

Universidade de Évora

**Efeito de Tensioactivos e de um Solvente Hidrofóbico na
Biodisponibilidade do Naftaleno**

Maria do Rosário Alves Freixo

**Dissertação para obtenção do grau de mestre em:
Química Analítica (Aplicação aos Processos Bioquímicos)**

Évora

1997

Resumo

Neste trabalho, estudaram-se estratégias para incrementar a degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) por uma co-cultura que se isolou a partir de solos contaminados. A degradação destes compostos tóxicos e recalcitrantes, nomeadamente na bioremediação de solos contaminados, é dificultada pela sua baixa solubilidade em água.

Para isolamento da co-cultura, adoptou-se um método em placa, diferente dos métodos previamente descritos na literatura e que, comparativamente, revelou algumas vantagens.

No estudo da degradação desta classe de compostos pela cultura mista isolada, utilizou-se o naftaleno como PAH modelo. A sua biodegradação foi comprovada pelo aumento da biomassa, num meio com naftaleno como única fonte de carbono e energia, e pelo desaparecimento do naftaleno em culturas inoculadas.

Mostrou-se inicialmente que a degradação do naftaleno é limitada pela sua taxa de dissolução. Em culturas alimentadas com naftaleno sólido, observou-se inicialmente um crescimento exponencial, com taxa específica de crescimento de $0.20 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$, enquanto a taxa de consumo do substrato se manteve aparentemente inferior à taxa de transferência do sólido para a fase aquosa; o crescimento celular prosseguiu com cinética de ordem zero, quando a concentração aquosa de naftaleno baixou para valores indetectáveis por cromatografia gasosa.

Foi estudado o efeito de tensioactivos (Tween 80 e Triton X-100) e de um solvente hidrofóbico, da classe dos polidimetilsiloxanos, na biodisponibilidade do naftaleno. Nas concentrações utilizadas, os tensioactivos e o solvente demonstraram ser fisiologicamente inertes para a cultura microbiana, mas o Tween 80 sustentou crescimento celular. A adição de tensioactivos não influenciou apreciavelmente a degradação do naftaleno pela cultura mista. Contudo, a adição do solvente hidrofóbico ao meio de cultura, embora não tenha tido um efeito significativo sobre a taxa específica de crescimento, prolongou o crescimento exponencial.

Deste modo, concluiu-se que para a cultura isolada, a adição de tensioactivos não tem interesse prático para a sua utilização em bioremediação dos poluentes estudados, mas o recurso a sistemas bifásicos, em que a transferência de hidrocarbonetos ocorre a partir de uma fase hidrofóbica, pode incrementar a biodisponibilidade dos PAHs.

Agradecimentos

Quero agradecer com especial apreço ao Doutor José Menaia pela orientação, apoio e incentivo prestados ao longo da realização deste trabalho. Estou igualmente agradecida ao Doutor Francisco Gírio, que acompanhou de perto o delinear inicial do programa de trabalho, e pelas valiosas sugestões que propôs durante o desenvolvimento do mesmo.

Agradeço ainda ao Professor Santos Arteiro o interesse e apoio que me dispensou.

A parte experimental deste trabalho de Mestrado foi realizado no INETI/IBQTA/UMIB, de que são responsáveis a Doutora Teresa Amaral-Collaço e o Doutor Francisco Gírio. Agradeço-lhes a simpatia com que me receberam no seu grupo de trabalho, e a disponibilidade de meios materiais que permitiram, em grande medida, a realização do trabalho.

Agradeço igualmente à Universidade de Évora e ao Professor Cruz Morais a organização deste curso de Mestrado, e o suporte financeiro disponibilizado para a minha formação.

Aos colegas da UMIB agradeço a solidariedade demonstrada ao longo do último ano, e que permitiu que cada dia de trabalho fosse por mim encarado com boa disposição e prazer. Estou particularmente grata à Patrícia Moura, ao Luís Alves e ao Luís Duarte, que dispensaram muito do seu tempo (do precioso tempo!) para me resolverem todo o tipo de dificuldades. Julgo que sem as suas contribuições, a forma final deste relatório não seria certamente a mesma.

Agradeço ainda aos meus familiares o incentivo e compreensão com que sempre contei.

PDMS - Polidimetilsiloxano

P. I. - Padrão interno

P_v - Pressão de vapor

q - taxa de consumo de substrato.

Q_t - Quantidade de sólido

r_{bio} - Taxa de consumo do substrato

r_{diss} - Taxa de dissolução do sólido

r_{mic} - Taxa de variação na concentração de substrato na fase micelar

r_{org} - Taxa de variação na concentração de substrato na fase orgânica

r_{diss}^{max} - Taxa máxima de transferência de massa de uma fase sólida para uma fase aquosa

r_{org}^{max} - Taxa máxima de transferência de massa de uma fase orgânica para uma fase aquosa

r_{mic}^{max} - Taxa máxima de transferência de massa de uma pseudofase micelar para uma pseudofase aquosa

S_t - Concentração total do soluto num sistema multifásico

tHBPA - trans-hidroxibenzilidenopiruvato

Triton X-100 - Éter de alquilfenol etoxilato

TSA - Meio Triptona, soja , agar

Tween 80 - "Monooleate sorbitan polyoxyethylene"

U.V. - Vis. - Ultra-violeta - Visível

V - Volume total do sistema

V_{aq} - Volume da fase aquosa

V_{mic} - Volume da fase micelar

V_{org} - Volume da fase orgânica

X_0 - Concentração da biomassa no instante $t=0$

X_t - Concentração da biomassa

Y - Coeficiente de rendimento (biomassa formada / substrato consumido)

μ - Taxa específica de crescimento

μ_{max} - Taxa específica máxima de crescimento

Índice

I. INTRODUÇÃO	1
I.1 Biodegradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos	1
I.1.1 Biodisponibilidade e toxicidade de PAHs	1
I.1.2 Metabolismo microbiano de PAHs em condições aeróbias	3
I.1.3 Metabolismo aeróbio do naftaleno em bactérias	5
I.1.4 Isolamento de estirpes degradadoras de PAHs	7
I.2 Cinética de dissolução e de degradação de PAHs	8
I.3 Estratégias adoptadas para incrementar a biodisponibilidade de PAHs	10
I.3.1 Adição de tensioactivos não iónicos aos meios de cultura	10
I.3.2 Utilização de cosolventes	12
I.3.3 Recurso a culturas bifásicas	12
I.4 Modelos de crescimento em culturas descontínuas	15
I.4.1 Biodegradação de PAHs em sistemas bifásicos sólido-líquido	15
I.4.2 Biodegradação de PAHs na presença de tensioactivos	20
I.4.3 Biodegradação de PAHs em sistemas bifásicos líquido-líquido	24
II. MATERIAIS E MÉTODOS	30
II.1 Materiais e métodos de uso geral	30
II.1.1 Reagentes químicos	30
II.1.2 Meios de cultura	30
II.1.3 Esterilização de soluções e dos PAHs	31
II.1.4 Manutenção das culturas e preparação de inóculos	31
II.2 Isolamento de microrganismos degradadores de PAHs	32
II.3 Degradação do naftaleno pela cultura isolada	33
II.3.1 Consumo de naftaleno em culturas com PDMS	34
II.3.2 Evolução da concentração aquosa de naftaleno e da biomassa em culturas com substrato sólido	34
II.3.3 Crescimento celular em culturas com substrato sólido	34
II.3.4 Crescimento celular em culturas com PDMS	35
II.4 Partição celular em culturas bifásicas com PDMS	35

II.5 Ensaio de biodegradabilidade e biocompatibilidade do PDMS e dos tensoactivos	36
II.6 Doseamento do naftaleno por cromatografia gasosa	36
II.6.1 Preparação de padrões e tratamento das amostras para análise do naftaleno em PDMS	36
II.6.2 Preparação de padrões e tratamento das amostras para análise do naftaleno em meios aquosos	37
II.6.3 Análise de amostras de naftaleno	38
II.7 Doseamento do naftaleno por espectrofotometria	39
II.8 Doseamento da proteína total em suspensões bacterianas pelo método de Lowry	39
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
III.1 Isolamento de uma cultura mista degradadora de PAHs	41
III.2 Doseamento do naftaleno	43
III.2.1 Análise de soluções de naftaleno em PDMS por GC	43
III.2.2 Análise de soluções aquosas de naftaleno por GC	45
III.3 Consumo de naftaleno em culturas bifásicas com PDMS	46
III.4 Evolução da concentração aquosa de naftaleno e da biomassa em culturas com substrato sólido	47
III.5 Estudo da biodegradabilidade e da biocompatibilidade do PDMS e tensoactivos	49
III.6 Efeito da biodisponibilidade do naftaleno no crescimento celular	51
III.7 Efeito da adição de tensoactivos no crescimento celular em naftaleno	53
III.8 Efeito da presença de uma fase orgânica no crescimento celular em naftaleno	55
IV. CONCLUSÃO	58
V. BIBLIOGRAFIA	59

I. Introdução

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs) são compostos constituídos por mais do que um anél benzénico. Vários elementos desta classe de compostos, nomeadamente o naftaleno, fenantreno e antraceno, estão incluídos na Lista Europeia de Poluentes Prioritários. A sua presença no meio ambiente foi incrementada nos últimos decénios como resultado da actividade humana, onde persistem devido à sua baixa solubilidade em água, baixa taxa de dissolução e forte adsorção nos solos [1]. O decaimento dos PAHs pode ter causas abióticas (fotooxidação ou oxidação química), ou resultar da acção de microrganismos [2].

A transformação mediada biologicamente é particularmente importante, na medida em que pode conduzir à mineralização completa dos PAHs. Actualmente, a bioremediação *in situ* de solos e águas contaminados, e a biodegradação conduzida em reactores, são consideradas as tecnologias mais vantajosas, do ponto de vista económico e de redução do potencial tóxico, para tratamento de resíduos contendo elevada concentração de PAHs [1].


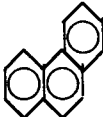

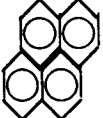


I.1 Biodegradação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

I.1.1 Biodisponibilidade e toxicidade de PAHs

Os PAHs são compostos lipofílicos, sólidos, cuja biodisponibilidade (e toxicidade) é limitada pela sua baixa solubilidade e má transferência em meios aquosos [3]. Estas características originam uma forte adsorção aos solos, cuja magnitude varia consoante o tipo de solo [4]. Os factores ambientais que mais condicionam a biodisponibilidade dos PAHs são: o tipo de solo, o pH, a concentração em nutrientes, a presença de matéria orgânica, a actividade em H₂O e a pressão parcial de O₂ [2].

A biodegradabilidade destes compostos correlaciona-se directamente com a respectiva solubilidade em fase aquosa (Tabela I.1), sendo quase sempre controlada pela taxa de desadsorção dos compostos nos solos, e não pela actividade dos microrganismos que os consomem [2]. Estas observações corroboram a hipótese de o consumo de PAHs

Tabela I.1 Estruturas químicas, propriedades físico-químicas, persistência no meio ambiente e actividade biológica de alguns PAHs [2, 5].

Composto	MM (g/mol)	Solubilidade em H ₂ O a 25°C (mg/L)	log P ^{a)}	Tempo de 1/2 vida (dias)	Actividade Biológica
Naftaleno 	128.2	31.700	3.36	2.4-4.4	Inactivo
Fenantreno 	178.2	1.300	4.57	4-18	Inactivo
Antraceno 	178.2	0.070	4.54		Inactivo
Pireno 	202.3	0.140	5.18	34-90	Activo (carcinogénico)
Benzo[a]antraceno 	228.3	0.002	5.91		Activo (carcinogénico)
Benzo[a]pireno 	252.3	0.003	6.35	200-300	Activo (carcinogénico)

a) P - coeficiente de partição n-octanol/H₂O

se efectuar a partir da fase aquosa. Contudo, existe evidência que algumas estirpes bacterianas podem utilizar directamente naftaleno adsorvido em solos [6], mas os factos referidos sustentam que esta não será uma capacidade comum entre os organismos degradadores de PAHs.

Os mecanismos de biodegradação dos PAHs em condições aeróbias estão bem estudados. A biodegradação pode ainda decorrer na ausência de oxigénio, mas julga-se que não prossegue em condições fortemente anaeróbias [3], pois requer a incorporação de átomos de oxigénio nos anéis aromáticos.

Para a toxicidade dos PAHs, contribui a sua boa solubilidade na membrana citoplasmática [3], que possibilita a migração dos compostos para o interior celular. É frequente correlacionar a toxicidade de classes de compostos com parâmetros que descrevem a sua partição entre uma fase aquosa e outra hidrofóbica pois, para uma série de compostos homólogos, a maior ou menor facilidade em penetrar nas células vai determinar o potencial tóxico do hidrocarboneto. O parâmetro mais usual nestas correlações é logP, sendo P o coeficiente de partição n-octanol/H₂O (Tabela I.1).

Em células de mamíferos, os PAHs são biologicamente inactivos *per se*, e só após a sua oxidação pelas enzimas microsossomais do sistema citocromo P-450, revelam o seu carácter tóxico [7, 8]. A monooxigenação do PAH conduz inicialmente à formação de um óxido de areno instável, que possui capacidade de ligação covalente às moléculas de DNA, de RNA e às proteínas. Este composto pode ser posteriormente inactivado por conjugação com glutatona, ácido glucurónico ou sulfato [7].

I.1.2 Metabolismo microbiano de PAHs em condições aeróbias

Os mecanismos descritos para o metabolismo de PAHs, são diferentes para bactérias e fungos (Figura I.1).

As bactérias iniciam o processo degradativo pela incorporação de dois átomos de oxigénio no núcleo aromático, formando assim um cis-dihidrodiol. A aromaticidade do anel é refeita por desidrogenação, obtendo-se um composto dihidroxilado. A abertura do anel pode efectuar-se entre os dois carbonos hidroxilados, ou entre um destes carbonos e o carbono adjacente não hidroxilado (fissão orto ou meta do anel, respectivamente). Os produtos resultantes são, naturalmente, diferentes [1, 7].

Em fungos, o metabolismo dos PAHs ocorre sobretudo como um processo de desintoxicação celular; é conduzido pelas enzimas do sistema citocromo P-450, e a sequência reaccional observada apresenta analogias com a observada em células de mamíferos [7]. Em contraste com as bactérias, não existe conhecimento de estirpes de fungos capazes de utilizar os PAHs como única fonte de carbono e energia [1]: o PAH é cometabolizado com outro substrato adicionado ao meio de cultura.

Os fungos lenhicolíticos constituem um caso particular, na medida em que possuem frequentemente a capacidade de proceder à mineralização completa de PAHs [9, 10]. A degradação é iniciada por um sistema enzimático extracelular, que se julga ser igualmente responsável pela oxidação inicial da lenhina [9]: a oxidação de lenhina é, tal como a

degradação de poluentes aromáticos, uma resposta do fungo a limitações de nutrientes (azoto), e recorre por isso ao mesmo sistema enzimático [9].

As peroxidases lenholíticas por um lado, e o sistema citocromo P-450 por outro, são os grupos enzimáticos responsáveis pela degradação dos PAHs por parte de fungos, podendo actuar complementarmente no caso dos fungos lenholíticos [11].

É conveniente salientar, que da acção microbiana nem sempre resulta uma desintoxicação efectiva do ambiente. Alguns produtos da oxidação microbiana dos PAHs, tais como fenóis e quinonas, possuem um potencial tóxico muito superior ao dos seus precursores [3, 7]: a presença de um grupo funcional polar e electrofílico melhora a transferência de massa destes compostos em meios aquosos e permite, como se referiu, a sua ligação covalente aos sítios nucleófilos de proteínas e ácidos nucleicos, dando assim início a processos degenerativos celulares [3, 7].

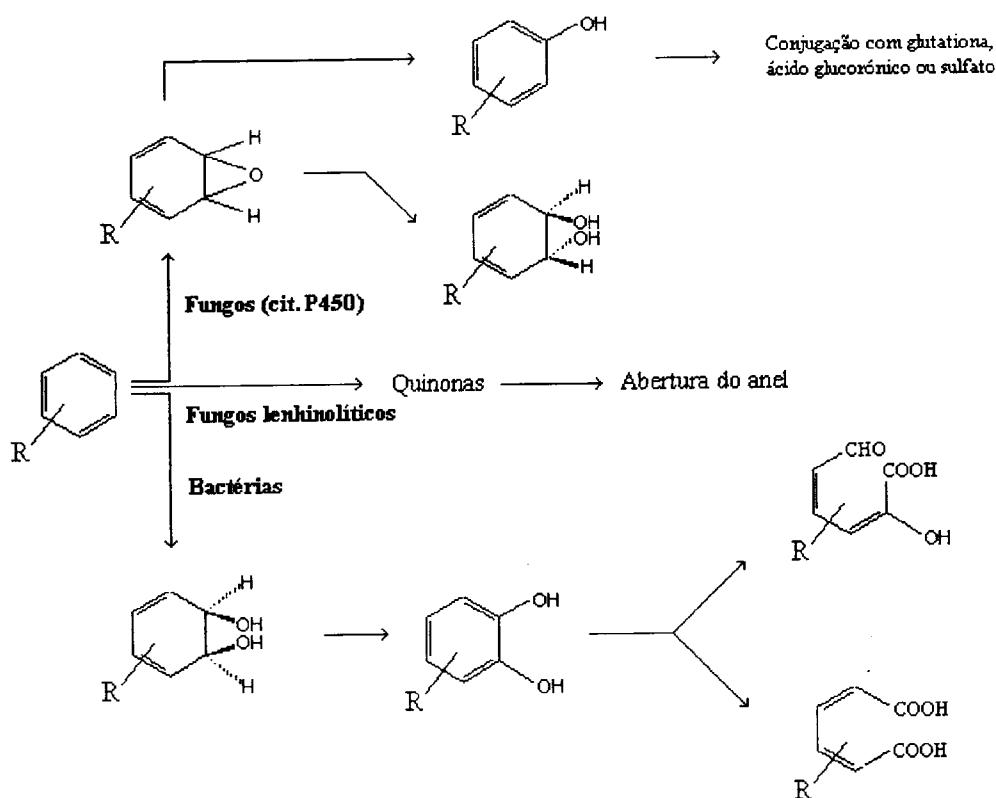


Figura I.1. Vias metabólicas utilizadas por bactérias e fungos para a degradação inicial de PAHs [1, 7]. R - Radical aromático.

