

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**DEGRADAÇÃO DE 2-CLOROFENOL, 3-CLOROFENOL, 2,4-DICLOROFENOL E ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACETATO**

**POR *Alcaligenes faecalis*.**

PAULO IVO KOEHNTOPP

Florianópolis - SC

1998

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**DEGRADAÇÃO DE 2-CLOROFENOL, 3-CLOROFENOL, 2,4-DICLOROFENOL E ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACETATO**

**POR *Alcaligenes faecalis*.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Nelson H. Gabilan.

Co-orientador: Profª. Dra. Maria de Fátima Carvalho Jonas.

PAULO IVO KOEHNTOPP

Florianópolis - SC

1998

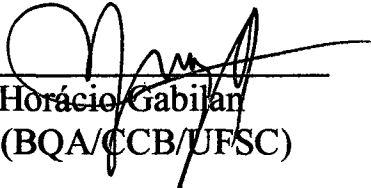
**“DEGRADAÇÃO DE 2-CLOROFENOL, 3-CLOROFENOL, 2,4  
DICLOROFENOL E 2,4 DICLOROFENOXIACETATO POR  
UMA CEPA BACTERIANA DE *ALCALIGENES FAECALIS*”**

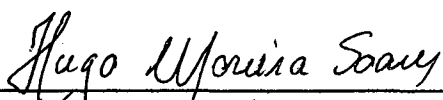
POR

PAULO IVO KOEHNTOPP

Dissertação julgada e aprovada em sua  
forma final, pelo Orientador e membros  
da Banca Examinadora, composta pelos  
Professores Doutores:

Comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Nelson Horácio Gabilan  
Orientador (BQA/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Hugo Moreira Soares  
(EQA/CTC/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Sandra Aparecida Furlan  
UNIVILLE

Florianópolis, outubro de 1998

A parte experimental deste trabalho foi desenvolvida nos Laboratórios do Centro de Desenvolvimento Biotecnológico (CDB) de Joinville e no Laboratório de Microbiologia Aquática da Universidade Federal de Santa Catarina.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Ivo, e a minha mãe, Xênia, pelo incondicional apoio dado em todos os momentos de minha vida;

Ao meu irmão, Fernando, e a minha cunhada, Jair, pela felicidade que proporcionaram a mim e meus familiares com a vinda de Felipe;

Ao orientador e principalmente amigo, Nelson H. Gabilan, que pacientemente, acolheu-me para a execução e discussão deste trabalho, muitíssimo obrigado;

A professora Dra. Sandra A. Furlan e ao Dr. Hugo M. Soares, que gentilmente se dispuseram a compor a banca de avaliação;

A Professora Tereza C. P. Barbosa pela utilização do Laboratório de Microbiologia Aquática e Ambiental e a Moisés Pérez-Barinoto pelo apoio técnico;

A Professora Maria de Fátima Carvalho Jonas pela orientação inicial dos trabalhos;

A UNIVILLE, CDB e UFSC, juntamente com todos os profissionais destas instituições, pela possibilidade do desenvolvimento deste trabalho;

A família Dokonal (Paulo, Ieda, Tatiana e Juliana) pelo apoio durante meus dias em Florianópolis;

Ao companheiro Davi (UNIVILLE), pela ajuda com a montagem das figuras;

Aos amigos Gilmar, Lineu e Cláudio, pelas palavras de incentivo;

A todos os que, pacientemente, souberam suportar minha ausência durante estes dias, principalmente o amigo Mateus;

De coração, meu muitíssimo obrigado.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	i
<b>LISTA DE TABELAS</b>	iii
<b>ABREVIATURA</b>	iv
<b>RESUMO</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vi
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	3
2.1. Compostos recalcitrantes	3
2.2. Biorremediação	4
2.3. Clorofenóis	6
2.3.1. Fenóis monoclorados (2-Clorofenol e 3-Clorofenol)	7
2.3.2. Fenóis diclorados (2,4-Diclorofenol e Ácido 2,4-Diclorofenoxiacetato)	8
2.4. Biodegradação de compostos halogenados aromáticos	9
2.5. Degradação de clorofenóis por <i>Alcaligenes</i>	15
2.6 <i>Alcaligenes faecalis</i> , uma cepa degradadora de fenóis	16
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	19
3.1. Reagentes	19
3.2. Equipamentos	19
3.3. Microorganismos	19
3.4. Preparo do inóculo	20
3.5. Manutenção e conservação das culturas	21
3.6. Estabilidade dos clorofenóis à esterelização	21
3.7. Meios de cultura	21
3.8. Ensaio de degradação de fenol e clorofenóis	22
3.9. Adaptação sucessiva a concentrações crescentes de clorofenóis	22
3.10. Degradação de clorofenóis na presença de fenol	23

3.11. Métodos analíticos	23
3.11.1. Por absorvância	23
3.11.2. Por peso seco de células	23
3.12. Preparação das amostras para análise	24
3.13. Métodos analíticos	24
3.13.1. Determinação de fenol por colorimetria	24
3.13.2. Determinação de fenol e clorofenóis por cromatografia líquida (HPLC)	25
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	26
4.1. Estabilidade dos clorofenóis à esterelização	26
4.2. Análise de clorofenóis por HPLC	26
4.3. Crescimento e degradação de fenol por <i>A. faecalis</i> em meio TEF (fontes de carbono: nutrientes e fenol)	28
4.4. Crescimento e degradação de fenol por <i>A. faecalis</i> em meio MSM (fenol como única fonte de carbono)	31
4.5. Crescimento e degradação de clorofenóis por <i>A. faecalis</i> em meio MSM (clorofenóis como única fonte de carbono)	33
4.6. Crescimento e degradação de 2,4-DCP por <i>A. faecalis</i> em diferentes meios	36
4.7. Crescimento e degradação de 2,4-D por <i>A. faecalis</i> em diferentes meios	38
4.8. Adaptação sucessiva de <i>A. faecalis</i> a concentrações crescentes de clorofenóis	38
4.8.1. Degradação de 2-CP em meio MSM e TEF	40
4.8.2. Degradação de 3-CP em meio MSM e TEF	41
4.8.3. Degradação de 2,4-DCP em meio MSM e TEF	41
4.8.4. Degradação de 2,4-D em meio MSM e TEF	44
4.9. Crescimento sucessivo de <i>A. faecalis</i> em concentrações crescentes de 2,4- DCP	47
4.10. Crescimento sucessivo de <i>A. faecalis</i> em concentrações crescentes de 2,4-D	49
4.11. Composição química dos meios de degradação	49

4.12. Degradação de 2-CP, 3-CP, 2,4-D e 2,4-DCP em meio MSM na presença de fenol (Co-metabólito) por <i>A. faecalis</i>	52
4.12.1. Degradação de 2-CP e 3-CP por <i>A. faecalis</i> na presença de fenol	52
4.12.2. Degradação de 2,4-DCP e 2,4-D por <i>A. faecalis</i> na presença de fenol	55
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>59</b>



## LISTA DE FIGURAS

1.	Estrutura química de biocidas biodegradáveis e recalcitrantes	5
2.	Estrutura química de 2-CP e 3-CP	8
3.	Estrutura química de 2,4-DCP e 2,4-D	8
4.	Via de degradação bacteriana de clorofenóis	11
5.	Vias de degradação bacteriana de fenol: <i>ortho</i> -clivagem e <i>meta</i> -clivagem	13
6.	Processo de humificação de 2,4-D e outros herbicidas junto ao solo	14
7.	Cromatograma representativo de fenol, 2-CP, 3-CP, 2,4-DCP e 2,4-D em meio TEF, obtido por cromatografia em HPLC	27
8A.	Crescimento de <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio TEF contendo 500 mg/L de fenol	29
8B.	Degradação de 500 mg/L de fenol em meio TEF por <i>Alcaligenes faecalis</i>	29
9.	Crescimento bacteriano: relação entre absorvância e o peso seco de células de <i>Alcaligenes faecalis</i>	30
10A.	Crescimento de <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM suplementado com 500 mg/L de fenol	32
10B.	Degradação de 500 mg/L de fenol em meio MSM por <i>Alcaligenes faecalis</i>	32
11A.	Crescimento de <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM na presença de 4 mg/L de fenol, 2-CP, 3-CP, 2,4-DCP e 2,4-D	35
11B.	Degradação de 4 mg/L de fenol, 2-CP, 3-CP, 2,4-DCP e 2,4-D em meio MSM por <i>Alcaligenes faecalis</i>	35
12A.	Crescimento de <i>Alcaligenes faecalis</i> na presença de 4 mg/L de 2,4-DCP em meio MSM suplementado extrato de levedura; succinato ou glicose	37
12B.	Degradação de 4 mg/L de 2,4-DCP por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM suplementado com extrato de levedura; succinato ou glicose	37
13A.	Crescimento de <i>Alcaligenes faecalis</i> na presença de 4 mg/L de 2,4-D em meio MSM suplementado com extrato de levedura; succinato ou glicose	39
13B.	Degradação de 4 mg/L de 2,4-D por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM suplementado com extrato de levedura; succinato ou glicose	39

14A. Degradação sucessiva de 2-CP por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM	42
14B. Degradação sucessiva de 2-CP por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio TEF	42
15A. Degradação sucessiva de 3-CP por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM	43
15B. Degradação sucessiva de 3-CP por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio TEF	43
16A. Degradação sucessiva de 2,4-DCP por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM	45
16B. Degradação sucessiva de 2,4-DCP por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio TEF	45
17A. Degradação sucessiva de 2,4-D por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM	46
17B. Degradação sucessiva de 2,4-D por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio TEF	46
18. Crescimento de <i>Alcaligenes faecalis</i> : adaptação sucessiva a diferentes concentrações de 2,4-DCP (2 a 64 mg/L) em meio TEF	48
19. Crescimento de <i>Alcaligenes faecalis</i> : adaptação sucessiva a diferentes concentrações de 2,4-D (2 a 64 mg/L) em meio TEF	50
20A. Degradação de 6 mg/L de 2-CP por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM, na presença de 20, 50, 200 e 500 mg/L de fenol	53
20B. Concentração residual de 2-CP por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM de 6 a 14 horas	53
21A. Degradação de 6 mg/L de 3-CP por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM, na presença de 20, 50, 200 e 500 mg/L de fenol	54
21B. Concentração residual de 3-CP por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM de 6 a 14 horas	54
22A. Degradação de 2 mg/L de 2,4-DCP por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM, na presença de 20, 50, 200 e 500 mg/L de fenol	56
22B. Concentração residual de 2,4-DCP por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM de 20 a 42 horas	56
23A. Degradação de 2 mg/L de 2,4-D por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM, na presença de 20, 50, 200 e 500 mg/L de fenol	57
23B. Concentração residual de 2,4-D por <i>Alcaligenes faecalis</i> em meio MSM de 20 a 42 horas	57

## LISTA DE TABELAS

1. Composição do meio TEF	20
2. Tempo de retenção e concentração de fenol, 2-CP, 3-CP, 2,4-DCP e 2,4-D, obtidos por cromatograma em HPLC	27
3. Composição dos meios de cultura (em g/L): MSM, TEF e meio nutritivo	51

**ABREVIATURA**

2-CP	2-clorofenol
3-CP	3-clorofenol
4-CP	4-clorofenol
2,3-DCP	2,3-diclorofenol
2,4-DCP	2,4-diclorofenol
2,6-DCP	2,6-diclorofenol
2,4,5-T	Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacetato
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacetato
4-AAP	4-aminoantipirina
AUFS	Pulsos captados por segundo
DCP-hidroxilase	2,4-diclorofenol-hidroxilase
DDT	Tricloro- <i>bis</i> ( <i>p</i> -clorofenil)-etano (herbicida)
GEM	Genetic engineering microorganism
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KDa	KiloDalton
MSM	Meio de sais mínimos
PCBs	Bifenil-policlorados
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHB	Poli-hidroxibutirato
ppm	Parte por milhão
SEM	Erro padrão da média
TEF	Meio enriquecido com fenol
TSB	Caldo tripcase de soja
UV/VIS	Ultravioleta/visível
UFC	Unidades formadoras de colônias
rpm	Rotações por minuto

## RESUMO

As indústrias de papel e celulose e a utilização de herbicidas, inseticidas e fungicidas, produzem os compostos orgânicos halogenados (clorofenóis), que por serem de difícil degradação, constituem um dos grandes grupos de poluentes do meio ambiente.

O objetivo deste trabalho foi estudar a degradação de 2-clorofenol (2-CP), 3-clorofenol (3-CP), 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) e ácido 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) por uma linhagem isolada de *Alcaligenes faecalis*, uma cepa degradadora de fenol. Também foi investigada a indução da capacidade de degradação na presença de fenol (co-metabolismo).

Adaptações sucessivas de *A. faecalis* a 2-CP e 3-CP (16 mg/L) permitiram que estes compostos fossem totalmente consumidos, como única fonte de carbono, em 24 horas. No entanto, ensaios de adaptação apenas permitiram a biodegradação parcial de 4 mg/L de 2,4-DCP e 2,4-D, em 48 horas. A suplementação do meio com extrato de levedura e glicose apenas reduziu o tempo para a degradação dos diclorofenóis. Apesar disso, *A. faecalis* mostrou crescimento na presença de até 64 mg/L de 2,4-DCP e 2,4-D.

Diferentes concentrações de fenol (20, 50, 200 e 500 mg/L) adicionados ao meio (co-metabolismo) reduziram o tempo para a degradação total de todos os clorofenóis testados. Fenol (50 mg/L) demonstrou o melhor efeito na indução da capacidade de degradação de 2-CP e 3-CP (6 mg/L) e de 2,4-DCP e 2,4-D (2 mg/L).

*Alcaligenes faecalis*, mostrou maior capacidade de consumir monoclorofenóis do que diclorofenóis, como única fonte de carbono. Estudos posteriores poderão ser realizados para verificar os mecanismos da degradação e mineralização de clorofenóis, como as enzimas, os metabólitos e testes com a utilização da cepa em biorreatores.

## ABSTRACT

The bleaching kraft pulp, chlorination of potable water, herbicides and fungicides produce chlorinated phenols, which are considered as environmental pollutant due to their high resistance to biological degradation.

This work aimed to study the degradation of 2-chlorophenol (2-CP), 3-chlorophenol (3-CP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by *Alcaligenes faecalis*, a phenol-degrading strain.

Successive adaptation of *Alcaligenes faecalis* to monochlorophenol demonstrated total consumption of 2-CP and 3-CP (16 mg/L), as the only carbon source, after 24 h. However, *Alcaligenes faecalis* was also adapted to 4 mg/L of dichlorophenols (2,4-DCP and 2,4-D), but only a partial degradation of these compounds were detected. When minimum salt medium was supplemented with yeast extract and glucose, the time of total dichlorophenols disappearance was reduced, but no degradation was observed at higher concentration.

Phenol (20, 50, 200 and 500 mg/L) added to minimum salt medium accelerated the degradation of the chlorophenols tested.

*A. faecalis* strain showed a higher ability to degrade monochlorophenols than dichlorophenols, as the only carbon source.

Further studies might be carried out to verify the chlorophenol degradation and mineralization, such as the enzymes involved in the degradation and their metabolites.

## 1. INTRODUÇÃO

No Estado de Santa Catarina, as indústrias de papel e celulose e de cerâmica são grandes produtoras de compostos aromáticos (fenólicos), como resultado do processo de branqueamento da polpa de celulose e da gaseificação do carvão. Os compostos aromáticos são ainda amplamente distribuídos no ambiente, devido a sua presença nos efluentes industriais de coquearias, refinarias, siderúrgicas e minas de carvão.

Compostos aromáticos clorados constituem hoje um dos grandes grupos de poluentes do meio ambiente, como resultado de sua larga utilização, difícil degradação e ampla distribuição como componentes de herbicidas, inseticidas, fungicidas, solventes, fluidos de transferência hidráulica e de aquecimento, componentes na produção de plásticos e intermediários para sínteses químicas (FETZNER & LINGENS, 1994).

Quando os compostos são quimicamente muito estáveis, geralmente não encontrados em moléculas orgânicas de origem biológica, tóxicos a microorganismos e imunes à ataques enzimáticos, como é o caso dos fenóis clorados, eles são ditos recalcitrantes à degradação biológica (ATLAS & BARTHA, 1993). Fenóis e clorofenóis são solúveis em água e podem contaminar lençóis freáticos (FAVA et al., 1995a).

O lançamento e acúmulo destes compostos no meio ambiente, principalmente no meio aquático, reduzem drasticamente a população microbiana dos locais de despejo, resistindo somente os organismos que podem sobreviver com as fontes de energia disponíveis. Assim, a degradação e desaparecimento destes produtos tóxicos pode ser realizado por microorganismos presentes nestes meios (BOUWER & ZEHNDER, 1993).

Vários trabalhos têm procurado estabelecer as condições ideais para a degradação biológica de compostos aromáticos. Alguns microorganismos degradadores podem utilizar estes compostos como única fonte de carbono, enquanto outros necessitam de co-metabólitos para estimular a degradação (HINTEREGGER et al., 1992; ALEXANDER, 1994).

Este trabalho tem por objetivo analisar a capacidade de degradação de 2-clorofenol (2-CP), 3-clorofenol (3-CP), 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) e do ácido 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) por uma cepa bacteriana de *Alcaligenes faecalis*, degradadora de fenóis.

Neste trabalho foram estudados:

- A capacidade da cepa *Alcaligenes faecalis* em degradar os clorofenóis como única fonte de carbono e na presença de nutrientes (contendo outras fontes de carbono),
- a tolerância da bactéria a concentrações crescentes de clorofenóis;
- a influência do fenol como indutor para o co-metabolismo com os clorofenóis.

A busca e a utilização de microorganismos degradadores de clorofenóis pode fornecer resultados básicos, importantes e necessários para a otimização do processo de tratamento de efluentes industriais e biorremediação de ambientes contaminados com clorofenóis.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Compostos recalcitrantes

Compostos químicos que possuem estrutura molecular e/ou seqüências químicas não reconhecidas pelas enzimas degradativas atualmente existentes são chamados de compostos xenobióticos. Por outro lado, a resistência a degradação ou o metabolismo incompleto deste, resulta em certos compostos xenobióticos que se acumulam no meio ambiente, passando a ser denominados recalcitrantes à ação biológica ou simplesmente recalcitrantes. Compostos clorados ou halogenados presos a moléculas; ligações ternárias e quaternárias nos átomos de carbono; excesso de anéis aromáticos; cadeias moleculares muito grandes, p. ex. o polietileno; grande estabilidade às condições ambientais; falha na indução da síntese de enzimas degradativas pelo composto; problemas em relação a entrada do composto na célula, como sua insolubilidade ou tamanho; ou ainda a excessiva toxicidade deste ou de seus metabólitos, são algumas das razões mais comuns para um composto químico se tornar recalcitrante (ALEXANDER, 1994; SILVA & FAY, 1997).

A mineralização de moléculas orgânicas, isto é, a sua degradação a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e/ou outros compostos inorgânicos, é essencial para o ciclo do carbono e a manutenção da vida. A introdução de compostos xenobióticos dentro da biosfera, resulta na persistência de um grande número de compostos químicos como fonte de poluição (RAMOS et al., 1994; HÄGGBLÖM & VALO, 1995).

Práticas de monoculturas e necessidades cada vez maiores da produção de alimentos em larga escala, tem levado a esforços visando o controle de pragas na agricultura. Custos cada vez maiores de mão-de-obra e processos crescentes de mecanização agrícola têm favorecido a prática do uso indiscriminado de biocidas (ATLAS & BARTHA, 1993).

Muitos biocidas são compostos aromáticos halogenados e recalcitrantes ao ataque biológico por possuírem ligações químicas extremamente estáveis. Esta estabilidade é desejável em biocidas (inseticidas e herbicidas), nos quais os clorofenóis estão presentes como princípio ativo nas formulações. Entretanto, esta mesma propriedade torna estes compostos, um grande contaminante ambiental. Em geral, quanto mais extensiva for a introdução de

cloro na cadeia molecular, mais recalcitrante será o biocida (CHAUDHRY & CHAPALAMADUGU, 1991; ATLAS & BARTHA, 1993).

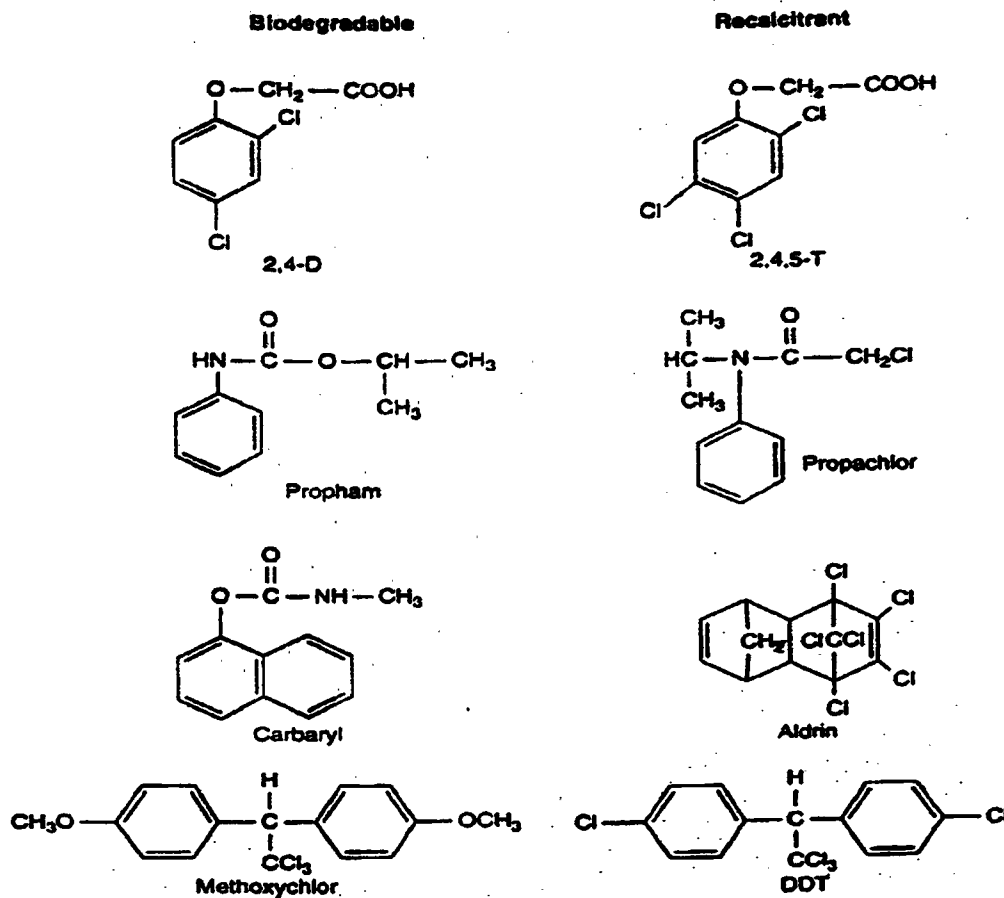
O caráter lipofílico permite a dissolução do fenóis clorados nos lipídios de microorganismos procariotos e eucariotos. Concentrados nas células, estes podem aumentar em duas ou três vezes sua magnitude em relação às concentrações encontradas no meio ambiente. Conseqüentemente, a concentração do poluente aumenta em relação ao nível trófico em que se encontra o organismo. O último nível da cadeia trófica, composto por pássaros, mamíferos carnívoros, peixes predadores, etc..., pode carregar uma carga de poluentes que excede as concentrações encontradas no meio ambiente em fatores de até  $10^4$  a  $10^6$  (BABICH & BORENFREUND, 1987; DANIEL et al., 1993).

A estrutura química de alguns biocidas biodegradáveis e outros recalcitrantes estão apresentados na Figura 1.

## 2.2. Biorremediação

O rápido desenvolvimento da química orgânica sintética durante o último século permitiu o surgimento de uma variedade de novos compostos que por despejo natural ou acidental, alcançaram o meio ambiente. Apesar disso, grande parte dos compostos sintéticos possuem similares ou quase similares na natureza, e são sujeitos à degradação microbiana (biodegradação), mesmo que muito lentamente (ATLAS & BARTHA, 1993).

A biodegradação de poluentes ambientais é um processo complexo que, em seus aspectos qualitativos e quantitativos, depende da natureza e da quantidade do poluente a ser tratado, do próprio ambiente em que tais compostos foram despejados, dos aspectos sazonais ligados ao ambiente em questão e da comunidade microbiana local. O processo que envolve a recuperação do meio ambiente (solos e águas contaminadas), utilizando microorganismos degradadores de compostos tóxicos é chamado de biorremediação (BOUWER & ZEHNDER, 1993; ALEXANDER, 1994). Poluentes aromáticos presentes em despejos industriais e contaminando áreas específicas, poderiam ser eliminados por sistemas de biorremediação de baixo custo (FIELD et al., 1995; CAPLAN, 1993).



**Figura 1** - Estrutura química de biocidas biodegradáveis e recalcitrantes (ATLAS & BARTHA, 1993).

Compostos cloroaromáticos contidos em efluentes industriais podem ser recuperados através de vários processos, como adsorção com carbono ativado (CHUDKY & SNOEYINK, 1984), extração com solventes, oxidação química ou polimerização com enzimas (KLIVANOV et al., 1983; DAVIS & BURNS, 1990).

