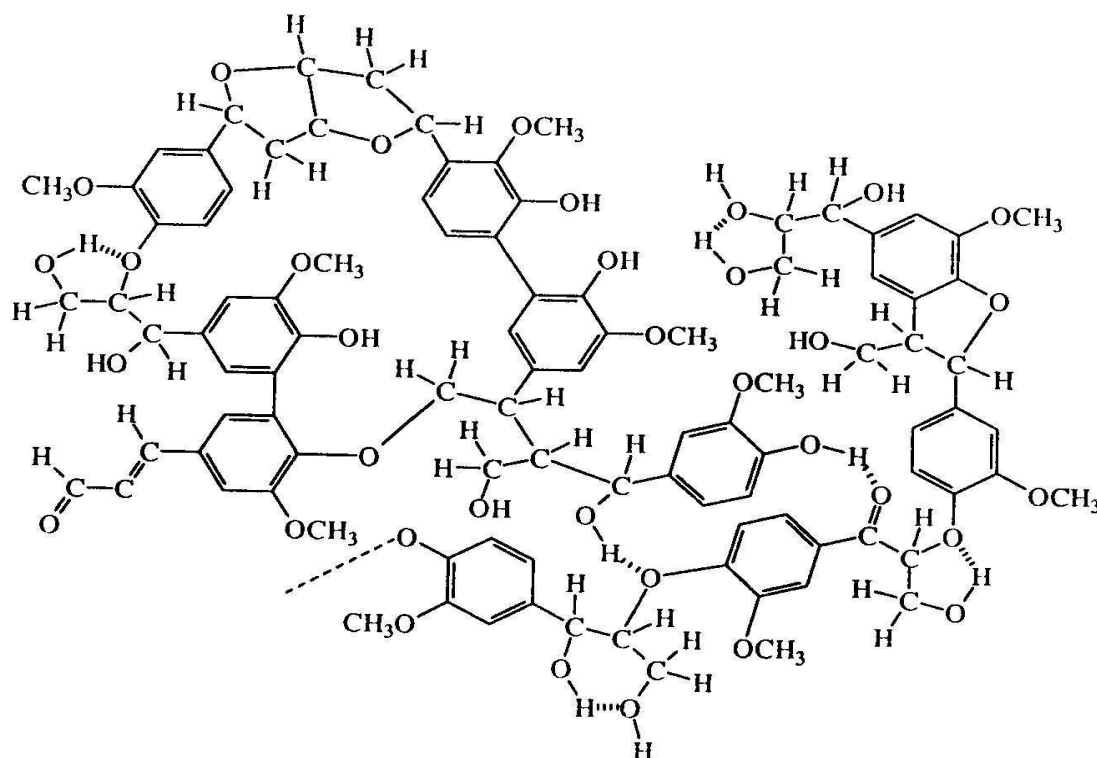


Figura 1 – Representação da molécula de lignina. Fonte: CARVALHO, 2005.

Durante o processo de decomposição da lignina, ligações intramoleculares entre componentes de fenilpropanoides são clivadas e oxidadas, contribuindo com a liberação de derivados de compostos fenólicos no solo (MÖLLER et al., 2002).

Várias vias metabólicas de degradação dos HAP's já foram identificadas e estudadas nos micro-organismos, sendo a mais estudadas as que possuem o metabolismo aeróbico realizado pelas bactérias, pelos fungos lignolíticos e pelos fungos não-lignolíticos (JACQUES et al, 2007).

1.2 Contaminação ambiental por compostos aromáticos

A industrialização trouxe um grande avanço para a economia brasileira e mundial, porém ela também é responsável pela contaminação ambiental. Que se agrava devido ao acúmulo de matérias primas e insumos, envolvendo sérios riscos de contaminação por transporte e disposição inadequada, e, além disso, a ainda existe grande ineficiência dos processos de conversão, o que necessariamente implica a geração de resíduos. Os problemas ambientais são cada dia mais graves, e frequentes, e podem ser vistos devido às mudanças na qualidade da água, do solo e do ar (KUNZ et al, 2002).

As atividades industriais, indústrias alimentícias, têxteis e de agroquímicas, utilizam mais de 21% da água potável que é disponível no mundo (SHIKLOMANOV, 2000), o que faz gerar uma quantidade de efluentes contaminados ainda maior (GUPTA; SUHAS, 2009).

A poluição dos recursos hídricos faz com que haja a diminuição do abastecimento de água potável, afetando diretamente a biodiversidade, e o desempenho dos ecossistemas dos quais o homem depende. Da mesma forma, a contaminação com produtos químicos orgânicos e inorgânicos e compostos industriais podem afetar drasticamente a saúde humana e interferir na utilidade da água para atividades agrícolas (RAMACHANDRA et al., 2009).

Os compostos fenólicos possuem na sua fórmula um anel aromático (benzeno) contendo um, dois ou mais grupos hidroxila O fenol (C_6H_6O) (figura 2) é um composto tóxico presente em diversos poluentes industriais, bactericidas, fungicidas, que pode causar tanto intoxicações agudas, quanto crônicas incluindo câncer. (McMURRY, 2008).

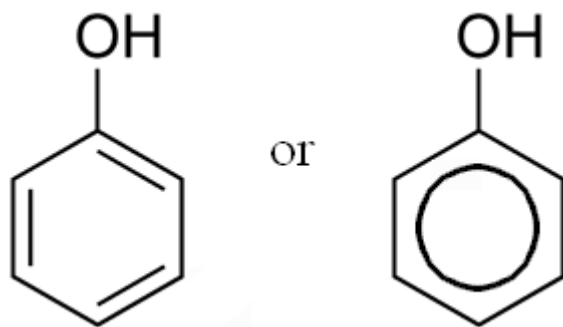


Figura 2 - Representação da molécula de fenol. Fonte SOLOMONS, 2009.

Os fenóis afetam drasticamente a salubridade geral da água, isso impacta sobre os organismos vivos, não só pela sua toxicidade, mas também pela alteração dos nutrientes e gases dissolvidos (oxigênio, dióxido de carbono) (ATKINS; JONES, 2006).

O petróleo ainda é o combustível mais usado, sua composição é uma mistura de compostos bem complexos, dentre eles os hidrocarbonetos os representantes da fração majoritária. Pela complexidade do petróleo, o tratamento de áreas contaminadas tende a ser difícil e com diversas problemáticas. Nos solos que possuem a contaminação por petróleo e os seus derivados, alguns tendem a se destacarem mais. Por isso exigem maior preocupação, e são identificados e quantificados primeiramente no processo de biorremediação, sendo eles: benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (FIGURA 3) (isômeros: orto-, meta- e para-xileno) Conhecidos também como BTEX, são descritos como hidrocarbonetos monoaromáticos, que tem em sua estrutura molecular a presença do anel benzênico. (COSTA et al, 2009).