I.1.3 Metabolismo aeróbio do naftaleno em bactérias

O naftaleno é o PAH mais solúvel em água e também o menos recalcitrante (Tabela I.1), sendo frequentemente utilizado como modelo para investigar os mecanismos de biodegradação desta classe de compostos.

A sequência metabólica que permite a degradação do naftaleno em bactérias, segue inicialmente o processo descrito na Figura I.2. A oxidação inicial a cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno é efectuada pelo sistema multienzimático denominado naftaleno-1,2-dioxigenase [7]. O sistema enzimático que intervêm de seguida é a cis-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftalenedesidrogenase; o componente terminal deste complexo enzimático, é uma proteína com elevada estereoselectividade para o isómero cis [7]. Estes dois sistemas enzimáticos foram isolados a partir de várias espécies de bactérias, e estão bem caracterizados na literatura [13-15].

O 1,2-dihidroxi-naftaleno sofre então abertura do anel, podendo resultar dois produtos, como se referiu. Contudo, apenas um dos intermediários, o trans-hidroxibenzilidenopiruvato (tHBPA) é convertido a salicilaldeído [1], o qual, por oxidações sucessivas, vai originar sucessivamente, salicilato e, finalmente, catecol.

O catecol pode sofrer fissão orto ou meta, consoante a espécie bacteriana. Na Figura I.3 estão representados os dois caminhos alternativos, como parte da via metabólica que permite a degradação do naftaleno.

O metabolismo do naftaleno e a sua regulação estão particularmente bem estudados na estirpe *Pseudomonas putida* PpG7. Para esta estirpe, as enzimas envolvidas na transformação do naftaleno em salicilato (“upper pathway”) estão codificadas num operão, denominado *nah* [16]; o operão *sal* inclui genes que permitem a expressão das enzimas que oxidam o salicilato a catecol, e efectuam a fissão meta do anel (“lower pathway”) [17]. Os dois operões estão organizados num plasmídeo, denominado NAH7, e são ambos induzidos pelo salicilato [18], que é assim um intermediário central na degradação do naftaleno. Em *Pseudomonas*, as enzimas intervenientes na fissão orto do anel são, por norma, codificadas por genes cromossomais.

Pouco se sabe acerca da especificidade das enzimas envolvidas na degradação do naftaleno. No caso do naftaleno e fenantreno, algumas estirpes bacterianas possuem a capacidade de metabolizar ambos os PAHs, enquanto que outras consomem apenas um deles [19]. A capacidade de oxidar múltiplos substratos pode resultar da presença de vias

metabólicas alternativas na estirpe bacteriana [7], ou ser efectuada por um único sistema enzimático [18, 20].

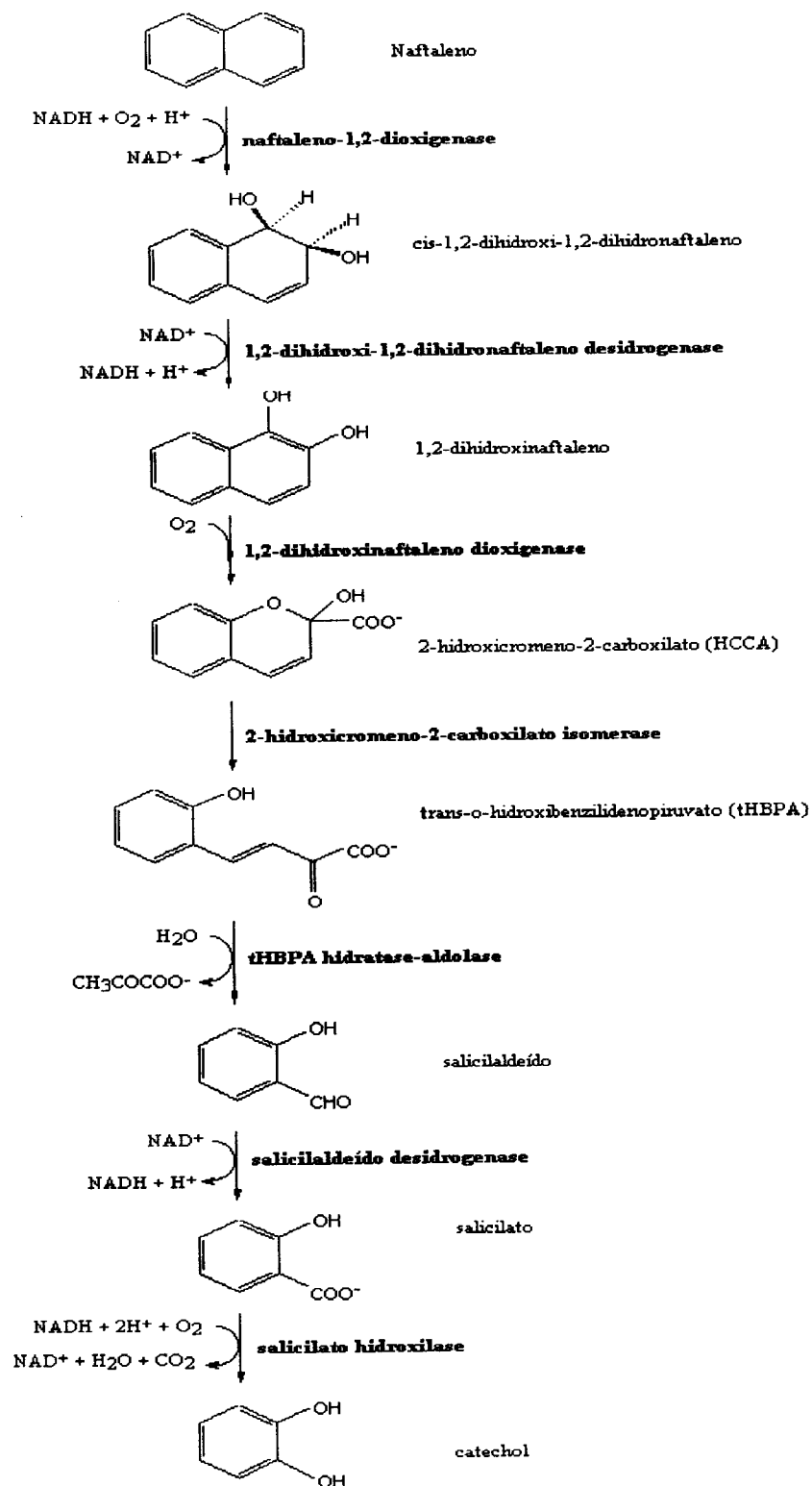


Figura I.2 Sequência metabólica que permite a degradação aeróbia do naftaleno a salicilato, e sua conversão em catecol [1].

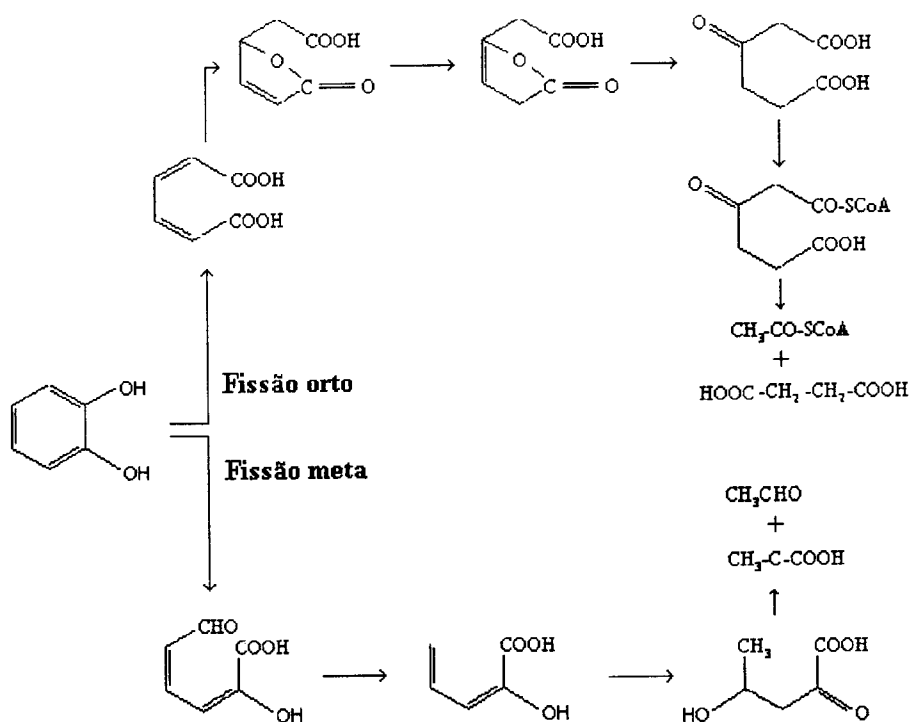


Figura I.3 Vias metabólicas alternativas que resultam da fissão orto e meta do anel aromático do catecol [21].

I.2 Isolamento de microorganismos degradadores de PAHs

I.2.1 Selecção do composto teste e da população microbiana

A recolha e tratamento da amostra que permite obter a população microbiana contendo estirpes com o fenótipo desejado, é um passo essencial no seu isolamento.

Consoante as características físico-químicas do composto que se pretende degradar, nomeadamente de solubilidade em fase aquosa, capacidade de adsorção em matrizes sólidas e volatilidade, a sua acumulação no meio ambiente poderá ocorrer preferencialmente em meios aquosos, adsorvido no solo, ou em fase gasosa. Os microorganismos com capacidade metabólica para degradar poluentes, acompanham a sua distribuição no meio ambiente, e a escolha do local para recolha da amostra deverá

reflectir este facto. Adicionalmente, é essencial que o local seleccionado garanta a presença do poluente há tempo suficiente, de modo a ser expectável o desenvolvimento de uma comunidade microbiana com a capacidade metabólica desejada.

Os processos de adsorção e volatilidade reduzem, como se referiu, a biodisponibilidade dos poluentes. Compostos com estas características dificultam o estabelecimento de comunidades microbianas que os metabolizem, pois o consumo de nutrientes por parte dos microrganismos processa-se, usualmente, a partir de uma fase aquosa [22]. Deste modo, pretendendo-se isolar uma estirpe que possua a capacidade de metabolizar uma classe de compostos homólogos, deve seleccionar-se o composto com características mais favoráveis do ponto de vista da volatilidade e solubilidade em fase aquosa (composto teste) [22, 23]. Alternativamente, pode optar-se por utilizar uma mistura de dois ou mais compostos.

As características físico-químicas dos PAHs são, como se viu, responsáveis pela sua forte adsorção nos solos. O naftaleno é a este respeito um composto atípico, pois sendo a sua pressão de vapor relativamente elevada quando comparada com a de outros PAHs ($P_v^{\text{Naft}} (217.9^\circ\text{C}) = 1 \text{ atm}$; $P_v^{\text{Fen}} (340^\circ\text{C}) = 1 \text{ atm}$ [12]), as perdas por volatilização tornam-se mais importantes do que sucede para os restantes hidrocarbonetos. Por este motivo, estudos conduzidos para avaliar a presença de comunidades degradadoras de PAHs, recorrem usualmente ao fenantreno como composto teste [24-26], ou a misturas complexas de composição indefinida, como são o óleo de antraceno ou o creosoto [27].

A obtenção de um inóculo, em fase aquosa, contendo uma fracção significativa e representativa dos microrganismos existentes numa dada amostra de solo, requer que se consiga efectuar uma boa dispersão das partículas de solo, e também que se consigam anular os mecanismos pelos quais as bactérias se fixam nas partículas [28]. A dispersão do solo por meios mecânicos não deve, no entanto, comprometer a sobrevivência dos microrganismos.

É conhecido o papel que os exopolisacáridos possuem na aderência das bactérias a superfícies. Estes polímeros promovem ainda a estabilidade dos agregados de partículas do solo [28]. A dispersão química, efectuada por detergentes, agentes quelantes e soluções aquosas de pirofosfato de sódio, ao promover alterações estruturais nos polisacáridos do solo, efectua uma dispersão das partículas semelhante à observada por métodos mecânicos agressivos, permitindo contudo uma maior taxa de sobrevivência microbiana. O seu uso garante a presença no lixiviado de bactérias, viáveis, fortemente aderentes ao solo [28].

I.2.2 Isolamento de estirpes degradadoras de PAHs

O isolamento de estirpes com as capacidades metabólicas pretendidas, pode efectuar-se em meio líquido ou sólido, selectivo para o fenótipo desejado.

O método tradicional consiste em efectuar culturas de enriquecimento dos microrganismos desejados, em frascos agitados. Para o efeito, utilizam-se meios mínimos, em que o composto teste é fornecido como principal (se não única) fonte de carbono e energia à população mista inicial. Exerce-se deste modo uma pressão selectiva em favor dos microrganismos com capacidade de utilização do composto teste. Transferências sucessivas da cultura de enriquecimento permitem obter uma cultura microbiana constituída maioritariamente por estirpes exibindo a capacidade metabólica pretendida.

As culturas de enriquecimento seleccionam os microrganismos com taxas de crescimento mais elevadas, pelo que não permitem avaliar a diversidade das estirpes microbianas, presentes na população inicial, que degradam efectivamente o composto teste. Deste modo, estirpes que nas condições seleccionadas cresçam mais lentamente, podem ser eliminadas no processo competitivo. Adicionalmente, conduzem com frequência ao estabelecimento de comunidades microbianas onde apenas uma fracção (não necessariamente predominante) dos microrganismos presentes, possui capacidade para metabolizar o substrato fornecido [29].

A maior desvantagem do método das culturas de enriquecimento é, no entanto, a sua morosidade. Encontram-se na literatura relatos de processos de estabilização de comunidades microbianas degradadoras de PAHs, por este método, que se prolongaram por períodos de quase um ano [30].

O isolamento das estirpes pretendidas pode efectuar-se ainda em quimiostato. Os quimiostatos são particularmente úteis no caso de compostos tóxicos a altas concentrações, pois permitem manter a concentração do substrato em valores inferiores aos que se utilizam em frascos agitados [31, 23]. A concentração do composto teste no meio é um parâmetro importante quando o composto é solúvel em fase aquosa. Por outro lado, permite seleccionar estirpes com taxas de crescimento baixas, mas que apresentem boas capacidades degradativas.

Os métodos de isolamento em placa são comparativamente mais rápidos do que os métodos em meio líquido, e possuem ainda a vantagem de permitir avaliar a diversidade de estirpes presentes na população inicial que possuem a capacidade metabólica

pretendida. O isolamento de microrganismos degradadores de PAHs é tradicionalmente efectuado em placa [1].

Utilizam-se placas com meio mínimo agarizado, cuja superfície é coberta com uma fina camada opaca de PAH sólido. O revestimento é obtido por pulverização de uma solução de PAH, num solvente orgânico volátil, sobre a camada inicial de meio. As colónias capazes de transformar o PAH em metabolitos solúveis são identificadas pelo aparecimento de um halo transparente em seu redor [25].

Existem algumas variantes deste método descritas na literatura. Assim, o espalhamento do inóculo inicial é feito, alternativamente, antes ou depois do revestimento com PAH sólido [1, 25]. Pode igualmente efectuar-se uma técnica por incorporação do inóculo no meio sólido, a que igualmente se adiciona o PAH, evitando-se deste modo o recurso a solventes orgânicos eventualmente tóxicos. A mistura referida é depois espalhada sobre uma camada de meio previamente solidificado [24], e efectua-se a detecção de colónias interessantes de forma análoga à anteriormente descrita.

I.3 Cinética de dissolução e de degradação de PAHs

Como se referiu, os PAH são pouco solúveis em fase aquosa, e possuem ainda baixas taxas de dissolução, como comprovam os seguintes valores, obtidos em frascos agitados (200 rpm): com partículas de dimensões 1000-2400 μm , no caso do naftaleno, e 600-1000 μm , no caso do fenantreno, as taxas de dissolução determinadas para os dois sólidos, foram de 13 e 1 $\text{mg dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$, respectivamente [42]. Pode concluir-se que as culturas microbianas de PAHs, em que o composto teste é adicionado na forma de sólido, constituem sistemas bifásicos sólido-líquido fortemente condicionados pelos processos de transferência de massa.

A determinação de parâmetros cinéticos, que descrevem o crescimento de estirpes bacterianas degradadoras de PAHs, é dificultada pela baixa solubilidade destes substratos. Alguns parâmetros disponíveis na literatura são apresentados na Tabela I.4.

Se bem que existam estirpes capazes de metabolizar vários PAHs, pouco se sabe acerca da biodegradação de misturas destes compostos. Considera-se, como norma, que populações mistas mineralizam sequencialmente os diferentes PAHs, pela ordem da sua biodegradabilidade [32]. Contudo, a biodegradação dos PAHs de elevada massa molar

Tabela I.4 Parâmetros cinéticos que descrevem o crescimento de estirpes bacterianas degradadoras de PAHs. q - taxa de consumo de substrato; K_s - constante de saturação; μ - taxa específica de crescimento.

Composto	Espécie bacteriana	Parâmetros biocinéticos				Ref.
		q (ng PAH. g cel ⁻¹ .min ⁻¹)	q (μ g PAH .ml ⁻¹ .dia ⁻¹)	K_s (μ M)	μ (h ⁻¹)	
Naftaleno	<i>Pseudomonas putida</i>	7.83 $\times 10^{-7}$		1.64		[6]
	Gram negativa	5.32×10^{-7}		0.71		
Naftaleno	Cultura mista				0.3	[33]
Fenantreno	“				0.03	
Antraceno	“				0.003	
Pireno	<i>Mycobacterium flavescens</i>		0.56		0.072	[34]
Fenantreno	<i>Mycobacterium</i> sp.				0.069	[35]
Pireno	“				0.056	
Fenantreno	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>		1.0×10^3		0.058	[36]

parece ser estimulada pela presença de hidrocarbonetos menos tóxicos [32], talvez porque possam ser cometabolizados na presença de outros substratos, por parte de microrganismos que não os utilizam como fonte primária de carbono.

Encontram-se na literatura poucos dados cinéticos relativos à biodegradação de misturas de PAHs. Os escassos dados disponíveis permitem concluir que a degradação de um determinado PAH pode ser inibida competitivamente por compostos da mesma família, o que revela a presença de um sistema enzimático, de baixa selectividade relativamente ao substrato, responsável pela degradação destes compostos [32].

I.4 Estratégias adoptadas para incrementar a biodisponibilidade de PAHs

As estratégias adoptadas para incrementar a taxa de degradação dos PAHs em culturas microbianas, baseiam-se na adopção de condições que permitem uma melhor transferência dos hidrocarbonetos. Actualmente, a adição de tensoactivos (não iónicos) ao meio de cultura e o recurso a solventes orgânicos (miscíveis e imiscíveis com a fase aquosa), são as opções consideradas para otimizar a biodegradação de PAHs em meios de cultura líquidos [49].