A eficiência do tratamento dos efluentes industriais e a biorremediação de ambientes contaminados poderia ser aumentada com a seleção de cepas degradadoras de compostos tóxicos. A degradação de compostos fenólicos poderia ser melhorada através do estudo de microorganismos que estão presentes nestes ambientes ou de seus produtos metabólicos, como as enzimas (DAVIS & BURNS, 1990, 1992; FIELD et al., 1992;

HINTEREGGER et al., 1992).

Ambientes aquáticos e efluentes industriais contendo compostos fenólicos podem ser descontaminados por enzimas como as peroxidases. As enzimas formam polímeros insolúveis dos compostos aromáticos que precipitam e então podem ser retiradas do meio por sedimentação e/ou filtração. Vários autores demonstraram que peroxidases produzidas por algumas células de raízes vegetais, como a batata, raiz forte e gengibre, exercem a mesma função das enzimas fúngicas. Águas residuais de indústrias contendo até 850 ppm de fenol, 2,4-D, 2,4-DCP, 2-CP e 2,6-DCP foram tratadas com eficiência por peroxidases (KLIVANOV et al., 1983; ADLER et al., 1994; DEC & BOLLAG, 1994).

### 2.3. Clorofenóis

Desde 1920, fenóis clorados tem sido intensamente usados na indústria e na agricultura como biocidas de largo espectro. Eles são utilizados na proteção da madeira contra fungos e, em combinação com creosoto, na proteção de estacas e dormentes ferroviários, além de tintas e óleos contra a ação biológica. A queima de madeira recém cortada também resulta em clorofenóis como poluente atmosférico (ALEXANDER, 1994; HÄGGBLUM & VALO, 1995). Clorofenóis são formados por vários processos: cloração da água potável contendo resíduos húmicos, combustão de matéria orgânica na presença de cloro e incineração de dejetos sólidos municipais.

A produção de um grande número de compostos fenóis clorados ocorre durante o branqueamento da polpa de celulose. Durante este processo, cerca de 100 a 300 g de clorofenóis são produzidos por tonelada de polpa, o que representa apenas uma pequena parcela do total de organoclorados despejados mundialmente por processos industriais.

A produção anual de clorofenóis foi estimada em mais de 200.000 toneladas, dos quais 80%, utilizada principalmente como protetores para madeira. Os clorofenóis são intermediários na síntese de vários biocidas, mas suas formulações contém várias “impurezas” (dioxinas, dibenzofuranos, fenoxifenóis). Em função destas “impurezas” e da persistência dos fenóis no ambiente, o uso dos clorofenóis tem sido recentemente restrito ou banido de muitos países, como a Suécia, Finlândia, Alemanha e Japão. Assim, a produção e o uso de fenóis

clorados tem decrescido substancialmente (ATLAS & BARTHA, 1993).

Os clorofenóis contribuem para a poluição do meio ambiente, pois são solúveis em água e podem contaminar lençóis freáticos (FAVA et al., 1995a). A biorremediação de aquíferos contaminados com compostos fenóis clorados constituem um complexo problema. Após 5 anos, lençóis freáticos contaminados por 200 mg/L de clorofenóis, ainda apresentaram taxas residuais de 30 a 50 mg/L (HÄGGBLÖM & VALO, 1995). Enquanto alguns dos fenóis clorados são dehalogenados anaerobicamente, outros servem como substrato em situações de aerobiose ou são atacados somente em co-metabolismo, na presença de outras substâncias, que podem ou não ser degradadas simultaneamente (ATLAS & BARTHA, 1993; ALEXANDER, 1994).

Do ponto de vista da toxicidade dos fenóis e dos clorofenóis, um grande problema é a diversidade de compostos tóxicos em muitas formulações, principalmente com relação às misturas de bifenil-policlorados (PCBs) e clorofenóis em biocidas (inseticidas e herbicidas) (BOYLE, 1992; FETZNER & LINGENS, 1994). No homem, intoxicações por fenol e fenóis clorados produzem diarreia, úlceras labiais, urina escura, ardência labial, etc... A presença prolongada de indivíduos a concentrações de 10 a 240 mg/pessoa/dia pode levar a morte (BAKER et al., 1978). Ratos de laboratório tratados com 5, 50 e 500 ppm de 2-CP por 3 semanas, mostraram perda de peso corporal, diminuição das taxas de fertilidade das fêmeas, maior número de crias recém-nascidas mortas e diminuição do número de anticorpos (EXON & KOLLER, 1982).

Solos e águas contaminados por clorofenóis podem ser descontaminados por processos de tratamento de efluentes convencionais, como por exemplo, lagoas de oxidação, plantas de tratamento de lodo ativado, biorreatores de leito fluidizado, inoculação de microorganismos degradadores e por tratamentos de precipitação com sistemas enzimáticos (WISERCARVER & FAN, 1988; DAVIS & BURNS, 1990).

### **2.3.1. Fenóis monoclorados (2-Clorofenol e 3-Clorofenol)**

O 2-CP e 3-CP são formados pela cloração de águas residuais contendo fenol e pela quebra de pesticidas fenólicos. O 2,3-DCP pode ser transformado em 2-CP ou 3-CP e o 2,4-

DCP pode produzir 2-CP (NICHOLSON et al., 1992; ALEXANDER, 1994).

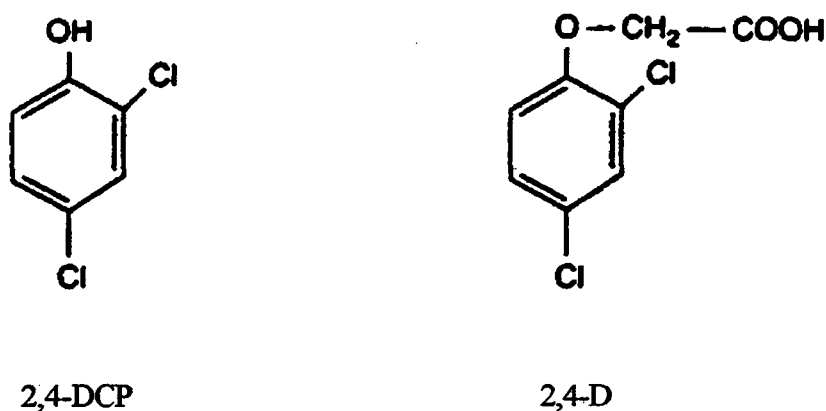
A Figura 2 abaixo mostra a estrutura química do 2-CP e do 3-CP.



**Figura 2** - Estrutura química de 2-CP e 3-CP.

### 2.3.2. Fenóis diclorados (2,4-Diclorofenol e Ácido 2,4-Diclorofenóxiacetato)

A Figura 3 abaixo mostra a estrutura química do 2,4-DCP e do 2,4-D.



**Figura 3** - Estrutura química de 2,4-DCP e 2,4-D.

O herbicida sintético 2,4-D é um dos mais utilizados em todo o mundo (HÄGGBLÖM & VALO, 1995). Este composto é encontrado em efluentes da indústria de papel e celulose como resultado do processo de branqueamento da polpa de celulose. O composto 2,4-DCP também é largamente utilizado como herbicida em todo o mundo (HÄGGBLÖM & VALO, 1995). A 2,4-diclorofenol hidroxilase (DCP-hidroxilase) é a

enzima chave na via de degradação de 2,4-D em muitas bactérias e catalisa a conversão de 2,4-D em 2,4-DCP (FUKUMORI & HAUSINGER, 1993a; DAUGHERTY & KAREL, 1994). O 2,4-D também pode ser resultado da degradação biológica do 2,4,5-T (ácido triclorofenóxiacetato), utilizado como herbicida (HÄGGBLÖM & VALO, 1995).

#### **2.4. Biodegradação de compostos halogenados aromáticos**

O termo degradação biológica ou biodegradação tem sido usado para descrever transformações (biotransformações) de todo o tipo, incluindo aquelas que finalizam em produtos mais complexos e tóxicos que o composto químico inicial. Também é utilizado para designar processos que resultam na completa oxidação do composto orgânico a  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}^3$  e/ou outros compostos inorgânicos. Em muitos casos, as transformações microbianas resultam em metabólitos mais estáveis e mais tóxicos que o composto inicial. Mesmo assim, o processo é caracterizado como degradação, pois o composto original foi consumido. Esta terminologia tem provocado confusões em relação à legislação de controle de emissão de compostos altamente tóxicos. Geralmente o termo mineralização tem sido proposto para descrever a degradação final de uma molécula orgânica em seus constituintes minerais,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  (HÄGGBLÖM & VALO, 1995). Neste trabalho o termo degradação foi utilizado com o significado de desaparecimento de fenol e de clorofenóis do meio extracelular. Os métodos empregados não permitiram verificar a completa mineralização destes compostos ou sua transformação para outros, que podem não ter sido detectados nas análises.

Limitações ambientais à biodegradação podem ser a excessiva concentração do poluente, concentrações desfavoráveis de nutrientes e minerais (ATLAS & BARTHA, 1993). A densidade da população de células do sistema bem como a concentração xenobiótico/biomassa exercem um importante efeito na mineralização dos compostos químicos. Além disso, influem também as condições como pH, temperatura e co-metabolismo com outros xenobióticos menos tóxicos, como por exemplo fenol, tolueno e benzeno (KOROL et al., 1989; HAIGLER et al., 1992). Muitas bactérias e fungos podem mineralizar clorofenóis, mas a biorremediação por microorganismos também pode levar

muitos anos, mesmo que as condições de pH, nutrientes e oxigênio sejam favoráveis (LAINE & JORGENSEN, 1996).

Condições de limitação de oxigênio diminuem a biodegradação, pois as etapas iniciais do catabolismo de compostos alifáticos, cíclicos e aromáticos por bactérias e fungos envolvem a oxidação do substrato por oxigenases. A adição de nitrogênio, fósforo, fertilizantes (contendo N-P-K), sais de amônia e potássio, podem acelerar o processo de biodegradação. Quanto ao pH, geralmente uma faixa ótima entre 5 e 7,8 (LEAHY & COLWELL, 1990).

A adaptação dos microorganismos contra a toxicidade dos xenobióticos ocorre através de uma modificação na membrana lipídica. A tolerância a hidrocarbonetos cíclicos é quase restrita às bactérias Gram-negativas, devido à sua maior concentração de lipídeos na membrana celular. Nas *Pseudomonas*, a adaptação para tolerar solventes orgânicos, parece estar na isomerização dos ácidos graxos insaturados cis e trans da parede celular (HEIPIEPER et al., 1994).

Segundo HÄGGBLOM & VALO (1995), existe um mecanismo geral para a degradação de clorofenóis por microorganismos. Bactérias aeróbias podem ser divididas em 2 grupos distintos, baseados na sua especificidade pelo substrato e no mecanismo de degradação, ou seja: cepas capazes de degradar penta-, tetra-, e triclorofenóis; e cepas que degradam mono- e diclorofenóis. Fenóis policlorados são geralmente degradados por declorinação inicial, via hidroxilação e declorinações redutivas, com a clivagem do anel aromático ocorrendo depois que todos ou quase todos os cloros tenham sido removidos. Por outro lado, os fenóis mono- e diclorados são geralmente degradados via catecol clorado, com declorinação depois da clivagem do anel aromático.

A degradação bacteriana de clorofenóis ocorre, provavelmente, via orto-fissão de clorocatecol à ácido mucônico (Figura 4), sendo o cloro eliminado por lactonização (SPAIN & NISHINO, 1987; TIMMIS et al., 1994).

Organismos individuais (culturas puras) podem metabolizar um limitado espectro de compostos fenólicos clorados. Entretanto, populações de vários organismos (culturas mistas), com suas várias enzimas de degradação, são mais aptas para a degradação de estruturas químicas complexas (LEAHY & COLWELL, 1990). Quando se trata de comunidades microbianas, nem todos os membros podem necessariamente degradar o



composto tóxico em questão, sendo que “alguns assumem o papel de somente alterar a estrutura da molécula para esta, em seguida, ser utilizada por outros microorganismos desta comunidade” (SHIMP & PFAENDER, 1985).

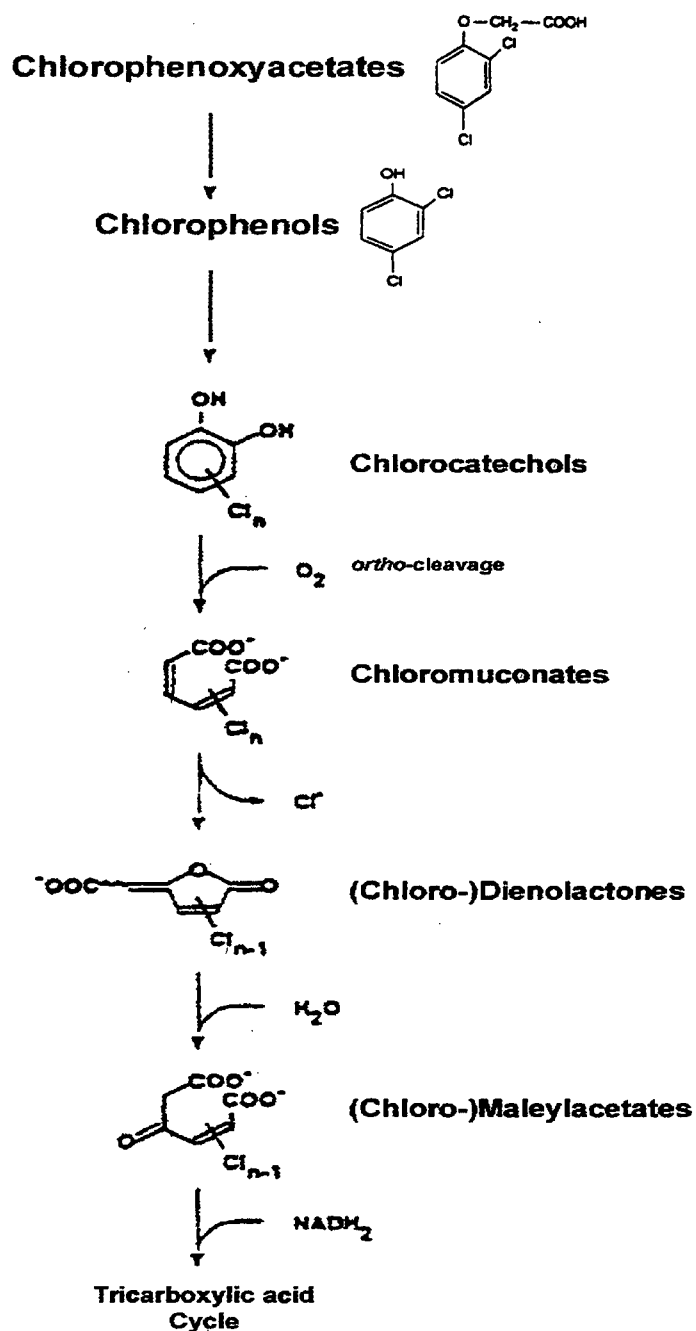


Figura 4 - Via de degradação bacteriana de clorofenóis (SCHLÖMANN, 1994).

Microorganismos encontrados em lagoas de tratamento de efluentes da indústria de papel e celulose foram capazes de degradar de 0,1 a 0,5 mM de fenol, 4-CP, 2,4-DCP e 2,4-D (CESPEDES et al., 1996). Experimentos com lodo ativado em reatores contínuos, recebendo efluentes industriais suplementados com 0,57 g/L de fosfato de amônia e 0,24 g/L de sulfato de amônia, demonstraram a capacidade deste em remover 99,5% de uma concentração inicial de 1420 mg/L de 2,4-D e 50 mg/L de 2,4-DCP em 35 horas (Mc ALLISTER et al., 1993).

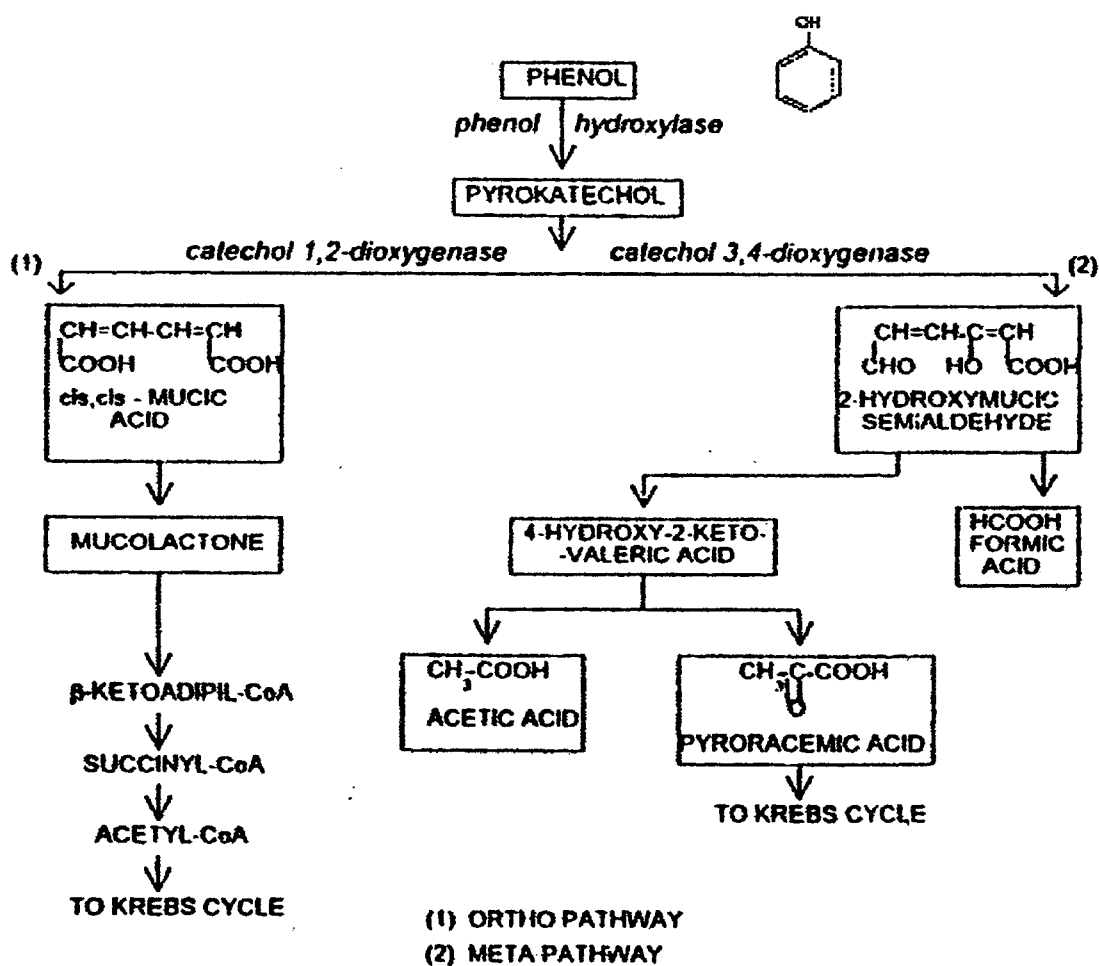
Culturas puras de *Pseudomonas picketti* utilizaram totalmente 2-CP (1,51 mmol/L), 3-CP (0,57 mmol/L) e 4-clorofenol (0,75 mmol/L), como única fonte de carbono, em 30-40 horas (FAVA et al., 1995b).

Compostos aromáticos como os fenóis, clorofenóis, cresóis, xileno e tolueno sofrem processos de biodegradação basicamente através de duas rotas degradativas (YANG & HUMPHREY, 1975; HINTEREGGER et al., 1992), a *meta*-clivagem e a *orto*-clivagem. A maioria das bactérias degradam os compostos fenólicos via *meta*-clivagem, oxidando o grupo hidroxila, como por exemplo no gênero *Pseudomonas* (Figura 5).

GREER et al. (1990) demonstraram que uma cepa *Pseudomonas cepacia* BRI6001, isolada de turfa por enriquecimento da cultura utilizou 2,4-D como única fonte de carbono e energia. Esta cepa foi capaz de crescer em meio MSM em concentrações de até 13 mM de 2,4-D e degradar 1 mM deste composto em 52 horas. Outra cepa de *Pseudomonas cepacia* CSV90 também utilizou 2,4-D como única fonte de carbono (BHAT et al., 1994).

Estudos em solos revelaram que a degradação de 2,4-D ocorre com grandes diferenças de eficiência na presença ou ausência de oxigênio. A degradação aeróbia foi até 2 vezes mais rápida do que a anaeróbia, em experimentos realizados na presença de 2,4-D (ESTRELLA et al., 1993).

A meia vida relativamente curta de 2,4-D, em solos contaminados, tem sido atribuída à ação de bactérias de diferentes gêneros com capacidade de mineralizar ou co-metabolizar completamente este composto (SINTON et al., 1986). A rota de degradação de 2,4-D por bactérias de solo tem sido investigada por alguns autores (DUXBURY et al., 1970; EVANS et al., 1971; THIELE et al., 1987).



**Figura 5** - Vias de degradação bacteriana de fenol: *orto*-clivagem e *meta*-clivagem (BODZECK et al., 1994).

Evidências mostraram que resíduos de biocidas a base de 2,4-D e outros clorados, podem se agregar ao solo húmico, como mostra a Figura 6. A humificação é parte do ciclo natural do carbono e não deveria estar exposto a resíduos de biocidas. Entretanto, alguns biocidas preservam seu caráter xenobiótico se ligado ao húmus e quando liberado subsequente por biodegradação da matriz do solo húmico adjacente. A ligação biocida – húmus pode contaminar sítios e biota as quais nunca antes foram expostas ao contaminante, afetando a fertilidade do solo e consequentemente a saúde humana (ATLAS & BARTHA, 1993).

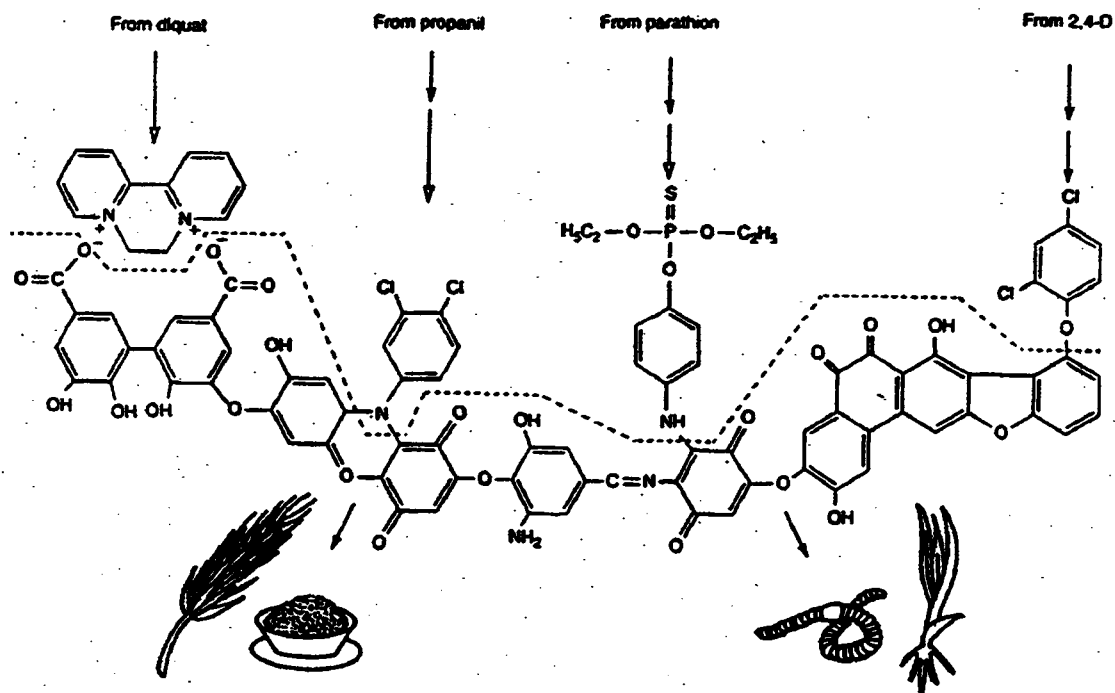


Figura 6 - Processo de humificação de 2,4-D e outros herbicidas junto ao solo (ATLAS & BARTHA, 1993).

Comunidades microbianas ou bactérias isoladas adaptadas à presença de fenol, aumentam o potencial de degradação quando submetidas sucessivamente a baixas concentrações. Assim, a adaptação é definida como “o incremento na capacidade de microorganismos em degradar um composto tóxico após ter sido submetido a um prolongado tempo de exposição ao agente químico” (SHIMP & PFAENDER, 1985).

Experimentos realizados por BOYD & SHELTON (1984) demonstraram que consórcios de microorganismos aclimatados aos fenóis clorados podem produzir vias de degradação diferentes daqueles não submetidos ao processo de adaptação. Além disso, a adaptação resultou em uma crescente capacidade de degradação de quantidades cada vez maiores dos compostos testados.

Estudos de degradação de 0,1 mM de 2-CP, 3-CP e 2,4-DCP com inóculo de sedimento estuarino revelaram uma total degradação destes compostos entre 120 e 220 dias. Quando as culturas foram realimentadas com estes compostos na mesma concentração anterior, a degradação total ocorreu em 40 dias (HÄGGBLÖM & YOUNG, 1990).