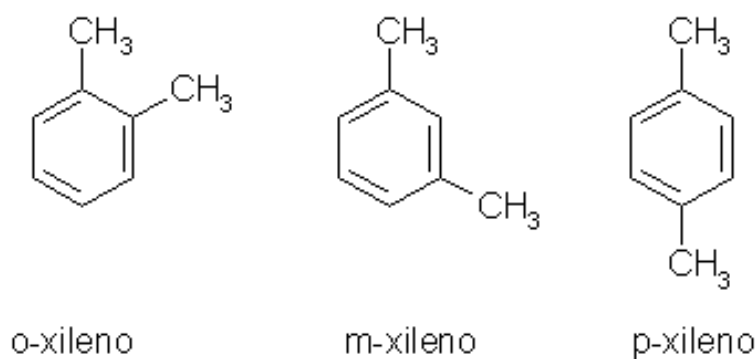


Figura 3 - Representação da molécula de xileno. Fonte SOLOMONS, 2009.

Esses compostos aromáticos são extremamente tóxicos ao meio ambiente, mas também aos seres humanos, apresentando toxicidade crônica mais significativa que os hidrocarbonetos alifáticos (também presentes no petróleo e derivados), mesmo em concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ (WATTS et al., 2000).

A tintura de tecidos é uma arte milenar, no início os corantes eram obtidos de forma natural através da extração de cira do barro, flores, plantas, mas hoje já existe uma disponibilidade comercial de corantes sintéticos. Devido esse aumento na demanda de tecidos tingidos, milhões de compostos químicos coloridos têm sido sintetizados nas últimas décadas, e cerca de 10.000 desses são fabricados em escala industrial (ZOLLINGER et al, 1991; ABRAHANT et al, 1977).

Pode-se estimar que cerca de 20% de todos os corantes que são utilizados para o tingimento dos tecidos sejam descartados em efluentes devido a sua incompleta fixação durante o processo, que resulta no descarte indevido de grandes concentrações dos corantes no ambiente (GUARANTINI; ZANONI, 2000; McMULLAN et al., 2001).

Diversos corantes, principalmente do grupo azo e seus subprodutos, podem ser carcinogênicos e/ou mutagênicos (BROWN; DEVITO,1993). Além disso, com as altas concentrações de efluentes coloridos que são despejados em corpos d'água são alterados os ciclos biológicos naturais, acarretando a redução da atividade fotossintética (YESILADA et al., 2003).

Para solucionar a problemática ambiental relacionada aos compostos descritos acima um dos processos viáveis é a biorremediação, processo descrito por Vidali (2001) como sendo qualquer utilização de organismos vivos, dentre eles os micro-organismos com a finalidade de degradar compostos poluentes, ou transformar em elementos menos tóxicos.

1.3 Tratamentos de efluentes contaminados com compostos tóxicos fenol, xileno (BTEX) e os corantes

O desenvolvimento de tecnologia para tratamento de efluentes tem sido motivo de grande interesse nas últimas décadas, devido ao aumento da conscientização e rigidez das regras ambientais, além da preservação e manutenção da flora e fauna (BRITO et al., 2004).

Há diversos métodos para o tratamento de ambientes ou efluentes contaminados com corantes, porém alguns tendem a apresentar limitações, sendo as mais importantes o custo elevado e baixa eficiência do tratamento dependendo da composição do efluente. Tem-se o tratamento por lodos ativados, como exemplo, que possui uma baixa eficiência na remoção de corantes e acabam gerando muitos resíduos (excesso de lodo) que também deverá ser tratado. Já o tratamento com carvão ativado tem o custo elevado devido à necessidade de troca desse material após a sua utilização (KUNZ et al., 2002).

Por isso, há necessidade de busca de novas técnicas, e o aprimoramento dos métodos que já existentes para que melhorem a eficiência na remoção dos rejeitos químicos industriais antes que eles sejam liberados no meio ambiente (GAYLARDE, et al., 2005).

Uma das áreas mais promissoras para tratamento destes efluentes vem sendo baseada nos métodos de biodegradação (ZIMMERMANN et al, 1982). Biodegradação é a capacidade de micro-organismos tem de reduzir substancias complexa a compostos mais simples e com menos prejuízos. Dentre eles carbono, água ou elementos individuais pela ação de micro-organismos (NAM, et al., 2001).

Alguns estudos revelam micro-organismos que são capazes de descolorir totalmente ou parcialmente diversos corantes e, em alguns casos, em questão de horas (BANAT et al., 1996). Essa capacidade de descoloração é devido à produção de enzimas extracelulares presentes na degradação das moléculas com estruturas químicas complexas (KUMARAN; DHARANI, 2011).

O uso dos micro-organismos para a remoção dos corantes é tido como um método eficaz e de baixo custo, e pode ser usado como um pré-tratamento (BANAT et al., 1996). Para que a técnica seja eficiente é importante que aconteça uma redução na toxicidade dos corantes e do efluente após o processo de tratamento. Para isso é de extrema importância a realização de alguns testes para avaliar a toxicidade antes do despejo dos efluentes nos corpos hídricos, já que a ausência de cor não significa que houve a diminuição da sua toxicidade (FATIMA; AHMAD, 2005)

Para que se possa avaliar a toxicidade desses compostos utilizam-se organismos que são sensíveis como bioindicador. Isso consiste em analisar a resposta fisiológica dos organismos expostos a diversas concentrações do poluente durante um período determinado (FATIMA; AHMAD, 2005). Abrahão e colaboradores (2002) relatam que podemos observar efeitos diversos com estes testes, como o aumento da mortalidade, alterações no crescimento, prejuízos na reprodução e comportamento alterado, desses organismos bioindicadores dentre outros efeitos

1.4 Micro-organismos descritos como degradadores de fenol, xileno e azo-corantes

Muitos micro-organismos já foram descritos como capazes de biodegradar substâncias tóxicas como fenol e corante sintéticos. Tschiech e Fuchs (1987) conseguiram isolar de uma amostra da estação de tratamento de águas residuais

municipais em Konstanz e de sedimentos de um córrego poluído perto de Konstanz, Alemanha, *Pseudomonas* sp. K172 e S100 que são responsáveis por degradar de forma anaeróbia o fenol, utilizando nitrato como aceptor final de elétrons.

Boopathy (1995) conseguiu isolar micro-organismos que utilizam o fenol como única fonte de carbono e energia. Sendo que os três isolados são membros do gênero *Azoarcus*, que primeiramente já foi descrito devido à capacidade de fixar nitrogênio. Chen e colaboradores (2014) e Thakur e colaboradores (2012) conseguiram isolar diversas espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e outros gêneros relacionados (*Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*) que vem sendo identificados como tendo ampla capacidade de degradação de compostos aromáticos. Eles alegaram que essas bactérias são muito versáteis e são conhecidas devido a sua atividade metabólica, que permitem que algumas delas se desenvolvam em condições extremas de limitação de nutrientes.