I.4.2 Adição de tensoactivos não iónicos aos meios de cultura

Os tensoactivos são moléculas que, por via da sua adsorção positiva à superfície da água, provocam uma diminuição da tensão superficial nessa interface. A tensão superficial de soluções aquosas de tensoactivos diminui com o aumento da concentração do detergente até atingir um valor mínimo, a partir do qual se mantém inalterada pela adição de mais tensoactivo [37].

Ao menor valor de concentração de tensoactivo em que se detecta o mínimo de tensão superficial da água/ar, corresponde a concentração micelar crítica (CMC) do tensoactivo. Para concentrações de tensoactivo superiores, as moléculas de detergente organizam-se em estruturas supra-moleculares: se não se exceder muito a CMC, a estrutura predominante é micelar [37]. Cada tensoactivo possui uma CMC e um número de agregação (número de moléculas por micela) característicos, que são alterados pela presença de solutos adicionais.

A solubilidade de PAHs em soluções micelares é superior à observada em água, em virtude de o centro do agregado constituir uma pseudofase hidrofóbica que contribui para a solubilização de compostos apolares [39]. O aumento na solubilidade aparente de compostos hidrofóbicos, inicia-se para concentrações de surfactante superiores à CMC, existindo uma gama de concentrações de detergente em que aumenta de forma linear [39]. Os valores de CMC determinados pelas variações na tensão superficial da água e na solubilidade de PAHs, são concordantes no caso de tensoactivos não iónicos [39].

Deve ter-se presente ainda que os tensoactivos diminuem igualmente a tensão superficial nas interfaces sólido/água [40]. Em solos, este efeito pode revelar-se

importante, pois permite melhorar a molhabilidade (wettability) das partículas de solo (nomeadamente, da sua estrutura porosa) por parte da água, e assim ocorrer o transporte facilitado de massa entre as duas fases. Pode igualmente justificar o incremento na cinética de dissolução de PAHs, observado na presença de tensioactivos em concentrações inferiores à CMC [41, 42].

Sendo as micelas estruturas dinâmicas, os hidrocarbonetos dissolvidos na pseudofase hidrofóbica estão em equilíbrio com as moléculas em solução:



Considerando a pseudofase micelar e a pseudofase aquosa como um sistema de fases imiscíveis, ele é susceptível de ser caracterizado por valores de constantes de partição, os quais são listados na Tabela I.3 para o naftaleno e fenantreno.

Tabela I.2 Propriedades de alguns tensioactivos não iónicos [38].

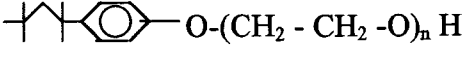
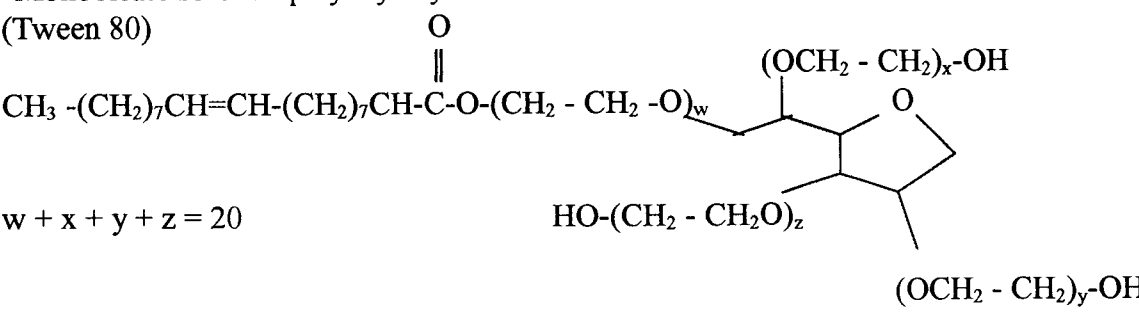
Tensioactivo	MM (g/mol)	CMC (mol/dm ³); N° de agregação
<p>Éter de alquilfenol etoxilato</p> <p>C₈PE_{9,5} (Triton X-100)</p>  <p>n = 9.5</p>	625	2.4 x 10 ⁻⁴ 140
<p>“Monooleate sorbitan polyoxyethylene” (Tween 80)</p>  <p>w + x + y + z = 20</p>	1300	10 ⁻⁵ 59

Tabela I.3 Constantes de partição (m_{mic}) para o naftaleno e fenantreno no sistema bifásico água/micelas ($m_{mic} = C_{mic} / C_{aq}$) [42].

Tensioactivo	Log m_{mic}	
	Naftaleno	Fenantreno
Triton X-100	4.68	6.02

A opção generalizada por tensioactivos não iónicos, em aplicações de bioremediação, justifica-se pelo facto de estes serem os tensioactivos com melhores características de biocompatibilidade [3].

I.4.3 Utilização de cosolventes

Com o objectivo de facilitar a transferência dos hidrocarbonetos, recorre-se ainda a solventes orgânicos que, sendo miscíveis com a fase aquosa, possuem igualmente uma boa capacidade de solubilizar o PAH sólido. A adição do PAH ao meio de cultura, previamente solubilizado num pequeno volume do cosolvente, permite obter suspensões de partículas sólidas de tamanho regular e com pequenas dimensões [3]. Os cosolventes mais comuns são a dimetilformamida, o dimetilsulfóxido, a acetona ou o etanol.

A eventual toxicidade ou biodegradabilidade dos tensioactivos ou cosolventes adicionados ao meio de cultura, é limitada pelas baixas concentrações utilizadas destes compostos químicos.

I.4.4 Recurso a culturas bifásicas

A biodegradação de substratos pouco solúveis pode igualmente ser incrementada pela sua prévia dissolução em solventes orgânicos imiscíveis com a fase aquosa. O princípio subjacente, é que a transferência de massa entre duas fases líquidas é mais eficiente que a observada entre uma sólida e outra líquida [43].

Outra vantagem associada aos sistemas bifásicos líquido-líquido, é que permitem ainda minimizar efeitos tóxicos ou inibitórios por parte de substratos e produtos, pois a concentração destes compostos em fase aquosa pode ser controlada pela escolha do solvente com as características de partição mais adequadas [44]. De um modo geral, pode

afirmar-se que há conveniência em minimizar a constante de partição do substrato entre as fases orgânica e aquosa, e maximizar este parâmetro para os produtos. Contudo, para substratos tóxicos, poderá existir vantagem em utilizar uma fase orgânica com a qual possuam grande afinidade, de forma a manter a respectiva concentração em fase aquosa em valores inferiores aos permitidos pela solubilidade dos compostos. Este é o princípio que justifica o recurso a sistemas bifásicos para estabelecer culturas de enriquecimento em substratos tóxicos, pois proporcionam, por norma, períodos de adaptação consideravelmente menores do que os registados na ausência do solvente orgânico [45].

As principais dificuldades que limitam o uso generalizado de sistemas bifásicos líquido-líquido, relacionam-se com o facto de, nestes sistemas, ser frequentemente vantajosa a utilização de elevadas percentagens volumétricas de solvente orgânico. É assim particularmente importante que a fase orgânica seja inerte, o que limita o uso dos processos bifásicos de biocatálise com microrganismos, em estado viável, a um número restrito de solventes [46].

O efeito tóxico ou inibitório associado aos solventes apolares é resultado da sua dissolução nas membranas citoplasmáticas, que altera a respectiva estrutura e compromete o desempenho das funções que lhe estão associadas [3]: observa-se, por norma, a fluidização da bicamada lipídica, a dissipação de gradientes iónicos e a alteração de actividades enzimáticas associadas à membrana.

Em geral, as bactérias gram-negativas toleram melhor do que as bactérias gram-positivas a exposição a elevadas concentrações de compostos apolares [3]. Este diferente comportamento justifica-se com base na composição da parede celular dos dois grupos de bactérias, pois os lipopolisacáridos da membrana exterior das bactérias gram-negativas, é responsável por uma diminuição na permeabilidade dos compostos hidrofóbicos [3].

Verifica-se que os solventes com log P situado na gama 1-5, são extremamente tóxicos; a toxicidade é menor para solventes fortemente polares, pois não se dissolvem nas membranas; diminui igualmente para compostos claramente apolares os quais, ao se dissolverem nas membranas celulares, não interactivam de forma a comprometer a sua integridade [47].

A toxicidade de solventes apolares, como o tolueno ou fenol, pode esbater-se após um período inicial de adaptação, durante o qual são desenvolvidos mecanismos de resistência [47]. Pode igualmente ser visível após uma longa exposição das células ao

solvente, o que parece ser o caso dos solventes mais fortemente apolares, como os hidrocarbonetos de cadeia longa.

Os solventes mais utilizados em fermentações bifásicas são hidrocarbonetos. É usual o recurso a hidrocarbonetos de cadeia longa, como o hexadecano ou octano e suas misturas de composição indefinida, como o óleo de parafina; hidrocarbonetos cíclicos, como a decalina; hidrocarbonetos ramificados, como o heptametilnonano e o di(2-etilhexil)ftalato; hidrocarbonetos aromáticos líquidos, como o bifenilmetano e o fenildecano [48, 49].

Recentemente, tem-se recorrido igualmente a polisiloxanos, como o polidimetilsiloxano (PDMS), que apresentam um conjunto de propriedades muito vantajosas. Estes polímeros são fisiologicamente inertes e difíceis de biodegradar [50, 51], e é a conjugação destas duas propriedades que faz deles uma fase orgânica de eleição em fermentações bifásicas. No meio ambiente, o decaimento dos PDMS é atribuído à sua prévia hidrólise, que origina oligodimetilsiloxanodióis, bastante menos recalcitrantes do que os seus precursores [52].

Os PDMS, cuja estrutura geral se apresenta na Figura I.4, são, tal como os tensoactivos, compostos anfifílicos com grupos polares e apolares alternando na cadeia polimérica. Na presença de uma fase aquosa, os polidimetilsiloxanos formam uma camada molecular à sua superfície, com os átomos de oxigénio orientados de forma a interactuar com a água [50].

Outras propriedades destes polímeros são a sua elevada solubilidade para gases e boa estabilidade térmica. A viscosidade dos fluidos é variável com o comprimento de cadeia do polímero, e a sua capacidade de solubilização pode ser controlada pela selecção da cadeia polimérica com os grupos hidrofóbicos adequados [51].

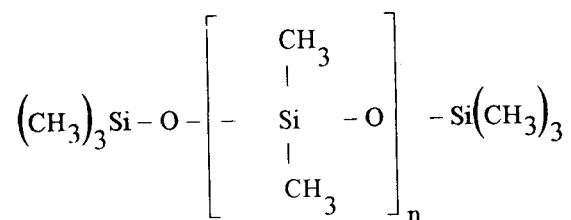


Figura I.4 Estrutura química dos polidimetilsiloxanos (PDMS) [51].

I.5 Modelos de crescimento em culturas descontínuas

O crescimento celular e a taxa específica de crescimento, em culturas descontínuas com um substrato pouco solúvel em fase aquosa, podem ser descritos por modelos de transferência de massa. Iremos considerar que o substrato é introduzido, no meio de cultura, no estado sólido ou dissolvido numa fase orgânica hidrofóbica e, ainda, avaliar o efeito da adição de tensoactivos em culturas com substrato sólido.

I.5.2 Biodegradação de PAHs em sistemas bifásicos sólido-líquido

I.5.2.1 Modelo de crescimento em substratos sólidos

O modelo descrito por Volkering e al. [33], considera que o consumo do substrato por parte dos microrganismos é efectuado exclusivamente a partir da fase aquosa, sendo necessário que ocorra previamente a dissolução do sólido. Outras hipóteses assumidas, são: o consumo de nutrientes tem como único fim o crescimento celular; não existe efeito inibitório por parte do substrato ou de qualquer dos produtos do metabolismo microbiano.

No caso de culturas descontínuas em meio líquido, a taxa de transferência de massa da fase sólida para a fase aquosa, é dada por:

$$-\frac{dQ_t}{dt} = K.A.(C_{eq} - C_t) \quad (1)$$

em que:

Q_t - Quantidade de sólido (kg).

C_t - Concentração do substrato na fase líquida (kg m^{-3}).

C_{eq} - Concentração do substrato em solução em condições de equilíbrio com a fase sólida (kg m^{-3}).

K - Coeficiente global de transferência de massa (m h^{-1}).

A - Área específica do sólido (m^2).

De acordo com a equação (1), os factores que afectam a taxa de dissolução dos sólidos, na ausência de microrganismos, são: (i) a área disponível para a transferência, por um lado; (ii) outros factores cujo efeito se revela no valor aparente de K , tais como a geometria e velocidade de agitação no sistema, e a composição e características reológicas do fluido.

Num meio inoculado, a variação na concentração total de substrato (ou seja, a sua velocidade de consumo), é dada por:

$$\frac{dS_t}{dt} = \frac{1}{V} \cdot \frac{dQ_t}{dt} + \frac{dC_t}{dt} \quad (2)$$

sendo:

S_t - Concentração total do substrato, presente no sistema multifásico (kg m^{-3}).

V - Volume total do sistema (m^3).

$\frac{dS_t}{dt}$ - Taxa de consumo do substrato, r_{bio} ($\text{kg m}^{-3}\text{h}^{-1}$).

$-\frac{1}{V} \cdot \frac{dQ_t}{dt}$ - Taxa de dissolução do sólido, r_{diss} ($\text{kg m}^{-3}\text{h}^{-1}$).

$\frac{dC_t}{dt}$ - Taxa de variação na concentração de substrato em fase aquosa ($\text{kg m}^{-3}\text{h}^{-1}$).

As taxas de produção de biomassa, r_x , e de consumo de substrato, r_{bio} , estão relacionadas pela equação:

$$r_x = -Y \cdot r_{\text{bio}} \quad (3)$$

r_x - $\frac{dX_t}{dt}$ ($\text{kg m}^{-3}\text{h}^{-1}$).

X_t - Concentração em biomassa (kg m^{-3}).

Y - Coeficiente de rendimento (kg de biomassa formada / kg de substrato consumido)

Deve ainda considerar-se que a velocidade de crescimento celular é determinada, por definição, por meio de uma relação com a taxa específica de crescimento (μ):

$$r_x = \mu(C_t) \cdot X_t \quad (4)$$

Tem-se então o seguinte conjunto de duas equações diferenciais, nas variáveis C_t e

X_t :

$$\frac{dX_t}{dt} = \mu(C_t) \cdot X_t \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \frac{dC_t}{dt} &= r_{\text{bio}} + r_{\text{diss}} = -\frac{r_x}{Y} + r_{\text{diss}} = \\ &= \frac{K \cdot A}{V} (C_{\text{eq}} - C_t) - \frac{X_t}{Y} \mu(C_t) \end{aligned} \quad (6)$$

As condições iniciais que definem as soluções particulares do sistema de equações diferenciais, são:

$$C_t(t=0) = C_{\text{eq}}$$

$$X_t(t=0) = X_0$$

O sistema de equações pode resolver-se, admitindo que o crescimento celular segue uma cinética de Monod:

$$\mu(C_t) = \frac{\mu_{\max} \cdot C_t}{K_s + C_t} \quad (7)$$

μ_{\max} - Taxa específica de crescimento máxima (h^{-1}).

K_s - Constante de saturação ($kg\ m^{-3}$).

As situações limite do modelo descrito, são analisadas de seguida:

A. $C_t = C_{eq}$.

Nestas condições, o crescimento não é limitado pela taxa de transferência de massa da fase sólida para a fase aquosa, o que se traduz na anulação do termo correspondente à transferência de massa em (6). Tem-se assim um aumento exponencial da biomassa, com uma taxa específica de crescimento constante e próxima de μ_{\max} se $K_s \ll C_{eq}$.

B. $C_t = 0; \frac{dC_t}{dt} = 0$.

Para $C_t = 0$, ocorre a taxa de transferência de massa máxima, r_{diss}^{\max} :

$$r_{diss}^{\max} = \frac{K \cdot A \cdot C_{eq}}{V} \quad (8)$$

Por outro lado:

$$\begin{aligned} r_{diss}^{\max} = -r_{bio} &\Leftrightarrow r_x = \frac{K \cdot A \cdot C_{eq} \cdot Y}{V} \Leftrightarrow \\ &\Leftrightarrow \mu(C_t) = \frac{K \cdot A \cdot C_{eq} \cdot Y}{V} \frac{1}{X_t} \end{aligned} \quad (9)$$

Conclui-se que a biomassa aumenta de forma linear (cinética de ordem zero), com taxa de formação constante e correspondente ao valor permitido pela taxa de transferência de substrato da fase sólida para a fase aquosa; nestas condições, a taxa específica de crescimento diminui continuamente com o aumento de biomassa.

Conclui-se que o crescimento é exponencial enquanto se verifica a condição $r_{diss}^{\max} \geq -r_{bio}$. A taxa de transferência de substrato influencia assim a duração da fase exponencial, e o valor da taxa de formação de biomassa durante a fase linear de crescimento celular.

A evolução dos parâmetros de crescimento e da concentração de substrato no meio, durante a fermentação descontínua, é representada na Figura I.5, admitindo os seguintes valores para os parâmetros fixos do modelo: $\mu_{\max} = 0.2 \text{ h}^{-1}$; $K_S = 0.2 \text{ mg/dm}^3$; $Y = 1 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $C_{\text{eq}} = 23 \text{ mg/dm}^3$; $X_0 = 8 \text{ mg/dm}^3$. À exceção do rendimento Y , cujo valor foi arbitrado, os valores indicados para os restantes parâmetros foram sugeridos por resultados obtidos neste trabalho e por outros autores.