Alguns microorganismos degradadores podem utilizar clorofenóis como única

fonte de carbono. Outros necessitam da presença de indutores como co-metabólitos para estimular a degradação do composto tóxico (SHIMP & PFAENDER, 1985; HINTEREGGER et al., 1992; BABU et al., 1995; FAVA et al., 1995a).

Em relação a adaptação de microorganismos à concentrações crescentes de compostos xenobióticos recalcitrantes, existem processos de co-metabolismo, e o termo “degradação” indica tanto a alteração ou quebra da molécula quanto a utilização da energia derivada destes processos (RAMOS & TIMMIS, 1987).

## 2.5. Degradação de clorofenóis por *Alcaligenes*

STEIERT & CRAWFORD (1985) desenvolveram uma nova cepa (geneticamente modificada, GEM) de *Alcaligenes* chamada A7-2, a partir de uma cepa A7, com habilidade para degradar fenol, 2-CP, 3-CP e 4-CP, como única fonte de carbono, em 24 horas.

*Alcaligenes eutrophus* JMP134, uma cepa geneticamente “construída” (GEM) mostrou capacidade de degradar 2,4-D através de hidroxilação para clorocatecol por dehalogenação, depois da clivagem do anel aromático. Esta cepa utilizou totalmente 5 mM de 2,4-D, como única fonte de carbono, em 5 dias (de BONT et al., 1986; PIEPER et al., 1988). Fenol (2 mM) também foi utilizado como única fonte de carbono (PIEPER et al., 1989).

GREER et al. (1992) comprovaram que cepas de *Alcaligenes*, *Pseudomonas* e *Bordetella*, isoladas de lagoas de tratamento de efluentes industriais, consumiram 1 mg/ml de 2,4-D, em meio de sais mínimos (MSM). Amostras de solo agrícola tratadas e não tratadas com 2,4-D mostraram que 57% dos microorganismos degradadores deste composto, isolados através da técnica de PCR, foram de cepas pertencentes aos gêneros *Sphingomonas*, *Pseudomonas* ou *Alcaligenes* (KA et al., 1994).

CLÉMENT et al. (1995) descreveram a capacidade da cepa *Alcaligenes eutrophus* JMP134, em degradar, como única fonte de carbono, 4-CP, 2,4-DCP e 2,4,6-triclorofenol. Uma completa degradação de 0,4 mM de 2,4,6-triclorofenol, foi observada na presença (co-metabolismo) de 0,4 mM de fenol, em 48 horas. O 2,4-DCP também foi degradado em co-metabolismo com fenol, em meio de sais mínimos, em 18-20 horas.

Fenol e 4-clorofenol foram degradados em co-metabolismo por uma cepa de *Alcaligenes eutrophus*, em 64 horas. A presença do fenol reduziu a produção de biomassa, mas incrementou a fase de adaptação para o crescimento exponencial (HILL et al., 1996).

A via de mineralização de 2,4-D foi primeiramente estabelecido no gênero *Arthrobacter* e é semelhante em *Alcaligenes eutrophus* JMP134. Primeiro, ocorre a remoção da radical acetato lateral, hidroxilação do 2,4-DCP, abertura do anel 3,5-diclorocatecol e subsequente conversão para succinato, que entra no metabolismo (GREER et al., 1990; HAUGLAND et al., 1990; FUKOMORI & HAUSINGER, 1993b).

## **2.6. *Alcaligenes faecalis*, uma cepa degradadora de fenóis**

Algumas indústrias de cerâmica e de energia (termoelétricas) do Estado de Santa Catarina, utilizam nos seus processos de produção, a gaseificação do carvão. O produto (efluente) da gaseificação do carvão, também chamado de liquor fenólico amoniacoal (pH 7 a 8), contém principalmente altas concentrações de fenol e derivados de fenóis (2,5 a 3,5 g/l). Os compostos fenólicos (fenol, cresóis, dimetil-fenóis, catecol, etc...) são os principais componentes do efluente da indústria de Cerâmica Eliane (Cocal do Sul, SC). Além destes compostos, o efluente também contém altas concentrações de tiocianato e amônia, traços de cianetos e sulfatos, BTX (benzeno, tolueno e xileno) e hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs), formados como subprodutos da gaseificação do carvão (LUTHY & TALLON, 1980). O efluente é tratado na empresa através de um sistema de lodo ativado. Provavelmente, este lodo ativado contém vários microorganismos resistentes e/ou com capacidade de degradar os compostos orgânicos, principalmente fenóis, presentes no efluente industrial.

Projetos desenvolvidos na UFSC, no Laboratório de Microbiologia Aquática e Ambiental e no Departamento de Bioquímica selecionaram do lodo ativado da Estação de Tratamento de Efluentes da Indústria de Cerâmica Eliane, várias bactérias degradadoras de fenol e cresóis (PÉREZ-BARINOTTO et al., 1996). Uma destas cepas, identificada como *Alcaligenes faecalis*, foi adaptada a diversas concentrações do efluente industrial. Esta cepa demonstrou a capacidade de degradar fenol e cresóis

presentes no efluente, em meio suplementado apenas com sais mínimos (meio MSM). Além disso, também consumiu rapidamente fenol em altas concentrações, de até 500 mg/L, como única fonte de carbono e energia (BARBOSA et al., 1995).

Esta espécie de bactéria se caracteriza por microorganismos Gram-negativo, forma de bastonetes de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 0,5 a 2,6  $\mu\text{m}$  de comprimento. Eles são móveis com 1 a 8 (ocasionalmente até mais de 12) flagelos e o estágio na forma de esporos é desconhecido. Também são obrigatoriamente aeróbios, com o oxigênio como acceptor final de elétrons no metabolismo respiratório. A temperatura ótima de cultivo de *Alcaligenes faecalis* é de 20 a 37°C e as colônias em ágar são não pigmentadas com reações de oxidase e catalase positiva. Os carboidratos não são utilizados como única fonte de carbono, mas as cepas apresentam bom crescimento em vários ácidos orgânicos, acetato e aminoácidos. Respiração anaeróbia foi observada com nitrito, mas não com nitrato, como acceptor final de elétrons. Os microorganismos são encontrados na água (não no ambiente marinho) e solo e alguns são habitantes comuns do trato intestinal de vertebrados. *Alcaligenes faecalis* é não patogênica e tem sido isolada de material clínico como sangue, urina, fezes, nematóides, insetos, etc... (HOLT & KRIEG, 1984).

A cepa degradadora de fenóis *Alcaligenes faecalis*, isolada do lodo ativado da Estação de Tratamento de efluentes da indústria de cerâmica foi utilizada neste trabalho. Como esta bactéria é encontrada no lodo ativado, um meio contendo vários componentes tóxicos da gaseificação de carvão (fenóis, tiocianatos, cianetos, sulfatos, alcatrão, metais pesados, BTX, PAHs, etc...), é provável que possua resistência e/ou capacidade de degradar os diferentes compostos aromáticos presentes no meio. Devido a estas características, a capacidade de degradação de clorofenóis nestas cepas ocorre em condições muito “especiais” e bastante interessantes, com vistas a sua possível utilização em processos de bioremediação.

Na literatura consultada, existem poucos trabalhos sobre a degradação de compostos cloroaromáticos por cepas “selvagens” do gênero *Alcaligenes*. Em trabalho recente, KANG et al. (1998) realizou a clonagem de uma enzima da via de degradação de fenóis de uma cepa *Alcaligenes eutrophus*. A maioria dos trabalhos foi desenvolvida com *Alcaligenes eutrophus*, modificada geneticamente (STEIERT & CRAWFORD, 1985; de BONT et al., 1986; PIEPER et al., 1988; PIEPER et al., 1989; JACOBSEN &

PEDERSEN, 1991; GREER et al. 1992; SPRINGAEL et al., 1993; COLLARD et al., 1994; CLÉMENT et al., 1995).

Estas cepas tem sido muito mais estudadas devido à sua capacidade de sintetizar e degradar os poli-hidroxibutiratos (PHBs), que poderão vir a ser utilizadas como “plásticos biodegradáveis” (CHUA et al., 1998).

Além do trabalho de SUROVTSEVA et al. (1981) demonstrando a degradação de 3,4-dicloroanilina, não há qualquer trabalho descrevendo a degradação de clorofenóis por *Alcaligenes faecalis*.

Este trabalho teve como objetivo analisar a capacidade de uma cepa bacteriana de *Alcaligenes faecalis* em degradar fenol, 2-CP, 3-CP, 2,4-DCP e 2,4-D, como única fonte de carbono, assim como verificar a adaptação da cepa a concentrações crescentes de clorofenóis e o co-metabolismo na presença de fenol.

Os resultados deste trabalho podem auxiliar no conhecimento sobre a capacidade de degradação de compostos clorados por *Alcaligenes faecalis*, com a possibilidade de viabilizar a utilização desta cepa selecionada sobre ambientes e efluentes contaminados com clorofenóis.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Reagentes

Os reagentes utilizados foram os seguintes: TSB - Caldo Tripcase de Soja, Bacto-agar (DIFCO, Alemanha); 2-CP, 2,4-DCP, 2,4-D, Succinato, 4-aminoantipirina, Ferricianeto de potássio (SIGMA Chemical, USA); 3-CP (ALDRICH, Alemanha); Extrato de levedura granulada, Glicose monohidratada, Metanol e Ácido acético glacial (MERCK, Alemanha); Fenol (Grupo Química). Outros sais e reagentes foram de qualidade PA.

#### 3.2. Equipamentos

Os seguintes equipamentos foram utilizados: Agitador CERTOMAT U acoplado a estufa CERTOMAT UK (B. Braun Alemanha); pHmetro CG840 (SCHOTT, Alemanha), Espectrofotômetro UV-160A (Shimadzu, Japão); Leitora de microplacas SLT (MICROTITER READER, USA) e Sistema de cromatografia líquida - HPLC (MERCK-HITACHI, Alemanha).

#### 3.3. Microorganismos

*Alcaligenes faecalis* isolada do lodo ativado da lagoa de oxidação de efluentes da gaseificação de carvão, na Estação de Tratamento de Efluentes da Indústria de Cerâmica Eliane S. A (Cocal do Sul, SC). As cepas foram isoladas pelo Laboratório de Microbiologia Aquática do Departamento de Ecologia-Zoologia (UFSC) e identificadas através de Galerias API 20-NE (Biomérieux, França) (PÉREZ-BARINOTTO et. al, 1996). Esta cepa bacteriana foi utilizado nos experimentos descritos a seguir.

### 3.4. Preparo de inóculo

As condições de cultivo da cepa de *Alcaligenes faecalis* foram definidas em ensaios anteriores realizados no Laboratório de Microbiologia Aquática por PÉREZ-BARINOTTO et al. (1996), segundo um método modificado descrito por GREER et al. (1990).

Para a "ativação" e crescimento da cepa foi utilizado o meio TEF, composto por TSB (Caldo tripcase de soja) (2,5 g/L) contendo Fenol (500 mg/L), pH 7,2. O meio de cultura TEF contém vários outros componentes listados na Tabela 1. As cepas foram retiradas (uma "alçada") do meio sólido de manutenção (item 3.5.) e transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL, fechados com rolha de algodão e gaze, contendo 50 mL de meio de cultura TEF. As culturas foram crescidas durante 24 horas, sob agitação de 170 min<sup>-1</sup> e temperatura de 30°C. Para a produção de biomassa, foram retirados 5 mL (pré-inóculo) e inoculados novamente em 45 mL de meio TEF em frascos Erlenmeyer de 250 mL, nas mesmas condições anteriores. Após 9 horas de crescimento em meio TEF, o que correspondia ao final da fase exponencial (Figura 8A), todo o meio de cultura foi centrifugado a 10.000 rpm e o precipitado ressuscitado em solução salina estéril (NaCl 9 g/L). O procedimento de centrifugação foi repetido mais uma vez. O precipitado foi novamente ressuscitado em 50 mL de água esterilizada e desta suspensão, foi retirada uma alíquota de 2 e 5 mL como inóculo e utilizado imediatamente nos ensaios de crescimento e degradação, respectivamente.

**Tabela 1 – Composição do meio TEF**

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Triptona	1,66
Glicose	0,21
Cloreto de Sódio	0,41
Fosfato Dipotássio	0,21
Fenol	0,5

### 3.5. Manutenção e conservação das culturas

A manutenção das culturas de *Alcaligenes faecalis* foi realizada em tubos de ensaio, contendo meio sólido preparado com TEF e Bacto-ágar 15,0 g/L. Após a inoculação neste meio, os tubos foram incubados por 24 horas a 30°C. Depois do crescimento, as culturas foram mantidas em geladeira a 4°C. Para a conservação de um “estoque” de colônias puras, as cepas foram crescidas em meio TEF por 24 horas num tubo de ensaio. Depois de adicionado 10% de glicerol, os tubos foram mantidos em geladeira a 4°C. (PÉREZ-BARINOTO et al., 1996).

### 3.6. Estabilidade dos clorofenóis à esterelização

Os meios de cultura, contendo os clorofenóis foram preparados e previamente esterelizados, para depois serem inoculados para os ensaios de degradação. Antes da realização dos ensaios, foi determinada se a esterilização provocava a redução da concentração inicial dos clorofenóis. Frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio TEF e concentrações de 16 mg/L de 2-CP, 3-CP, 2,4-DCP e 2,4-D foram tampados com rolhas de algodão e protegidas com papel alumínio. Os frascos foram esterilizados em panela de pressão laboratorial de bancada, durante 20 min a 120°C. A concentração residual de cada um dos clorofenóis foi determinada por HPLC (item 3.13.2), antes e depois da esterelização.

### 3.7. Meios de cultura

Os ensaios de degradação foram realizados nos seguintes meios de cultura:

- Meio MSM: meio de sais mínimos contendo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,5 g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,0 g/L e  $\text{NaNO}_3$ , 0,5 g/L, dissolvidos em água Milli-Q, pH 7,2 (GREER et al. 1990; CLÉMENT et al., 1995; KENNES et al., 1996).

- Meio TEF: TSB (Caldo tripcase de soja) (2,5 g/L) contendo Fenol (0,5 g/L), pH 7,2 (BARBOSA et al., 1995 ; PÉREZ-BARINOTTO et al., 1996).

- Meio nutritivo: meio MSM suplementado com extrato de levedura (200 mg/L); extrato de levedura (200 mg/L) + succinato (5 g/L); extrato de levedura (200 mg/L) + glicose (5 g/L) e succinato (5 g/L) (GREER et al., 1990).

### 3.8. Ensaio de degradação de fenol e clorofenóis

Os ensaios de degradação foram realizados utilizando 5 mL do inóculo, adicionado a 45 mL de meio de cultura (item 3.7.) em frascos Erlenmeyer de 250 mL, nas condições descritas anteriormente (item 3.4). Os meios de cultura (MSM, TEF ou meio nutritivo) foram suplementados com concentrações variadas de fenol e/ou clorofenóis.

Os clorofenóis utilizados nos ensaios foram: 2-clorofenol (2-CP), 3-clorofenol (3-CP), 2,4-diclorofenol (2,4-DCP) e ácido 2,4-diclorofenoxicetato (2,4-D).

### 3.9. Adaptação sucessiva a concentrações crescentes de clorofenóis

A cepa de *Alcaligenes faecalis* foi cultivada em meio MSM (suplementado com clorofenóis como única fonte de carbono) e TEF (clorofenóis, nutrientes-TSB e fenol, como fontes de carbono) e adaptada a concentrações crescentes de clorofenóis. O preparo e inoculação da cepa foi o mesmo descrito no ensaio anterior (item 3.8.). A degradação dos clorofenóis foi monitorada por HPLC (item 3.13.2.) até o desaparecimento total dos compostos do meio de cultura. Imediatamente, todo o meio foi centrifugado a 10.000 rpm (4°C) e o precipitado ressuspendido em solução salina estéril (NaCl 9 g/L). Deste, 5 mL da suspensão foi retirado e inoculado em outro Erlenmeyer contendo uma concentração crescente do clorofenol testado. A degradação foi determinada, a cepa lavada e novamente inoculada em concentrações crescentes e sucessivas.

### 3.10. Degradação de clorofenóis na presença de fenol

Ensaio foram realizados para verificar o efeito do fenol como indutor da degradação de clorofenóis. O procedimento de inoculação da cepa foi o mesmo descrito anteriormente (item 3.8.). Estes experimentos, em triplicata, foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio MSM e um dos clorofenóis: 2-CP (6 mg/L), 3-CP (6 mg/L), 2,4-DCP (2 mg/L) ou 2,4-D (2 mg/L). Cada 3 frascos de cultura foi suplementado com diferentes concentrações de fenol: 20, 50, 200 e 500 mg/L.

### 3.11. Métodos analíticos

#### 3.11.1. Por absorvância

O crescimento bacteriano foi determinado em alíquotas retiradas das culturas (frascos Erlenmeyer de 250 ml) em tempos definidos, pela medida da absorvância a 540 nm, em espectrofotômetro Shimadzu UV-160A.

#### 3.11.2. Por peso seco de células

Para verificar a relação direta entre a medida da absorvância e o aumento da biomassa, foi determinado o peso seco de células durante o crescimento bacteriano, segundo o método descrito por HOLT & KRIEG (1984) e ERZINGER (1995). Para a elaboração do gráfico relacionando estes dois dados, foi utilizada uma suspensão de células de *Alcaligenes faecalis* crescidas em meio TEF durante 9 horas (fase exponencial), com absorvância aproximada de 0,82-0,83.

Três amostras de 10 mL (triplicata) do meio de cultura TEF foram centrifugados a 12.800 g (12.000 rpm) por 15 minutos. O precipitado celular foi ressuspendido em 10 mL de água destilada e centrifugada por mais duas vezes nas mesmas condições. Um cadinho de

porcelana foi seco em estufa a 90°C por 24 horas, resfriado e tarado em balança analítica. O precipitado foi transferido para os cadinhos e levados à estufa a 90°C por 24 horas, resfriados em dessecador por 30 minutos e pesados na mesma balança analítica. O procedimento em estufa e dessecador foi repetido até o peso ficar constante. A concentração celular (mg/L) foi calculada dividindo a massa seca de células pelo volume de suspensão utilizado. Paralelamente, uma amostra do meio de cultura foi retirada e diluída para resultar em uma absorbância em 540 nm de aproximadamente 0,5. Esta suspensão foi diluída série de (1:10, 2:10,... a 9:10 e determinada a absorbância de cada diluição. A absorbância de cada diluição foi relacionada com a concentração celular (peso seco em mg/L) correspondente.

### **3.12. Preparação das amostras para análise**

Aliquotas foram retiradas das culturas durante os ensaios de degradação em tempos pré-definidos para cada experimento. Os volumes de cada alíquota foram de até 200 µL, e no máximo de 10% de volume total dos frascos Erlenmeyer. As amostras retiradas foram centrifugadas em microcentrífuga por 10 minutos a 12.800 g ( $\cong$  12.000 rpm). Os sobrenadantes foram utilizados para a determinação colorimétrica de fenol e cromatográfica de fenol e clorofenóis.

### **3.13. Métodos analíticos**

#### **3.13.1. Determinação de fenol por colorimetria**

O sobrenadante foi filtrado em filtros descartáveis MILLIPORE HV C-8 de 0,45 µm, utilizando seringas descartáveis de 1 mL. A concentração de fenol foi quantificada durante os ensaios de degradação, para acompanhar o consumo/desaparecimento deste composto. O método utilizado foi o da 4-aminoantipirina, descrito por YANG & HUMPRHEY (1975) e

modificado por BARBOSA et al. (1995) e PÉREZ-BARINOTTO et al. (1996). O método foi adaptado para ser utilizado com uma Leitora de Microplacas (Elisa). Neste método, 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante filtrado das amostras coletadas foram colocadas num "well" (poço) de uma microplaca de 96 wells. A seguir, foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de uma solução de ferricianeto de potássio  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  a 5% em glicina 0,1 M, em pH 9,7 (ajustado com NaOH 1 N). O volume foi completado com 100  $\mu\text{L}$  de uma solução de 4-aminoantipirina a 1% em glicina 0,1 M, em pH 9,7 (ajustado com NaOH 1 N). A microplaca foi envolvida com papel alumínio para proteção da luz e colocada sob agitação (rotação de  $150 \text{ min}^{-1}$ ) durante 20 minutos. Depois desse período, a microplaca foi lida a 505 nm numa leitora de microplaca (Leitora Elisa).

Na mesma microplaca foram aplicadas várias concentrações de fenol 1, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600  $\text{mg/L}$ , para a elaboração de uma curva padrão. A sensibilidade do método foi de 1  $\text{mg/L}$ . Os resultados da curva padrão foram analisados através de regressão linear.

### **3.13.2. Determinação de fenol e clorofenóis por cromatografia líquida (HPLC)**

A quantificação de fenol e dos clorofenóis foi realizado utilizando um Sistema de Cromatografia líquida - HPLC, composto de capilar de injeção manual de 20  $\mu\text{L}$ , Bomba de pressão automática L-6210, Forno termostatizado para coluna T-6300, Detetor UV/VIS L-4200, Interface D-6000 e Software D-6000 ligados a um Computador 486DX266 e Impressora. As amostras foram aplicadas em uma coluna Supelcosil LC-8 (15,0 cm x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$  - SUPELCO, USA) segundo um método modificado do anteriormente descrito por HINTEREGGER et al. (1992) e MIKESSELL et al. (1993). A coluna foi termostatizada a 40°C e eluída com uma solução de metanol-água (misturados na proporção de 3:1), contendo ácido acético a 1%. O fluxo de eluição foi de 1,0  $\text{mL/minuto}$  e os compostos detectados em 280 nm e sensibilidade 0,05 AUFS. Para a curva de calibração, soluções de concentração conhecida de fenol, 2-CP, 3-CP, 2,4-DCP e 2,4-D foram cromatografados e elaborados curvas-padrão para cada um dos compostos.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

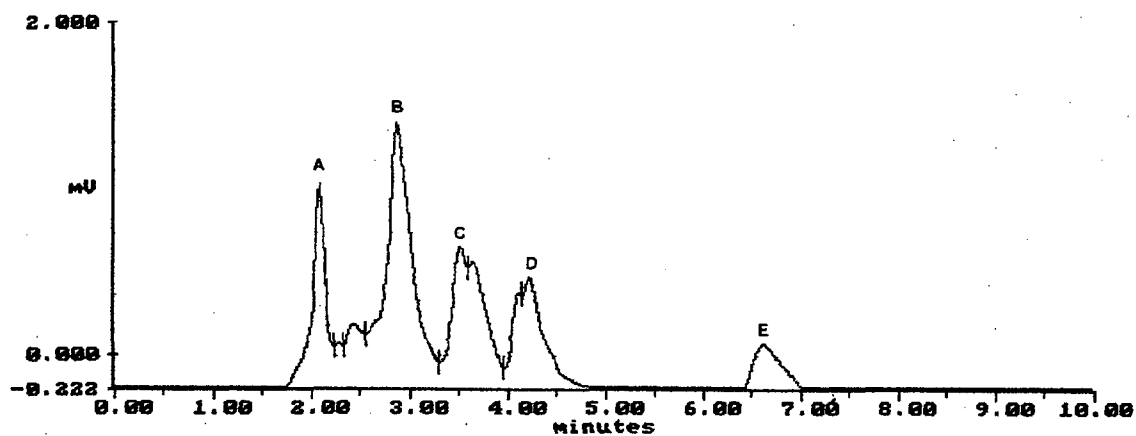
### 4.1. Estabilidade dos clorofenóis à esterilização

Os clorofenóis (2-CP, 3-CP, 2,4-DCP e 2,4-D) utilizados nos ensaios foram testados para verificar uma possível perda durante o processo de esterelização. A esterilização provocou uma redução da concentração inicial de cerca de 0,1 %, em média (resultados não apresentados). Assim, a concentração dos clorofenóis não foi afetada pela esterelização, ficando dentro do erro experimental.

### 4.2. Análise de clorofenóis por HPLC

A Figura 7 mostra um cromatograma representativo dos clorofenóis 2-CP, 3-CP, 2,4-DCP e 2,4-D em meio TEF (TSB + fenol) obtido por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). O tempo de retenção de cada um dos compostos analisados e suas respectivas concentrações estão apresentados na Tabela 2. A cromatografia mostrou a eluição iniciando com fenol, seguido pelo 2-CP, 3-CP, 2,4-DCP e 2,4-D, respectivamente. O cromatograma parece indicar uma tendência de separação dos clorofenóis pelo peso molecular, um resultado semelhante ao descrito por FAVA et al. (1995a).





**Figura 7.** Cromatograma representativo da eluição de fenol (A), 2-CP (B), 3-CP (C), 2,4-DCP (D) e 2,4-D (E) em meio TEF, obtido por cromatografia em HPLC (como descrito em Material e Métodos).

**Tabela 2 -** Tempo de retenção (RT) e Concentração de fenol, 2-CP, 3-CP, 2,4-DCP e 2,4-D obtidos por cromatograma em HPLC (como descrito em Material e Métodos).