Passos e colaboradores (2009) isolaram de um solo uma linhagem de *Aspergillus* sp. LEBM2 que foi contaminado por hidrocarbonetos derivados de petróleo, na região da Cidade do Rio Grande, RS, Brasil, e foi avaliada a taxa de biodegradação de fenol em concentrações crescentes. E pode se concluir que *Aspergillus* sp. LEBM2 possui uma alta adaptabilidade ao fenol, podendo degradá-lo efetivamente até uma concentração de $989 \pm 15 \text{ mg.L}^{-1}$, podendo também ser empregado em processos de bioaumentação.

Souza e Rosado (2009), isolaram fungos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus sajor-caju*, *Phellinus gilvus* e *Picnoporus sanguineus* de efluentes têxteis que se mostraram eficientes em processos de biodegradação e descoloração, contudo ainda é preciso estudos complementares para entender as reações das enzimas ligninolíticas que são as responsáveis por este processo em fungos.

De acordo com os estudos de Suzuki e colaboradores (2001), foi descoberto que os *Staphylococcus aureus* conseguem crescer e reduzir a quantidade de azo-corantes por produzirem azoreductase.

Otenio e colaboradores (2005), estudaram a atividade de degradação da espécie *Pseudomonas putida* CCMI 852, em alguns componentes da gasolina, o benzeno, tolueno e xileno (BTEX), e a espécie mostrou eficiência na degradação de tolueno e xileno exceto do benzeno. O resultado pode estar relacionado à adaptabilidade do gênero *Pseudomonas* a diversos substratos (SILVA et al., 2007).

Silva e colaboradores (2007), também conseguiram demonstrar que *Aspergillus flavus*, *Cladosporium sp.*, *Penicilium sp.* e *Phoma sp.* podem ser muito resistentes em condições adversas, e tem capacidade de degradar compostos fenólicos a partir de águas residuárias de postos de gasolina.

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 xylooxidans*, *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).

Kang e colaboradores (2005), foram responsáveis por isolar bactérias capazes de degradar hidrocarbonetos aromáticos do solo rizosférico de cana na Baía de Sunchon, com meio de cultivo de enriquecimento usando o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) como única fonte de carbono.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

- Bioprospectar micro-organismos com potencial de crescimento em fenol como única fonte de carbono e testar crescimento como única fonte de carbono e energia em substratos aromáticos como fenol, xileno e corantes.

2.2 Específicos

- Bioprospectar bactérias provenientes de solo de floresta semidecidual da região de Dourados-MS em meio contendo fenol como única fonte de carbono;
- Avaliar os isolados quanto ao crescimento em fenol e xileno utilizando como indicador de metabolismo o composto DCPIP;
- Avaliar o potencial de descoloração pelas bactérias isoladas do corante alaranjado de metila.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostra

Coletaram-se três amostras de solo proveniente de floresta semidecidual que se caracteriza por variação sazonal marcada pelas estações secas e chuvosas, com notória queda das folhas no período dos meses secos (MOREIRA, 2013) de uma profundidade de 0-10 cm, situada no município de Dourados (MS) nos seguintes pontos: Ponto n.º 1 - 22°17'06.4"S 54°48'37.5"W; Ponto n.º 2 - 22°17'05.7"S 54°48'39.9"W; Ponto n.º 3 - 22°17'04.9"S 54°48'42.8"W. Realizaram-se as coletas com materiais estéreis e em sacos de polipropileno estéril, em janeiro de 2016, homogeneizou-se as amostras e analisou o solo no Laboratório de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Teve-se como resultados das análises, o pH da H₂O, 6,74; o pH do CaCl₂, 6,19 e o pH SMP, 6,23, além de apresentar P, K, Ca, Mg, H+Al, SB e T nas concentrações 3,46 mg/dm³, 0,27 cmol/dm³, 4,04 cmol_c/dm³, 1,93 cmol_c/dm³, 2,30 cmol_c/dm³, 6,23 cmol_c/dm³ e 8,52 cmol_c/dm³, respectivamente.

3.2 Bioprospecção das bactérias

Para a bioprospecção das bactérias utilizou-se o meio Bunshnell Hass – BH, composto de 1g de KH₂PO₄, 1g de K₂HPO₄, 1g de NH₄NO₃, 0,2g de MgSO₄.7H₂O, 0,05g de FeCl₃, 0,02g de CaCl₂.2H₂O, para 1L de H₂O (ATLAS, 1995, com adaptações).

Para o preparo de 0,250 L do meio BH (Bushnell Haas), colocou-se em um frasco cerca de 0,150 L de H₂O deionizada e adicionou-se 0,05 g.L⁻¹ de MgSO₄; em um béquer pequeno adicionou-se 0,010 L de H₂O e 0,02 g.L⁻¹ de CaCl₂, dessa solução homogeneizada alíquotou-se 0,001 L ao frasco que continha MgSO₄, e adicionou-se ao meio também 0,25 g.L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,25 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, uma pequena alíquota de FeCl₃ e homogeneizou-se bem em cada adição. Em outro béquer, colocou-se 0,040 L de H₂O deionizada e adicionou-se 0,25 g.L⁻¹ de NH₄NO₃ e homogeneizou. Calibrou-se as duas soluções, corrigindo o pH para 6,8 com NaOH (1M), na segunda solução completou-se o volume para 0,050 mL utilizando H₂O deionizada, e na primeira solução acrescentou-se 5 g de ágar e completou-se o volume para 0,200 L com H₂O deionizada. As duas soluções foram autoclavadas por 20 min a 121 °C e em seguida foram misturadas em ambiente estéril na cabine de segurança biológica.

Para o preparo da solução de DCPIP dissolveu-se 0,100 g de DCPIP em 100 mL de caldo BH estéril, homogeneizou-se e filtrou-se em filtro 0,22 micrometros em

ambiente estéril e armazenou-se em frasco âmbar estéril e protegida de luz em geladeira. Após o preparo, alíquotou-se 1,25 mL de DCPIP e 65 µL de fenol (a cada 100 mL de meio), portanto uma concentração final de fenol de 650 µL.L⁻¹ (0,65%) concentrado no frasco contendo o meio BH, realizou-se esse procedimento em ambiente estéril.

3.3 Enriquecimento do solo com fenol

Para bioprospecção das bactérias o solo de floresta semidecidual foi previamente enriquecido com fenol. Para o enriquecimento adicionou-se 10 g do solo em Erlenmeyer estéril, contendo 90 mL do meio BH líquido e em outro Erlenmeyer solução salina à 0,9%. Adicionou-se 65 µl de fenol aos dois frascos e incubou-se Erlenmeyer em agitador orbital tipo shaker a 30 °C, 135 RPM por três dias.

Após a incubação dos frascos de enriquecimento, realizou-se a diluição seriada em duplicata até 10⁻⁵ e plaqueou-se 100 µl das duas últimas diluições (10⁻⁴ e 10⁻⁵) em meio BH sólido contendo fenol e DCPIP, por espalhamento em superfície. Incubou-se as placas em BOD a 30 °C até o aparecimento de colônias isoladas, cerca de 72h.