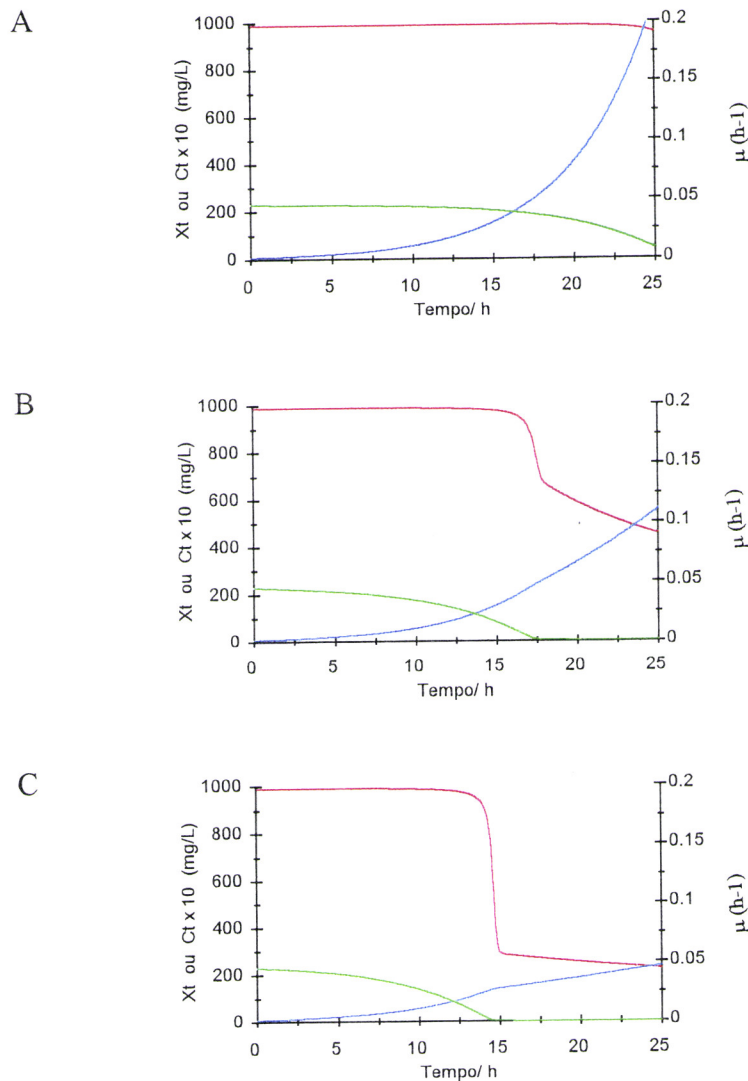


Figura I.5 Representação gráfica da quantidade de biomassa, X_t (—), taxa de específica crescimento, μ (—) e concentração aquosa de substrato C_t (—), durante uma fermentação descontínua com substrato sólido. (A) $K_A/V = 2 \text{ h}^{-1}$; (B) $K_A/V = 0.2 \text{ h}^{-1}$; (C) $K_A/V = 0.02 \text{ h}^{-1}$.

1.5.1.2 Avaliação do modelo

Tal como é previsto pelo modelo descrito, foi observado por vários autores, em culturas descontínuas com substratos sólidos, um aumento da biomassa que é exponencial numa fase inicial, seguido de uma fase de produção linear, cuja taxa de formação de biomassa é variável com a área específica do sólido [33]. Adicionalmente, verifica-se que o aumento da biomassa permanece exponencial enquanto o substrato é detectado em solução [33, 36].

A hipótese adoptada no modelo de Volkering e al., segundo a qual estirpes bacterianas utilizam exclusivamente os PAHs dissolvidos em fase aquosa, foi sustentada por estudos com um número limitado de estirpes [53, 54] e por algumas observações empíricas (secção I.1.1). Era geralmente aceite até há pouco tempo, mas estudos recentes sugerem que os microrganismos não se comportam como elementos passivos no ambiente, sendo capazes de alterar as condições de solubilização dos substratos sólidos de que estão dependentes.

De facto, em estudos cinéticos conduzidos em meio líquido, foram observadas taxas de degradação de naftaleno superiores às respectivas taxas de dissolução, determinadas em condições abióticas [55]. As hipóteses avançadas para justificar estes resultados, baseiam-se na possibilidade de os microrganismos mediar a solubilização do naftaleno por excreção de agentes emulsificantes, ou ainda de consumir o substrato por mecanismos envolvendo contacto físico com a fase insolúvel. Neste caso, a hidrofobicidade das bactérias possui um papel importante na sua adesão inicial às superfícies sólidas de PAHs [56].

Adicionalmente, estudos conduzidos com diferentes adsorventes, naturais e sintéticos, e duas estirpes bacterianas, permitem concluir que a capacidade de aderência dos microrganismos condiciona o seu acesso ao naftaleno adsorvido em suporte sólido. Outros factores que condicionam a biodisponibilidade do naftaleno adsorvido são as características de porosidade e a natureza da interacção entre o naftaleno e o suporte sólido [57]. Estas conclusões são validadas por estudos análogos com solos, tanto no que diz respeito à influência do suporte sólido [4], como no que diz respeito à importância da espécie bacteriana [6].

A bibliografia recente, sugere assim que não é correcta a generalização de um modelo único para descrever o mecanismo pelo qual os microrganismos têm acesso a substratos sólidos. Contudo, a correlação das taxas de crescimento celular ou de

degradação de PAHs, com as taxas de dissolução dos sólidos [33, 55], parece indicar que a dissolução espontânea dos sólidos é, ainda assim, um factor importante na sua biodisponibilidade.

I.5.2 Biodegradação de PAHs na presença de tensioactivos

I.5.2.2 Modelo de crescimento em substratos sólidos na presença de tensioactivos

Para descrever o crescimento em substratos sólidos, na presença de tensioactivos em concentração superior à CMC, adopta-se o modelo trifásico, descrito por Volkering e al. [42]. Neste modelo, o tensioactivo forma uma única estrutura supra-molecular (micelar), que contribui para aumentar a solubilidade aparente do PAH. O sistema é assim constituído por uma fase sólida e duas fases líquidas, consideradas imiscíveis (a fase aquosa e a fase micelar); a partição do soluto (PAH) ocorre entre as duas fases, podendo o equilíbrio ser caracterizado por uma constante de partição m_{mic} . Outras hipóteses do modelo, são: o consumo de substrato é feito exclusivamente a partir da fase aquosa; a presença do tensioactivo não altera a cinética de dissolução do substrato, nem o valor da solubilidade do composto na fase aquosa; o consumo de nutrientes tem como único fim o crescimento celular, não existindo efeito inibitório por parte do substrato ou de qualquer dos produtos do metabolismo microbiano. Iremos ainda considerar que o transporte de massa não ocorre directamente da fase sólida para a fase micelar, tal como se representa na Figura I.6.

Nestas condições, o balanço de massa ao soluto, pode escrever-se:

$$V \frac{dS_t}{dt} = \frac{dQ_t}{dt} + V \frac{dC_t}{dt} + V_{mic} \frac{dC_{mic,t}}{dt} \quad (10)$$

sendo:

$C_{mic,t}$ - Concentração do composto na fase micelar (kg m^{-3}).

V - Volume da fase aquosa, considerado próximo do volume total do sistema (m^3).

V_{mic} - Volume da fase micelar, considerado desprezável face ao volume total (m^3).

Pode escrever-se (10) da seguinte forma:

$$\begin{aligned} \frac{dC_t}{dt} &= \frac{dS_t}{dt} - \frac{1}{V} \frac{dQ_t}{dt} - \frac{V_{mic}}{V} \frac{dC_{mic,t}}{dt} \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow \frac{dC_t}{dt} &= r_{bio} + r_{diss} + r_{mic} \end{aligned} \quad (11)$$

$-\frac{V_{mic}}{V} \frac{dC_{mic,t}}{dt}$ - Taxa de variação na concentração de substrato na fase micelar, r_{mic} ($kg\ m^{-3}h^{-1}$).

A transferência de massa da fase sólida para a fase aquosa é dada pela equação (1). Por seu lado, a transferência de massa entre as duas pseudofases líquidas, consideradas imiscíveis, vem:

$$\begin{aligned} \frac{dC_{mic,t}}{dt} &= \frac{K_{mic} \cdot A_{mic}}{V_{mic}} \cdot (C_i - C_{aq,eq}) \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow \frac{dC_{mic,t}}{dt} &= \frac{K_{mic} \cdot A_{mic}}{V_{mic}} \cdot (C_i - \frac{C_{mic,t}}{m_{mic}}) \end{aligned} \quad (12)$$

em que:

$C_{aq,eq}$ - Concentração do composto em fase aquosa, em condições de equilíbrio com a fase micelar de concentração no soluto $C_{mic,t}$ ($kg\ m^{-3}$).

K_{mic} - Coeficiente global de transferência de massa entre as fases imiscíveis ($m\ h^{-1}$).

A_{mic} - Área específica interfacial (m^2).

m_{mic} - Constante de partição entre a fase micelar e a fase aquosa.

A taxa de consumo de substrato relaciona-se com a taxa de crescimento celular por meio de (3). Substituindo (1), (3), (5) e (12) em (11), tem-se:

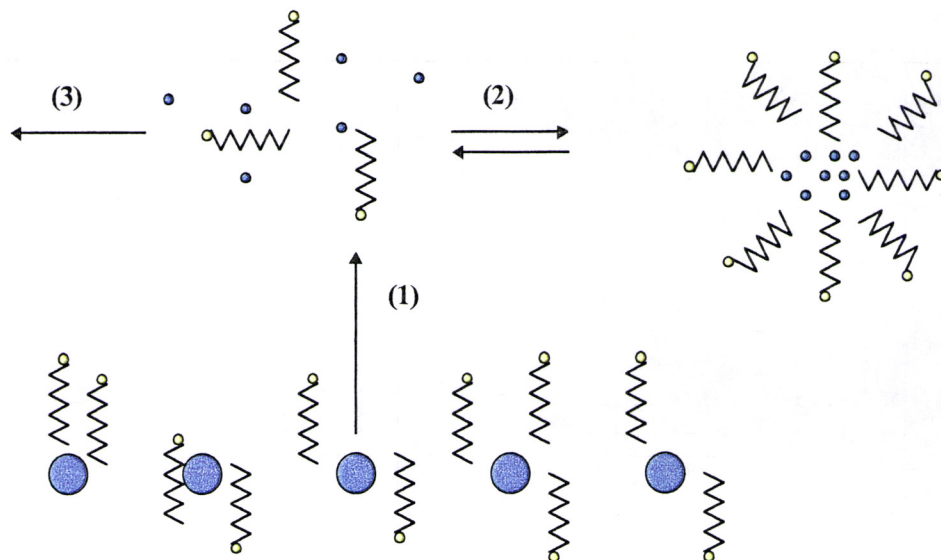


Figura I.6 Modelo trifásico de crescimento em substratos sólidos, na presença de tensoactivos em concentração superior à CMC [42]. (1) Dissolução do soluto na fase aquosa; (2) Partição do soluto entre a fase aquosa e a fase micelar; (3) Consumo do soluto a partir da fase aquosa.

$$\frac{dC_t}{dt} = \frac{K \cdot A}{V} (C_{eq} - C_t) + \frac{K_{mic} \cdot A_{mic}}{V} \left(\frac{C_{mic,t}}{m_{mic}} - C_t \right) - \frac{X_t}{Y} \mu(C_t) \quad (13)$$

A solução do sistema constituído pelas equações (12), (13) e (5), cujas variáveis são C_t , $C_{mic,t}$ e X_t , pode ser particularizado considerando as condições iniciais:

$$C_t(t=0) = C_{eq} = C_{mic,max} / m_{mic}$$

$$C_{mic,t}(t=0) = C_{mic,max}$$

$$X_t(t=0) = X_0$$

$C_{mic,max}$ é a máxima concentração de soluto que uma fase micelar, fornada pela quantidade disponível de tensoactivo, pode acomodar.

Tal como se concluiu anteriormente, verifica-se ainda que o crescimento exponencial perdura até a taxa de consumo do substrato igualar a sua taxa máxima de transferência para a fase aquosa. No sistema trifásico, a taxa máxima de transferência de soluto para a fase aquosa nunca é inferior à observada no sistema sem adição de tensoactivo, pois vem dada por:

$$r_{diss}^{max} + r_{mic}^{max} = \frac{K \cdot A \cdot C_{eq}}{V} + \frac{K_{mic} \cdot A_{mic} \cdot C_{mic,t}}{V \cdot m_{mic}} \quad (14)$$

Analogamente, a extensão da fase exponencial no modelo descrito, nunca é inferior à observada nas culturas sem tensoactivo, e aumenta com o valor de $C_{mic,max}$, ou seja com a quantidade de tensoactivo adicionado. Por outro lado, tem-se que:

$$r_{diss}^{max} + r_{mic}^{max} = -r_{bio} \Leftrightarrow r_X = Y \cdot \left(\frac{K \cdot A \cdot C_{eq}}{V} + \frac{K_{mic} \cdot A_{mic} \cdot C_{mic,t}}{V \cdot m_{mic}} \right) \quad (15)$$

Nestas condições, a taxa específica de crescimento diminui ao longo da fermentação, mas nunca é inferior ao valor registado no sistema análogo, sem adição de tensoactivo.

A fase micelar comporta-se assim como um reservatório de substrato, o que permite, por um lado, prolongar o crescimento exponencial, e por outro, incrementar a taxa de crescimento quando o sistema se encontra controlado pelos mecanismos de transferência de massa.

1.5.2.3 Avaliação do modelo

As observações experimentais descritas na literatura sobre o efeito da adição de tensoactivos na mineralização de PAHs nem sempre são concordantes. A adição de

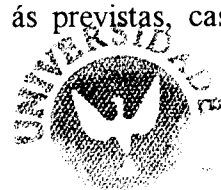
tensioactivos em concentrações inferiores à CMC é descrita, por alguns autores, como sendo benéfica para o processo de degradação de PAHs; a influência na tensão superficial e molhabilidade das superfícies sólidas, factores que influenciam o coeficiente global de transferência de massa K , são as causas avançadas para justificar o efeito benéfico dos tensioactivos nesta gama de concentrações [38]. Ou seja, a adição de tensioactivos, em concentrações inferiores às respectivas CMC, permite melhorar a cinética de dissolução do substrato.

Por seu turno, observa-se que o recurso a concentrações superiores à CMC, podem conduzir à total inibição da biodegração [38, 49], sendo o efeito inibitório atribuído, nos estudos citados, a causas fisiológicas reversíveis, resultantes da interacção micelas-bactérias [38], ou à não acessibilidade do substrato micelizado, em virtude da sua elevada hidrofobicidade [49].

Outros autores referem que a adição de tensioactivo, para concentrações supra-CMC, a culturas descontínuas em fase linear de crescimento (cinética de ordem zero), permite um incremento na taxa de formação de biomassa [42], não sendo observados efeitos inibitórios até concentrações de tensioactivos não iónicos de 10 g/L. Quando a adição do tensioactivo é efectuada no início da experiência, a fase exponencial de crescimento é mais prolongada [42]. As observações são justificadas pela existência de mecanismos de transporte de massa alternativos, na presença da fase micelar, e por um incremento importante no valor do coeficiente de transferência de massa K . Outros estudos registam igualmente incrementos nas taxas de degradação do naftaleno e fenantreno, em consequência do aumento de solubilidade aparente [58, 59].

Estima-se que o tempo de residência do naftaleno e pireno em micelas de dodecilsulfato de sódio se situem nas gamas 4-13 e 343-588 μ s, respectivamente [58]. Estes baixos tempos de residência tornam plausível a transferência de solutos da fase hidrofóbica para a fase aquosa, e permitem concluir que as moléculas de PAH dissolvidas em micelas, embora não directamente acessíveis aos microrganismos, estão contudo biodisponíveis [58]. Contudo, como se afirmou, a presença da fase micelar no meio de cultura pode actuar como um sequestrante do substrato, sendo o efeito mais notório para os compostos mais hidrofóbicos, em baixas concentrações, e na presença de tensioactivos em concentrações supra-CMC [49].

A acessibilidade directa dos microrganismos aos PAHs dissolvidos na fase micelar é controversa. Estudos recentes indicam que os microrganismos podem interactuar com as micelas, o que se traduz em taxas de biodegradação superiores às previstas, caso se



ignore o seu acesso aos hidrocarbonetos micelizados [58, 60]. Refere-se ainda que, para uma mesma estirpe bacteriana, a acessibilidade do fenantreno micelizado poderá estar dependente do tensoactivo em causa [60]; adicionalmente, a fracção a que os microrganismos tem acesso directo, varia igualmente com o tensoactivo. Estes dados apontam para a existência de interacções micelas-bactérias, cuja importância depende, muito naturalmente, das características do tensoactivo.

I.5.3 Biodegradação de PAHs em sistemas bifásicos líquido-líquido

I.5.3.2 Modelo de crescimento em sistemas bifásicos líquido-líquido

Considera-se que o substrato é adicionado ao meio dissolvido numa fase orgânica, e que o seu consumo é feito exclusivamente a partir da fase aquosa. O solvente orgânico, o substrato e os produtos, não possuem efeitos inibitórios. O consumo de nutrientes tem como único fim o crescimento celular.

O balanço de massa ao substrato é dado por:

$$V_t \frac{dS_t}{dt} = V_{aq} \frac{dC_t}{dt} + V_{org} \frac{dC_{org,t}}{dt} \quad (16)$$

sendo:

$C_{org,t}$ - Concentração do composto na fase orgânica (kg m^{-3}).

V_t - Volume do sistema bifásico (m^3).

V_{aq} - Volume da fase aquosa (m^3).

V_{org} - Volume da fase orgânica (m^3).

$-\frac{dC_{org,t}}{dt}$ - Taxa de variação na concentração de substrato na fase orgânica, r_{org} ($\text{kg m}^{-3}\text{h}^{-1}$).

A transferência de massa entre a fase orgânica e a fase aquosa é dada por:

$$\begin{aligned} \frac{dC_{org,t}}{dt} &= \frac{K_{org} \cdot A_{org}}{V_{org}} \cdot (C_t - C_{aq,eq}) \Leftrightarrow \\ \Leftrightarrow \frac{dC_{org,t}}{dt} &= \frac{K_{org} \cdot A_{org}}{V_{org}} \cdot \left(C_t - \frac{C_{org,t}}{m_{org}}\right) \end{aligned} \quad (17)$$

em que:

$C_{aq,eq}$ - Concentração do composto em fase aquosa, em condições de equilíbrio com a fase orgânica de concentração no soluto $C_{org,t}$ (kg m^{-3}).

K_{org} - Coeficiente global de transferência de massa entre as fases imiscíveis (m h^{-1}).

A_{org} - Área específica interfacial (m^2).

m_{org} - Constante de partição entre a fase orgânica e a fase aquosa.