Identificação	Composto	Concentração (mg/L)	Tempo de retenção (min.)
A	Fenol	4	2,08
B	2-CP	4	2,87
C	3-CP	4	3,51
D	2,4-DCP	4	4,21
E	2,4-D	4	6,61

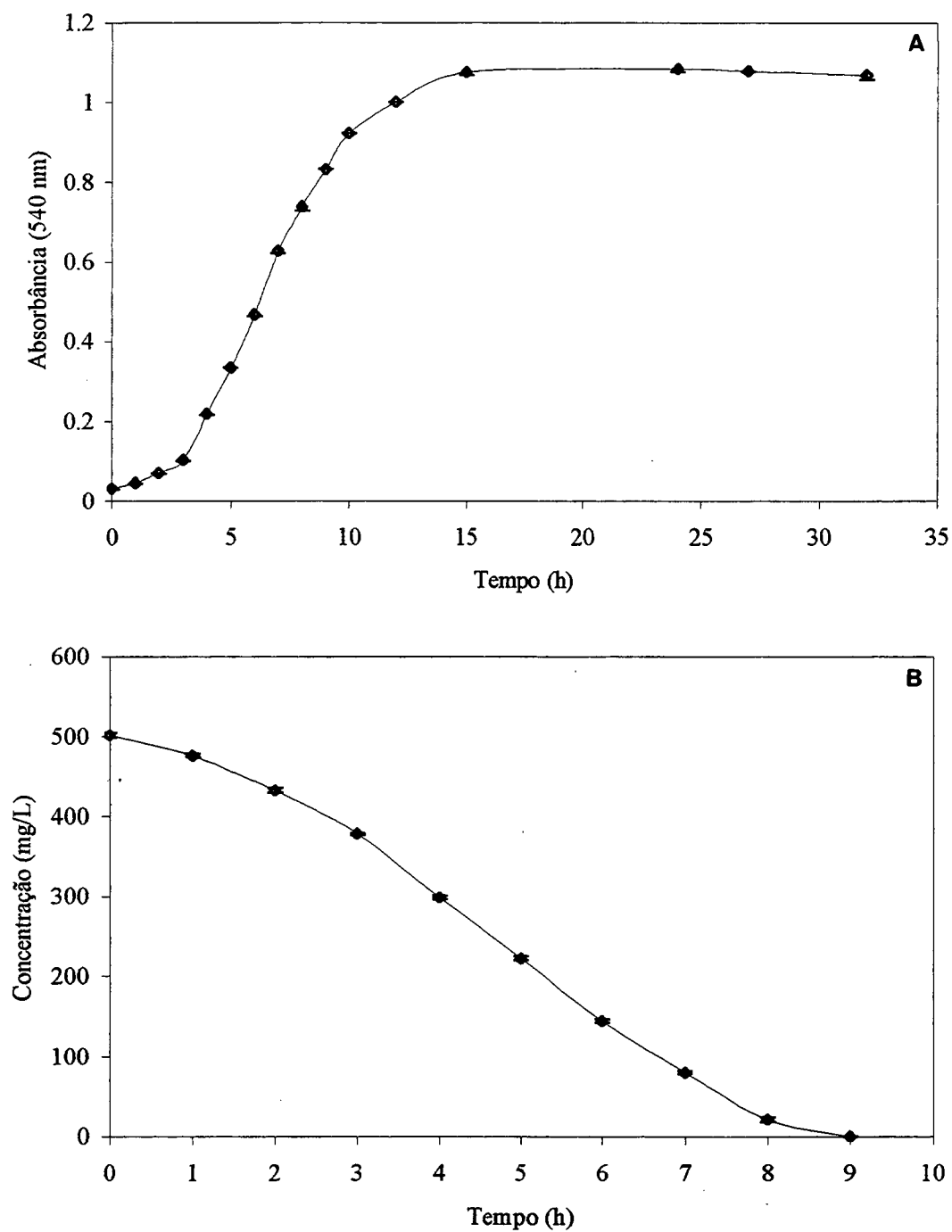
#### 4.3. Crescimento e degradação de fenol por *A. faecalis* em meio TEF (fontes de carbono: nutrientes-TSB e fenol)

*Alcaligenes faecalis* cultivada em meio TEF (TSB + fenol 500 mg/L) mostrou uma fase inicial de adaptação de aproximadamente 3 horas, e no período de 5 a 10 horas o crescimento foi exponencial. Depois de 15 horas, alcançou a fase estacionária, com máximo de concentração celular (Figura 8A).

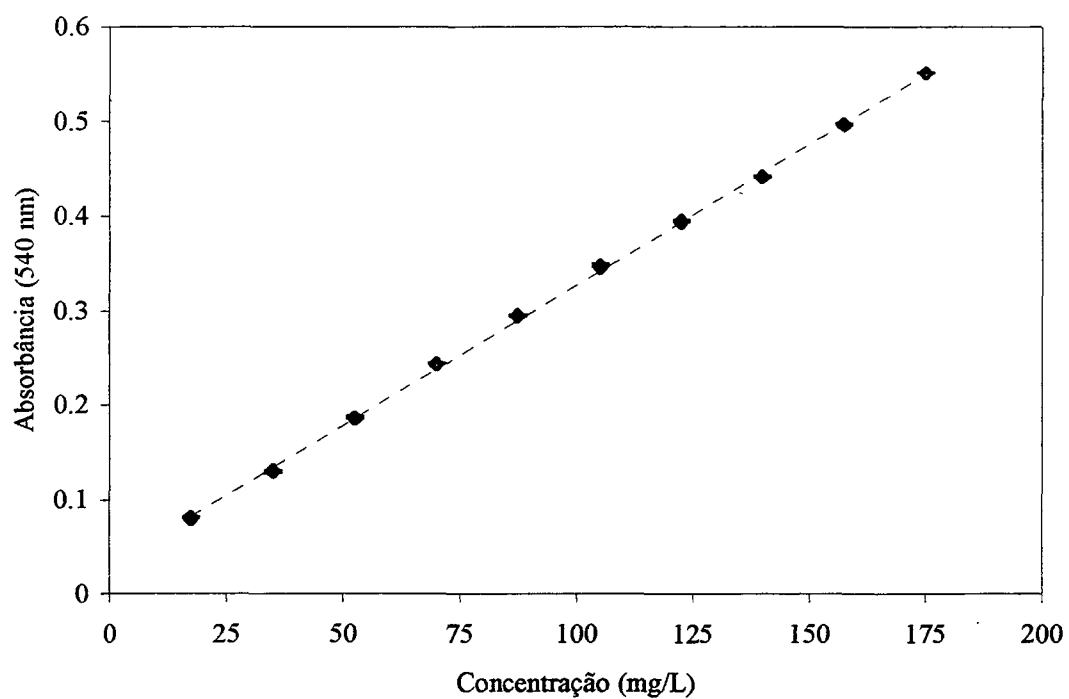
A degradação do fenol neste meio parece ter ocorrido preferencialmente durante a fase exponencial do crescimento microbiano, sendo totalmente consumido após 9 horas de incubação (Figura 8B). Após o consumo total de fenol, a cepa alcançou a fase estacionária de crescimento (Figura 8A).

PIEPER et al. (1989) realizaram ensaios de degradação de fenol com cepas (geneticamente modificada, GEM) de *Alcaligenes eutrophus* JMP134, isoladas de efluentes industriais. As cepas cultivadas em meio de nutrientes (extrato de levedura, glicose e sais) contendo fenol (500 mg/L), mostraram o máximo de crescimento bacteriano junto com a degradação total do fenol, depois de 5 dias de incubação. Em relação ao tempo de degradação da mesma concentração de fenol, em condições de cultura semelhantes (na presença de outras fontes de carbono), *Alcaligenes faecalis* apresentou muito mais eficiência do que a cepa “construída” de *Alcaligenes eutrophus* (PIEPER et al., 1989).

O crescimento bacteriano pode ser expressado através da contagem de colônias por volume analisado (UFC/ml), pela medida da absorbância e pela determinação do peso seco (biomassa) (HOLT & KRIEG, 1984). A medida da absorbância é um método bastante simples e rápido, mas em alguns casos pode não refletir o crescimento bacteriano ou aumento da biomassa. Assim, a cepa de *Alcaligenes faecalis* foi cultivada em meio TEF e o crescimento bacteriano foi monitorado ao mesmo tempo pela absorbância e pelo peso seco (biomassa). Com estes dados foi elaborada a Figura 9, que mostra uma relação direta de proporcionalidade entre absorbância a 540 nm e peso seco da cepa em crescimento em meio TEF. A linearidade foi observada nas concentrações celulares de 16,5 mg/L (absorbância de 0,080) a 173 mg/L (absorbância de 0,551).



**Figura 8** – (A) Crescimento e (B) degradação de 500 mg/L de fenol em meio TEF por *Alcaligenes faecalis*. Os resultados representam a média de 3 experimentos.



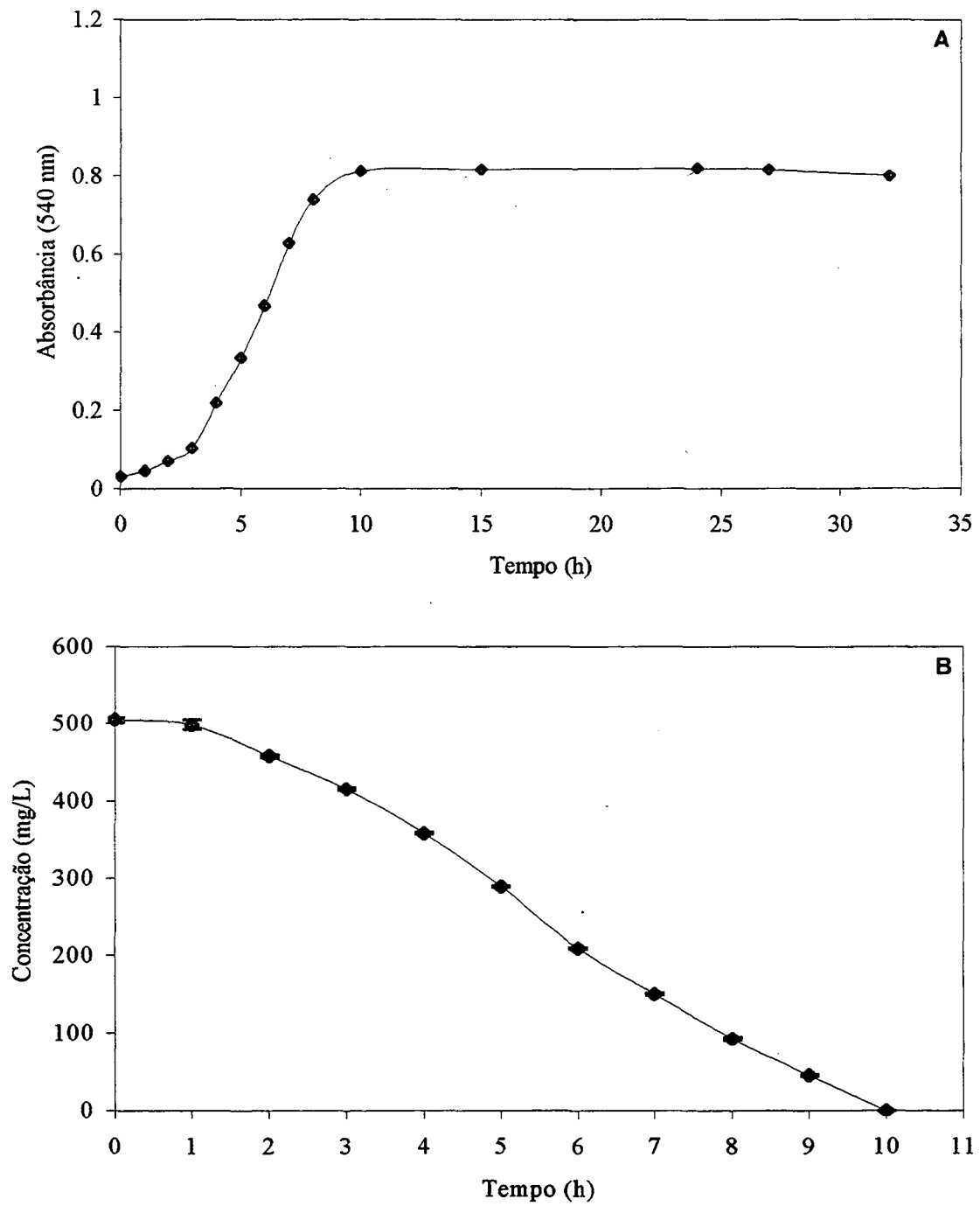
**Figura 9** – Crescimento bacteriano: relação entre absorbância (540 nm) e o peso seco (mg/L) de células durante o crescimento de *Alcaligenes faecalis* em meio TEF contendo 500 mg/L de fenol. Os resultados representam a média de 3 experimentos.

#### 4.4. Crescimento e degradação de fenol por *A. faecalis* em meio MSM (fenol como única fonte de carbono)

Ensaio preliminares realizados por PÉREZ-BARINOTTO et al. (1996) não mostraram crescimento de *Alcaligenes faecalis* em meio de sais mínimos (MSM), sem fonte de carbono. O meio foi suplementado com 500 mg/L de fenol, com a finalidade de demonstrar a capacidade deste microorganismo em utilizar este composto como única fonte de carbono e energia. O crescimento de *Alcaligenes faecalis* na presença de 500 mg/L de fenol está apresentado na Figura 10 A. Comparando o crescimento da cepa em meio TEF (Figura 8 A), onde a fase estacionária foi alcançada em 15 horas e observada uma absorbância máxima de 1,013; em meio MSM, a fase estacionária ocorreu em apenas 10 horas e a absorbância máxima foi menor, de 0,785.

Em relação ao tempo para a degradação total do fenol na presença de outras fontes de carbono (meio TEF, Figura 8B) e como única fonte de carbono (meio MSM, Figura 10B), foram observados os tempos de 9 e 10 horas, respectivamente. Os resultados também indicam que o fenol foi consumido durante a fase exponencial do crescimento bacteriano, conforme mostrado na Figura 10B. Praticamente, nos dois meios o fenol foi degradado no mesmo tempo, mas no meio TSB + fenol, a cepa continuou a consumir outros nutrientes (do TSB) para aumentar ainda mais a biomassa, retardando a fase estacionária.

Ensaio realizados por STEIERT & CRAWFORD (1985) em meio MSM com *Alcaligenes A7-2* (GEM), demonstraram a capacidade desta cepa em degradar apenas 0,02 mg/L de fenol. CLÉMENT et al. (1995) mostraram que uma cepa de *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (GEM) cresceu em meio MSM na presença de 37,6 mg/L de fenol, como única fonte de carbono, em 20 horas. Em trabalho mais recente, HILL et al. (1996) descreveram que cepas de *Alcaligenes eutrophus* degradaram uma baixa concentração, 0,24 mg/L de fenol, em 64 horas. Em concentrações acima de 1 mg/L foi observado inibição do crescimento bacteriano e da degradação do fenol. Nestas concentrações muito baixas do composto a ser degradado, com longo tempo para a degradação, poderia estar ocorrendo o processo descrito por FAUZI et al. (1996). Estes autores comentam que microorganismos incubados com concentrações muito baixas (ppb) de compostos xenobióticos apresentaram uma degradação mais lenta, do que quando



**Figura 10** – (A) Crescimento e (B) degradação de 500 mg/L de fenol em meio MSM por *Alcaligenes faecalis*. Os resultados representam a média de 3 experimentos.

cultivadas em concentrações maiores (ppm). Microorganismos isolados (culturas mistas) de lagoas de tratamento de efluentes da indústria de papel e celulose foram capazes de degradar de 9,4 a 47 mg/L de fenol em meio de sais mínimos (CESPEDES et al., 1996). Assim, a cepa de *Alcaligenes faecalis* utilizada neste trabalho, demonstrou ser bastante eficiente na degradação de fenol, como única fonte de carbono.

#### 4.5. Crescimento e degradação de clorofenóis por *A. faecalis* em meio MSM (clorofenóis como única de carbono)

A cepa de *Alcaligenes faecalis* foi testada em ensaios preliminares e cultivada em meio de sais mínimos (MSM) na presença de diferentes concentrações de clorofenóis. A degradação destes compostos foi determinada após 48 horas. A degradação dos monoclorofenóis e dos diclorofenóis foi inibida em concentrações acima de 4 e 2 mg/L, respectivamente (resultados não mostrados). Assim, a cepa foi cultivada em meio de sais mínimos suplementados com a mesma concentração (4 mg/L) de um dos seguintes compostos: fenol, 2-CP, 3-CP, 2,4-DCP ou 2,4-D (Figura 11A). *A. faecalis* mostrou o mais rápido crescimento em fenol, comparado ao meio com monoclorofenóis (2-CP e 3-CP). Nestes meios foi observado uma fase de latência (“lag”) de cerca de 3 horas, possivelmente devido à presença do cloro junto a estrutura molecular do composto. Entretanto, nestes três compostos a cepa alcançou a mesma absorvância (biomassa) na fase estacionária, após 12 horas. No meio contendo diclorofenóis (2,4-DCP e 2,4-D), a cepa apresentou o período de latência observado nos monoclorofenóis, mas o crescimento foi ligeiramente mais lento e com uma menor absorvância na fase estacionária.

A degradação do fenol, monoclorofenóis (2-CP, 3-CP) e diclorofenóis (2,4-DCP e 2,4-D) por *A. faecalis* foi monitorada durante o crescimento bacteriano e estão apresentados na Figura 11B. O fenol (4 mg/L) desapareceu do meio rapidamente em 1 hora, mas isto aparentemente não refletiu em ganho de biomassa (absorvância) (Figura 11A). Os resultados mostraram também que 2-CP e 3-CP foram consumidos totalmente pela cepa em 12 horas, mais lentamente do que o fenol. Assim, *A. faecalis* parece possuir a capacidade de utilizar 2-CP e 3-CP como única fonte de carbono. É importante notar que no tempo de 3 horas, cerca

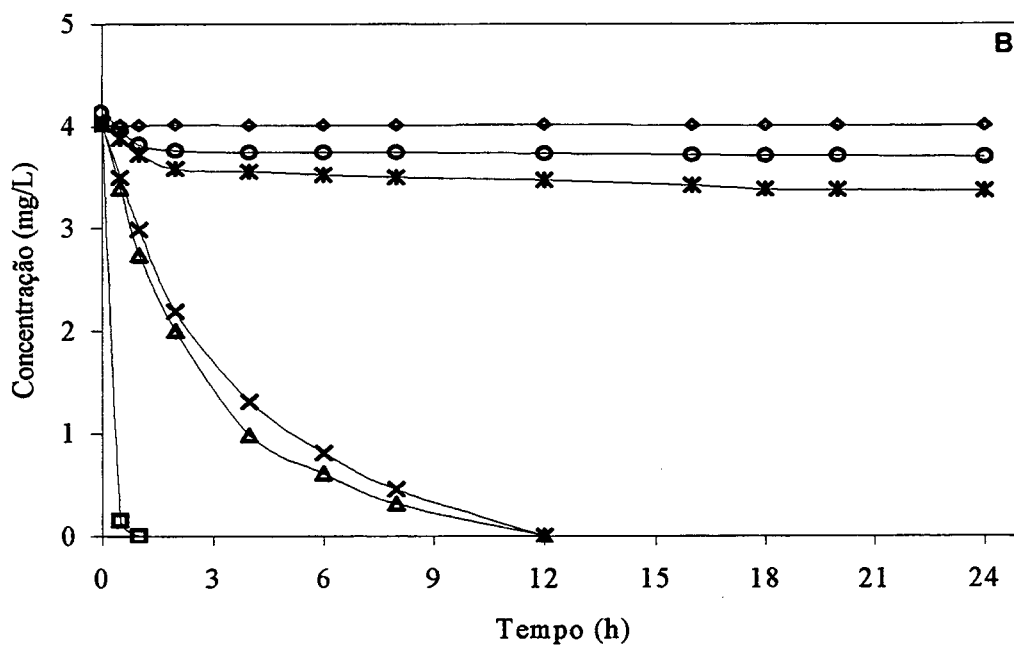
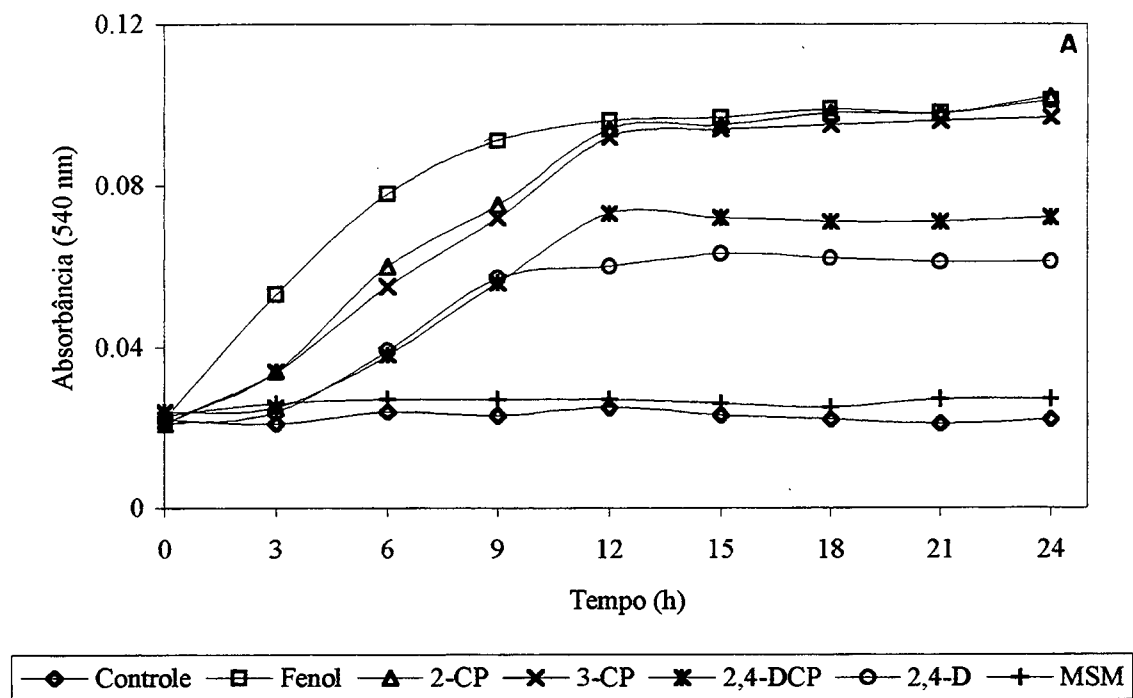
de 50% dos monoclorofenóis tinha desaparecido do meio (Figura 11B) e a cepa parece ainda estar no período de latência (Figura 11A).

Os microorganismos requerem um fornecimento substancial de energia para a declorinação e posterior clivagem das ligações do anel aromático (CHAUDHRY & CHAPALAMADUGU, 1991). Segundo ATLAS & BARTHA (1993), quanto mais extensiva for a introdução de cloro na cadeia molecular, mais persistente será a degradação dos compostos. STEIERT & CRAWFORD (1985) demonstraram que *Alcaligenes* A7-2 (GEM) degradou apenas 0,02 mg/L de 2-CP e 3-CP em meio MSM, em 24 horas. No entanto, cepas de *Pseudomonas pickettii* cultivadas em meio MSM, degradaram totalmente altas concentrações de 2-CP (194,18 mg/L) e 3-CP (73,3 mg/L), depois de 30 a 40 horas (FAVA et al., 1995b). GRADY et al. (1993) também demonstraram a degradação de altas concentrações de 2-CP (160 mg/L) por um consórcio de bactérias (culturas mistas) de solo, em 48 horas. A alta concentração de monoclorofenóis consumida está de acordo com o fato de que consórcios de microorganismos podem produzir diferentes vias de degradação, que resultam na capacidade de degradar quantidades maiores de compostos clorados (BOYD & SHELTON, 1984).

Nos meios contendo diclorofenóis, 2,4-DCP e 2,4-D, foi observado um menor crescimento em relação ao fenol e aos monoclorados, sugerindo uma maior dificuldade da cepa na declorinação de dois cloros do que na declorinação de somente um (Figura 11A). No composto 2,4-D existe ainda a presença de um radical acetato e a necessidade da bactéria *Alcaligenes* em realizar uma etapa adicional de clivagem na biotransformação de 2,4-D em 2,4-DCP, conforme mostrado na Figura 3.

A Figura 11B mostra que a concentração inicial de 2,4-DCP e de 2,4-D foram somente reduzidas no período de latência (3 horas), em 16,5% e 10,5%, respectivamente. Após esse período e até 24 horas não foi observado qualquer redução destes compostos do meio. Culturas mistas isoladas de lodo estuarino degradaram 16,3 mg/L de 2,4-DCP em 120-220 dias (HÄGGBLÖM & YOUNG, 1990). GREER et al. (1990) descreveram que uma cepa de *Pseudomonas cepacia* BRI6001 foi capaz de crescer em meio MSM e consumir 221 mg/L de 2,4-D, em 94 horas. Consórcios de microorganismos isolados de lagoas de tratamento de efluentes da indústria de papel e celulose e aclimatados com fenol, demonstraram a capacidade de degradar altas concentrações de 2,4-DCP (16,3 a 81,5 mg/L)





**Figura 11** – (A) Crescimento e (B) degradação de 4 mg/L de: fenol; 2-CP; 3-CP; 2,4-DCP; e 2,4-D em meio MSM por *Alcaligenes faecalis*. Controle: meio MSM com 4 mg/L de Fenol, sem inóculo. Os resultados representam a média de 3 experimentos.

e 2,4-D (22,1 a 110,5 mg/L) em meio MSM, em 24 horas (CESPEDES et al., 1996). Um trabalho publicado recentemente mostra a mineralização de 2,6-DCP (50 mg/L) por uma cepa bacteriana *Ralstonia* sp. (STEINLE et al., 1998).