Após o aparecimento de colônias, as que apresentaram morfologia e coloração diferentes foram selecionadas e repicadas em novas placas contendo o mesmo meio por esgotamento para obtenção de colônias puras.

3.4 Identificação morfotintorial e bioquímica dos isolados

Repicou-se as colônias isoladas em meio TSA (triptona soja ágar), e incubou-se os isolados a 30 °C para identificação morfotintorial pelo método de Gram.

Para a coloração de Gram, usou-se o kit New Prov, (seguindo as instruções do fabricante), contendo cristal violeta, lugol, solução descorante e fucsina. Preparou-se 16 lâminas fixando o esfregaço bacteriano, e uma por uma cobriu-se com cristal violeta e deixou-se por aproximadamente 1 minuto, escoou-se o corante e lavou-se em um filete de água corrente; cobriu-se a lâmina com lugol e deixou-se agir por aproximadamente 1 minuto; escoou-se o lugol e lavou-se em um filete de água corrente; adicionou-se solução descorante sobre a lâmina até que não se desprendesse mais corante; lavou-se em um filete de água corrente; cobriu-se a lâmina com fucsina e deixou-se agir por aproximadamente 30 segundos; lavou-se em um filete de água corrente e deixou-se secar ao ar livre.

Para a visualização ao microscópio adicionou-se uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço das 16 lâminas e observou-se no microscópico com objetiva de imersão (100 X, ou seja, com aumento de 1000 x).

Com as bactérias Gram-positivas realizaram-se posteriormente testes de catalase, que se coloca uma gota de peróxido de hidrogênio 3% sobre uma lâmina, e com o auxílio de uma alça bacteriológica de platina, adicionam-se as colônias em estudo na gota de peróxido de hidrogênio. Se houver desprendimento imediato de bolhas, a produção de efervescência indica a conversão do H_2O_2 em água e oxigênio gasoso, confirma a hipótese de ser positiva, caso haja a ausência de bolhas ou efervescência, é negativo.

Quando as bactérias foram identificadas como Gram-negativas, foi realizado teste de oxidase. Próximo à chama, com auxílio de uma pinça em aço inoxidável retirou-se uma tira de teste de oxidase (Laborclean) uma ou duas colônias da bactéria em análise foram friccionadas sobre a superfície da tira indicada; e observou-se o resultado em até 2 minutos: o desenvolvimento de uma coloração violeta caracteriza a prova da oxidase positiva e quando não há mudança de coloração da tira o teste é considerado negativo.

3.5 Preservação dos isolados em tubos inclinados

Para a preservação dos isolados, o procedimento de preservação em tubo inclinado fez-se em triplicata. Cada tubo continha cerca de 15 ml do meio sólido BH com fenol, que foram vertidos nos tubos de ensaio numa posição a 45° até solidificação. Foram estriadas nas superfícies do meio inclinado as colônias das bactérias isoladas, incubadas até o crescimento em estufa à 30 °C e armazenadas em ambiente refrigerado a 10 °C, por cerca de 30 dias quando repicou-se novamente os isolados.

3.6 Padronização de Pré-inóculo das bactérias

Realizou-se o repique em placas de Petri das bactérias em triplicata, contendo o meio BH com fenol, manteve-se na estufa a 30° C durante 72h. Preparou-se 16 tubos tipo Falcon estéreis contendo 15 mL do meio BH para a padronização do inóculo. Realizou-se a padronização no fluxo laminar, e foi utilizado o espectrofotômetro a 600 nm até se obter a absorbância 1,0. A partir deste pré-inóculo, inoculou-se nos experimentos abaixo descritos.

3.7 Crescimento das bactérias isoladas em fenol e xileno como únicas fontes de carbono e energia

Para o crescimento em meio líquido foi utilizado o meio BH com o indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). Esta técnica foi descrita e desenvolvida primeiramente por Hanson e colaboradores (1993) e consiste na oxidação microbiana dos hidrocarbonetos, os elétrons presentes são cedidos até os aceptores, como o oxigênio, nitrato e sulfato. E ao adicionar um acceptor de elétron como o DCPIP ao meio de cultura, é provável observar a capacidade dos micro-organismos tem de utilizar os hidrocarbonetos, o fenol e o xileno, como substrato (MARIANO et al., 2009). Essa visualização se dá pela mudança de cor do DCPIP que quando oxidado é incolor e quando reduzido passa para a coloração azul, segundo metodologia descrita por Otenio e colaboradores (2010).

Preparou-se tubos estéreis contendo 14 mL do meio BH, indicador metabólico DCPIP na concentração 2g.L^{-1} , e uma fonte de carbono, sendo ela xileno ou fenol a $650\ \mu\text{L.L}^{-1}$.

O experimento realizou-se em duplicata, contendo dois controles para cada fonte de carbono com 15 mL cada, e outros 32 tubos contendo 14 mL do meio BH, DCPIP e uma fonte de carbono, xileno ou fenol.

Inoculou-se 1 mL de cada micro-organismos padronizado no pré-inóculo descrito acima em cada tubo e na sua duplicata. Mediu-se a densidade óptica a 600 nm de todos os tubos no tempo zero e fotografou-se para verificação qualitativa da perda de cor do indicador DCPIP. Realizou-se a leitura da absorbância a 600 nm para também verificar a oxidação do DCPIP no tempo zero hora e no tempo 120 horas (COSTA FILHO, 2010).

Envolveu-se os tubos com papel alumínio para evitar a fotodegradação do DCPIP e incubou-se em BOD a 30°C durante 5 dias. Posteriormente a este tempo mediu-se novamente a densidade óptica e fotografou-se os tubos novamente.

3.8 Potencial de crescimento das bactérias isoladas em corante alaranjado de metila como única fonte de carbono e energia

Para a avaliação do crescimento das bactérias em corante alaranjado de metila testou-se os 16 isolados obtidos e preparou-se tubos estéreis contendo meio BH, juntamente com o corante alaranjado de metila na concentração de 1g.L^{-1} .

Realizou-se o experimento em duplicada, contendo dois tubos controles sem adição do inóculo de bactérias. Neste caso o inóculo realizou-se adicionando uma alçada

(alça calibrada de 10 μL) da respectiva bactéria em cada tubo. Realizou-se a leitura da absorbância inicial a 460 nm de todos os tubos, e os tubos incubados em estufa a 30 ° C durante 5 dias. Posteriormente mediu-se novamente a absorbância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Bioprospecção de bactérias com potencial de degradação do fenol

Por meio do resultado apresentado na Tabela 1, constata-se que no total foram bioprospectadas 16 isolados bacterianos (Tabela 1). Pode-se observar que na análise morfológica dos micro-organismos foram isolados cinco cocos Gram-positivos e catalase positiva; onze bastonetes Gram-negativos, oxidase positiva.