Substituindo (3), (5) e (17) em (16), tal como se fez anteriormente:

$$\begin{aligned} \frac{dC_t}{dt} &= \frac{V_{org}}{V_{aq}} r_{org} + \frac{V}{V_{aq}} r_{bio} \\ &= \frac{K_{org} \cdot A_{org}}{V_{aq}} \left(\frac{C_{org,t}}{m_{org}} - C_t \right) - \frac{V}{V_{aq}} \frac{X_t}{Y} \mu(C_t) \end{aligned} \quad (18)$$

A solução do sistema constituído pelas equações (5), (17) e (18), cujas variáveis são C_t , $C_{org,t}$ e X_t , pode ser particularizado considerando as condições iniciais:

$$C_{org,t}(t=0) = C_0$$

$$C_t(t=0) = C_0 / m_{org}$$

$$X_t(t=0) = X_0$$

O crescimento exponencial perdura enquanto se verificar a condição $V_{org} \cdot r_{org}^{max} \geq -V_t \cdot r_{bio}$, e a respectiva taxa específica de crescimento é variável consoante o valor de C_0/m_{org} . Verifica-se ainda que a taxa máxima de transferência de substrato para a fase aquosa e a extensão da fase exponencial dependem também da razão $C_{org,t}/m_{org}$, podendo resultar inferiores às observadas no sistema sólido-líquido, se C_0/m_{org} for muito inferior a C_{eq} :

$$r_{org}^{max} = \frac{K_{org} \cdot A_{org}}{V_{aq}} \frac{C_{org,t}}{m_{org}} \quad (19)$$

Na Figura I.7 representa-se a variação, com os parâmetros $K_{org} \cdot A_{org} / V_{aq}$ e m_{org} , das concentrações de substrato nas duas fases e dos parâmetros de crescimento. Admitiram-se os valores indicados na alínea I.5.1.1 para os parâmetros fixos do modelo, e considerou-se $C_0 = 1 \text{ g/dm}^3$. A aplicação do modelo descrito permite verificar (Figura I.7 (D)) que, para substratos muito hidrofóbicos, pode ocorrer o seu sequestro na fase orgânica, comportando-se o sistema de forma análoga a um sistema contínuo.

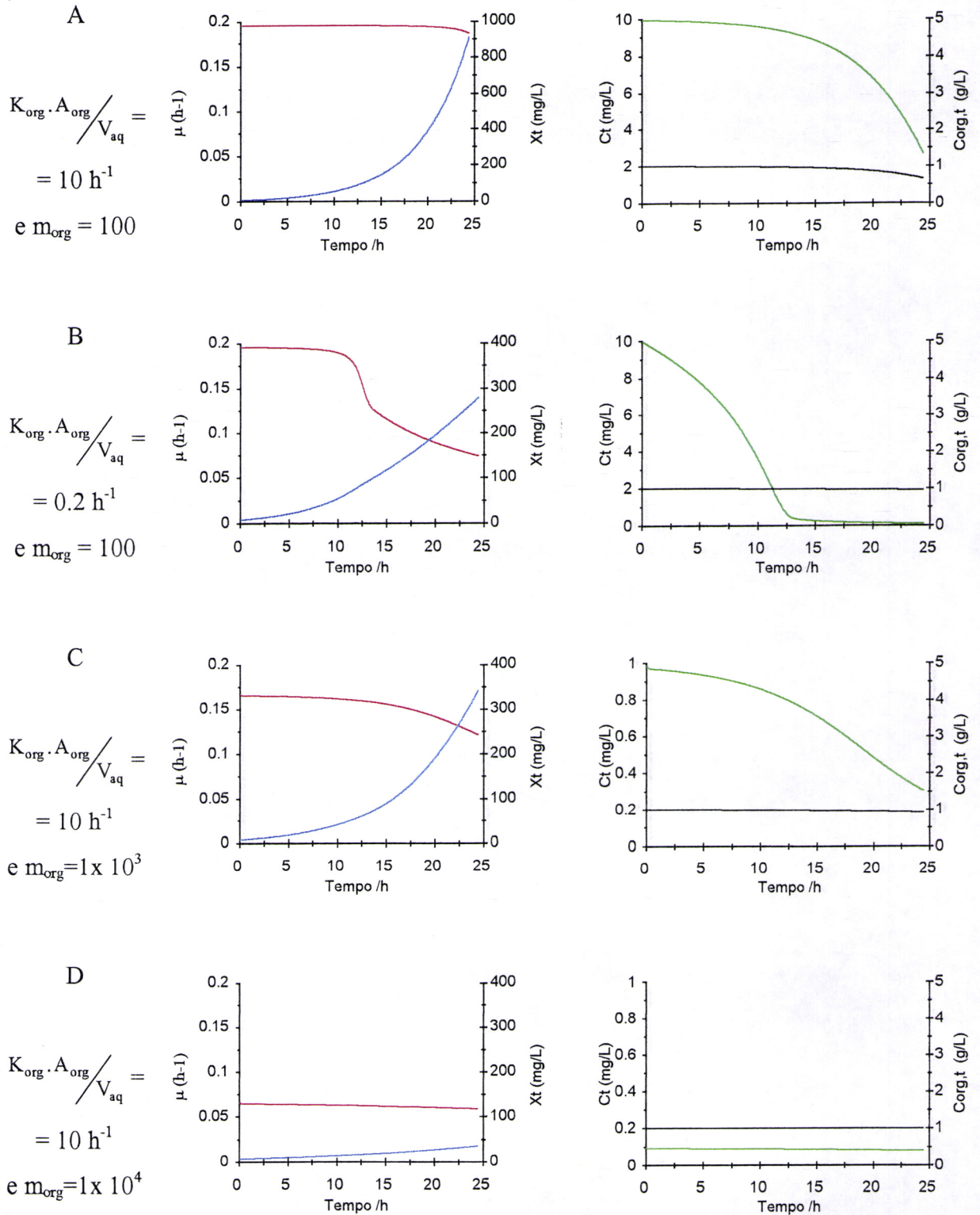


Figura I.7 Representação gráfica da quantidade de biomassa, X_t (—), da taxa de crescimento específica, μ (—) e das concentrações de substrato, na fase aquosa, C_t (—), e na fase orgânica, $C_{org,t}$ (—), durante uma fermentação descontínua bifásica.

1.5.3.2 Avaliação do modelo

Um aspecto que poderá limitar a aplicabilidade do modelo descrito, reside na conhecida capacidade de algumas estirpes bacterianas para aderir à interface de fases hidrofóbicas. Esta aderência é comum entre os microrganismos degradadores de n-alcenos líquidos, e permite que assimilação dos hidrocarbonetos se processe de um modo particularmente eficiente [49].

A aderência a solventes orgânicos hidrofóbicos é uma característica dependente da hidrofobicidade celular das estirpes, que varia consoante a fase de crescimento e o meio de cultura [61]; é incrementada em culturas contínuas, demonstrando ainda sensibilidade relativamente à taxa de diluição do sistema [52], e pode ser quantificada por meio de métodos descritos na literatura [61].

Como se referiu, a aderência a fases hidrofóbicas sólidas foi encontrada em microrganismos degradadores de PAHs. Surpreendentemente, algumas estirpes que degradam PAHs, tem a possibilidade de aderir a interfaces líquidas mas não a superfícies sólidas [62].

Deste modo, em culturas bifásicas, o contacto directo das células com a fase orgânica pode permitir taxas de degradação do substrato superiores em uma ordem de grandeza, às observadas a partir do substrato dissolvido em fase aquosa [49]. Na realidade, mesmo quando o solvente orgânico actua de forma a tornar indetectável o substrato em fase aquosa, a biodegradação pode prosseguir com taxas muito favoráveis [49], não sendo referido, para solventes orgânicos, um efeito inibitório por sequestro do substrato, análogo ao descrito para tensoactivos. Este facto é notável, e resulta inteiramente da interacção com o solvente apolar ser fisiologicamente menos tóxica para os microrganismos, do que a interacção com micelas.

A adição de tensoactivos a sistemas com solventes orgânicos, aumenta consideravelmente a população microbiana em fase aquosa, pois impede a aderência das células à fase líquida hidrofóbica [48]. Para os substratos mais hidrofóbicos, como o hexadecano (elevado m_{org}), a presença do tensoactivo pode conduzir à total inibição da biodegradação; no caso do naftaleno, possui um efeito benéfico na mineralização do substrato, o que é interpretado pela existência de outras limitações nutricionais, para as bactérias na interface líquido-líquido, que não a limitação pelo substrato.

II. Materiais e Métodos

II.1 Materiais e métodos de uso geral

II.1.1 Reagentes químicos

Na preparação de meios de cultura, utilizaram-se os reagentes: dihidrogenofosfato de potássio, p.a., sulfato de magnésio heptahidratado, p.a., hidrogenofosfato de sódio dihidratado, p.a., ácido clorídrico (25%, d = 1.12, p.a.), da Merck; sulfato de amónia, p.a., da Riedel-de-Haën e hidróxido de potássio, p.a., da Pronolab; extracto de levedura (azoto total, 9.8% (p/p); azoto amoniacal, 5.1 % (p/p)) e TSA (Tryptona, soja, agar), da Oxoid; agar purificado, da Difco; dextrose, da HiMedia. Recorreu-se ainda a PDMS, visc. = 20 centistokes, da Sigma; Tween 80 (d = 1.080, para síntese), da Merk e Triton X-100 (d = 1.080), da USB.

Os hidrocarbonetos aromáticos utilizados foram: naftaleno, g.p.> 99%, fenantreno e antraceno, g.p.> 98%, e bifenil, g.p.> 99%, da Merck, e dibenzotiofeno, g.p.> 99%, da Acrös.

Outros reagentes utilizados, foram: etér etílico, p.a., e etanol, g.p.> 99.8%, da Pronolab; pirofosfato de sódio decahidratado, p.a., da Sigma; metanol, p.a., e tartarato duplo de sódio e potássio tetrahidratado, g.p.> 99.5%, da Riedel-de-Haën; sulfato de cobre pentahidratado, p.a., e reagente de Folin-Ciocalteu (d = 1.24), da Merck, e albumina de soro bovino (BSA), da USB.

Para a filtração das suspensões bacterianas, utilizaram-se filtros da Gelman Sciences, com diâmetro de 47 mm e porosidade de 0.2 µm, sendo os filtrados recolhidos concentrados com o auxílio de cartuchos Sep-Pak C18, da Waters Associates.

Utilizou-se água desionizada para preparação de soluções químicas (Millipore, 18.2 MΩ.cm) e meios de cultura (0 µS/cm).

II.1.2 Meios de cultura

O meio TSA foi preparado de acordo com as instruções do fabricante.

Utilizou-se um meio mineral definido (meio MM), descrito em [63], cuja composição é indicada na Tabela II.1. O pH deste meio foi acertado a um valor entre 6.9 e 7 com ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. Inicialmente, para isolamento dos

Tabela II.1 Composição do meio mineral MM [63].

Constituintes	Concentração final g/dm ³
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5
KH ₂ PO ₄	1.7
Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O	1.7
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.2
EDTA	0.0125
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0.00225
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0.00125
CoCl ₂ . 6H ₂ O	1.5 x 10 ⁻⁴
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1.5 x 10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ . 7H ₂ O	2.0 x 10 ⁻⁴
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.00225
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0.0015
H ₃ BO ₃	5.0 x 10 ⁻⁴
KI	5.0 x 10 ⁻⁵

microrganismos, o meio MM foi suplementado com 0.01 g/dm³ de extracto de levedura (meio MMYE). Os meios MM e MMYE sólidos, foram preparados por adição de 15 g/dm³ de agar.

II.1.3 Esterilização de soluções e dos PAHs

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave, a 120°C, e à pressão relativa de 1 kg/cm³, durante 15 min. Os substratos de crescimento foram adicionados ao meio estéril, na forma de soluções “stock” ou como partículas sólidas.

O naftaleno e outros PAHs foram esterilizados em frascos rolhados, pesados assepticamente, e adicionados ao meio de cultura quando necessário. As suas soluções em PDMS, foram preparadas por adição do sólido estéril ao solvente, tendo este sido previamente esterilizado em separado.

II.1.4 Manutenção das culturas e preparação de inóculos

Os microrganismos isolados foram rotineiramente conservados em rampas (slants) de meio TSA ou placas com MM e naftaleno sólido, incubadas a 30°C e conservadas a 4°C.

Constituíram-se pré-inóculos em frascos rolhados, por passagem destas culturas para meio líquido MM com naftaleno sólido. A pureza dos pré-inóculos preparados foi confirmada por espalhamento em meio TSA, antes da sua utilização. Os pré-inóculos foram preparados com antecedência, e conservados a 4°C até ao momento da sua utilização.

Consoante a necessidade, foram preparados inóculos em naftaleno ou glucose, após duas passagens no meio contendo o substrato pretendido.

O crescimento de microrganismos foi estudado invariavelmente por inoculação de culturas em fase exponencial de crescimento, cuja pureza fora previamente avaliada por espalhamento em meio TSA.

II.2 Isolamento de microrganismos degradadores de PAHs

Foram pesquisadas amostras de cinco solos de características diferentes, provenientes de terrenos da Expo com contaminação antiga em hidrocarbonetos.

O isolamento dos microrganismos foi feito em placa, utilizando um método por incorporação, com modificações relativamente às técnicas usuais descritas na literatura [17, 18].

Em assépcia, adicionou-se aproximadamente 1g de cada amostra de solo a uma solução de pirofosfato de sódio 0.1 M (10% (p/v)). As suspensões assim obtidas foram agitadas no Vortex durante 1 min., para desagregar os microrganismos, e filtradas para separar as partículas sólidas de terra.

Os filtrados foram seguidamente diluídos em série até 10^{-3} . Cada uma das diluições decimais foi então incorporada em MMYE, agarizado, e mantido em estado semi-sólido a 40°C, de modo a obter uma diluição de 1:10 das suspensões iniciais, na mistura de meio agarizado de volume total de 7.5 ml.

Após homogeneização da mistura, fez-se o seu rápido espalhamento sobre uma camada de meio MMYE, previamente solidificado e coberto por uma fina camada de fenantreno sólido, obtida por pulverização de uma solução deste composto em éter dietílico. A incubação das placas foi efectuada a 30°C, em atmosfera húmida.

Uma vez que as colónias degradadoras de fenantreno eram morfológicamente idênticas, e possuíam aspecto semelhante, repicou-se apenas uma colónia, efectuando-se novo espalhamento em placas com meio MMYE, cobertas com fenantreno.

A terceira passagem foi realizada para placas com meio MM, sendo fornecido naftaleno no estado de vapor como substrato. Para tal, depositaram-se, nas tampas das placas de Petri, pequenos cristais de naftaleno estéril. Repicou-se então uma das colónias desenvolvidas em meio selectivo para rampas de TSA, onde foram conservadas do modo anteriormente descrito.

Para determinação da pureza das colónias formadas em MM com naftaleno, fez-se o seu espalhamento em meio geral (TSA). Efectuaram-se então repicagens sucessivas de colónias com morfologia e aspecto idênticos, seguidas de novo espalhamento em TSA das diluições em série dos repicados. Paralelamente, e para o mesmo efeito, o repicado das colónias obtidas após três passagens por meio selectivo, foi diluído em série até 10^{-8} em MM, e incubado com naftaleno sólido. A diluição máxima em que foi observado crescimento foi então semeada por espalhamento em TSA.

II.3 Degradação do naftaleno pela cultura isolada

A biodegradação do naftaleno foi avaliada pelo aumento da biomassa e pelo desaparecimento do substrato nas culturas inoculadas. O aumento da biomassa foi rotineiramente seguido por leituras de absorvância a 590 nm e, quando explicitamente indicado, por doseamento da proteína total nas suspensões bacterianas.

Utilizaram-se frascos agitados, com inóculos a 10% e uma concentração de substrato de 0.01 mol/dm^3 . Nos ensaios com PDMS, utilizou-se 20% v/v de fase orgânica, pelo que a sua concentração inicial em naftaleno foi de 0.05 mol/dm^3 (1 g/dm^3).

Os frascos agitados foram incubados à temperatura de 30°C e com agitação de 130 rpm, num agitador orbital da New Brunswick Scientific.

O meio utilizado foi o meio MM.

As condições descritas foram mantidas para todos os ensaios realizados em meio líquido.

II.3.1 Consumo de naftaleno em culturas com PDMS

O consumo de naftaleno foi comprovado para culturas bifásicas com PDMS, com volume total de 150 ml, e incubadas durante 48 h.

A sedimentação da biomassa e a separação das fases foi obtida por centrifugação a 6000 g durante 10 min, numa centrífuga MSE Mistral 3000i, da Sanyo. Recolheu-se então a fase orgânica para análise.

Foram inoculados três balões e analisadas as respectivas fases orgânicas em separado. O controlo abiótico sofreu um tratamento idêntico ao efectuado às amostras.

II.3.2 Evolução da concentração aquosa de naftaleno e da biomassa em culturas com substrato sólido

Inocularam-se doze balões, com culturas de volume total de 75 ml, e possuindo naftaleno (0.1 g por balão) em partículas de diâmetro médio aproximado de 0.5 mm. Em intervalos de tempo regulares, foram abertos dois balões, para recolha dos respectivos sobrenadantes. O doseamento do naftaleno, na mistura dos dois duplicados equivalentes, foi efectuado por cromatografia gasosa (GC), sendo ainda efectuada a sua análise por U.V-Vis, na gama entre 200 e 600 nm, num espectrofotómetro da Jasco, modelo V-530.

Em paralelo, seguiu-se a evolução da biomassa por leituras de absorvância e doseamento da proteína total nas suspensões bacterianas.

II.3.3 Crescimento celular em culturas com substrato sólido

Nas culturas com substrato sólido, avaliaram-se os efeitos, na taxa de crescimento celular, do tamanho das partículas sólidas de naftaleno e da adição de dois tensioactivos, em diferentes concentrações, ao meio de cultura.

Os ensaios foram realizados em culturas de volume total de 150 ml, pelo que a concentração de naftaleno indicada corresponde a 0.2 g de naftaleno por ensaio.

II.3.3.1 Ensaios com partículas de diferentes diâmetros

O naftaleno foi adicionado ao meio de cultura na forma de esferas, com diâmetro aproximado de 7 mm. As esferas iniciais foram subdivididas, em alguns ensaios, em partículas de diâmetro médio aproximado de 0.5 mm. Os ensaios com uma partícula grande e partículas pequenas foram realizados em triplicado.

II.3.3.2 Ensaio na presença de tensioactivos

O naftaleno foi adicionado ao meio na forma de partículas de diâmetro médio aproximado de 0.5 mm. Testou-se o efeito da adição de Tween 80 e Triton X-100, em concentrações próximas da CMC dos tensioactivos, e ainda em concentrações cerca de 10 e 100 vezes superiores à CMC respectiva. Mais concretamente, para o Tween 80, a gama de concentrações utilizada variou entre 1.1×10^{-5} e 1.1×10^{-3} mol/dm³ (ou seja, entre 0.003 e 0.3 % v/v), e para o Triton X-100 variou entre 2.1×10^{-4} e 2.1×10^{-2} mol/dm³ (ou seja, entre 0.031 e 3.1 % v/v). Os ensaios foram realizados em triplicado.