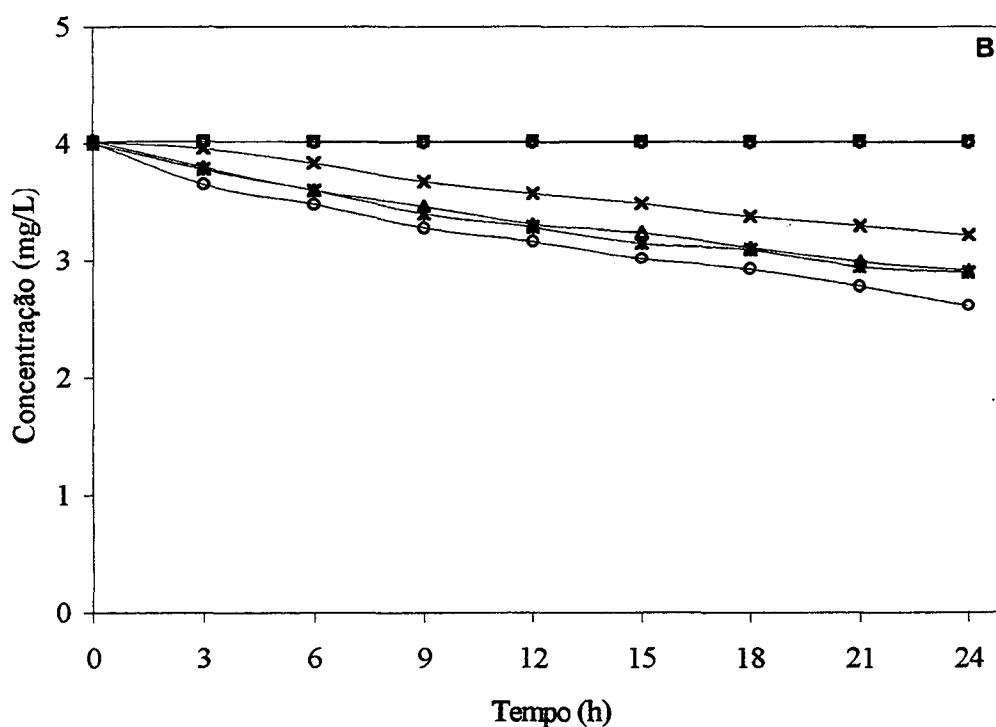
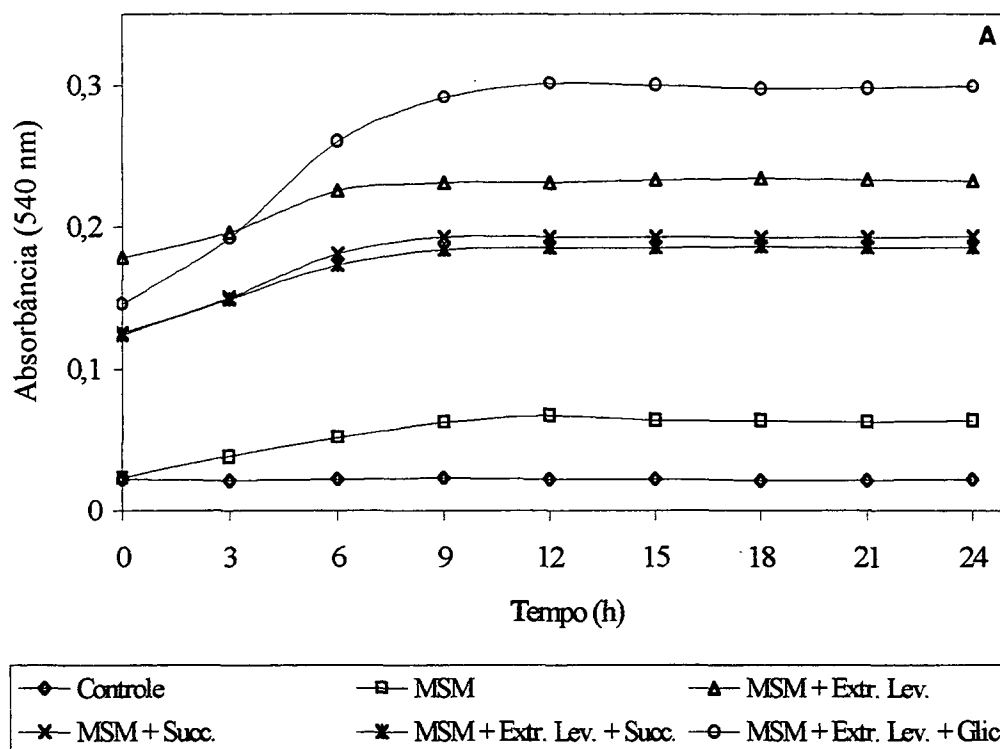
Os resultados demonstraram que *Alcaligenes faecalis* possui a capacidade de utilizar 2-CP e 3-CP (4 mg/L), como única fonte carbono, em 12 horas. Quanto à degradação de clorofenóis, *Pseudomonas* demonstrou maior eficiência se comparada a *Alcaligenes faecalis*, e esta foi melhor do que as cepas conhecidas de *Alcaligenes eutrophus*, incluindo as GEM. Além de um trabalho de 1981, descrevendo a degradação de dicloroanilina (SUROVTSEVA et al., 1981), não há dados na literatura mostrando a degradação de compostos clorados por cepas de *Alcaligenes faecalis*.

#### 4.6. Crescimento e degradação de 2,4-DCP por *A. faecalis* em diferentes meios

Devido à dificuldade de degradação de alguns clorofenóis, GREER et al. (1990) adicionaram nutrientes ao meio MSM e incrementaram a utilização destes compostos por *Pseudomonas cepacia*. Para também tentar melhorar a degradação de 2,4-DCP e 2,4-D por *Alcaligenes faecalis*, o meio MSM foi testado com a adição dos mesmos nutrientes: extrato de levedura (200 mg/L), succinato (5 g/L), extrato de levedura (200 mg/L) + succinato (5 g/L) e extrato de levedura (200 mg/L) + glicose (5 g/L) (GREER et al., 1990).

No meio MSM contendo 2,4-DCP (4 mg/L) e suplementado com extrato de levedura e glicose, *Alcaligenes faecalis* mostrou o melhor crescimento alcançando o maior “ganho” de absorvância (Figura 12A). Nos outros meios testados, o crescimento foi semelhante.

A Figura 12B mostra que, num período de 24 horas, a degradação de 2,4-DCP (4 mg/L) por *Alcaligenes faecalis* em meio MSM suplementado com extrato de levedura + glicose, extrato de levedura + succinato, extrato de levedura e succinato foi de 35, 28, 27,5 e 20%, respectivamente. Aparentemente, a presença de glicose foi o que mais estimulou o crescimento e a degradação de 2,4-DCP. A adição de nutrientes melhorou a degradação de 2,4-diclorofenol por *Alcaligenes faecalis*, quando comparado ao obtido em meio MSM (Figura 11B). No entanto, esta cepa demonstrou a capacidade de consumir apenas parcialmente 4 mg/L de 2,4-DCP.



**Figura 12 - (A) Crescimento e (B) degradação de 4 mg/L de 2,4-DCP por *Alcaligenes faecalis* em meio MSM suplementado com 200 mg/L de extrato de levedura (Extr. Lev.); 5 g/L de succinato (Succ.) ou 5 g/L de glicose (Glic.). Controle: meio MSM com 4 mg/L de 2,4-DCP, sem inóculo. Os resultados representam a média de 3 experimentos.**

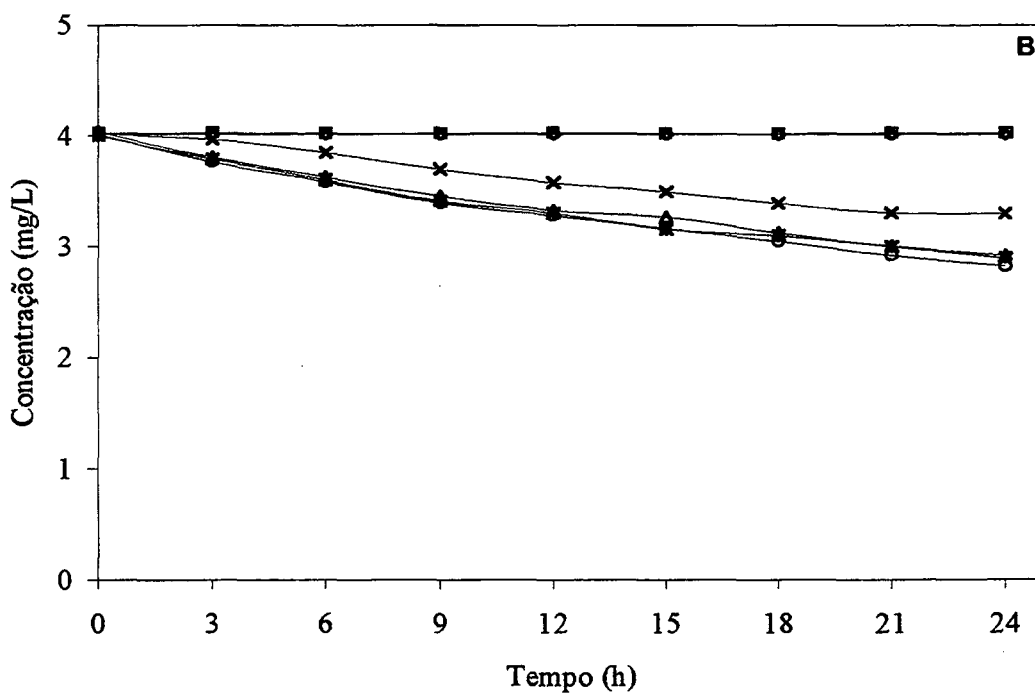
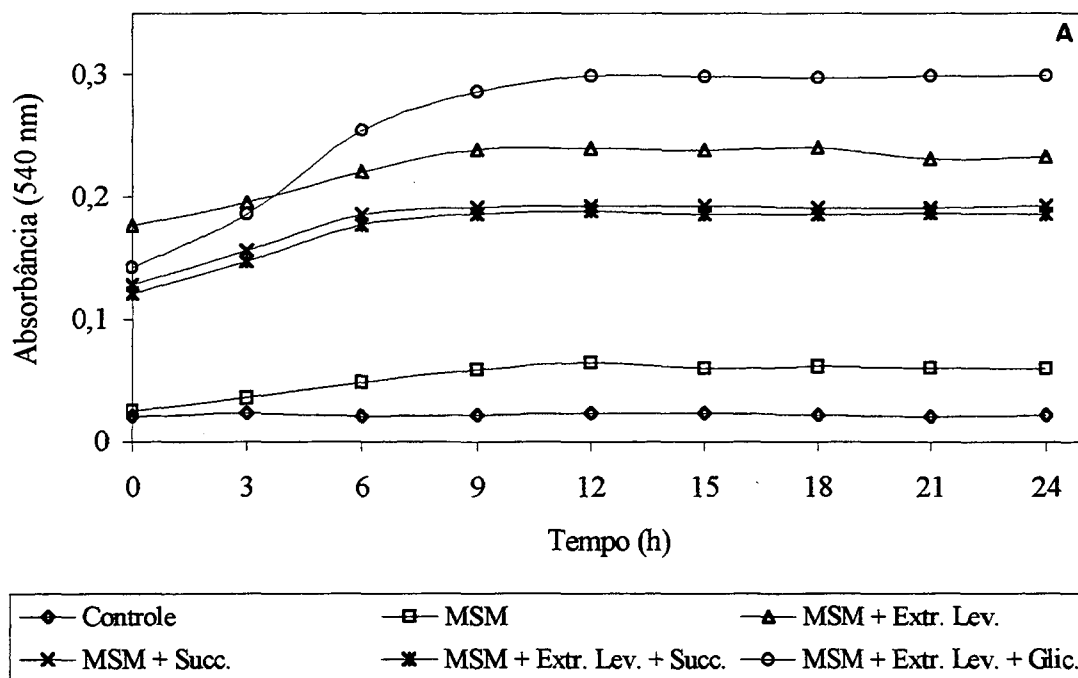
#### 4.7. Crescimento e degradação de 2,4-D por *A. faecalis* em diferentes meios

Os experimentos de cultivo de *Alcaligenes faecalis* em meio MSM contendo 2,4-D (4 mg/mL) e suplementados com os mesmos nutrientes do item anterior (4.6.) estão apresentados nas Figuras 13A e 13B. O crescimento bacteriano foi melhor no meio MSM suplementado com extrato de levedura e glicose. A Figura 13B mostra que, num período de 24 horas, a degradação de 2,4-D (4 mg/L) por *Alcaligenes faecalis* em meio MSM suplementado com extrato de levedura + glicose, extrato de levedura + succinato, extrato de levedura e succinato foi de 30, 28, 27 e 18%, respectivamente. Em meio MSM também não foi observado a degradação de 4 mg/L de 2,4-D. *Alcaligenes faecalis* mostrou um melhor crescimento e degradação de diclorofenóis nos meios suplementados com nutrientes quando comparado aos resultados do meio MSM (Figuras 11A e 11B).

GREER et al. (1990) descreveram que a cepa *Pseudomonas cepacia* BRI6001 foi capaz de degradar, em meio MSM suplementado com meios nutrientes, altas concentrações de 2,4-D (221 mg/L) em 94 horas. Outros autores, observaram em *Alcaligenes* MI, a degradação de apenas 1 mg/L de 2,4-D, em meio MSM, em 9 horas (GREER et al., 1992). Esta concentração é 4 vezes menor do que a utilizada em nossos ensaios. CESPEDES et al. (1996) realizaram ensaios com consórcios de microorganismos, que consumiram 22,1 a 110,5 mg/L de 2,4-D em 24 horas. Isto mostra a maior capacidade de degradação de compostos aromáticos clorados por consórcios de bactérias, onde várias rotas metabólicas interagem na degradação de um composto (LEAHY & COLWELL, 1990).

#### 4.8. Adaptação sucessiva de *A. faecalis* a concentrações crescentes de clorofenóis

Experimentos realizados por BOYD & SHELTON (1984) demonstraram que microorganismos, submetidos a processos de adaptação a concentrações crescentes de clorofenóis, adquiriram uma capacidade de degradação de quantidades cada vez maiores destes. HÄGGBLOM & YOUNG (1990) estudaram a degradação de 12,8 mg/L de 2-CP e 3-CP e de 16,3 mg/L de 2,4-DCP, com inóculo de sedimento estuarino, que degradaram totalmente os compostos entre 120 e 220 dias. Quando as culturas foram realimentadas com



**Figura 13** – (A) Crescimento e (B) degradação de 4 mg/L de 2,4-D por *Alcaligenes faecalis* suplementado com 200 mg/L de extrato de levedura (Extr. Lev); 5 g/L de succinato (Succ.) ou 5 g/L de glicose (Glic.). Controle: meio MSM com 4 mg/L de 2,4-D, sem inóculo. Os resultados representam a média de 3 experimentos.

estes compostos na mesma concentração, a degradação total passou a ocorrer em 40 dias. As Figuras 11B, 12B e 13B mostram que a cepa de *Alcaligenes faecalis* degradou 4 mg/L de monoclorofenóis, totalmente em 12 horas e diclorofenóis, apenas parcialmente (10 a 35%). Assim, testes de degradação sucessiva de 2-CP, 3-CP, 2,4-DCP e 2,4-D por *Alcaligenes faecalis*, foram realizados em meios MSM e TEF, para verificar a capacidade da cepa em se adaptar e degradar concentrações cada vez maiores de clorofenóis.

#### 4.8.1. Degradação de 2-CP em meio MSM e TEF

A adaptação da bactéria a concentrações crescentes de 2-CP (1 a 25 mg/L), como única fonte de carbono e energia, foi realizada através de ensaios de degradação sucessivos em meio MSM. Os resultados mostraram que concentrações de até 16 mg/L foram completamente consumidos num período de 24 horas (Figura 14 A). Em maiores concentrações de 20 e 25 mg/L, o 2-CP foi degradado parcialmente em 61,5 e 34,5%, respectivamente. Isto poderia indicar uma saturação da bactéria em relação a concentração do substrato (KAFKEWITZ et al., 1996). FAVA et al. (1995b) demonstraram que *Pseudomonas picketti* foi capaz de degradar 194,18 mg/L de 2-CP, em ensaios sucessivos de degradação num período de 30 a 40 dias.

*Alcaligenes faecalis* também foi adaptada sucessivamente nas mesmas concentrações de 2-CP, em meio TEF (na presença de outras fontes de carbono e fenol 500 mg/L). A Figura 14B mostra uma clara redução no tempo de degradação das várias concentrações de 2-CP e também um aumento na capacidade de degradação. Neste meio pode ser observado, que a cepa foi capaz de consumir totalmente uma concentração de 20 mg/L, em 36 horas. A concentração de 26 mg/L de 2-CP foi degradada parcialmente (75%), o que foi cerca de duas vezes mais do que o consumido em meio MSM. Este resultado sugere que a suplementação de nutrientes ou de fenol ao meio MSM, poderia auxiliar a degradação de clorofenóis, como descrito por GREER et al. (1990), ou uma possível saturação pelo substrato em 25 mg/L de 2-CP (KAFKEWITZ et al., 1996).

Os ensaios de adaptação sucessivas em meio MSM e TEF (Figura 14A e 14B) permitiram que uma concentração de 16 mg/L de 2-CP, praticamente 4 vezes mais do que

nos ensaios anteriores, fossem totalmente degradadas em 20 a 24 horas. Na presença de TEF (TSB e fenol 500 mg/L), *Alcaligenes faecalis* consumiu até 20 mg/L de 2-CP (Figura 14B), o que corresponde a uma concentração 5 vezes maior do que a antes utilizada.

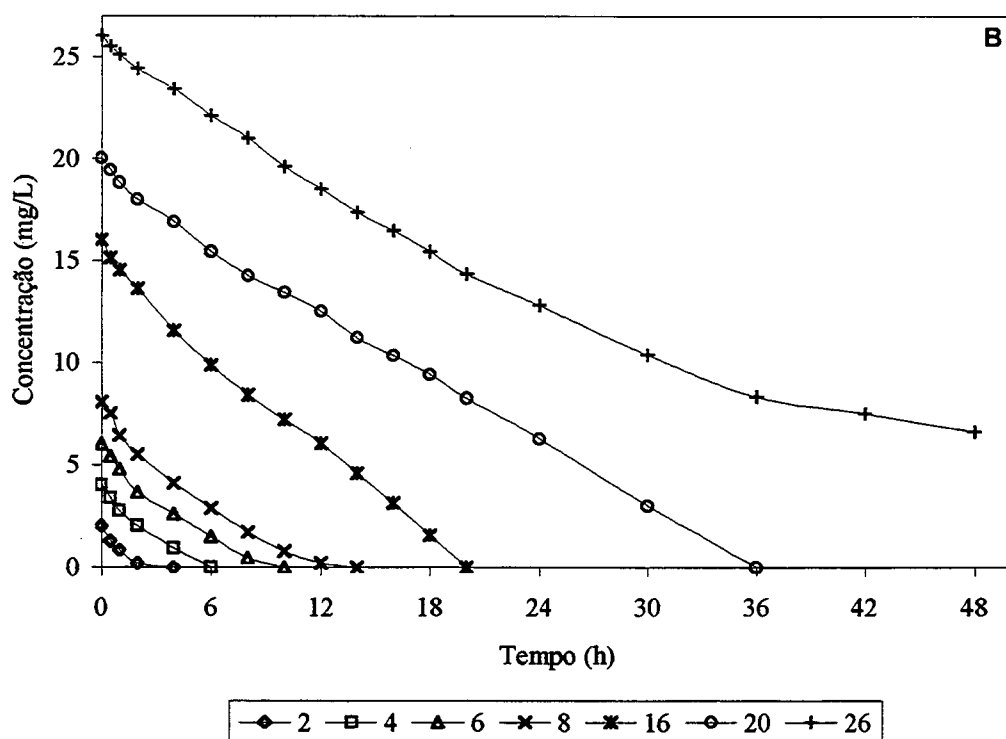
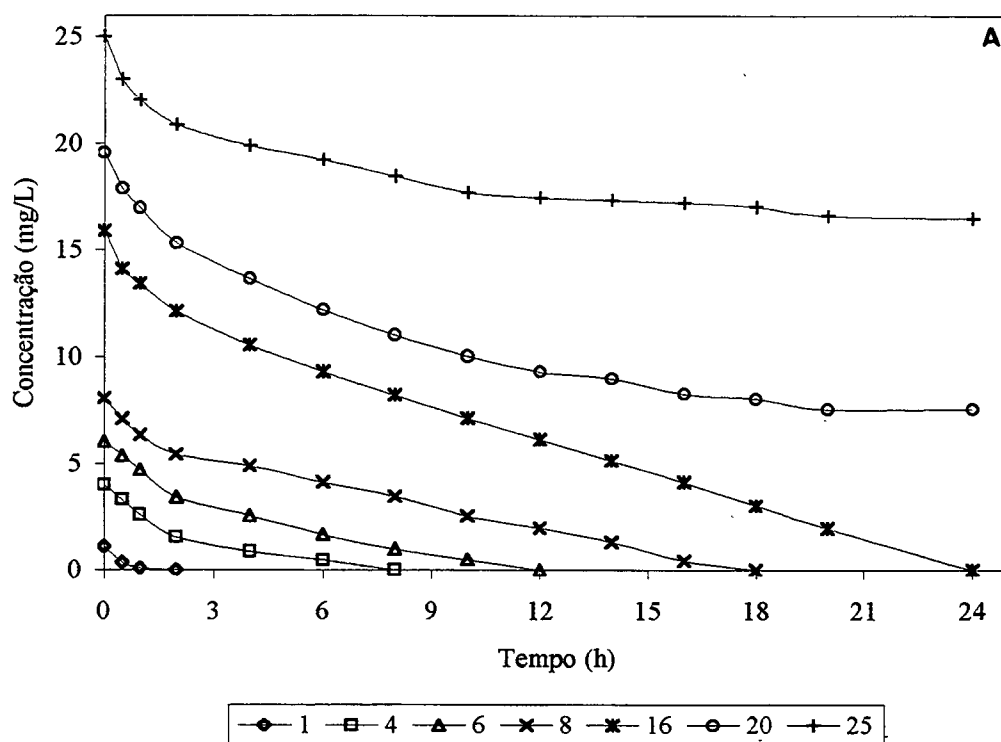
#### 4.8.2. Degradação de 3-CP em meio MSM e TEF

A Figura 15A apresenta os resultados da degradação sucessiva de 3-CP, como única fonte de carbono (meio MSM), em concentrações crescentes de 1 a 25 mg/L. Assim como foi observado para 2-CP, concentrações de 15 mg/L de 3-CP foram consumidas em 24 horas. As concentrações de 20 e 25 mg/L também foram degradadas parcialmente em 60,5 e 34,5%, respectivamente. *Pseudomonas picketti*, em experimentos de adaptação sucessiva em meio MSM, degradou até 73,3 mg/L de 3-CP em 30 a 40 dias (FAVA et al., 1995b).

O mesmo experimento realizado em meio TEF (Figura 15B) mostrou uma redução no tempo de degradação das várias concentrações de 3-CP e um aumento na capacidade de degradação (Figura 15B). Altas concentrações de 3-CP, passaram a ser consumidas totalmente em 36 horas (20 mg/L) e parcialmente (26 mg/L). Os ensaios de adaptação sucessivos provocaram uma redução do tempo para a degradação total e a capacidade da cepa em consumir maiores concentrações de 3-clorofenol.