Realizou-se o teste de oxidase para verificar se os isolados são produtores da enzima oxidase, para que assim pudesse ser identificado a possível classificação dos isolados, sendo que a oxidase positiva ajuda caracterizar espécies de *Neisseria* e *Pseudomonas*.

Com isso pode-se verificar que a maioria das espécies de micro-organismos que são capazes de degradar o fenol e xileno, podem pertencer ao gênero *Pseudomonas*, uma Gram-negativa com oxidase positiva como Tschiech e Fuchs (1987) conseguiram isolar. Além de outros gêneros similares, como *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia* que foram isolados por Chen e colaboradores (2014) e Thakur e colaboradores (2012).

Almeida (2015), isolou dos biomas brasileiros, no cerrado o micro-organismo capazes de degradar o fenol, dentre desses isolados BF 2.5 foi identificado como *Staphylococcus*, o isolado BF 2.3.2 não foi possível à identificação devido à baixa qualidade das sequências amplificadas. E os de manguezal foram identificados como *Bacillus sp.* MF-1 e MF-2 como *Bacillus circulans*, comprovando que também é possível que uma bactéria Gram-positiva como *Staphylococcus*, tenha a capacidade de degradar o fenol.

Páliz (2012) estudando a otimização da auto 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*. Mohite e colaboradores (2010) detectaram um isolado de *Streptococcus epidermis* com capacidade de degradar fenol presentes em solos contaminados com óleo de uma região industrial. Estes resultados sugerem que é comum o isolamento de bactérias do gênero *Staphylococcus* em ambientes contaminados.

Tabela 1 – Identificação morfotintorial das bactérias isoladas e perfil de crescimento das bactérias em fenol e xileno como única fonte de carbono e energia.

| Bactérias | Morfologia | Gram | Absorbância 600 nm Fenol | | Absorbância 600 nm Xileno | | Oxidação do DCPIP | |
|-----------|------------|----------|--------------------------|-------------|---------------------------|-------------|-------------------|--------|
| | | | Tempo 0 h | Tempo 120 h | Tempo 0 h | Tempo 120 h | Fenol | Xileno |
| P1 | Bastonete | Negativo | 0,349 | 0,186 | 0,372 | 0,267 | ++ | - |
| P2 | Bastonete | Negativo | 0,356 | 0,170 | 0,364 | 0,277 | +++ | - |
| P3 | Bastonete | Positivo | 0,348 | 0,180 | 0,374 | 0,181 | +++ | ++ |
| P4 | Cocos | Positivo | 0,367 | 0,178 | 0,355 | 0,184 | ++ | ++ |
| P5 | Bastonete | Negativo | 0,353 | 0,168 | 0,359 | 0,186 | ++ | ++ |
| P6 | Cocos | Positivo | 0,349 | 0,168 | 0,371 | 0,217 | +++ | + |
| P7 | Bastonete | Negativo | 0,349 | 0,290 | 0,381 | 0,191 | - | ++ |
| P8 | Bastonete | Negativo | 0,358 | 0,164 | 0,370 | 0,280 | +++ | - |
| P9 | Bastonete | Negativo | 0,357 | 0,125 | 0,389 | 0,188 | ++ | ++ |
| P10 | Cocos | Positivo | 0,363 | 0,183 | 0,344 | 0,258 | ++ | - |
| P11 | Cocos | Positivo | 0,349 | 0,192 | 0,366 | 0,188 | + | ++ |
| P12 | Cocos | Positivo | 0,368 | 0,179 | 0,378 | 0,199 | ++ | ++ |
| P13 | Bastonete | Negativo | 0,357 | 0,240 | 0,359 | 0,281 | + | - |
| P14 | Bastonete | Negativo | 0,369 | 0,171 | 0,339 | 0,186 | ++ | ++ |
| P15 | Bastonete | Negativo | 0,353 | 0,189 | 0,367 | 0,277 | +++ | - |
| P16 | Bastonete | Negativo | 0,364 | 0,302 | 0,373 | 0,284 | - | - |

(-) sem oxidação do DCPIP (controle sem bactéria); (+) oxidação sutil do indicador DCPIP; (++) oxidação razoável do indicador DCPIP; (+++) oxidação ótima do indicador DCPIP demonstrando que a fonte de carbono foi metabolizada.

4.2 Crescimento das bactérias isoladas em fenol e xileno como únicas fontes de carbono e energia

No presente trabalho averiguou-se que houve diferentes níveis de perda de coloração do DCPI (oxidação) indicando que o micro-organismo metabolizou a fonte de carbono.

Na FIGURA 2, selecionou-se resultados obtidos que se usou como padrão dos demais resultados encontrados para uma avaliação qualitativa do uso de fenol ou xileno. O controle X (-) todos os tubos que não se observou oxidação do DCPIP o experimento 13 F (+) é o padrão dos tubos que teve uma pequena oxidação do DCPIP, para um azul mais brando. O experimento 3 X (++) utilizou-se como padrão dos tubos que houve grande oxidação visível, mas que ainda possui um leve fundo azulado e o experimento 15 F (+++) utilizou-se como padrão para os tubos que apresentaram uma oxidação total.

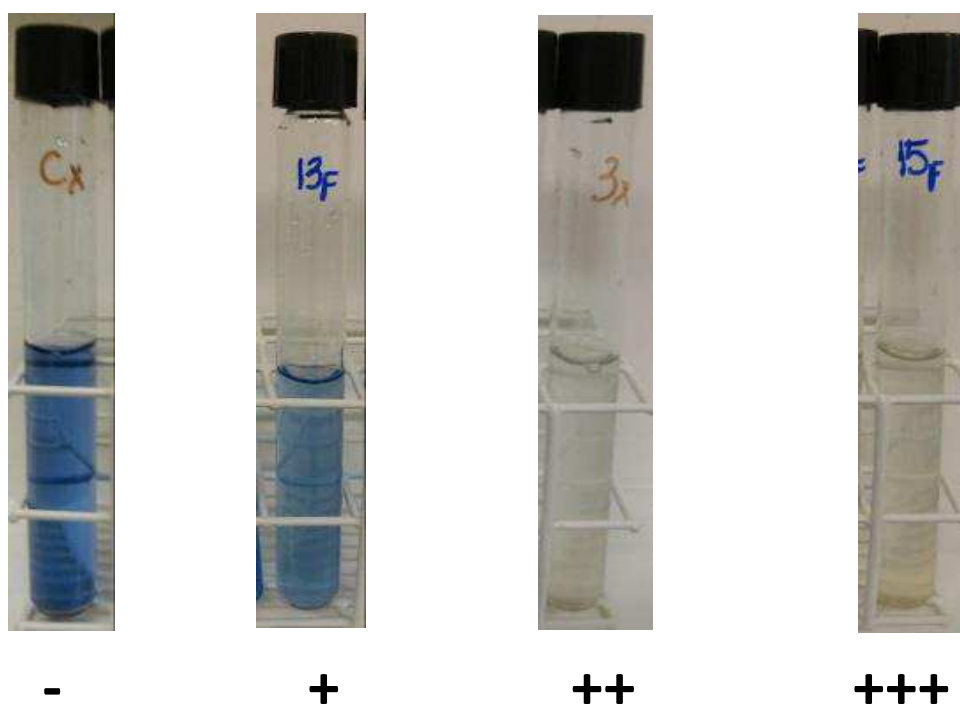


Figura 4 - Padrão qualitativo para avaliação do crescimento das bactérias estudadas em fenol ou xileno como única fonte de carbono com indicador DCPIP. (-) sem oxidação do DCPIP (controle sem bactéria); (+) oxidação sutil do indicador DCPIP; (++) oxidação razoável do indicador DCPIP; (+++) oxidação ótima do indicador DCPIP demonstrando que a fonte de carbono foi metabolizada