A adição dos tensioactivos aos meios de cultura foi efectuada a partir das respectivas soluções comerciais, ou de soluções aquosas de concentração adequadas.

II.3.4 Crescimento celular em culturas com PDMS

Os ensaios foram realizados em triplicado, para culturas de volume total de 150 ml, nas condições referidas anteriormente, e seguiram-se as respectivas absorvâncias em fase aquosa. Simultaneamente, inocularam-se, em triplicado, culturas com substrato sólido (diâmetro médio das partículas de cerca de 0.5 mm). Pretendeu-se desta forma avaliar o comportamento dos dois sistemas, no que concerne ao crescimento celular, para as mesmas condições experimentais e para um mesmo inóculo.

II.4 Partição celular em culturas bifásicas com PDMS

Estudou-se a localização preferencial da biomassa em culturas com PDMS, na ausência de substrato e nas condições utilizadas na incubação. Para tal, adicionou-se PDMS (20% v/v) a culturas crescidas com partículas sólidas, e seguiu-se a correspondente absorvância na fase aquosa, com tempos de contacto das fases, com agitação, até 1h. Este ensaio foi repetido para culturas em diferentes fases de crescimento, de forma a cobrir a gama de tempos de incubação seguida nas curvas de crescimento traçadas.

II.5 Ensaio de biodegradabilidade e biocompatibilidade do PDMS e dos tensoactivos

Avaliou-se a possibilidade do PDMS e dos dois tensoactivos utilizados como aditivos aos meios de cultura poderem ser consumidos como fonte de carbono pela cultura mista isolada. Para tal, realizaram-se ensaios sem fonte de carbono alternativa, e verificou-se a eventual ocorrência de crescimento celular.

Os eventuais efeitos tóxicos ou inibitórios do PDMS e dos dois tensoactivos utilizados como aditivos aos meios de cultura, foram testados em ensaios com glucose como substrato. Utilizou-se uma concentração de glucose no meio de $5.5 \times 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$ (1 g/dm^3).

Os ensaios de biodegradabilidade e biocompatibilidade foram realizados em frascos agitados, com culturas de volume total de 150 ml, nas mesmas condições em que se estudou a degradação do naftaleno. Para os tensoactivos, as concentrações utilizadas nos ensaios, corresponderam aos respectivos valores máximos adicionados às culturas com substrato sólido. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

II.6 Doseamento do naftaleno por cromatografia gasosa

Os meios de cultura foram doseados por GC. O tratamento da amostra variou consoante a natureza da fase (aquosa ou orgânica) analisada. Foram analisados volumes de 50.0 ml de meios aquosos, e de 2.0 ml de fase orgânica.

Em qualquer dos casos, utilizou-se o bifenil como padrão interno para a análise.

II.6.1 Preparação de padrões e tratamento das amostras para análise do naftaleno em PDMS

Soluções auxiliares

Solução de bifenil em PDMS, de concentração 2 g/dm^3 .

Soluções padrão

Preparam-se padrões, em PDMS, com concentração de 1g/dm^3 em bifenil e possuindo as seguintes concentrações em naftaleno: padrão 1: 0.1g/dm^3 ; padrão 2: 0.5g/dm^3 ; padrão 3: 1.5g/dm^3 . Preparou-se ainda uma solução sem naftaleno (padrão 0).

Tratamento das amostras

Adicionou-se 1.0 ml de solução de bifenil em PDMS, de concentração 2g/dm^3 , a igual volume fase orgânica, recolhida a partir das culturas bifásicas.

As amostras foram extraídas com volumes equivalentes de metanol, efectuando-se cada extracção em duplicado. Após agitação vigorosa, as misturas foram deixadas em repouso durante 12 h. a 4°C , para separação das fases. Recolheram-se os extractos metanólicos de cada amostra para frascos de vidro selados com septos de teflon, que foram conservados a 4°C para análise posterior.

Os padrões foram extraídos com metanol de forma idêntica, sendo recolhidos os respectivos extractos para análise.

II.6.2 Preparação de padrões e tratamento das amostras para análise do naftaleno em meios aquosos

Soluções auxiliares

Prepararam-se soluções de naftaleno e bifenil em metanol, com concentração de 2g/dm^3 .

Tabela II.2 Preparação de soluções padrão de naftaleno em água, com volume total de 50.0 ml.

Padrão	Volume de sol. metanólica 2g/dm^3 (μl)		Volume de metanol (μl)	Concentração (mg/dm^3)	
	Naftaleno	Bifenil		Naftaleno	Bifenil
1	25	250	225	1.0	10.0
2	62.5	250	187.5	2.5	10.0
3 (2x)	100	250	150	4.0	10.0
3' (2x)	125	250	125	5.0	10.0
4	250	250	0	10.0	10.0
5	375	125	0	15.0	5.0

Soluções padrão

Os padrões foram preparados por adição das quantidades adequadas das soluções auxiliares em água, de modo a obter um volume total de 50.0 ml. A preparação das soluções padrão é descrita na Tabela II.2.

Tratamento das amostras

Com os sobrenadantes das culturas bacterianas, prepararam-se soluções de volume total de 50.0 ml, contendo 250 µl de solução de bifenil 2 g/dm³ e igual volume de metanol. As amostras assim obtidas possuem concentração de 10.0 mg/dm³ em padrão interno.

A concentração das amostras foi efectuada por passagem em coluna Sep-Pak C18, previamente lavada e acondicionada. De seguida, permitiu-se a secagem da coluna, sob vácuo, durante 3-4 min, e extraíram-se os compostos retidos com 2.0 ml de etanol. Os extractos etanólicos foram conservados a 4°C, em frascos de vidro selados, para análise posterior.

Os padrões foram concentrados de modo idêntico, sendo recolhidos os respectivos extractos para análise.

II.6.3 Análise de amostras de naftaleno

As amostras e padrões preparados foram analisados por GC, com um cromatógrafo da Crompack, modelo CP 9001, com detector de ionização de chama. A coluna empregue nas análises de soluções de naftaleno, foi uma coluna de enchimento da Crompack (Cat. no. 1235), de dimensões 1m x 1/8" x 2mm, com fase estacionária e % de cobertura 10% CP 5CB, e com suporte sólido Chromosorb W HP, 100-120 mesh.

As análises foram efectuadas nas seguintes condições: volume de amostra, 2µl; fluxo do gás de arraste (azoto), 15 ml/min; fluxo de hidrogénio, 30 ml/min; fluxo de ar, 250 ml/min; temperatura no injector, 250°C; temperatura no detector, 335°C. O programa de temperaturas adoptado foi o seguinte: 100°C durante 5 min; 5°C/min até 180°C; 10°C/min até 300°C.

II.7 Doseamento do naftaleno por espectrofotometria

Soluções auxiliares

Preparou-se uma solução de naftaleno em metanol, com concentração de 2 g/dm³.

Soluções padrão

Por diluição da solução auxiliar em água, preparam-se soluções padrão, de volume total de 20.0 ml, com concentração entre 5.0 e 20.0 mg/dm³.

Análise de amostras e padrões

As amostras e padrões foram analisados por espectrofotometria, ao comprimento de onda de 275 nm, com água como branco.

II.8 Doseamento da proteína total em suspensões bacterianas pelo método de Lowry

Fez-se a sedimentação da biomassa de suspensões de 4 ml de volume por centrifugação a 13 000 g durante 15 min, procedendo-se à sua lavagem com MM. As células foram rebentadas por digestão com NaOH 1 mol/dm³, durante 5 min. a 100°C. O volume de NaOH utilizado para ressuspender as células variou entre 275 e 500 µl, consoante a intensidade da suspensão bacteriana. Sempre que o volume disponível do extracto celular permitiu, analisaram-se várias diluições em NaOH 1 mol/dm³ de cada amostra.

Após a obtenção do extracto contendo a proteína solúvel celular, procedeu-se à determinação da quantidade de proteína total de acordo o método descrito em [64].

Soluções auxiliares

Solução de proteína BSA (albumina de soro bovino) 1.0 mg/cm³.

Solução de NaOH 1 mol/dm³.

Solução A: Na₂CO₃ 2%(p/v); solução B₁: 2%(p/v); solução B₂: CuSO₄ 1%(p/v); solução C: obtida por mistura, com agitação contínua, de 50.0 ml de A + 0.5 ml de B₁ + 0.5 ml de B₂; solução D: reagente de Folin-Ciocalteu 1:2 (v/v).

Preparação de soluções padrão

Por diluição da solução auxiliar de BSA em NaOH 1 mol/dm³, prepararam-se padrões de proteína, de volume total de 200 µl, com concentração entre 0.1 e 1.0 mg/cm³. O branco é constituído por 200 µl de NaOH 1 mol/dm³.

Tratamento das amostras

Adicionaram-se 2 ml de solução C a 200 µl de solução proteica. As misturas foram deixadas à temperatura ambiente durante 10 min., adicionando-se de seguida 0.2 ml de solução D. Permitiu-se um novo período de repouso de 30 min. à temperatura ambiente, antes de efectuar a análise das soluções.

O tratamento descrito é comum para amostras e padrões.

Análise de amostras e padrões

As amostras e padrões foram analisados por espectrofotometria, ao comprimento de onda de 750 nm, contra o branco de concentração nula em proteína.

III. Resultados e Discussão

III.1 Isolamento de uma cultura mista degradadora de PAHs

O método adoptado para isolamento em placa de microrganismos degradadores de PAHs, foi original em relação aos métodos propostos na literatura [17, 18] e descritos previamente (secção I.2.2).

De um modo geral, considera-se que consoante a pulverização da solução volátil de PAHs seja efectuada antes ou depois do espalhamento do inóculo, podem observar-se, respectivamente, dificuldades em efectuar o espalhamento do inóculo sobre a camada de sólido, ou efeitos inibidores do solvente nos microrganismos. A avaliação experimental conduzida dos dois procedimentos alternativos, permitiu corroborar estas desvantagens.

No que diz respeito ao método por incorporação do inóculo e do PAH, verificou-se que frequentemente não dá origem a uma camada homogénea do sólido, dificultando em alguns casos a detecção de colónias degradadoras de PAHs.

Do nosso ponto de vista, as variantes introduzidas permitiram conservar as vantagens dos dois métodos alternativos, no que diz respeito à homogeneidade e espessura do revestimento de PAH sólido, ao espalhamento eficaz do inóculo e à minimização dos efeitos tóxicos e inibidores do solvente orgânico utilizado.

As colónias degradadoras de PAHs, quando crescidas por incorporação, com fenantreno como substrato, dependem simultaneamente da difusão do substrato e do oxigénio para crescer. Esta dupla limitação foi minimizada, tanto quanto possível, pela incorporação dos inóculos num filme de meio agarizado de espessura reduzida. Poderá, no entanto, ter sido responsável pelas dimensões diminutas das colónias obtidas (Figura III.1). Quando crescidas por espalhamento, com naftaleno no estado de vapor como substrato, as colónias atingiam dimensões superiores (foram observadas colónias com cerca de 3mm de diâmetro). Apresentavam então tonalidade laranja e bordos rendilhados.

Inicialmente, nas placas de MMYE semeadas com diluições das suspensões de solo, verificou-se o crescimento de colónias que não degradaram o fenantreno, como se comprovou pelo facto de a camada de hidrocarboneto sólido se manter inalterada em redor dessas colónias e por ensaios de crescimento em meio líquido. O crescimento



Figura III.1 Placa original que permitiu a identificação de colónias degradadoras de fenantreno. Devido às reduzidas dimensões das colónias, não é visível na fotografia a descontinuidade introduzida pelas colónias que consomem fenantreno, na camada sólida deste hidrocarboneto.

destas colónias deverá ter ocorrido à custa de compostos orgânicos residuais, presentes nos inóculos iniciais. A selectividade do meio não foi diminuída pela adição de extracto de levedura ao meio mineral, pois a concentração desta fonte nutritiva no meio MMYE era muito baixa. A sua adição destinou-se a atenuar eventuais necessidades em factores de crescimento.

Se bem que em meio selectivo se tenha observado a formação de colónias aparentemente iguais na sua morfologia e aspecto, o mesmo não se verificou para as colónias crescidas em meio geral (TSA). Deste modo, quando uma única colónia, crescida em naftaleno ou fenantreno, foi repicada e espalhada em TSA, observou-se a formação sistemática de dois tipos de colónias que, sendo embora idênticas na sua dimensão e morfologia, apresentavam diferentes graus de opacidade. Após 36 h. a 30°C, os dois tipos de colónias crescidos em TSA possuíam diâmetro aproximado de 1.5 mm. A observação microscópica dos microrganismos de cada uma das colónias, mostrou serem constituídas por bacilos, isolados ou associados em cadeia, sendo indistinguíveis as bactérias que constituíam os dois tipos de colónias, mesmo quando observadas em grandes ampliações (1000x), sob contraste de fase.

As tentativas efectuadas em TSA para isolar as duas estirpes, não permitiram observar a formação sistemática de colónias de um só tipo. Não foram, portanto, obtidos resultados que inequivocamente indicassem que os microrganismos utilizados neste trabalho constituem uma co-cultura, com interdependência elevada também em meios ricos, ou uma cultura pura. A investigação a desenvolver para obter esta confirmação sai fora do âmbito deste trabalho, e não é relevante para os objectivos propostos.

Deste modo, os ensaios de degradação do naftaleno foram realizados com a cultura microbiana que, de acordo com as evidências experimentais obtidas, era uma co-cultura de duas estirpes bacterianas.

A co-cultura cresceu ainda em MM, com dibenzotiofeno (um hidrocarboneto aromático sulfurado) e Tween 80 como únicas fontes de carbono e energia. Nos ensaios em placa realizados em meio MMYE, com antraceno, as colónias resultantes não originaram halos transparentes em seu redor, que evidenciassem a transformação do hidrocarboneto num produto mais solúvel. Este facto não permite afirmar que a co-cultura não consome antraceno; no entanto, nos ensaios realizados em meio MM líquido com antraceno, não se observou o crescimento celular, pelo que se concluiu que a co-cultura não tem capacidade de utilizar o antraceno.

III.2 Doseamento do naftaleno

Para análise do naftaleno por GC em meios de cultura, utilizou-se o bifenil como padrão interno, em virtude da semelhança estrutural dos dois compostos. Nas condições cromatográficas utilizadas, os tempos de retenção foram de, aproximadamente, 8.8 e 14.1 minutos, para o naftaleno e bifenil, respectivamente. A diferença dos tempos de retenção permite uma boa separação dos dois compostos, e confirma o bifenil como um padrão interno adequado para análise do naftaleno.

III.2.1 Análise de soluções de naftaleno em PDMS por GC

A boa estabilidade térmica dos PDMS, justifica o seu uso como fase estacionária em GC [67], mas impossibilita a análise por cromatografia gasosa das soluções de naftaleno neste solvente. Deste modo, tornou-se necessária a prévia extracção das

amostras com metanol, que é um solvente imiscível com os PDMS e possui as características de volatilidade exigidas aos solventes para análise por GC.

A recuperação do naftaleno, após a extracção das amostras, revelou-se muito baixa, o que foi vantajoso do ponto de vista da análise cromatográfica, uma vez que as soluções em PDMS possuíam uma concentração demasiado elevada para análise por esta técnica. Por outro lado, o recurso a um padrão interno para a extracção, contribuiu para uma maior reprodutibilidade no processo de tratamento das amostras.

Os cromatogramas dos extractos metanólicos evidenciaram, no entanto, a presença de numerosos picos adicionais, cuja origem não foi integralmente esclarecida. A regularidade nos tempos de retenção destes picos, sugere que resultaram da solubilidade parcial dos PDMS de cadeia mais curta em metanol, ou da hidrólise dos polímeros em oligómeros de menor massa molar.

Verificou-se assim, que o extracto metanólico do solvente puro, apresentava um cromatograma com picos coincidentes com os do analito e padrão interno, pelo que as respectivas áreas foram subtraídas nos cromatogramas das amostras. Após esta correcção, foi possível obter a curva de calibração representada na Figura III.2.

O cálculo da concentração do naftaleno, nas amostras de PDMS, foi efectuado com base na expressão analítica da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados:

$$\frac{A_{\text{naft}}}{A_{\text{p.i.}}} = (0.00 \pm 0.04) + (2.00 \pm 0.03) \times C_{\text{naft}} \text{ (g / dm}^3\text{)}$$

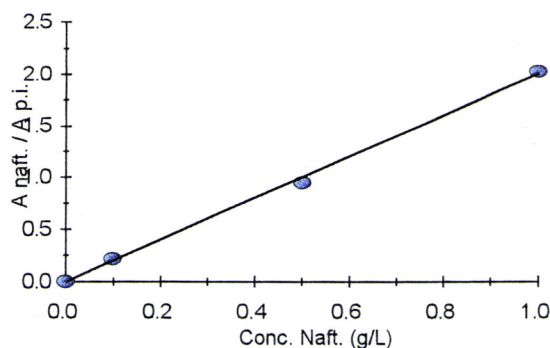


Figura III.2 Curva de calibração para soluções de naftaleno em PDMS, na gama de concentrações entre 0 e 1 g/dm³, com o bifenil como padrão interno.

O método revelou linearidade na gama de concentrações entre 0 e 1 g/dm³, e boa reprodutibilidade e exactidão.

III.2.2 Análise de soluções aquosas de naftaleno por GC

Para acompanhar a evolução da concentração aquosa de naftaleno, torna-se necessário avaliar numa gama que vai desde a concentração correspondente à solução saturada, a 30°C, até um valor tão baixo quanto possível. A análise de meios de cultura, para tempos de incubação pequenos (nomeadamente, para t = 0), não requer uma técnica separativa, tendo sido efectuada por um método espectrofotométrico. Optou-se então, por considerar que a gama de concentrações interessantes, para análise pelo método cromatográfico, se situa entre 1 e 15 mg/dm³. O limite inferior indicado foi estabelecido arbitrariamente, mas o limite máximo da escala teve em conta a solubilidade aquosa do naftaleno.