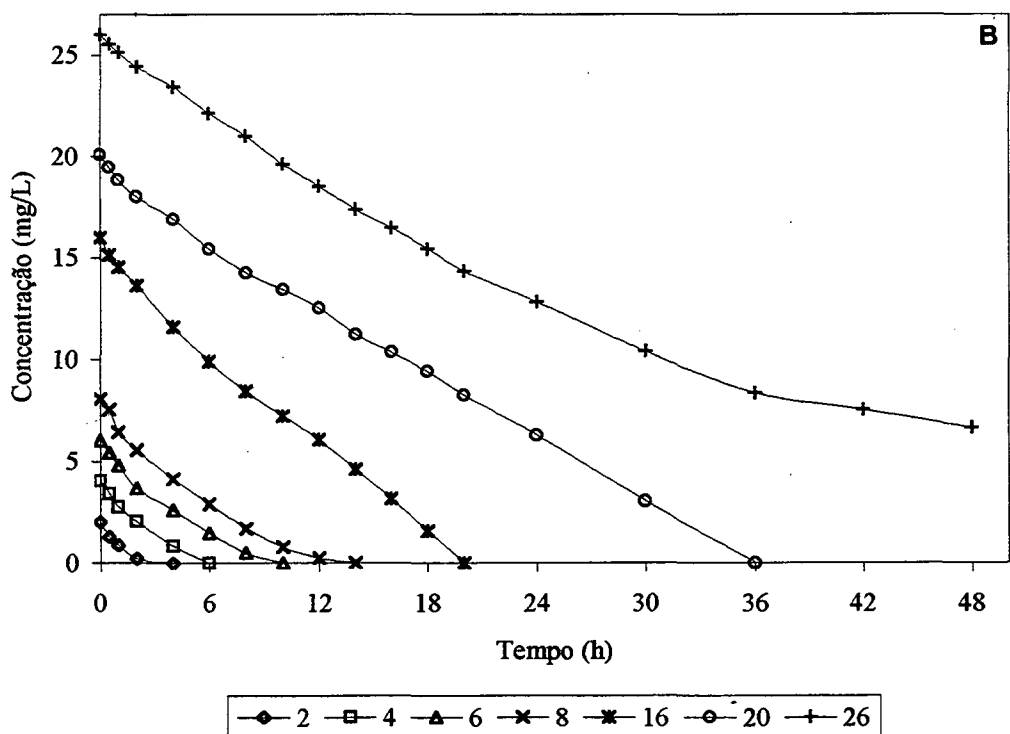
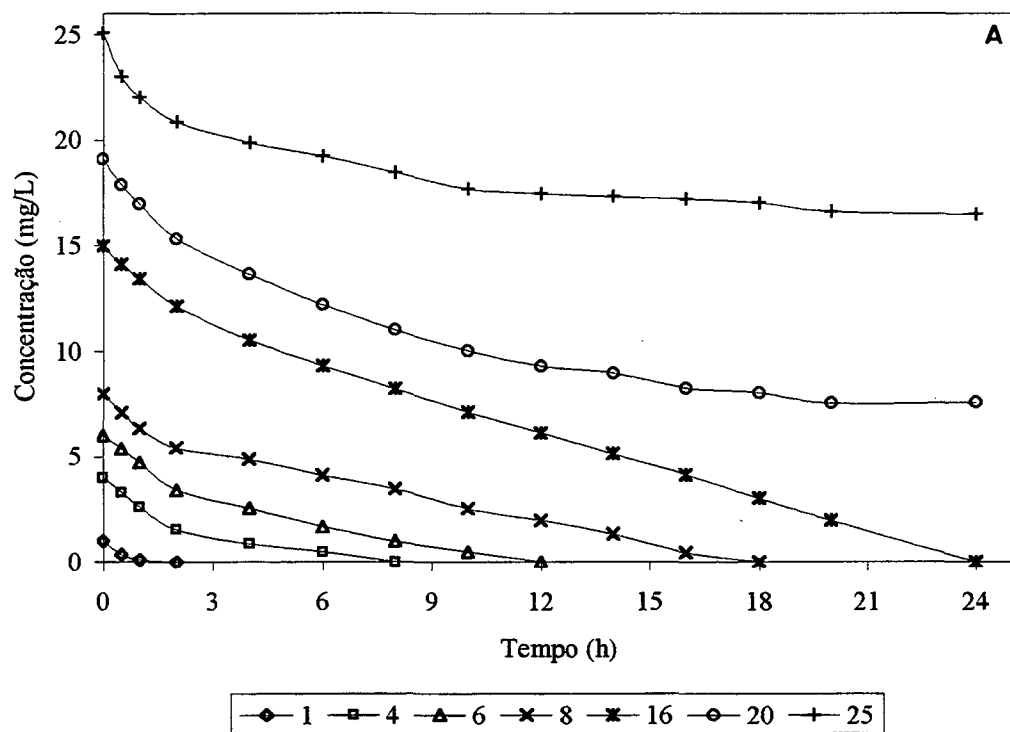
#### 4.8.3. Degradação de 2,4-DCP por *A. faecalis* em meio MSM e TEF

Testes preliminares mostraram que num intervalo de 48 horas, *Alcaligenes faecalis* degradou totalmente 2,4-DCP, somente nas concentrações de 0,5 a 2 mg/L (resultados não mostrados). Na concentração de 4 mg/L, em meio MSM e MSM suplementado com nutrientes, os diclorofenóis foram degradados apenas parcialmente (10 a 35%) (Figuras 12B e 13B). Isto parece demonstrar uma baixa capacidade da cepa de *Alcaligenes faecalis* em degradar diclorofenóis. Ensaios de adaptação sucessivas foram realizados em meios MSM e TEF, para estimular a degradação de maiores concentrações de diclorofenóis (Figuras 16A e 16B). Entretanto, ao contrário dos resultados positivos com monoclorofenóis, 2,4-DCP foi



**Figura 14** – Degradação sucessiva de diferentes concentrações (mg/L) de 2-CP por *Alcaligenes faecalis* em meios (A) MSM e (B) TEF. Os resultados representam a média de 3 experimentos.





**Figura 15** - Degradação sucessiva de diferentes concentrações (mg/L) de 3-CP por *Alcaligenes faecalis* em meios (A) MSM e (B) TEF. Os resultados representam a média de 3 experimentos.

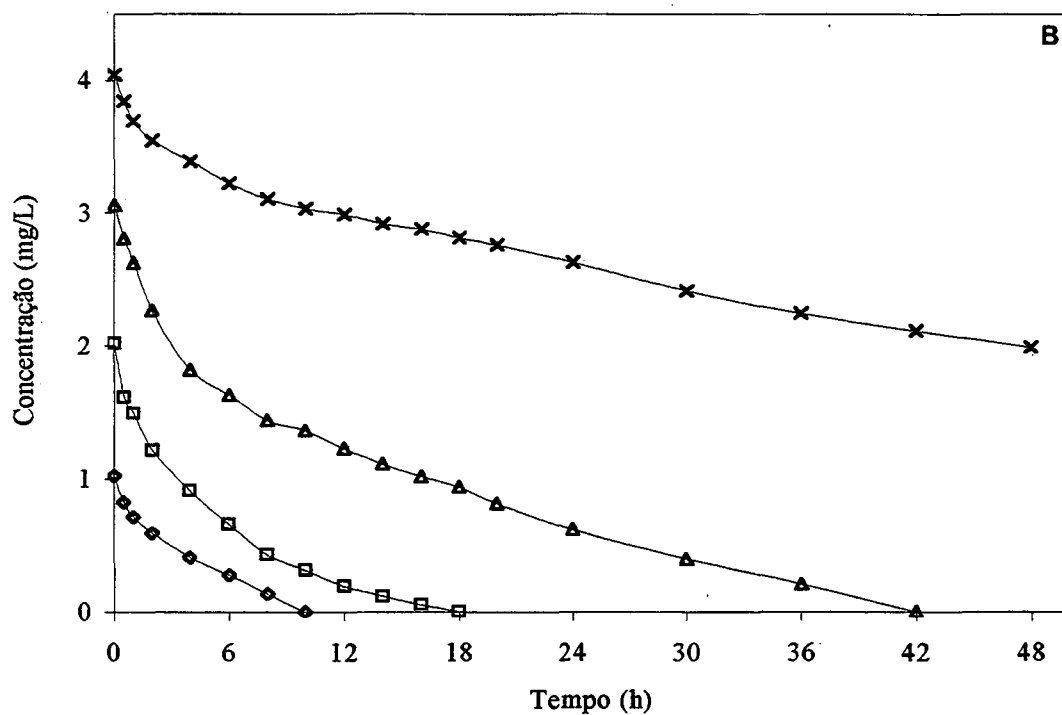
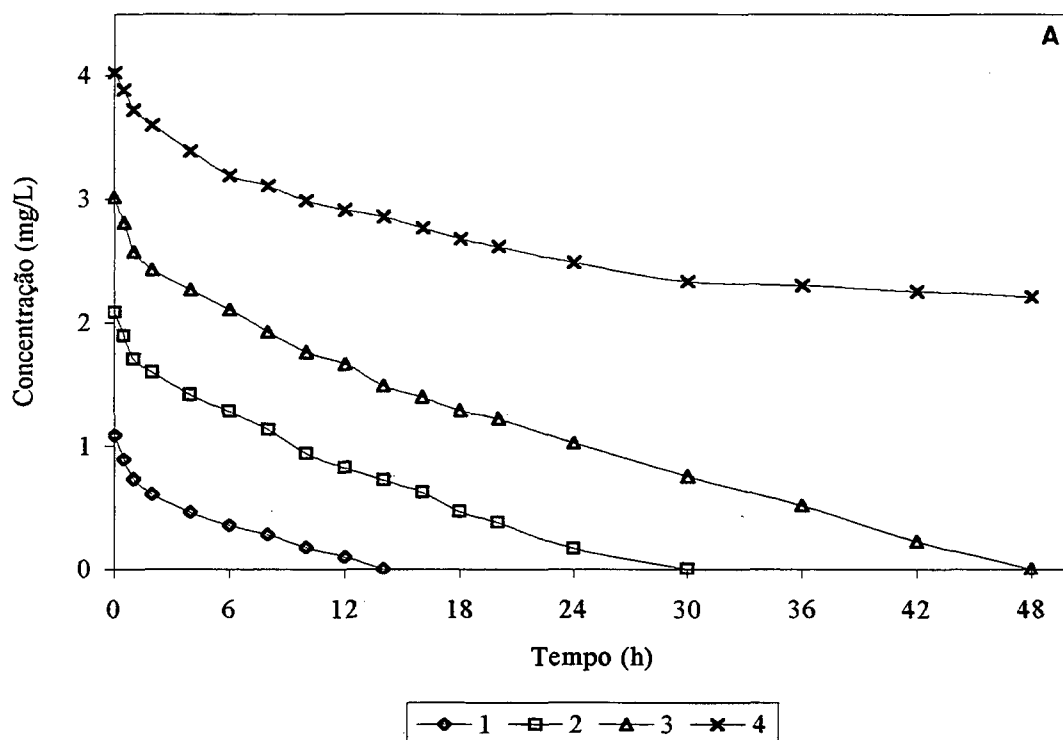
totalmente consumido somente até a concentração de 3 mg/L em meio MSM (em 48 horas) e TEF (42 horas). O tempo para a degradação total de 2 mg/L de 2,4-DCP foi reduzido de 30 horas no meio MSM para 18 horas em TEF, na presença de nutrientes (TSB e fenol 500 mg/L). Estes resultados foram melhores do que os relatados para cepas puras de *Chryseomonas luteola* e *Sphingomonas paucimobilis*, adaptadas a 2,4-DCP, que degradaram em meio MSM, até 1,5 mg/L do composto em 71 horas (SMITH-GREENIER & ADKINS, 1996).

Os ensaios mostraram uma redução apenas parcial da concentração inicial de 4 mg/L de 2,4-DCP, de 45% no meio MSM e de 50% no meio TEF (Figura 16A e 16B). Este resultado foi melhor do que o obtido com redução de apenas 16,5% de 2,4-DCP em meio MSM (Figura 11B). Portanto, a cepa adaptada não consumiu uma maior concentração de 2,4-DCP, mas reduziu o tempo de degradação do composto. Microorganismos de sedimentos estuarinos foram realimentados sucessivamente com 16,3 mg/L de 2,4-DCP. O tempo de degradação total do composto foi reduzido de 120 a 220 para 40 dias (HÄGGBLOM & YOUNG, 1990).

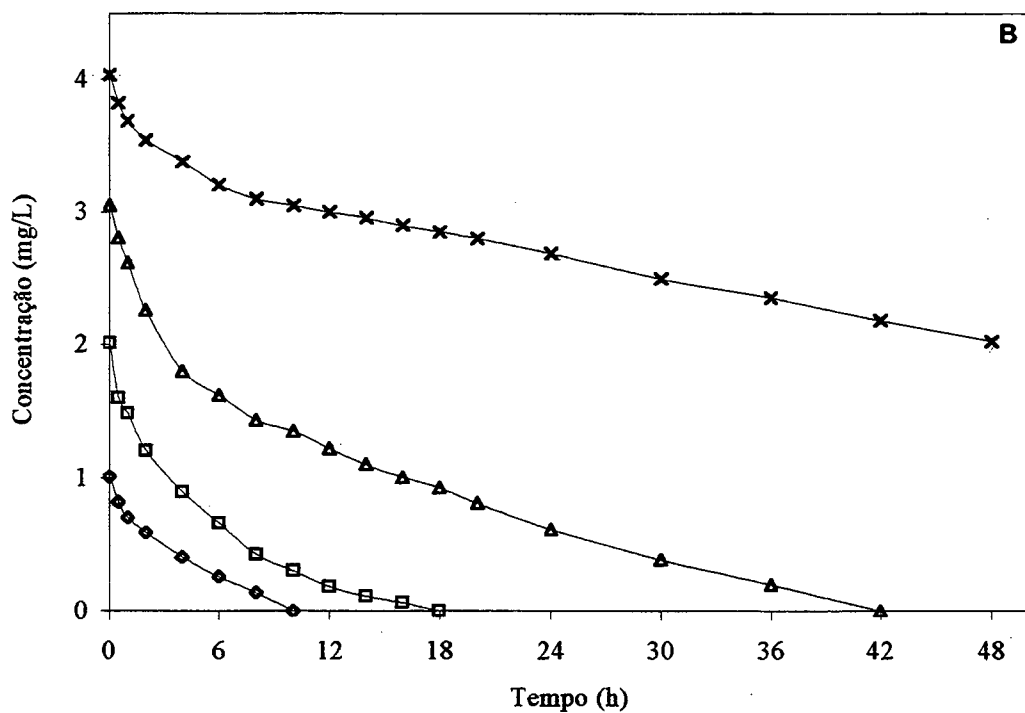
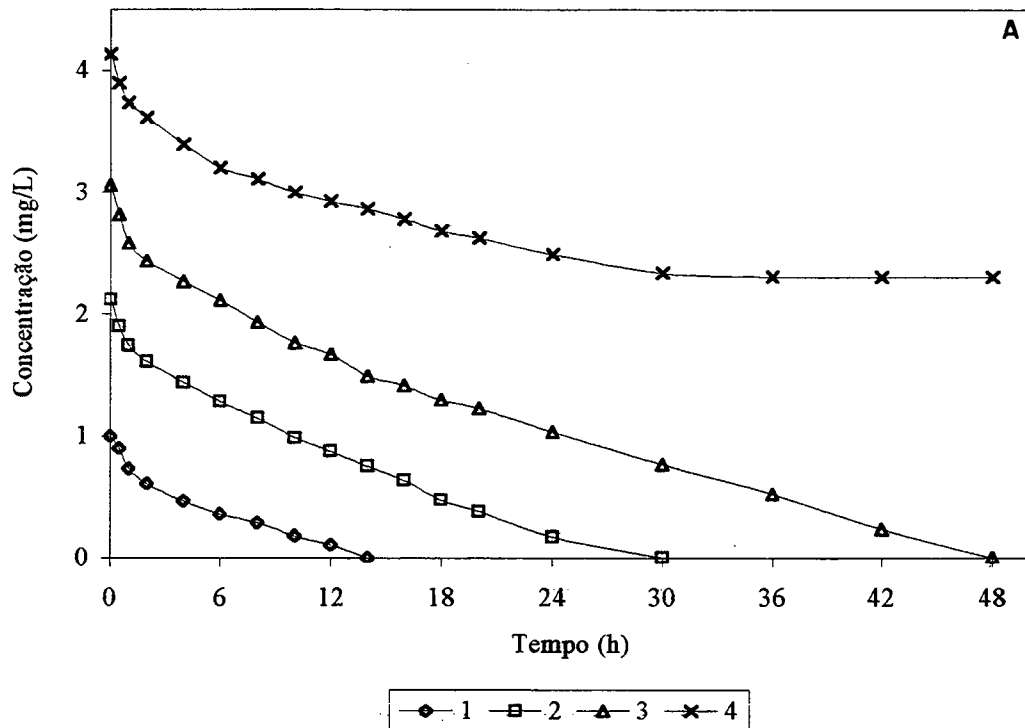
#### 4.8.4. Degradação de 2,4-D por *A. faecalis* em meio MSM e TEF

*Alcaligenes faecalis* adaptada sucessivamente a concentrações crescentes de 2,4-D, mostrou a capacidade de degradar totalmente até 3 mg/L do composto como única fonte de carbono (Figura 17A). Os ensaios mostraram uma redução apenas parcial da concentração inicial de 4 mg/L de 2,4-D, de 44% no meio MSM e de 50% no meio TEF (Figura 17A e 17B). Apesar disso, esta redução da concentração de 2,4-D nos ensaios sucessivos foi melhor do que os 10%, antes obtido no meio MSM (Figuras 11B) e de 30% em meio MSM + nutrientes (Figura 13B).

Comparado aos monoclorofenóis, os resultados mostraram uma maior dificuldade de degradação dos diclorofenóis. *Alcaligenes faecalis* apresentou menor degradação de 2,4-D, em relação ao 2,4-DCP, provavelmente devido à dificuldade da cepa, em remover o radical acetato, como discutido por LAINE & JÖRGENSEN (1996).



**Figura 16** – Degradação sucessiva de diferentes concentrações (mg/L) de 2,4-DCP por *Alcaligenes faecalis* em meios (A) MSM e (B) TEF. Os resultados representam a média de 3 experimentos.



**Figura 17** – Degradação sucessiva de diferentes concentrações (mg/L) de 2,4-D por *Alcaligenes faecalis* em meios (A) MSM e (B) TEF. Os resultados representam a média de 3 experimentos.

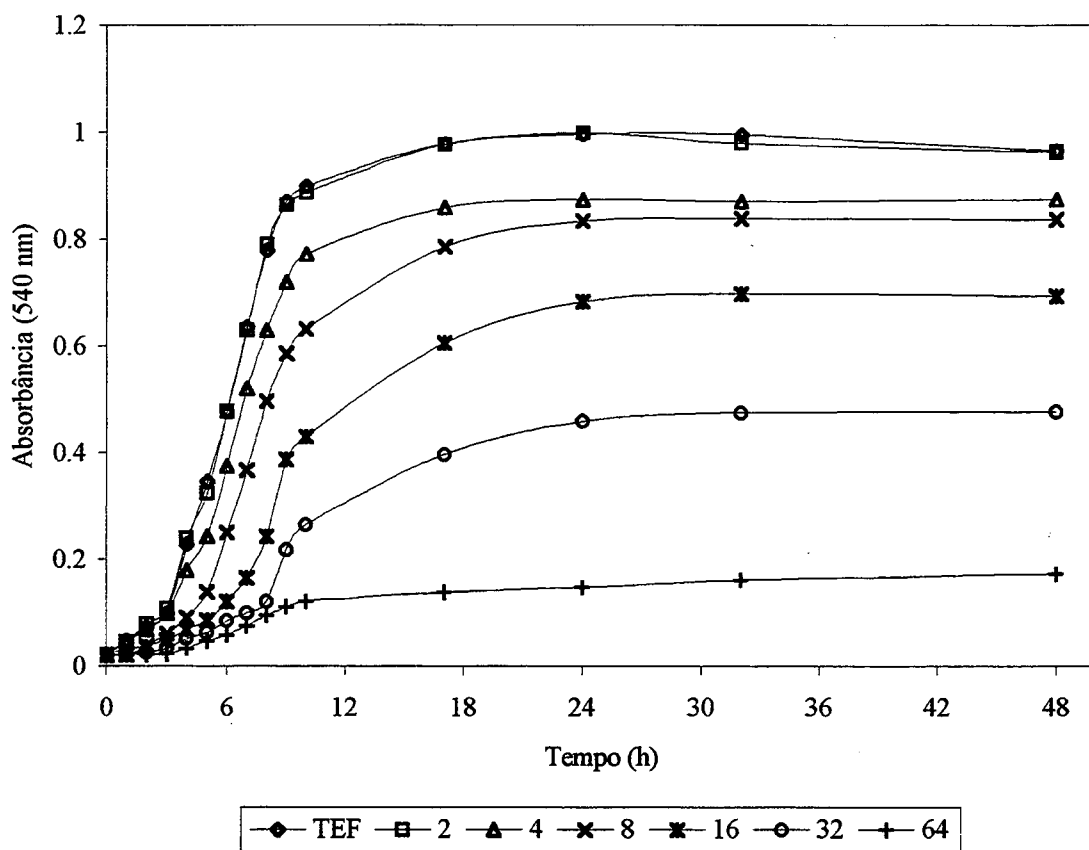
Os resultados demonstraram que as adaptações de *Alcaligenes faecalis* a sucessivas e crescentes quantidades de 2-CP, 3-CP, 2,4-DCP e 2,4-D, permitiram o consumo de maiores concentrações de clorofenóis ou reduziram o tempo de degradação.

Nos ensaios realizados como o meio TEF, foi observado um aumento da velocidade e da capacidade de degradação dos compostos aromáticos clorados em relação ao meio MSM. Estes resultados sugerem que isto teria ocorrido pela presença de nutrientes (componentes do TSB, Tabela 1) ou ainda devido ao fenol, que poderia atuar como indutor da degradação dos clorofenóis, por co-metabolismo (ATLAS & BARTHA, 1993; CLÉMENT et al., 1995).

#### 4.9. Crescimento sucessivo de *A. faecalis* em concentrações crescentes de 2,4-DCP

*Alcaligenes faecalis*, em ensaios de adaptação sucessivas em meio TEF, degradou parcialmente até 4 mg/L de 2,4-DCP (Figura 16B). Apesar disso, a cepa mostrou um bom crescimento na presença de até 32 mg/L de 2,4-DCP, provavelmente consumindo o fenol e nutrientes, como o TSB (Figura 18). A cepa consumiu 2,4-DCP (2 mg/L) em meio TEF em 18 horas (Figura 16B). No entanto, a cepa apresentou o mesmo crescimento nessa concentração de 2,4-DCP e em meio TEF (Figura 18). O aumento nas concentrações de 2,4-DCP reduziram o crescimento bacteriano. Isto poderia indicar uma inibição do crescimento pelo substrato ou uma possível morte dos microorganismos, na concentração de 64 mg/L de 2,4-DCP. O meio contendo 4 mg/L de 2,4-DCP em meio TEF (Figura 18) é semelhante, com exceção do fenol, ao meio 4 mg/L de 2,4-DCP em MSM suplementado com extrato de levedura e glicose (Figura 13A e Tabela 3, Composição dos meios de cultura). Portanto, apesar destes meios terem composição semelhante, a cepa parece ter crescido muito melhor na presença de fenol (TEF).

Os resultados demonstraram que apesar da capacidade de degradar baixas quantidades de 2,4-DCP, a cepa de *Alcaligenes faecalis* demonstrou tolerância à presença de altas concentrações deste diclorofenol no meio.



**Figura 18** – Crescimento de *Alcaligenes faecalis*: adaptação sucessiva a diferentes concentrações de 2,4-DCP (2 a 64 mg/L) em meio TEF (na presença de fenol 500 mg/L). Os resultados representam a média de 3 experimentos.

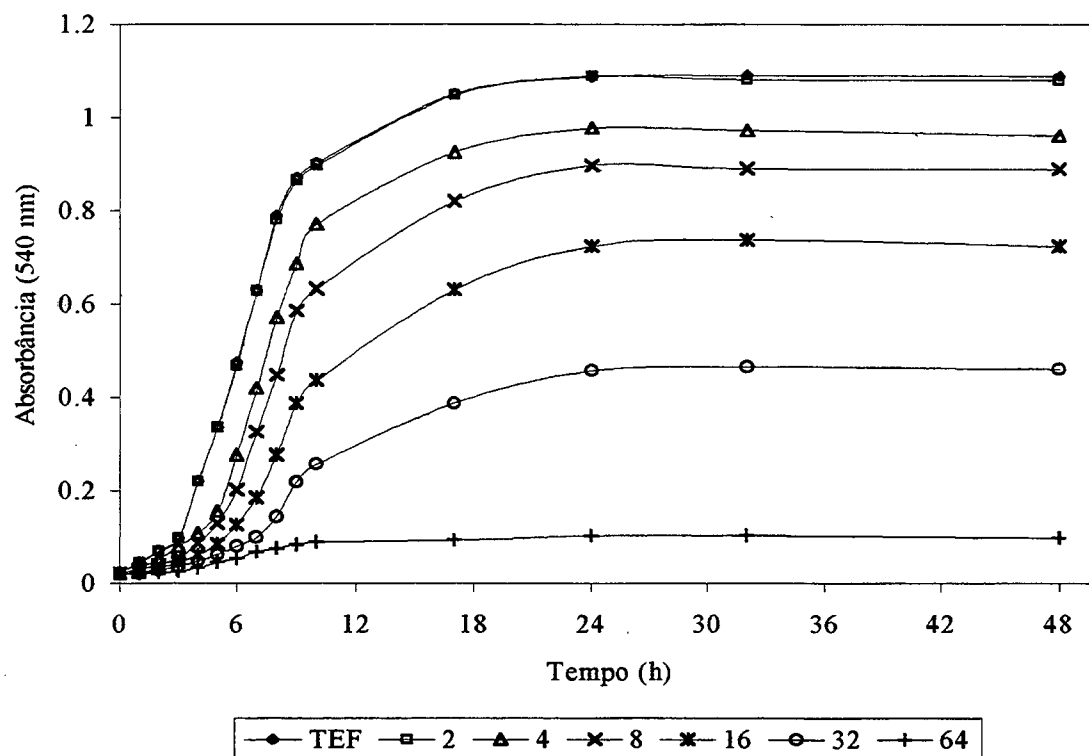
#### 4.10. Crescimento sucessivo de *A. faecalis* em concentrações crescentes de 2,4-D

Apesar de *Alcaligenes faecalis* degradar apenas parcialmente 4 mg/L de 2,4-D, em meio TEF (Figura 17B), esta cepa continuou a mostrar crescimento na presença de até 32 mg/L deste diclorofenol, como apresentado na Figura 19. Este resultado demonstrou uma alta tolerância do microorganismo à presença de concentrações crescentes de 2,4-D. Os meios utilizados contendo 2,4-D (2 mg/L) são semelhantes na Figura 19 e Figura 17B. As concentrações crescentes de 2,4-D resultaram na redução do crescimento de *Alcaligenes faecalis*, ocorrendo a inibição pelo substrato ou morte das células, a partir de 64 mg/L.