No experimento utilizando o fenol como fonte de carbono (Tabela 1), teve-se como resultados que todas os isolados estudados apresentaram aumento de biomassa nos tubos. Nos isolados bacterianos P7 e P16 foram os únicos que não apresentaram oxidação do DCPIP (-). Nos tubos contendo os micro-organismos P11 e P13 houve a oxidação do DCPIP, porém em menor intensidade (+). Os tubos com os micro-organismos P1, P4, P5, P9, P10, P12 e P14 apresentaram o terceiro padrão de oxidação, na qual é possível observar a perda de cor com um leve azulado (++) . E por fim, nos tubos contendo os micro-organismos P2, P3, P6, P8 e P15 apresentou-se o maior de nível de oxidação do DCPIP, tornando-se quase incolores, o que provavelmente indica que eles foram capazes de utilizar toda a fonte de carbono do fenol como substrato do meio.

Em relação à capacidade de metabolizar o fenol, todos os isolados apresentaram crescimento nos tubos na concentração testada (0,65%), sendo que 14 das 16 bactérias (87,5%) isoladas apresentaram capacidade de metabolização total ou parcial de fenol. Estes resultados podem ser considerados bastante satisfatórios, quando comparados a estudos semelhantes, visto que, Ribeiro e colaboradores (2016) tiveram resultados semelhantes a isso, quando estudaram 21 bactérias endofíticas, 15 delas (71,4% dos

isolados) apresentaram crescimento em todas as concentrações que foram testadas (50, 100 e 150 mg.L⁻¹), o que indicou utilização total ou parcial do fenol. No trabalho publicado por Gayathri e colaboradores (2010) verificou-se que dentre os micro-organismos que foram isolados de folhas de manguezais de Pichavaram, Tamil Nadu, 20 deles (55,5%) , apresentaram capacidade de crescer em meio de cultura suplementado com fenol a 0,05% de concentração. Desta forma, o presente trabalho apresentou melhores resultados.

Os compostos fenólicos são os agentes responsáveis por grande parte da diminuição da carga microbiana do vegetal, por isso, as bactérias que tem a capacidade de tolerar o fenol e o xileno são de extrema importância, porque elas continuam viáveis e produzindo diversas substâncias que promovem o crescimento vegetal (SOLEIMANI et al., 2010).

Embora a maior parte da contaminação por fenol seja pelo impacto da ação do homem, os compostos fenólicos são naturalmente produzidos a partir da degradação de polímeros que contenham anéis aromáticos, tais como a lignina e a tanina ou ainda como componente do exsudato produzido pelas raízes (VAN SCHIE & YOUNG, 1998).

No experimento utilizando o xileno como fonte de carbono (em concentração de 650 µl.L⁻¹), teve-se como resultados P1, P2, P8 P10, P13, P15 e P16 apresentaram crescimento microbiano, porém os tubos não apresentaram oxidação do DCPIP (-) (Tabela 1). O micro-organismo P6 apresentou oxidação, porém em menor intensidade (+). Os tubos inoculados com os micro-organismos P3, P4, P5, P7, P9, P11, P12 e P14 foram os experimentos que apresentaram o terceiro padrão de oxidação do DCPIP, nos quais é possível observar a perda de cor com um leve azulado (+ +). Em meio contendo xileno, nenhuma bactéria apresentou a oxidação total do meio com o indicador redox DCPIP.

Sanches (2009) avaliou com o indicador redox DCPIP, o potencial de biodegradação e oxidação de hidrocarbonetos e biodiesel, sendo incluso nesses os BTEX que são hidrocarbonetos e estão presentes no petróleo. E ele verificou-se que na concentração de 1 g.L⁻¹, há maior atividade oxidativa para as linhagens de fungos e bactérias selecionadas na utilização do petróleo como substrato. Sendo que a atividade média de diminuição da cor do DCPIP é maior no petróleo bruto.

Sanches (2009) ainda afirma que em comparação com o biodiesel, o petróleo foi degradado com mais eficiência que o primeiro. A biodegradação ocorre pelo mecanismo de óxido-redução em condições aeróbias.

Esse resultado confirma que em menores concentrações dos BTEX e do DCPIP, os micro-organismos são aptos a degradar, ficando evidente o potencial degradador que pode ter grande contribuição para a minimização da poluição ambiental gerada pelos BTEX, por meio da sua aplicação, com certos aprimoramentos, em tratamentos de biorremediação.

4.3 Potencial de crescimento das bactérias isoladas em corante alaranjado de metila como única fonte de carbono e energia

Além dos estudos de potencial de metabolização de fenol e xileno pelas bactérias, testou-se também a capacidade das mesmas de crescer em meio contendo o azo-corante alaranjado de metila na concentração de 1 g.L^{-1} , observando também se houve descoloração do corante, visto que este corante, assim como fenol possui anéis aromáticos que se assemelham aos anéis aromáticos da lignina.

Como se pode observar na FIGURA 3 não houve crescimento bacteriano, nem tampouco descoloração do corante alaranjado de metila.

Isso pode estar relacionado com a não capacidade dos micro-organismos que foram isoladas em descolorir/degradar o corante utilizando-o como fonte de carbono e energia, ou também pela alta concentração de corante utilizada nos experimentos.

Mancilha e Cavalcante (2006) utilizaram o alaranjado de metila, dentre outros azo-corantes na concentração 0,05 % m/v, que foram incubados em agitador orbital (130rpm) a 28°C , no escuro, por dez dias. E tiveram como resultados, a degradação da maioria dos isolados, porém os níveis de descoloração não foram significativos.

Barreto, 2006 conseguiu dos vinte ensaios realizados, a maior porcentagem de descoloração que encontrou foi em quatro ensaios apenas, mas a porcentagem de descoloração conseguida foi de 96-98%, mostrando que houve clivagem do corante.