Os ensaios preliminares conduzidos, permitiram concluir que o naftaleno não é detectado para soluções, em acetato de etilo, com concentração de 1.0 mg/dm³. Deste modo, efectuou-se a pré-concentração da amostra por extracção em fase sólida com colunas C18, as quais possuem uma elevada retenção para os PAHs. O recurso a um padrão interno, para toda a sequência de tratamento das amostras, tornou-se imprescindível, uma vez que não se conseguiu controlar adequadamente os fluxos de amostra e solvente através da coluna. A curva de calibração obtida (Figura III.3), demonstra que a reprodutibilidade da análise é aceitável.

O cálculo da concentração do naftaleno, nas amostras aquosas, foi efectuado com base na expressão analítica da curva de calibração, obtida pelo método dos mínimos quadrados:

$$\frac{A_{\text{naft}}}{A_{\text{P.I.}}} = (0 \pm 0.2) + (0.124 \pm 0.008) \times C_{\text{naft}} \text{ (mg / dm}^3\text{)}$$

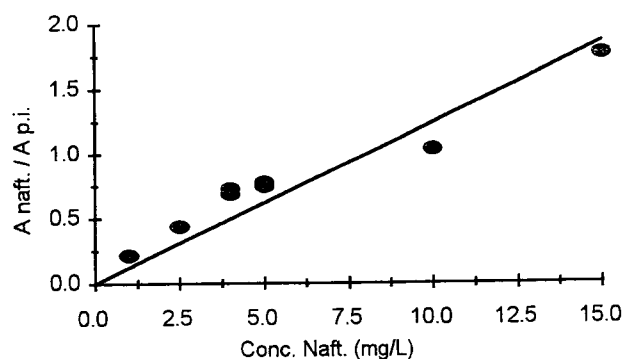


Figura III.3 Curva de calibração para soluções aquosas de naftaleno, na gama de concentrações entre 1 e 15 mg/dm³, com o bifênil como padrão interno.

III.3 Consumo de naftaleno em culturas bifásicas com PDMS

Se bem que nas condições de incubação utilizadas, exista uma perda elevada de naftaleno por volatilização, os resultados obtidos comprovam o consumo de naftaleno e permitem concluir que o crescimento celular ocorreu à custa deste substrato, que actuou como única fonte de carbono e energia (Tabela III.1).

Nos ensaios realizados, a volatilização foi responsável pelo desaparecimento de, aproximadamente, 40% do naftaleno em solução. Este resultado está de acordo com o facto de a volatilização concorrer, de uma forma essencial, para o decaimento do naftaleno nos solos.

Tabela III.1 Doseamento do naftaleno, em culturas bifásicas com PDMS, após 48h de incubação.

Amostras	Conc. naftaleno (g/dm ³)
Controle abiótico	0.57
Amostras inoculadas	0.03 ± 0.03

III.4 Evolução da concentração aquosa de naftaleno e da biomassa em culturas com substrato sólido

O crescimento celular em meio MM, com naftaleno sólido, revelou-se exponencial durante as primeiras horas de incubação [Figuras III.4 (A, B) e III.7 (A,B)], transitando posteriormente para um crescimento linear no tempo [Figuras III.4 (A) e III.7 (B)]. Tal como previsto pelo modelo de crescimento em substratos sólidos, previamente descrito [33], coincidiram no tempo a transição para um crescimento linear e a diminuição da concentração aquosa de naftaleno a um valor próximo de zero [Figura III.4 (A, B, D)]. Os resultados referidos não permitem obter os valores das taxas de consumo e de dissolução do substrato, mas indicam que o aumento da biomassa foi exponencial enquanto a taxa de consumo do substrato se manteve inferior à taxa de transferência máxima do naftaleno para a fase aquosa.

A avaliação da biomassa bacteriana por doseamento da proteína solúvel [Figura III.4 (C)], correlacionou com o crescimento exponencial inicial, traduzido no perfil de absorvância a 590 nm. Esta técnica é um indicador da quantidade de biomassa de um sistema, apesar da proteína celular poder variar consoante a fase de crescimento das células. As ligeiras diferenças no perfil das curvas de crescimento, obtidas pelos dois métodos independentes, podem ser justificadas nesta base.

A evolução dos compostos aromáticos no meio de cultura, pode ainda ser inferida pela sua absorção no U.V.-Vis. Verificou-se assim (Figura III.5), que a absorção dos sobrenadantes a 225 nm diminuiu com o tempo de incubação. A presença de bandas intensas ($\epsilon \approx 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$) na gama de comprimentos de onda entre 200 e 300 nm, é característica dos compostos aromáticos, pelo que os resultados sugerem que a concentração total deste tipo de compostos, em fase aquosa, diminuiu ao longo da fermentação. Ou seja, a evolução registada nos espectros de absorção, é consentânea com o facto de a aromaticidade inicial do naftaleno ser destruída no processo de degradação.

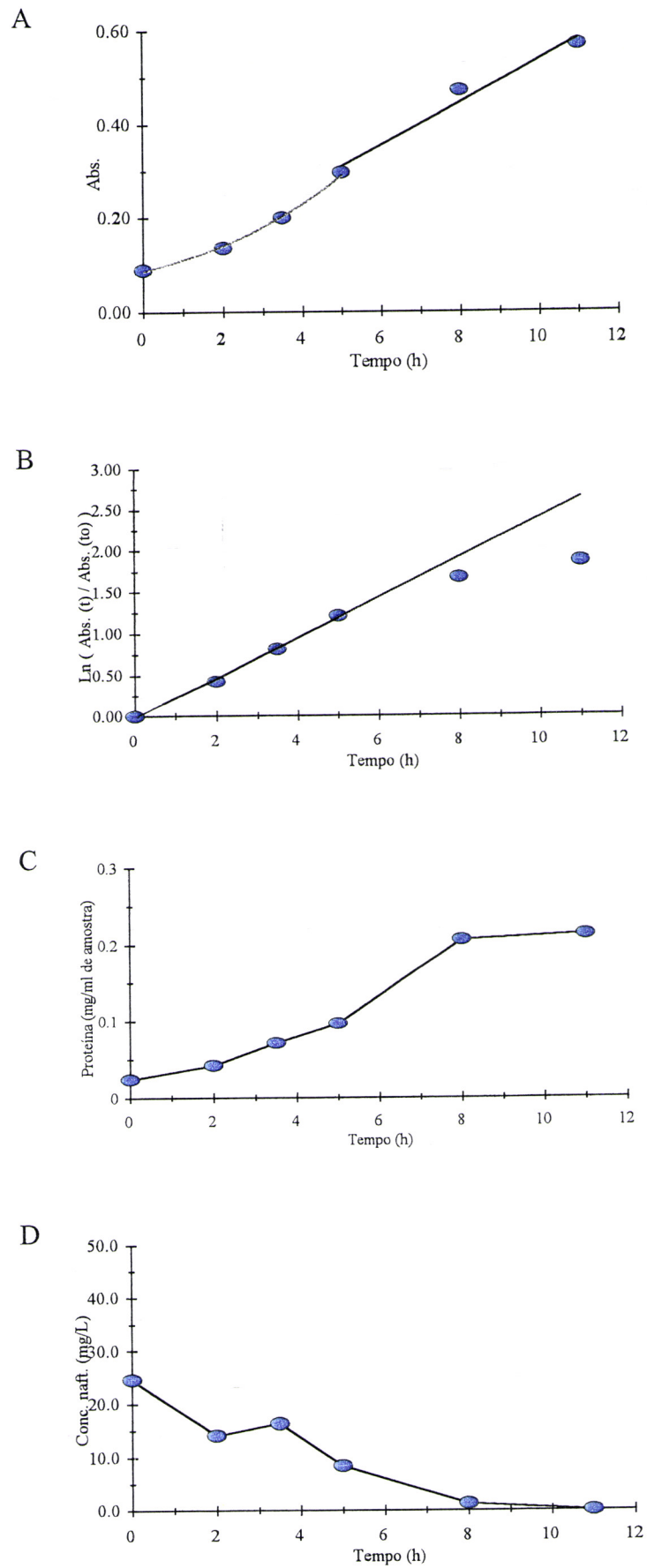


Figura III.4 Evolução da biomassa (A-C) e da concentração aquosa de naftaleno (D) em culturas com substrato sólido.

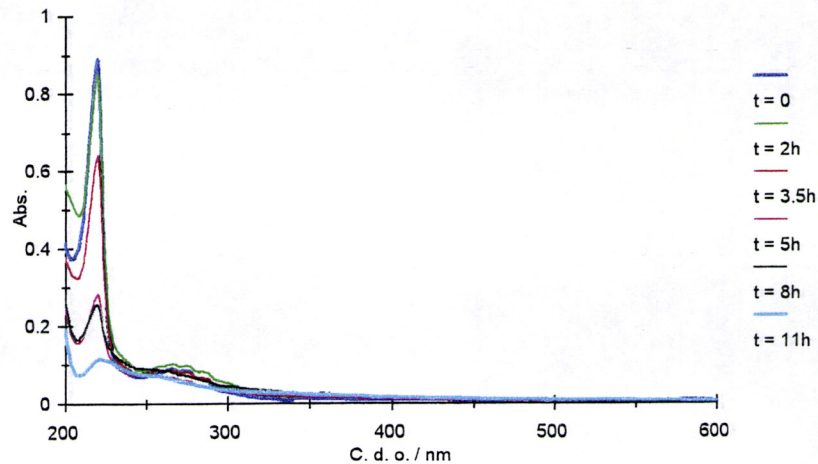


Figura III.5 Evolução da absorção no U.V.-Vis dos sobrenadantes (diluídos a 1:10) de meios de cultura.

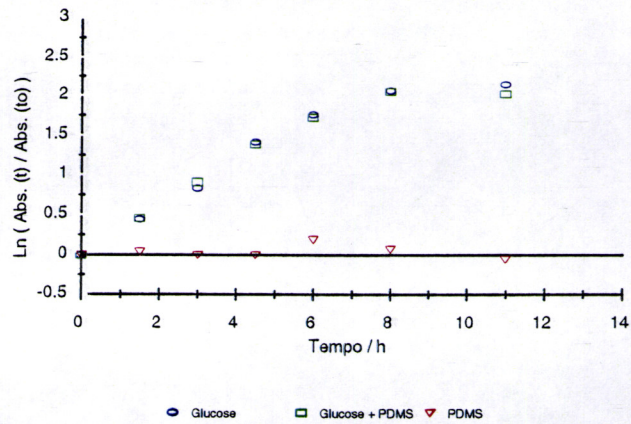
III.5 Estudo da biodegradabilidade e da biocompatibilidade do PDMS e tensoactivos

A biocompatibilidade do PDMS e tensoactivos foi estudada com um substrato solúvel em fase aquosa, para o qual não deve ocorrer um incremento na taxa de degradação por adição dos compostos referidos ao meio de cultura. Os possíveis efeitos adversos do PDMS e tensoactivos no crescimento bacteriano, puderam assim ser avaliados nos ensaios realizados em glucose, onde não foram evidentes efeitos tóxicos ou inibitórios, para tempos de incubação entre 11 e 14 h (Figura III.6).

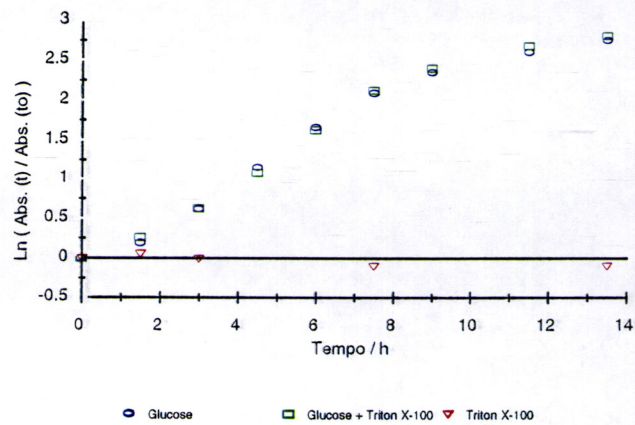
O PDMS e Triton X-100 não demonstraram capacidade para sustentar crescimento celular [Figura III.6 (A, B)], pelo que se inferiu que não foram degradados pela co-cultura.

Observou-se no entanto aumento da biomassa em meio MM, com Tween 80 como única fonte de carbono e energia [Figura III.6 (C)]. Os resultados com inóculos crescidos em glucose, indicam que a co-cultura consumiu inicialmente o substrato residual adicionado com o inóculo. O consumo de Tween 80 requereu aparentemente uma fase de adaptação prévia, e parece ter-se iniciado apenas quando o substrato alternativo se esgotou. A quantidade de substrato adicionado durante a inoculação é mínima para

A



B



C

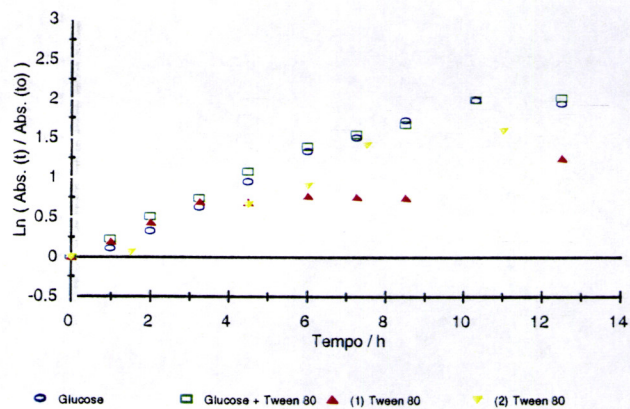


Figura III.6 Ensaio de biodegradabilidade e biocompatibilidade do PDMS (A), Triton X-100 (B) e Tween 80 (C). Os substratos adicionados ao meio MM indicam-se, na legenda das figuras, para cada conjunto de ensaios. Os ensaios de biodegradabilidade do Tween 80, foram realizados com inóculos crescidos em glucose (1) e naftaleno (2).

inóculos crescidos em naftaleno sólido, mas os resultados evidenciam igualmente que ocorreu um período de adaptação ao novo substrato. Não se pode, no entanto, inferir sobre a preferência de qualquer um dos substratos, mas apenas que os compostos

mencionados são eventualmente degradados por vias metabólicas distintas, verificando-se inicialmente a degradação permitida pelos sistemas enzimáticos expressos nas células.

Como se referiu, os PDMS possuem boa solubilidade para gases, nomeadamente para o oxigénio: a 25°C, os valores médios das solubilidades do ar e N₂ são de 0.19 e 0.17 ml/g de PDMS [51], o que contrasta com os valores tabelados para a água, a 20°C, de 0.03 e 0.016 ml /g de H₂O, para o O₂ e N₂, respectivamente [66]. A limitação por oxigénio é frequente em culturas descontínuas, onde origina perfis de crescimento semelhantes aos descritos para substratos sólidos: em ambos os casos, ocorre limitação por difusão de um nutriente com baixa solubilidade aquosa.

Pelos motivos referidos, as culturas com glucose, na presença de PDMS, possuem em princípio uma transferência de oxigénio mais eficiente. Contudo, os ensaios realizados para este substrato não revelaram limitação pelo oxigénio e, em acordo com este facto, as curvas de crescimento com e sem PDMS, foram semelhantes [Figura III.6 (A)].

III.6 Efeito da biodisponibilidade do naftaleno no crescimento celular

Para investigar se a biodisponibilidade do naftaleno é o factor que limita o crescimento microbiano, estudaram-se sistemas com partículas de diferente área superficial, aos quais correspondem igualmente taxas máximas de dissolução do naftaleno diferentes.

Os perfis das curvas de crescimento obtidas (Figura III.7), comportaram-se de acordo com o previsto pelo modelo de crescimento em substrato sólidos [33]. Como se referiu, a taxa máxima de dissolução de sólidos (r_{diss}^{max}), influencia a extensão da fase exponencial de crescimento em culturas com este tipo de substratos, e também o valor constante da taxa de produção de biomassa, durante a fase linear de crescimento.

A taxa específica de crescimento, determinada com base na fase exponencial dos ensaios com partículas pequenas e uma partícula grande [Figura III.7 (B)], foram de 0.20 ± 0.02 e $0.20 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Os valores calculados podem, contudo, não corresponder à taxa específica máxima, como se referiu na secção I.5.1. As duas taxas de produção de biomassa calculadas [Figura III.7 (A)], diferem em cerca de 30%, registando-se um valor superior no sistema com partículas pequenas, em acordo com as equações (8) e (9).

Os ensaios de crescimento com partículas sólidas foram repetidos em diversas experiências independentes. De um modo geral, obteve-se uma concordância razoável para as taxas específicas de crescimento, calculadas em baixas concentrações celulares; a reprodutibilidade nos valores das taxas de produção de biomassa, calculados em concentrações celulares superiores, foi compreensivelmente menor, uma vez que a área específica do sólido é uma variável com elevado erro associado.

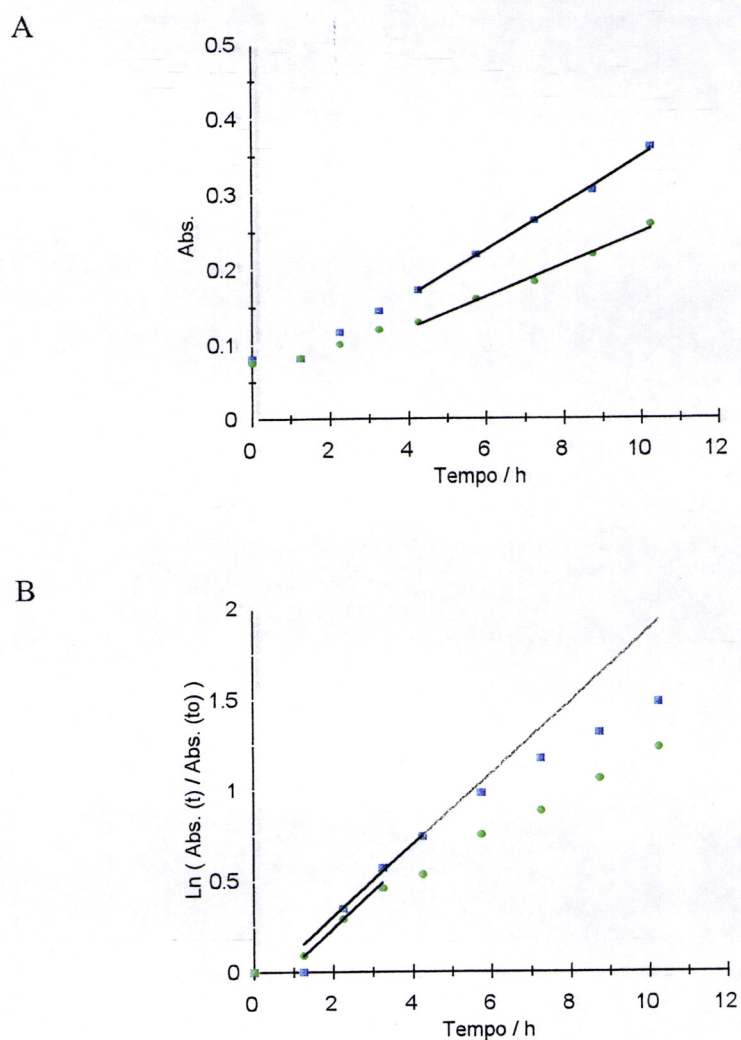


Figura III.7 Crescimento da co-cultura com naftaleno sólido, subdividido em partículas pequenas (■) ou fornecido como partícula única (●).