*Pseudomonas cepacia* demonstrou uma alta tolerância e capacidade de degradar 2,4-D. A inibição do crescimento ocorreu somente a partir de 2.860 mg/L do composto, mas 221 mg/L do composto foram degradados pela cepa (GREER et al., 1990). Por outro lado, PIEPER et al. (1988) inibiram o crescimento de *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (GEM), somente com concentrações acima de 1.105 mg/L de 2,4-D, uma tolerância muito superior à demonstrada por *Alcaligenes faecalis*.

#### 4.11. Composição química dos meios de degradação

A Tabela 3 mostra a composição dos meios utilizados nos testes de degradação de clorofenóis. MSM, composto por fosfatos e nitrato, foi o meio adequado para induzir a cepa *Alcaligenes faecalis* a utilizar os clorofenóis, como única fonte de carbono. Este é um meio barato e poderia ser utilizado em larga escala em experimentos e/ou processos de bancada ou em testes de descontaminação de solo. No meio TEF, que contém nutrientes-TSB e fenol, foram observados dados efetivos da degradação de clorofenóis. Por outro lado, o meio nutritivo (Tabela 3) que possui na sua composição extrato de levedura e glicose (Tabela 3) parece ter estimulado a difícil degradação de diclorofenóis (Figuras 12 e 13). Quando comparados, os meios nutritivo e TEF são muito semelhantes. Como fonte de aminoácidos, meio nutritivo e TEF contém extrato de levedura e triptona, respectivamente. Os dois também contém glicose, em menor concentração no meio TEF. A diferença entre os dois meios é a presença de fenol no meio TEF, e este demonstrou



**Figura 19** – Crescimento de *Alcaligenes faecalis*: adaptação sucessiva a diferentes concentrações de 2,4-D (2 a 64 mg/L) em meio TEF (na presença de fenol 500 mg/L). Os resultados representam a média de 3 experimentos.



os melhores resultados. Portanto, o fenol poderia estar atuando como indutor da degradação de clorofenóis (co-metabolismo). A degradação de compostos aromáticos clorados pode ser dificultada pela falta de nutrientes essenciais no meio ou de um indutor para o metabolismo dos compostos (CHAUDHRY & CHAPALAMADUGU, 1991; ATLAS & BARTHA, 1993).

**Tabela 3** – Composição dos meios de cultura (em g/L): MSM (sais mínimos); TEF (TSB + fenol); meio nutritivo (MSM + extrato de levedura + glicose).

Meio	Fosfatos	Nitrato	NaCl	Glicose	Triptona	Extrato Levedura	Fenol
MSM	1,5 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1,0 $\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5					
TEF	0,21 $\text{K}_2\text{HPO}_4$		0,41	0,21	1,66		0,5
MSM + Fenol	1,5 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1,0 $\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5					0,5
Meio nutritivo*	1,5 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 1,0 $\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5		5		0,2	

\* Meio utilizado nos ensaios de degradação de diclorofenóis (Figuras 12 e 13)

#### 4.12. Degradação de clorofenóis por *A. faecalis* em meio MSM na presença de fenol (Co-metabolismo)

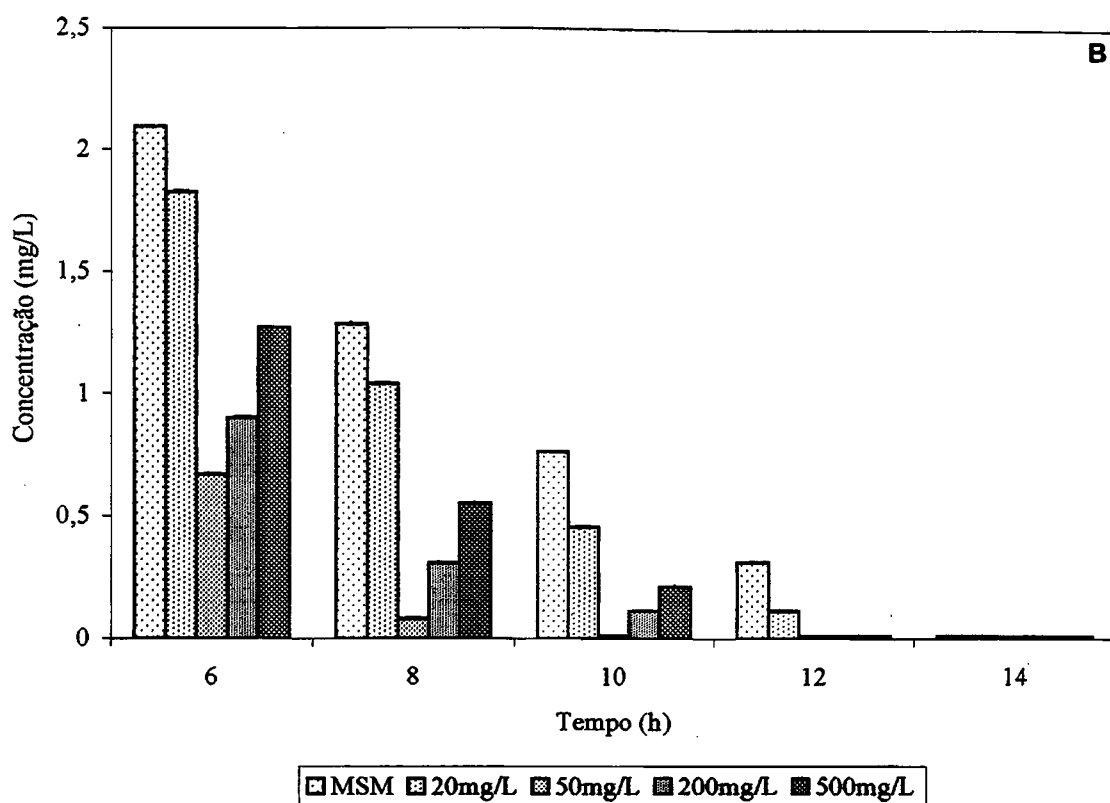
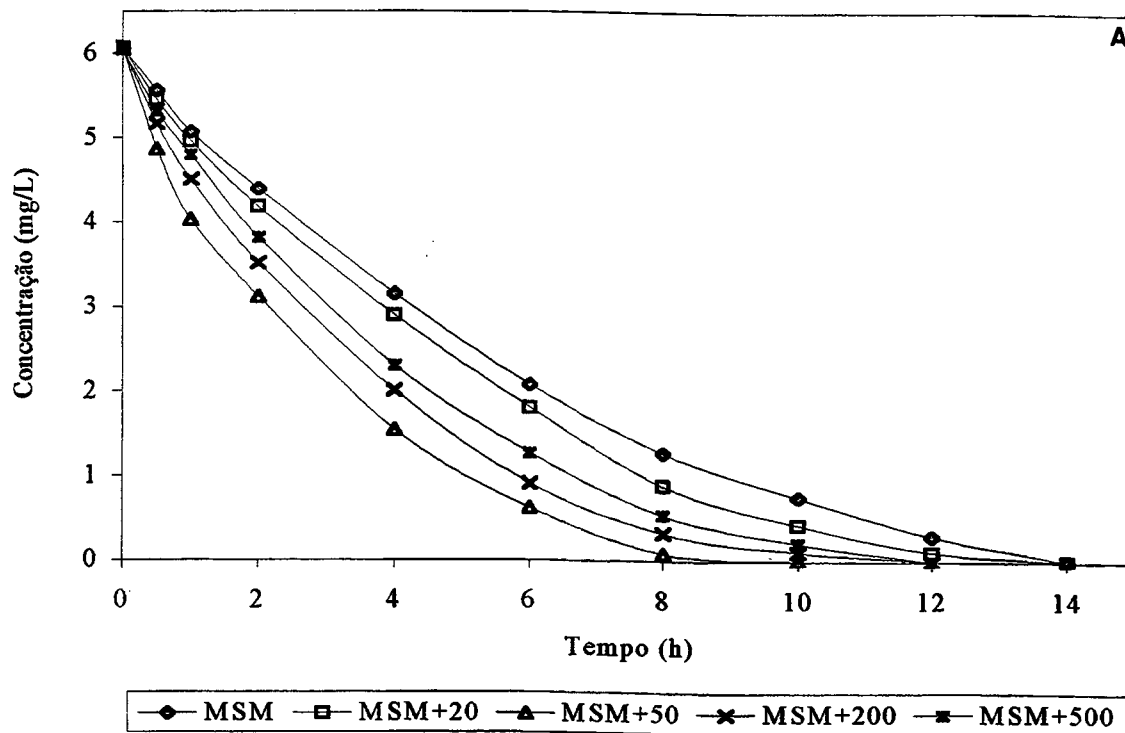
HILL et al. (1996) realizaram experimentos com uma cepa de *Alcaligenes eutrophus* na presença de 4-CP em co-metabolismo com fenol. Os autores observaram uma redução de biomassa e um incremento de até 35% em relação ao tempo de adaptação, antes da fase exponencial.

##### 4.12.1. Degradação de 2-CP e 3-CP por *A. faecalis* na presença de fenol

O efeito do fenol como indutor da degradação de clorofenóis foi testado com 6 mg/L de 2-CP e 3-CP. O ensaio de degradação foi realizado em meio MSM suplementado com diferentes concentrações de fenol (20, 50, 200 e 500 mg/L). A presença de fenol, provocou a redução do tempo de degradação de fenóis monoclorados (Figuras 20A e 21A). Para facilitar a visualização dos resultados, os dados parciais foram apresentados como histogramas (Figura 20B e 21B). Como pode ser observado, 6 mg/L de 2-CP e 3-CP, foram totalmente degradadas em co-metabolismo na presença de 50 mg/L de fenol, em 10 horas. Neste mesmo tempo ainda existiam quantidades residuais de 2-CP e 3-CP, nas outras concentrações de fenol. Durante a o ensaio de co-metabolismo, também foi monitorado o tempo necessário para o consumo total de fenol: 20 mg/L (2 horas), 50 mg/L (4 horas), 200 mg/L (7 horas) e 500 mg/L (10 horas).

A degradação de 2-CP e 3-CP ocorreu de modo semelhante e as concentrações de fenol com melhores resultados foram na seguinte ordem: 50 > 200 > 500 > 20 mg/L > MSM. Estes dados sugerem uma possível proporção de monoclorofenol : fenol ideal para a indução da degradação destes compostos.

HILL et al. (1996) demonstraram a degradação de 4-CP em co-metabolismo com fenol. A degradação foi inibida a partir de 1,08 mg/L de fenol e 0,069 mg/L de 4-CP. Na presença de fenol (0,24 mg/L), 4-CP (0,055 mg/L) foram degradados em 64 horas. Um resultado semelhante foi obtido por SCHIMIDT (1987), demonstrando que a adição de 470 mg/L de fenol em meio MSM contendo 257,2 mg/L de 2-CP, 3-CP e 4-CP, reduziu em 20%, o tempo de 48 horas, necessário para a degradação destes compostos por uma cepa de *Pseudomonas* sp B13.



**Figura 20** – (A) Degradação de 6 mg/L de 2-CP por *Alcaligenes faecalis* em meio MSM, na presença de 20; 50; 200 ou 500 mg/L de fenol. (B) Dados da Figura 20 A mostrando a concentração residual de 2-CP no período de 6 a 14 horas. Os resultados representam a média de 3 experimentos e as barras o erro padrão da média (SEM).

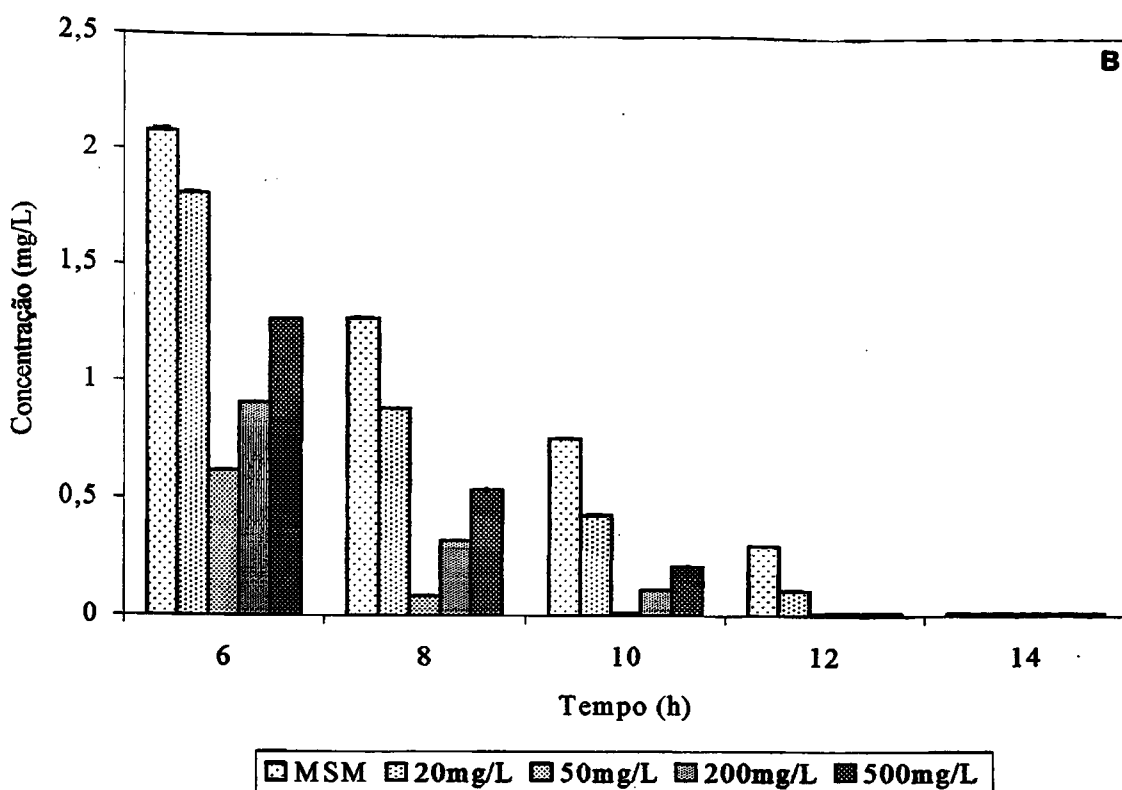
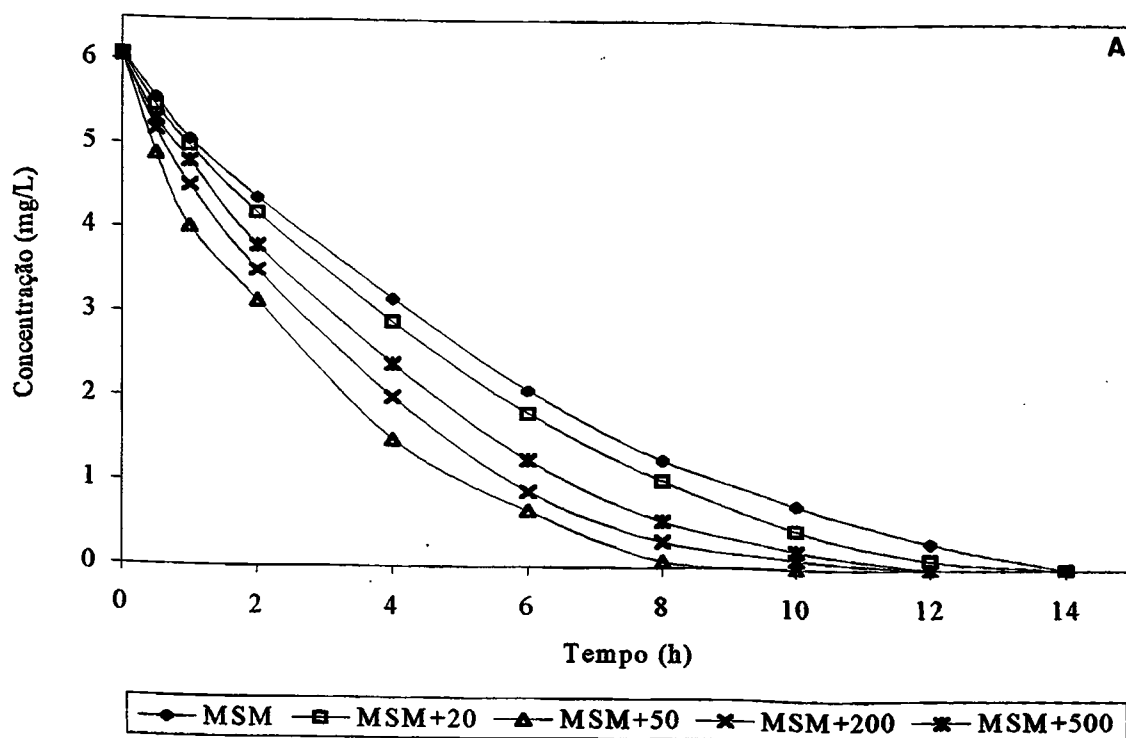


Figura 21 – (A) Degradação de 6 mg/L de 3-CP por *Alcaligenes faecalis* em meio MSM, na presença de 20; 50; 200 ou 500 mg/L de fenol. (B) Dados da Figura 21 A mostrando a concentração residual de 3-CP no período de 6 a 14 horas. Os resultados representam a média de 3 experimentos e as barras o erro padrão da média (SEM).

#### 4.12.2. Degradação de 2,4-DCP e 2,4-D por *A. faecalis* na presença de fenol

Os mesmos ensaios de indução da degradação pelo fenol foram realizados com diclorofenóis (2 mg/L de 2,4-DCP e 2,4-D). Os resultados também indicaram que o fenol induziu a degradação de diclorofenóis por *A. faecalis*, como mostrado nas Figuras 22A e 23 A. Para melhor visualização, os dados foram colocados em histogramas (Figura 22B e 23B). Como mostram estas Figuras, 2 mg/L de 2,4-DCP, foi totalmente degradado na presença (co-metabolismo) de 50 mg/L de fenol, em 20 horas (Figura 22A e 22B). Nas mesmas condições, o 2,4-D foi totalmente degradado em 24 horas (Figura 23A e 23B). Em ambos os casos, no tempo de 24 horas, ainda existiam concentrações residuais de 2,4-DCP e 2,4-D nas outras concentrações de fenol.

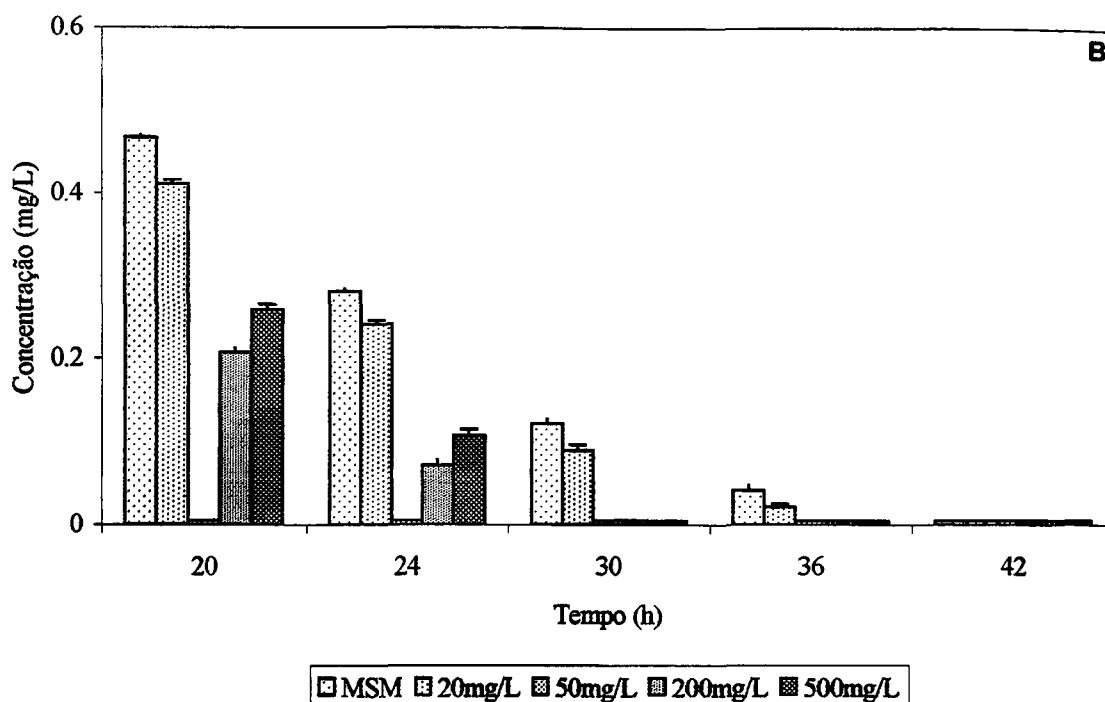
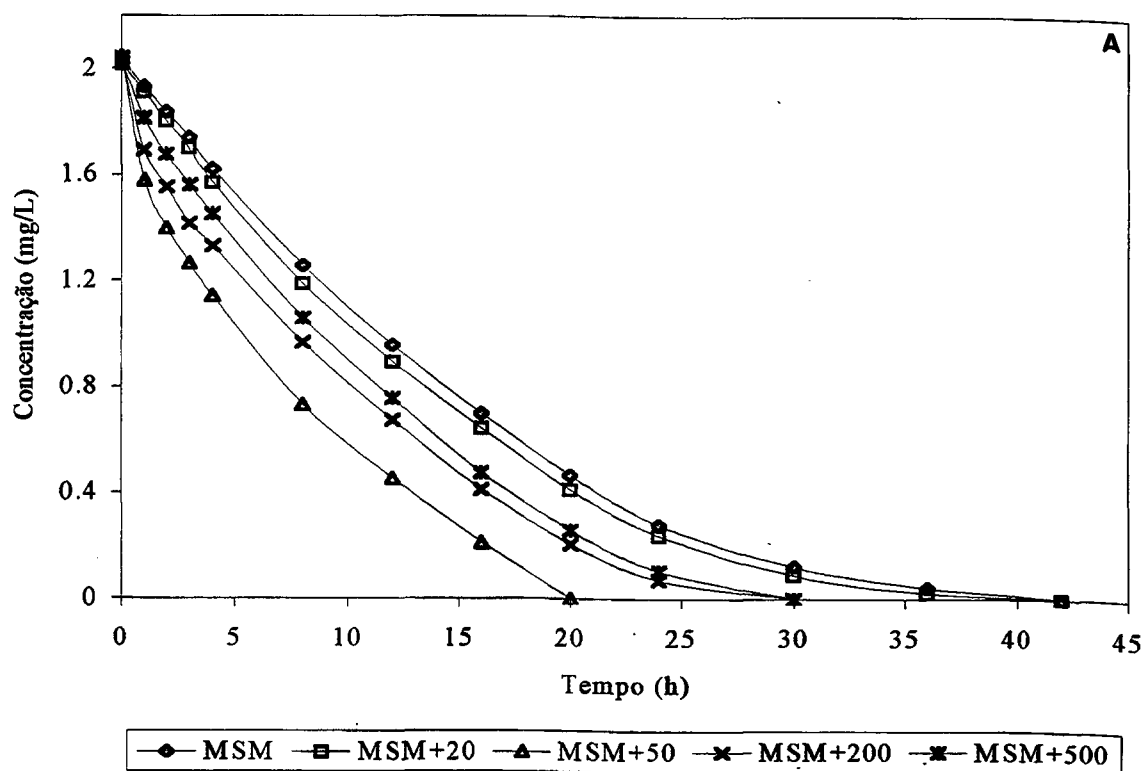
A presença de diclorofenóis nestes ensaios não alterou o tempo de degradação das diferentes concentrações do indutor, fenol, que foram rapidamente consumidas nos mesmos tempos observados para monoclorofenóis (item 4.12.1).

A cepa *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (GEM), mostrou crescimento na presença de 359 mg/L de 2,4-DCP e 94,1 mg/L de fenol, em meio MSM (HÄGGBLÖM & VALO, 1995). Ensaio de co-metabolismo por *Alcaligenes eutrophus* JMP134 foram realizados para a degradação de 79 mg/L de 2,4,6-triclorofenol e 37,6 mg/L de fenol. A cepa degradou totalmente 2,4,6-TCP em 48 horas e o fenol foi consumido em 20 horas (CLÉMENT et al., 1995). MÜLLER & BABEL (1994) observaram que *Alcaligenes eutrophus* JMP134 utilizou 2,4-D em co-metabolismo com 94,1 mg/L de fenol.