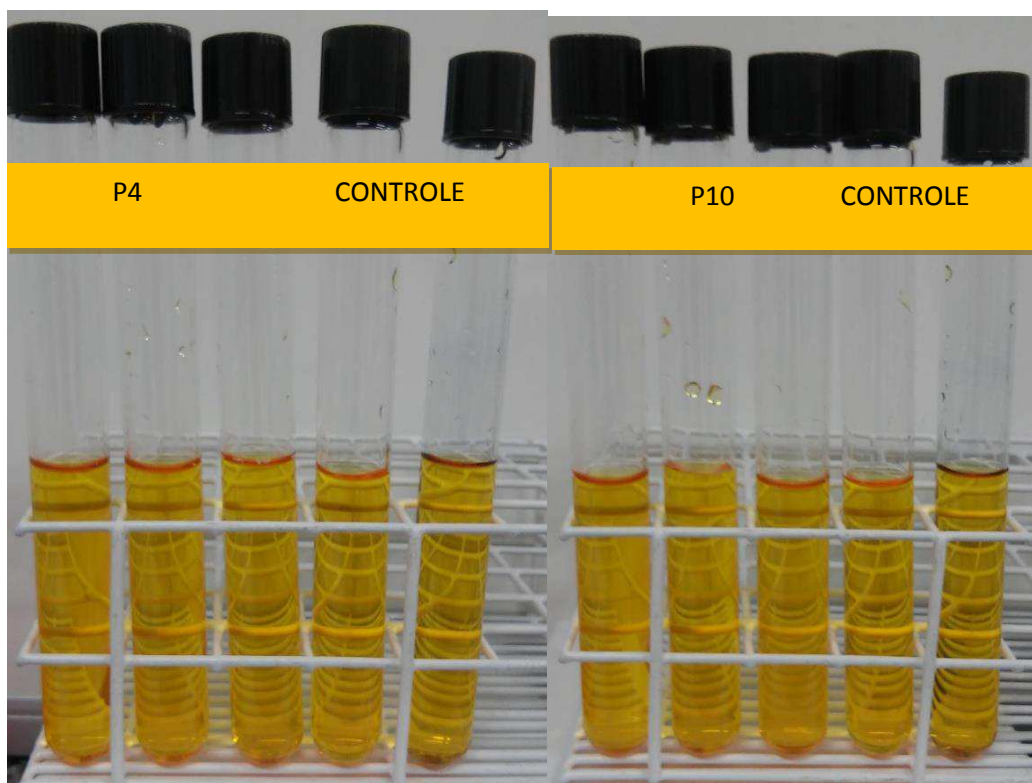


Figura 5 - Foto mostrando a não capacidade de crescimento das bactérias estudadas em alaranjado de metila.

CONCLUSÃO

A utilização de micro-organismo na remediação de ambientes contaminados por poluentes orgânicos pode ser utilizada, mas pode ser aprimorada. Nesse sentido, os resultados demonstram uma grande potencialidade de alguns isolados bacterianos, abrindo possibilidades para avaliação da aplicabilidade destas bactérias em um sistema de biorremediação na recuperação de áreas afetadas pela exposição a hidrocarbonetos e fenol.

REFERÊNCIAS:

- ABRAHANT, E. N.; Dyes and Their Intermediates; **Edward Arnold Ltd.**; London, 1977.
- ABRAHÃO, A. J.; SILVA, G.A. Influência de alguns contaminantes na toxicidade aguda de efluentes da indústria têxtil. **Revista Química Têxtil**, Barueri. 67: 8-34, 2002.
- ALMEIDA-ROTTA, A. P. S. Degradação de fenol por bactérias de dois biomas brasileiros. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.
- ATKINS, P W.; JONES, L. Princípios de Química: questionando a vida moderna o meio ambiente. 3 ed. **Guanabara Koogan**, 2006.
- BANAT, I.M; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial Decolorization of Textile-Dye-Containing Effluents: A Review. **Bioresource Technology**. 58: 217-227, 1996.
- BARRETO, N. S. E. TAKAKI, M. C. G. Descoloração e Detoxificação do azo corante alaranjado por *Geobacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. fluorescens* Isolados e em Cultura Mista. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
- BONFÁ, M. R.L.; GROSSMAN, M. J.; MELLADO, F. P. E.; DURRANT, L. R. Phenol degradation by halophilic bacteria isolated from hypersaline environments. **Biodegrad**. v.24. p.699-709, 2013.
- 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.
- BRITO, N. N. et al. Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais. In: FÓRUM DE ESTUDOS CONTÁBEIS, 4., Rio Claro: Faculdades Integradas Claretianas, 2004.
- BROWN, M.A; DEVITO S.C. Predicting azo dye toxicity. *Crit Rev. Environmental Science and Technology Journal*. v.23, p.249-324, 1993.
- CARVALHO, C. C. Produção de Ligninases por Basidiomicetos através de Fermentação em estado sólido, caracterização e aplicação das enzimas. 112f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2005.
- CHEN W.M.; Chang J.S.; Wu C.H.; Chang S.C. Characterization of phenol and TCE degradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. **Research in Microbiology**. v.155, p.672-680 2004
- COSTA FILHO, G.F.; TEIXEIRA, M.V.; MONTAGNOLLI, R.N.; PAULO, P.R.M.; BIDOIA, E.D. Vegetable oils biodegradability test using redox indicator 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP). Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Bioquímica e Microbiologia, Rio Claro, SP, Brasil, 2010.

- COSTA, A. H. R.; NUNES, C. C.; CORSEUIL, H. X. Biorremediação de águas subterrâneas impactadas por gasolina e etanol com o uso de nitrato. **Eng. Sanit. Ambient.** V.14 n° 2 Rio de Janeiro, 2009.
- degrading bacteria *Microbacterium* sp. EMB-1 and *Rhodococcus* sp. EMB-2 isolated from reed rhizosphere of sunchon bay. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 169-177, 2005.
- DEL RÍO, J. C.; GUTIÉRREZ, A. ; MARTÍNEZ, A. T. Identifying acetylated lignin units in non-wood fibers using pyrolysis-gas chromatography/ mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom.** V.18, p.1181-1185, 2005;
- FATIMA, R. A.; AHMAD, M.. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. **Sci. Total Environ.** v.346: p.256-273; 2005.
- FENGEL, D., WEGENER, G. Wood, chemistry, ultrastructure, reactions. New York: **Waster & Grugter**, p. 613, 1984.
- GAYATHRI, S.; SARAVANAN, D.; RADHAKRISHNAN, M.; BALAGURUNATHAN,R.; KATHIRESAN, K. Bioprospecting potential of fast growing endophytic bacteria from leaves of mangrove and salt-marsh plant species. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 397-402, 2010.
- GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação – Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biociência & Desenvolvimento.** v. 34, p. 36-43, 2005.
- GUARANTINI, C. I. ; ZANONI, V. B. Corantes Têxteis. **Revista Química Nova.** v. 23, p. 71- 78, 2000.
- GUPTA, V.K.; SUHAS, S. Application of low-cost adsorbents for dye removal – A review. **Journal of Environmental Management.** v. 90, p. 2313-2342, 2009.
- HANSON, K. G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, p. 745-748, 1993.
- JACQUES, R. J.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural.**, vol.37, n.4, p. 1192-1201, 2007.
- KANG, S.; OH, K. H.; KAHNG, H. Y. Physiological characterization of BTEX degrading bacteria *Microbacterium* sp. EMB-1 and *Rhodococcus* sp. EMB-2 isolated from reed rhizosphere of sunchon bay. **Korean Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 169-177, 2005.
- KUMARAN, N. S.; DHARANI, G.; Decolorization of textile dyes by white rot fungi *Phanerocheate chrysosporium* and *Pleurotus sajor-caju*. **Journal of Applied Technology in environmental Sanitation.** v. 1, n. 4, p. 361-370, 2011.
- KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S.G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova.** São Paulo, v.25, n.1, p.78-82, 2002.
- MANCILHA, E. S. L.; CAVALCANTI, M. A. Q. Seleção de basidiomycetes coletados e isolados em área de Mata Atlântica – PE com atividade fenol – oxidase e sua aplicação da descoloração de corantes sintéticos. Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE, 2006

- MARIANO, A. P. ANGELIS, D. F.; PIRÔLLO, M. P.; CONTIERO, J.; BONOTTO, M. D. Investigation about the Efficiency of the Bioaugmentation Technique when Applied to Diesel Oil Contaminated Soils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Rio Claro, 52, 5, 1297-1312, 2009.
- McMULLAN, G., MEEHAN, C., CONNEELY, A., KIRBY, N., ROBINSON, T., NIGAM, P., BANAT, I.M., MARCHANT, R., SMYTH, W.F. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** V.56, p.81-87, 2001.
- McMURRY, J., Química Orgânica. Editora CENGAGE Learning. Tradução da 6ª Edição Norte Americana, v. vol. 1 e vol. 2, 2008
- MÖLLER, A.; KAISER, K.; ZECH, W. Lignin, carbohydrate, and amino sugar distribution and transformation in the tropical highland soils of northern Thailand under cabbage cultivation, Pinus reforestation, secondary forest, and primary forest. **Australian Journal of Soil Research**, v.40, p.977-998, 2002.
- MORAES, R. M.; DELITTI, W. B. C.; VUONO, Y. S. Litterfall and litter nutrient content in two Brazilian Tropical Forests. **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, n.1, p.9-16, 1999.
- NAIR, C. I.; JAYACHANDRAN, K.; SHASHIDHAR, S. Biodegradation of phenol. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 25, p. 4951-4958, 2008.
- NAM, K., RODRIGUEZ, W., KUKOR, J.J. "Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by biodegradation combined with a modified Fenton reaction", **Chemosphere**, v. 45, pp. 11-20, 2001.
- OTENIO, M. H.; SILVA, M. T. L.; MARQUES, M. L. O.; ROSEIRO, J. C.; BIDOIA, PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM 852. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 258-261, 2005.
- PÁLIZ, K. P. 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. p.34, 2012.
- RAMACHANDRA, T. V., AHALYA, N.; KANAMADI, R. D. Biosorption: Techniques and mechanisms. CES Technical Report 110, **Centre for Ecological Sciences Indian Institute of Science**, Bangalore, 2009.
- RIBEIRO, I. D. A.; OLIVEIRA, B. F. R.; RODRIGUES, A. A.; SIBOV, S. T.; VIEIRA, J. D. G. Avaliação da capacidade de degradação de hidrocarbonetos e fenol por isolados bacterianos endofíticos de bambu. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.13 n.23; 2016.
- SANCHES, R. J. Seleção de micro-organismos com potencial de biodegradação de hidrocarbonetos e biodiesel. Engenharia Ambiental do Instituto de Geociências e Ciências Exatas – Unesp. Rio Claro SP, 2009.
- SANTOS, G. A.; GAMARGO, F. A. O. Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre: **Genesis**, p.491, 1999.
- SELLE, G. L; Ciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais. Uberlândia, v. 23, n. 4, p. 29-39, 2007.

- SHIKLOMANOV, I.A.. Appraisal and assessment of world water resources. **Water Int** v.25, p.11–32, 2000.
- SILVA, T. R.; VALDMAN, E.; VALDMAN, B.; LEITE, S. G. F. Salicylic acid degradation from aqueous solutions using *Pseudomonas fluorescens* HK44: parameters studies and application tools. **Brazilian Journal of Microbiology**. n. 38, p. 39-44. 2007.
- SOLEIMANI, M.; AFYUNI, M.; HAJABBASI, M. A.; NOURBAKHS, F.; SABZALIAN, M. R.; CHRISTENSEN, J. H. Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. **Chemosphere**, v. 81, n. 9, p. 1084-1090, 2010.
- SOLOMONS, T. W. Graham; Fryhle, Craig B. **Química Orgânica**, vol. 1 e 2. 9 ed. LTC, 2009
- SOUZA, A, F; ROSADO, F,R. Utilização de fungos basidiomicetos em biodegradação de efluentes têxteis. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.2, n.1, p. 121-139, 2009.
- SUZUKI, Y., YODA, T., RUHUL, A.; SUGIURA, W. Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *Bacillus* sp. OY1-1 isolated from soil. **J Biol Chem**. p.276, 2001.
- SWITZER, G. L.; NELSON, L. E. Nutrient accumulation and cycling in Loblolly Pine (*Pinus taeda*) plantation ecosystems: The first 20 years. Soil Science Society of **America Proceedings. Madison.**, v. 36, p. 143 – 147, 1972.
- TAN, K. H. Environment soil science. New York: Marcell Dekker, 255p, 1994.
- THAKUR I.S.; Venna P.; Upadhyaya K. Molecular cloning and characterization of pentachlorophenol-degrading monooxygenase genes of *Pseudomonas* sp. from the chemostat. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.290, p.770-74, 2002.
- 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.
- 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. Disponível em: . doi: 0099-2240/98/\$04.0010
- VIDALI, M. Bioremediation: an overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p.1163-1172, 2001.
- VITAL, A. R. T. et al. Produção de serapilheira e ciclagem de nutrientes de uma floresta estacional semidecidual em zona ripária. **Revista Árvore**, v.28, n.6, p.793-800, 2004.
- WATTS, R. J.; HALLER, D. R.; JONES, A. P.; TEEL, A. L. A foundation for the risk-based treatment of gasoline-contaminated soils using modified **Fenton's reactions**. *J. Hazard. Mater.*, v. 76, p.73-89, 2000.
- YESILADA O.; ASMA D.; CING S. Decolorization of textile dyes by fungal pellets. **Process Biochemistry**. v.38, p.933-938, 2003.
- ZIMMERMANN, T.; KULLA, H. G. e LERNINGER, T.; *Eur. J. Biochem.* 129, 197, 1982.
- ZOLLINGER, H.; Color Chemistry, V. C. H. **Publishers, New York**, 2a ed., 1991.