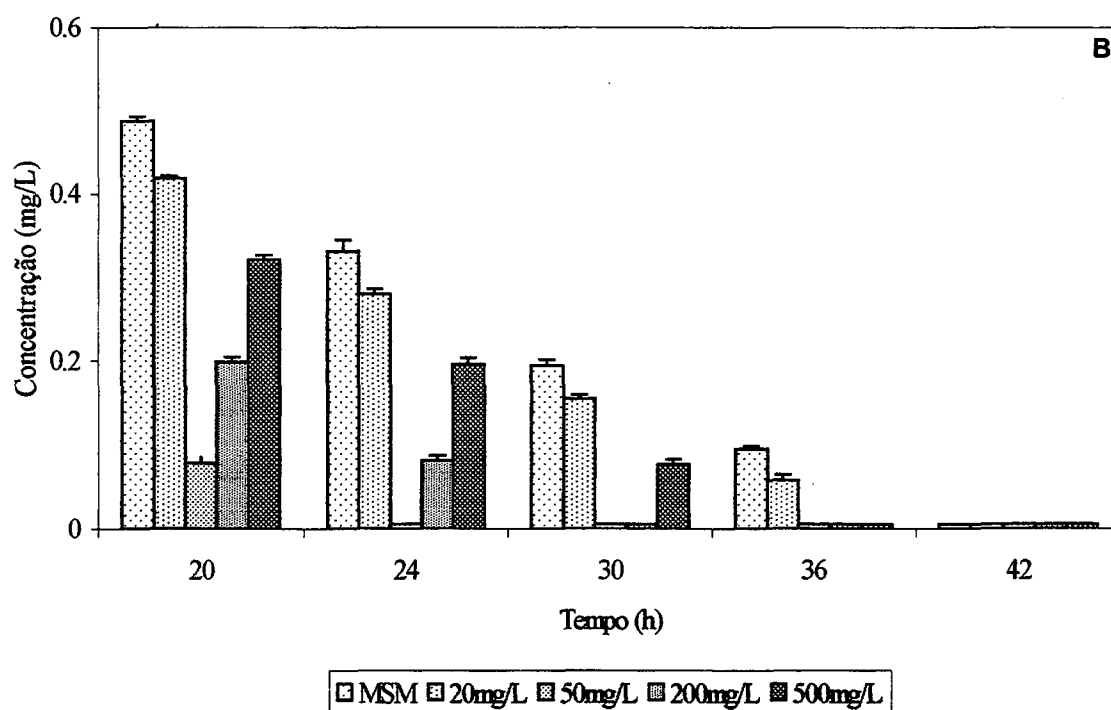
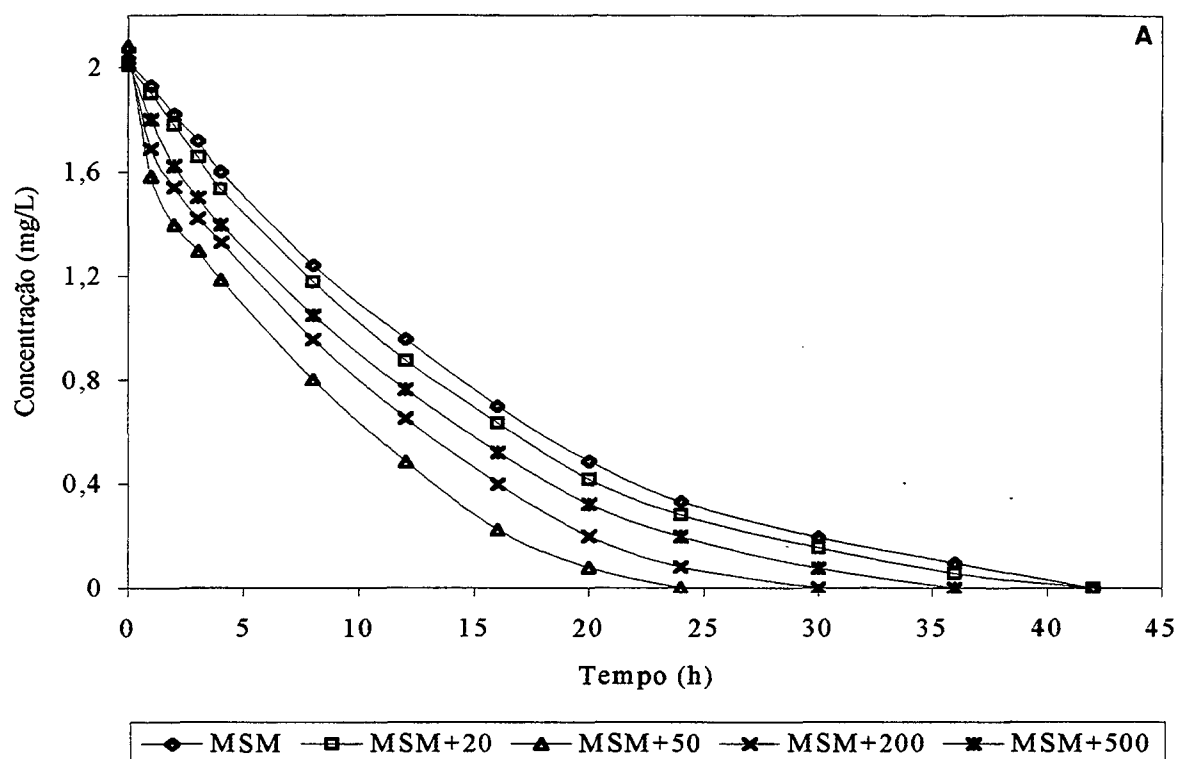
As melhores taxas de degradação de 2,4-DCP e 2,4-D também foram obtidas nas concentrações de fenol, na ordem 50 > 200 > 500 > 20 mg/L > MSM.

Os resultados poderiam sugerir uma proporção diclorofenol : fenol ideal para a indução da degradação de 2,4-DCP e 2,4-D, sendo que estes últimos foram de degradação mais difícil do que os monoclorofenóis, em todas as situações testadas.

De modo geral, *Alcaligenes faecalis* demonstrou maior dificuldade na degradação dos compostos diclorofenóis do que monoclorados. Dentre os diclorados, o 2,4-D mostrou ser mais recalcitrante que o 2,4-DCP, devido ao radical acetato, ligado a sua estrutura, o que envolve uma etapa a mais na via de degradação deste composto, além da presença dos dois átomos de cloro.



**Figura 22** – (A) Degradação de 2 mg/L de 2,4-DCP por *Alcaligenes faecalis* em meio MSM, na presença de 20; 50; 200 ou 500 mg/L de fenol. (B) Dados da Figura 22 A mostrando a concentração residual de 2,4-DCP no período de 20 a 42 horas. Os resultados representam a média de 3 experimentos e as barras o erro padrão da média (SEM).



**Figura 23** – (A) Degradação de 2 mg/L de 2,4-D por *Alcaligenes faecalis* em meio MSM, na presença de 20; 50; 200 ou 500 mg/L de fenol. (B) Dados da Figura 23 A mostrando a concentração residual de 2,4-D no período de 20 a 42 horas. Os resultados representam a média de 3 experimentos e as barras o erro padrão da média (SEM).

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A cepa de *Alcaligenes faecalis*, apresentou melhor capacidade de consumir os monoclorofenóis do que diclorofenóis, como única fonte de carbono. Dentre os diclorados, o 2,4-D mostrou ser mais recalcitrante que o 2,4-DCP.

Estudos posteriores poderão ser realizados para verificar os mecanismos da degradação de clorofenóis, como a sua mineralização, a preferência pelos monoclorofenóis, a atividade das enzimas de degradação, os metabólitos e também verificar a possibilidade de realizar testes com a cepa em biorreatores para a descontaminação de clorofenóis.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, P. R.; AURORA, R.; GHAOUTH, A.E; GLENN, D. M & SOLAR, J. M. Bioremediation of phenolic compounds from water with plant root surface peroxidases. *J Environ Qual*, **23**:1113-1117,1994.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and Biodeterioration**. Academic Press, Inc., San Diego, California, U.S.A., p. 302, 1994.
- ATLAS, R. M. & BARTHA, R. **Microbial Ecology, Fundamentals and Applications**. 3.ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California, U.S.A, 1993.
- BABICH, H. & BORENFREUND, E. In vitro citotoxicity of organic pollutants to bluegill sunfish. *Environ Res*, **42**(1):229-237,1987.
- BABU, K.S.; AJITHKUMAR, P.V. & KUNHI, A. A. M. Simultaneous degradation of 3-chlorobenzoate and phenolic compounds by a defined mixed culture of *Pseudomonas sp.* *World J Microbiol Biotechnol*, **11** (2):148-152,1995.
- BAKER, E. L.; BERTOZI, P. E.; FIELD, P. H. & SKINNER, H. G. Phenol poisoning due to contaminated drinking water. *Arch Environ Health*, 89-94,1978.
- BARBOSA, T. C.; LUZ, A. P.; BEDIN, M. L. & GABILAN, N. H. Effect of ceramic plant effluent on the phenol degradation by *Acinetobacter calcoaceticus*. *II Latin-American Biodegradation and Biodeterioration Symposium*. Abstracts. Gramado - RS, 1995.
- BHAT, M. A.; TSUDA, M.; HORIIKE, K.; NOZAKI, M.; VAIDYANATHAN, C.S & NAKAZAWA, T. Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Appl Environ Microbiol*, **60**(1):307-312, 1994.
- BODZEK, M.; BOHDZIEWICZ, J. & KOWALSKA, M. Preparation of phenol membrane-immobilized enzymes for phenol decomposition. *J Chem Tech Biotechnol*, **61**:231-239,1994.
- BOUWER, E. J. & ZEHNDER, A. J. B. Bioremediation of organic compounds: putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnology*, **11**(8):360,367,1993.
- BOYD, S. A. & SHELTON, D. R. Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. *Appl Environ Microbiol*, **47**:272-277,1984.

- BOYLE, M. The importance of genetic exchange in degradation of xenobiotic chemicals. *Environ Microbiol*, **13**:319-333,1992.
- CAPLAN, J. A. The worldwide bioremediation industry: prospects for profit. *Trends in Biotechnology*, **11**(8):320-323,1993.
- CESPEDES, R.; MATURANA, A.; BUMANN, U. BRONFMAN, M. & GONZALEZ, B. Microbial removal of chlorinated phenols during aerobic treatment of effluents from radiata pine kraft pulps bleached with chlorine-based chemicals, with or without hemicellulases. *Appl Microbiol Biotechnol*, **46**(5-6):631-637,1996.
- CHAUDHRY, G. R. & CHAPALAMADUGU, S. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol Reviews*, **55**:59-79, 1991.
- CHUA, H.; YU, P. H. & LO, W. Accumulation of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate in *Alcaligenes eutrophus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. **70-72**:929-935,1998.
- CHUDKY, W. A. & SNOEYINK, V. L. Bioregeneration of activated carbon saturated with phenol. *Environ Sci Technol*, **18**(1):1-5,1984.
- CLÉMENT, P.; MATUS, V.; CÁRDENAS, L. & GONZÁLEZ, B. Degradation of trichlorophenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *FEMS Microbiol Lett*, **127**:51-55,1995.
- COLLARD, J. M.; CORBISIER, P.; DIELS, L.; DONG, Q.; JEANTHON, C.; MERGEAY, M.; TAGHAVI, S.; van der LELIE, D. WILMOTTE, A. & WUERTZ, S. Plasmid for heavy metal resistance in *Alcaligenes eutrophus* CH34: mechanisms and application. *FEMS Microbiol Rev.*, **14**(4):405-414,1994.
- DANIEL, F. B.; ROBINSON, M.; OLSON, G. R.; YORK, R. G. & CONDIE, L. W. Ten and ninety-day toxicity studies of 2-chlorophenol in Sprague-Dawley rats. *Drug Chem Toxicol*, **16**(3):277-291,1993.
- DAUGHERTY, D. D. & KAREL, S. F. Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by *Pseudomonas cepacia* DB01(pR0101) in a dual-substrate chemostat. *Appl Environ Microbiol*, **60**(9):3261-3267,1994.
- DAVIS, S. & BURNS, R. G. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. *Appl Microbiol Biotechnol*, **32**:721-726,1990.

- DAVIS, S. & BURNS, R. G. Covalent immobilization of laccase on activated carbon for phenolic effluent treatment. *Appl Microbiol Biotechnol*, **37**:911-916,1992.
- De BONT, J. A.; VORAGE, M. J.; HARTMANS, S. & van de TWEEL, W. J. Microbial degradation of 1,3-dichlorobenzene. *Appl Environ Microbiol*, **52**(4):677-680,1986.
- DEC, J. & BOLLAG J. M. Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnol Bioeng*, **44**:1132-1139,1994.
- DUXBURY, J. M.; TIEDJE, J. M.; ALEXANDER, M. & DAWSON, J. E. 2,4-D metabolism: enzymatic conversion of chloromaleylacetic acid to succinic. *J Agric Food Chem*, **18**:199-201,1970.
- ERZINGER, G. S. *Estudo cinético da produção de glicose-frutose oxidoreductase por Zymomonas mobilis ATCC29191*. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, São Paulo, 1995.
- ESTRELLA, M. R.; BRUSSEAU, M. L.; MAIER, R. S.; PEPPER, I. L.; WIERENGA, P. J. & MILLER, R. M. Biodegradation, sorption and transport of 2,4-dichlorophenoxyacetic acids in saturated and unsaturated soils. *Appl Environ Microbiol*, **59**(12):4266-4273,1993.
- EVANS, W. C.; SMITH, B. S. W.; FERNLEY, H. N. & DAVIES, J. I. Bacterial metabolism of 2,4-Dichlorophenoxyacetate. *Biochem J*, **122**:543-551,1971.
- EXON, J. K. & KOLLER L. D. Effects of transplacental exposure to chlorinated phenols. *Environ Health Perspect*, **46**:137-140,1982.
- FAUZI, A. M.; HARDMAN, D. J. & BULL, A. T. Biodehalogenation of low concentrations of 1,3-dichloropropanol by mono- and mixed cultures of bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, **46**:660-666,1996.
- FAVA, F.; ARMENANTE, P. M.; KAFKEWITZ, D. & MARCHETTI, L. Influence of organic and inorganic growth supplements on the aerobic biodegradation of chlorobenzoic acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, **43**:171-177,1995a.
- FAVA, F.; ARMENANTE, P. M. & KAFKEWITZ, D. Aerobic degradation and dechlorination of 2-chlorophenol, 3-chlorophenol and 2,4-dichlorophenol by a *Pseudomonas picketti* strain. *Lett Appl Microbiol*, **21**(5):307-312,1995b.

- FETZNER, S. & LINGENS, F. Bacterial dehalogenases: Biochemistry, genetics, and biotechnological applications. *Microbiol Rev*, **58**(4):641-685,1994.
- FIELD, J. A.; JONG, E. D.; COSTA, G. F. & de BONT, J. A. M. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of White Rot Fungi. *Appl Environ Microbiol*, **58**:2219-2226,1992.
- FIELD, J. A.; STAMS, A. J. M.; KATO, M. & SCHRA, G. Enhanced biodegradation of aromatic pollutants in co-cultures of anaerobic and aerobic bacterial consortia. *Antonie von Leeuwenhoek*, **67**:47-77,1995.
- FUKUMORI, F. & HAUSINGER, R. P. Purification and characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetate/alpha-ketoglutarate dioxygenase. *J Biol Chem*, **268**(32):24311-24317,1993a.
- FUKUMORI, F. & HAUSINGER, R. P. *Alcaligenes eutrophus* JMP134 "2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase" is an  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenase. *J Bacteriol*, **175**(7):2083-2086,1993b.
- GRADY, C. P.; CORDONE, L. & CUSACK, L. Effects of media composition on substrate removal by pure and mixed bacterial cultures. *Biodegradation*, **4**(1):23-28,1993.
- GREER, C. W.; HAWARI, J. & SAMSON, R. Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat. *Arch Microbiol*, **154**:317-322,1990.
- GREER, L. E.; ROBINSON, J. A. & SHELTON, D. R. Kinetic comparison of seven strains of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **58**(3):1027-1030,1992.
- HÄGGBLÖM, M. M. & YOUNG, L. Y. Chlorophenol degradation coupled to sulfate reduction. *Appl Environ Microbiol*, **56**(11):3255-3260,1990.
- HÄGGBLÖM, M. M. & VALO, R. J. Bioremediation of Chlorophenol Waste. In: LISS, W., ed. **Microbial Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals**. Wiley Liss, Inc., New York, U.S.A, pages 389-434, 1995.
- HAIGLER, B. E.; PETTIGREW, C. A. & SPAIN, J. C. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. Strain JS150. *Appl Environ Microbiol*, **58**(7):2237-2244,1992.

- HAUGLAND, R. A.; SCHLEMM, D. J.; LYONS III, R. P.; SFERRA, P.R. & CHAKRABARTY, A. M. Degradation of the chlorinated phenoxyacetic herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by pure and mixed bacterial cultures. *Appl Environ Microbiol*, **56**(5):1357-1362,1990.
- HEIPIEPER, J. H.; FRANS, J. W.; SIKKEMA, J.; KEWELOH, H. & de BONT, J. A. M. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Elsevier Science Ltd*, **12**:409-415,1994.
- HILL, G. A.; MILNE, B. J. & NAWROCKI, P. A. Cometabolic degradation of 4-chlorophenol by *Alcaligenes eutrophus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, **46**:163-168,1996.
- HINTEREGGER, C.; LEITER, R.; LOIDL, M.; FERSSCHL, A. & STREICHSBIER, F. Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII. *Appl Microbiol Biotechnol*, **37**:252-259,1992.
- HOLT, J. & KRIEG, N. R. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A, 1984.
- JACOBSEN, C. S. & PEDERSEN, J. C. Mineralization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in soil inoculated with *Pseudomonas cepacia* DBO1 (pRO101), *Alcaligenes eutrophus* AEO106 (pRO101) and *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4): effects of inoculation level and substrate concentration. *Biodegradation*, **2**(4):253-263,1991.
- KA, J. O.; HOLBEN, W. E. & TIEDJE, J. M. Genetic and phenotypic diversity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degrading bacteria isolated from 2,4-D-treated field soils. *Appl Environ Microbiol*, **60**(4):1106-1115,1994.
- KAFKEWITZ, D.; FAVA, F. & ARMENANTE, P. M. Effect of vitamins on the aerobic degradation of 2-chlorophenol, 4-chlorophenol and 4-chlorobiphenyl. *Appl Microbiol Biotechnol*, **46**(4):414-421,1996.
- KANG, B. S.; HA, J. Y.; LIM, J. C.; LEE, J.;KIM, C. K.; MIN, K. R. & KIM, Y. Structure of catechol 2,3-dioxygenase gene from *Alcaligenes eutrophus* 335. *Biochem Biophys Res Commun*. **245**(3):791-796,1998.
- KENNES, C.; WU, W.; BHATNARGA, L. & ZEIKUS, J. G. Anaerobic dechlorination and mineralization of pentachlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol by mutagenic pentachlorophenol degrading granules. *Appl Microbiol Biotechnol*, **44**(6):801-806,1996.

- KLIVANOV, A. M.; TU, T. M. & SCOTT, K. P. Peroxidases-catalyzed removal phenols from coal-conversion waste waters. *Science*, **221**:259-261,1983.
- KOROL, S.; ORSINGHER, M.; SANTINI, P.; MORETTON, J. & D'AQUINO, M. Biodegradation of phenolic compounds. II. Effects of inoculum, xenobiotic concentration and adaptation on *Acinetobacter* and *Pseudomonas* phenol degradation. *Rev Lat-amer Microbiol*, **31**:117-120,1989.
- LAINE, M. M. & JÖRGENSEN, K. S. Straw compost and bioremediated soil as inoculum for the bioremediation of chlorophenol-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol*, **62**(5):1507-1513,1996.
- LEAHY, J. G. & COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev*, **54**(3):305-315,1990.
- LUTHY, R. G. & TALLON, J. T. Biological treatment of a coal gaseification process wastewater. *Water Res*, **14**:1269-1282,1980.
- Mc ALLISTER, P. J.; RAO BHAMIDIMARRI, S. M.; CHONG, R. & MANDERSON, G. J. Activated sludge treatment of phenoxy herbicides and chlorophenols. *Wat Sci Tech*, **28**(7):111-115,1993.
- MIKESELL, M. D.; KUKOR, J. J. & OLSEN, R. H. Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer. *Biodegradation*, **4**:249-259,1993.
- MÜLLER, R. H. & BABEL, W. Phenol and its derivates as heterotrophic substrates for microbial growth - an energetic comparison. *Appl Microbiol Biotechnol*, **42**:446-451,1994.
- NICHOLSON, D. K.; WOODS, S. L.; ISTOK, J. D. & PEEK, D. C. Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenol-acclimated methanogenic consortium. *Appl Environ Microbiol*, **58**(7):2280-2286,1992.
- PÉREZ-BARINOTO, M. E. P.; BARBOSA, T. C. P. & GABILAN, N. H. Efeito da composição do meio na degradação de fenol por duas bactérias aeróbicas. *Anais da I Reunião Nacional sobre Microbiologia Aplicada*. UNICAMP, Campinas - SP, FAPESP, 48-53, 1996.

- PIEPER, D. H.; REINEKE, W.; ENGESSER, K. & KNACKMUSS, J. H. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2-methylphenoxyacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. *Arch Microbiol*, **150**:95-102,1988.
- PIEPER, D. H.; ENGESSER, K-H. & KANCKMUSS, H-J. Regulation of catabolic pathways of phenoxyacetic acids and phenols in *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Arch Microbiol*, **151**:365-371,1989.
- RAMOS, J. L. & TIMMIS, K. N. Experimental evolution of catabolic pathways of bacteria. *Microbiol Sci*, **4**(9):228-237,1987.
- RAMOS, J.L.; DIAZ, E.; DOWLING, D.; LORENZO, V.; SOREN, M.; O'GARA, F.; RAMOS, C. & TIMMIS, K.N. The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Bio/Technology*, **12**:1349-1356,1994.
- SCHLÖMANN, M. Evolution of chlorocatechol catabolic pathways. *Biodegradation*, **5**:301-321,1994.
- SCHIMIDT, E. Response of a chlorophenols degrading mixed culture to changing loads of phenol, chlorophenol and cresols. *Appl Microbiol Biotechnol*, **27**:94-99,1987.
- SHIMP, R. J. & PFAENDER, F. K. Influence of naturally occurring humic acid on biodegradation of monosubstituted phenols by aquatic bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **49**(2):402-407,1985.
- SILVA, C. M. M. & FAY, E. F. Persistência e biomagnificação de moléculas xenobióticas. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L., ed. *Microbiologia Ambiental*. Embrapa-CNPMA, Jaguariúna, São Paulo, pgs. 67-105,1997.
- SINTON, G. L.; FAN, L. T.; ERICKSON, L. E. & LEE, S. M. Biodegradation of 2,4-D and related xenobiotic compounds. *Enzyme Microbiol Technol*, **8**:395-403,1986.
- SMITH-GREENIER, L. L. & ADKINS, A. Degradation of diclofop-methyl by pure cultures of bacteria isolated from Manitoban soils. *Can J Microbiol*, **42**(3):227-233,1996.
- SPAIN, J. C. & NISHINO, S. F. Degradation of 1-4-dichlorobenzene by *Pseudomonas* sp. *Appl Environ Microbiol*, **53**(3):1010-1019,1987.

- SPRINGAEL, D.; DIELS, L.; HOOYBERGHS, L.; KREPS, S. & MERGEAY, M. Construction and characterization of heavy metal-resistant haloaromatic-degrading *Alcaligenes eutrophus* strains. *Appl Environ Microbiol*, **59**(1):334-339,1993.
- STEIERT, J. G. & CRAWFORD, R. L. Microbial degradation of chlorinated phenols. *Trends in Biotechnology*, **3**(12):300-305,1985.
- STEINLE, P.; STUCKI, G.; STETTLER, R. & HANSELMANN, K. W. Aerobic mineralization of 2,6-dichlorophenol by *Ralstonia* sp. Strain RK1. *Appl Environ Microbiol*, **64**(7):2566-2571,1998.
- SUROVTSEVA, E. G.; VASIL'EVA, G. K.; BASKUNOV, B. P. & VOL'NOVA, A. I. Decomposition of 3,4-dichloroaniline by an *Alcaligenes faecalis* culture. *Mikrobiologiya*, **50**(4):740-743,1981.
- THIELE, J.; MÜLLER, R. & LINGENS F. Initial characterization of 4-chlorobenzoate dehalogenase from *Pseudomonas* CBS3.FEMS. *Microbiol Lett*, **41**:115-119,1987.
- TIMMIS, K. N.; STEFFAN, R. J. & UNTERMAN, R. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Ann Rev Microbiol*, **48**:525-527,1994.
- WISERCARVER, K. D. & FAN, L. S. Biological phenol degradation in a gas-liquid-solid fluidized bed reactor. *Biotechnol Bioeng*, **33**:1029-1038,1988.
- YANG, D. R. & HUMPHREY, A. Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. *Biotechnol Bioeng*, **18**:1211-1235,1975.