Deste modo, consideramos que os factores de erro que maior influência têm nos resultados obtidos, estão relacionados com a quantidade de substacto sólido adicionado e com o respectivo grau de partição. Verificou-se que o erro máximo associado à pesagem do sólido foi de ± 0.05 g, o que é um valor considerável. Por outro lado, o tamanho e porosidade das partículas sólidas são parâmetros de difícil reprodução. Observou-se no entanto que as medidas de biomassa, efectuadas para um conjunto de replicados, apresentaram sempre um desvio inferior a 10% em relação à média do conjunto.

De um modo geral, a natureza dos substratos determina taxas de utilização do oxigénio mais elevadas para hidrocarbonetos do que outros substratos de mais fácil utilização, como são os açúcares simples: valores referidos na literatura, para o naftaleno, situam-se na gama 2.6-4.5 mmol O₂.g cel⁻¹.h⁻¹ [39]. Estes valores sugerem que, em culturas descontínuas com naftaleno sólido, pode ocorrer igualmente limitação pelo oxigénio.

O facto de as curvas de crescimento se mostrarem sensíveis à área superficial do sólido, permitiu concluir que a limitação observada foi realmente devida ao substrato, pois a transferência de oxigénio nos dois sistemas era idêntica (não seria o caso, se o parâmetro variado fosse a velocidade de agitação). É pois evidente que, nos sistemas estudados, a limitação pelo substrato ocorreu para concentrações de biomassa mais baixas do que as correspondentes à limitação por oxigénio, e deve prevalecer.

III.7 Efeito da adição de tensioactivos no crescimento celular em naftaleno

Em nenhum dos ensaios realizados com tensioactivos, se observou a solubilização total do naftaleno, pelo que o modelo trifásico de Volkering e al [42], descrito na secção I.5.2, deve ser aplicável aos resultados obtidos.

Ao contrário do previsto no modelo de crescimento, as curvas obtidas sem tensioactivo, e na presença de diferentes concentrações dos tensioactivos, não diferem significativamente, e as variações registadas encontram-se dentro do erro experimental associado ao método (Figura III.8). Mesmo para o Tween 80, que é metabolizado pela co-cultura [Figura III.6(C)], as curvas de crescimento com e sem tensioactivo não diferem apreciavelmente.

Concluiu-se que o possível efeito da adição de tensoactivos é demasiado subtil para ser avaliado experimentalmente unicamente por meio de leituras de absorvância, e não tem efeito prático sobre a biodisponibilidade do naftaleno na cultura microbiana estudada. Este é um resultado inesperado, pois a acção de tensoactivos em culturas com PAHs sólidos, é mais frequentemente descrito como sendo fortemente inibidor ou apreciavelmente benéfico para o crescimento microbiano [58].

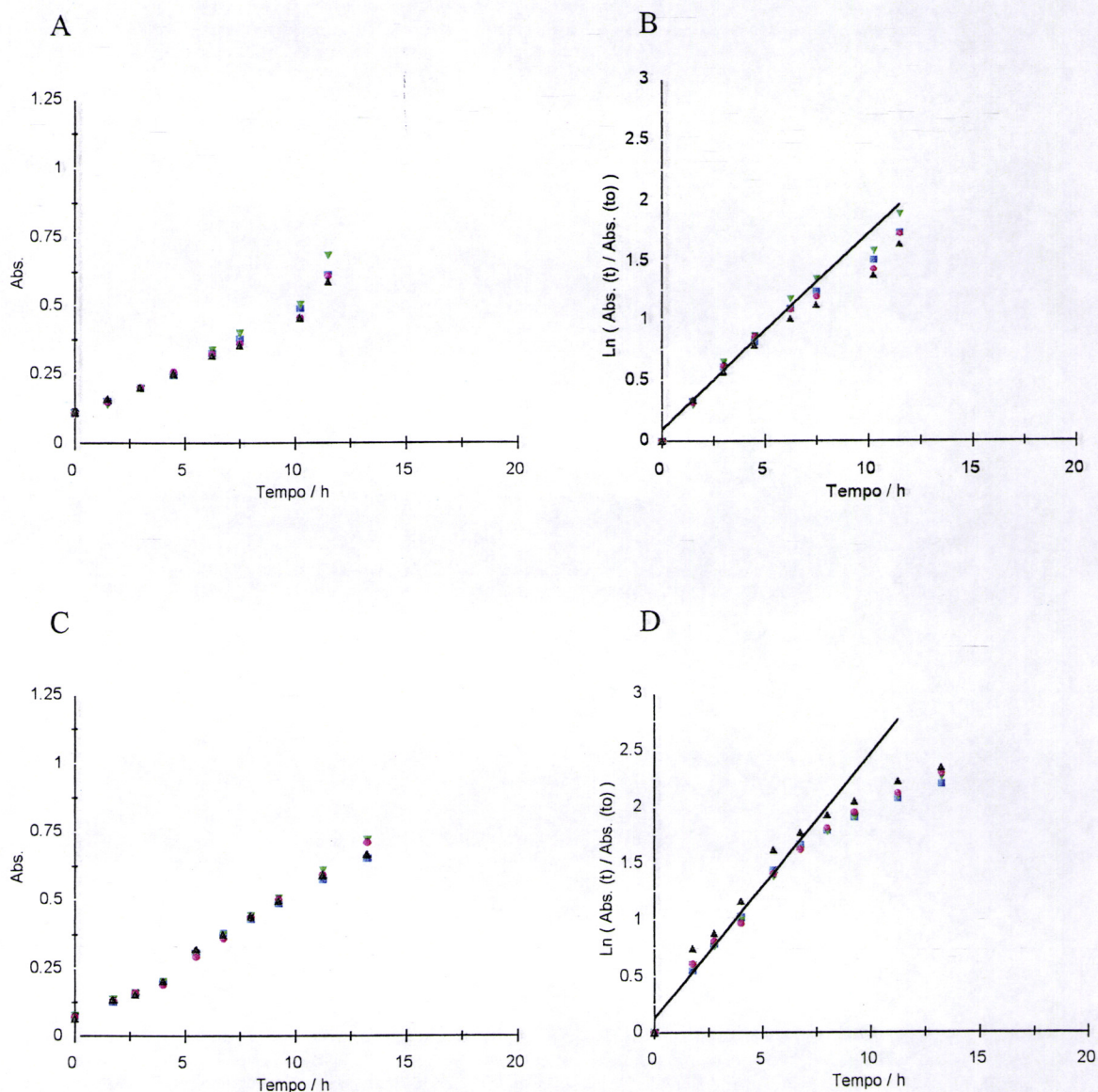


Figura III.8 Curvas de crescimento da co-cultura com naftaleno sólido, na presença dos tensoactivos Triton X-100 (A, B) e Tween 80 (C, D). Os ensaios foram realizados sem tensoactivo (■), com os tensoactivos em concentrações correspondentes às respectivas CMC (▼), e em concentrações 10 (●) e 100 (▲) vezes superiores às CMC.

A ausência de um efeito detectável dos tensoactivos testados, pode ter sido mascarada pela eventual produção de biotensoactivos por parte da co-cultura. De facto, em culturas com fenantreno, observou-se que o crescimento celular foi sempre precedido pela produção intensa de espuma no meio de cultura, o que em si não permite concluir se o substrato fornecido induz realmente a formação deste tipo de compostos. Deve ainda acrescentar-se que em culturas com naftaleno, não se observou nunca uma emulsificação semelhante. Contudo, a aptidão para produzir biotensoactivos, pode estar na origem da aparente ausência de efeito dos tensoactivos adicionados ao meio de cultura.

III.8 Efeito da presença de uma fase orgânica no crescimento celular em naftaleno

Nos ensaios com PDMS, utilizaram-se concentrações de naftaleno muito próximas do limite de solubilidade neste solvente. Este procedimento pretendeu otimizar o quociente $\frac{C_{org,t}}{m_{org}}$ (eq. 19), do qual depende a taxa de transferência máxima do naftaleno para a fase aquosa (r_{org}^{max}). Para substratos tóxicos em altas concentrações, nem sempre este é o procedimento mais adequado, pois os tempos de lactência das culturas são diminuídos se a concentração aquosa destes compostos for mantida em valores baixos.

Para inóculos não adaptados a elevadas concentrações de naftaleno, verificou-se que a presença da fase orgânica, com a referida concentração em naftaleno, originava fases de lactência consideravelmente mais curtas que as observadas para sistemas com substrato sólido (resultados não apresentados).

Nas condições experimentais em que os ensaios foram realizados, a presença de uma fase hidrofóbica que solubilizou o naftaleno, revelou possuir um efeito benéfico na degradação deste substrato. O período de crescimento exponencial foi mais prolongado, sendo sucedido por uma fase com taxa de crescimento específica variável que se manteve, durante um intervalo de tempo considerável, próxima da taxa de crescimento específica inicial (Figura III.9).

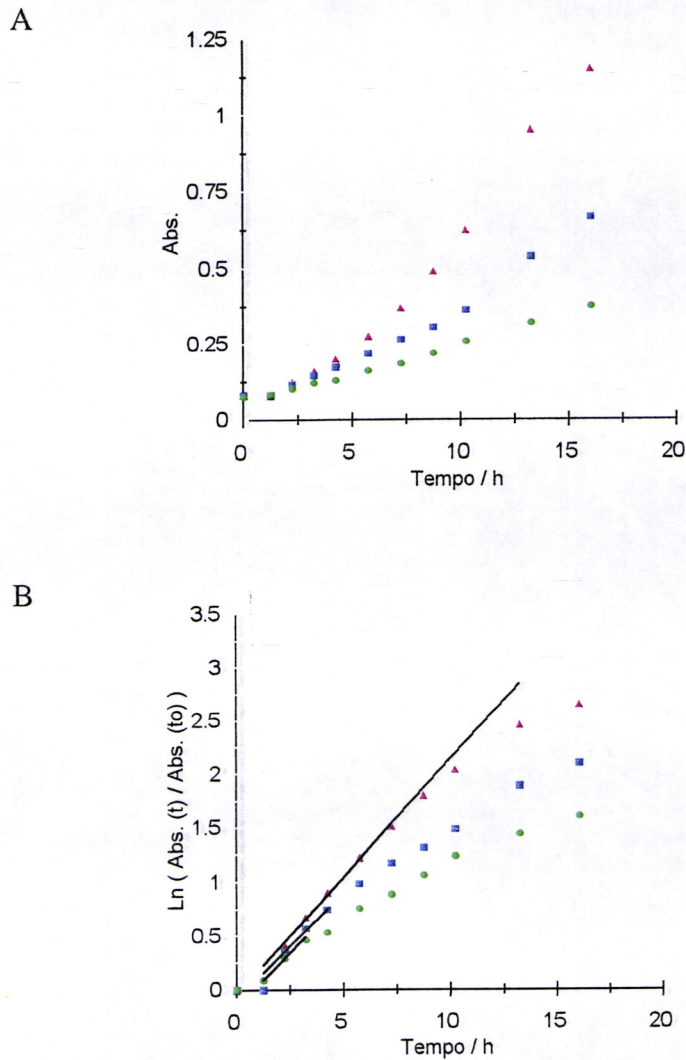


Figura III.9 Crescimento da co-cultura com naftaleno dissolvido em PDMS (▲), e naftaleno sólido, subdividido em partículas pequenas (■) ou fornecido como partícula única (●).

A taxa específica de crescimento inicial, calculada com os dados relativos ao sistema com PDMS, foi de $0.22 \pm 0.01 \text{ h}^{-1}$, que é um valor concordante com o obtido nos sistemas com substrato sólido.

Como se afirmou, os sistemas com partículas sólidas podem ser duplamente limitados (pelo substrato e oxigénio), mas nas condições experimentais adoptadas deve prevalecer a limitação pelo substrato. A presença da fase orgânica permite, contudo, uma transferência facilitada para ambos os nutrientes. A concordância dos valores de taxa específica de crescimento, obtidas para sistemas com PDMS e partículas sólidas, indica que as culturas com PDMS são ainda limitadas pelo substrato. Contudo, os dados

disponíveis não são conclusivos a este respeito, pois não se determinou a evolução das concentrações aquosas dos dois substratos catabólicos ao longo da fermentação.

Estudou-se ainda a partição da biomassa em culturas bifásicas, nas condições utilizadas na incubação. Observou-se que a adição de PDMS não originou um decréscimo da correspondente absorvância na fase aquosa, podendo-se concluir que, no meio de crescimento celular, a biomassa se distribuiu preferencialmente na fase aquosa. Na medida em que as determinações experimentais da quantidade de biomassa foram realizadas apenas para esta fase, é lícito concluir que foram, ainda assim, representativas da quantidade de biomassa total do sistema.

O ensaio descrito não permite concluir acerca da hidrofobicidade das superfícies celulares, pois não se seguiram os procedimentos usuais, que envolvem, nomeadamente, a lavagem e ressuspensão das células [59]. A presença de metabolitos celulares, nomeadamente de agentes tensioactivos, impede a aderência das células a superfícies hidrofóbicas, e interfere com o resultado dos testes de hidrofobicidade.

IV. Conclusão

Neste trabalho isolou-se uma co-cultura com capacidade para degradar vários PAHs, e que foi utilizada para identificar estratégias que permitam incrementar a biodegradação de PAHs em meios de cultura líquidos. Após se ter verificado que a biodisponibilidade dos compostos é o factor que limita a respectiva degradação, avaliou-se então o efeito de tensioactivos e de um solvente hidrofóbico no crescimento celular.

Para a cultura microbiana estudada, observou-se que a adição de tensioactivos não é uma solução com interesse prático. Os resultados obtidos carecem no entanto de dados para a sua interpretação, nomeadamente no que diz respeito à variação da tensão superficial ao longo de fermentações com substrato sólido. A natureza das interações dos microrganismos com substratos pouco solúveis e dos quais dependem, e a respectiva resposta à presença de tensioactivos no meio de cultura, são muito variáveis e impossibilitam qualquer generalização.

As culturas bifásicas com 20% de PDMS, quando comparadas com culturas com substrato sólido, permitiram obter maiores crescimentos celulares, em virtude de as taxas específicas de crescimento se manterem superiores durante uma fracção de tempo significativa, face ao tempo total de incubação. No entanto, os valores máximos de taxa específica de crescimento observados nos dois sistemas não diferiram apreciavelmente. Estes resultados foram interpretados como consequência da transferência facilitada de substrato, na presença de PDMS.

Os maiores crescimentos celulares observados nos sistemas com solvente hidrofóbico, permite pressupor interesse no uso de sistemas análogos em aplicações biotecnológicas de tratamento deste tipo de poluentes. Os resultados obtidos sugerem que o desenvolvimento de processos contínuos com recirculação de fases orgânicas facilmente separáveis, podem conduzir a processos tecnológicos de bioremediação com elevado interesse prático.

V. Bibliografia

1. Carl E. Cerniglia, 1993. "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Current Opinion in Biotechnology*, 4:331-338.
2. Carl E. Cerniglia, 1992. "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Biodegrad.*, 3:351-368.
3. Jan Sikkema, Jan de Bont, Bert Poolman, 1995. "Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons", *Microbiol. Rev.*, 59:201-222.
4. Walter Weissenfels, Hans-Jürgen Klewer, Joseph Langhoff, 1992. "Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36:689-696.
5. Mei-Ming Hsieh, John Dorsey, 1995. "Bioavailability estimation by reversed-phase liquid chromatography: high bonding density C-18 Phases for modeling biopartitioning processes", *Anal. Chem.*, 67:48-57.
6. William F. Guerin, Stephen Boyd, 1992. "Differential bioavailability of soil-sorbed naphthalene to two bacterial species", *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:1142-1152.
7. Carl E. Cerniglia, 1984. "Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Adv. Appl. Microbiol.*, 30:31-71.
8. E. A. Stroeve, 1982. "Biochemistry", Cap. 32, Mir Publishers, Moscovo.
9. Jim A. Field, Ed de Jong, Gumersindo F. Costa, Jan A. M. de Bont, 1992. "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi", *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:2219-2226.
10. John A. Bumpus, 1989. "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:154-158.
11. "Handbook of Chemistry and Physics", 1980. Ed. Robert Weast, Melvin Astle, 61^a ed., CRC Press.
12. Lea Bezalel, Yitzhak Hadar, Peter Fu, James Freeman, Carl Cerniglia, 1996. "Metabolism of phenanthrene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*", *Appl. Environ. Microbiol.*, 36:2547-2553.
13. Ensley, Gibson, 1983. "Naphthalene dioxygenase: purification and properties of a terminal oxygenase system", *J. Bacteriol.*, 155:505-511.
14. Dua, Meera, 1981. *Eur. J. Biochem.*, 120:461.

15. Patel, Gibson, 1974. "Purification and properties of cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas putida*", J. Bacteriol., 119:879-888.
16. N. W. Dunn, I. C. Gunsalus, 1973. J. Bacteriol., 114:974-979.
17. A. M. Chakrabarty, 1972. J. Bacteriol., 112:815-823.
18. Fu-Min Menn, Bruce Applegate, Gary Saylor, 1993. "NAH plasmid-mediated catabolism of anthracene and phenanthrene to naphthoic acids", Appl. Environ. Microbiol., 59:1938-1942.
19. H. Kiyohara, K. Nagao, 1978. "The catabolism of phenanthrene and naphthalene by bacteria", J. Gen. Microbiol., 105:69-75.
20. C. Allen, D. Boyd, M. Larkin, Karen Reid, N. Sharma, K. Wilson, 1997. "Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene and indole by a *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038", Appl. Environ. Microbiol., 63:151-155.
21. Thomas Brock, Michael Madigan, 1988. "Biology of Microorganisms", 5th, Prentice Hall.
22. Edward Bouwer, Alexander Zehnder, 1993. "Bioremediation of organic compounds - putting microbial metabolism to work", Tibtech., 11(8):360-367.
23. Alexander Glazer, Hiroshi Nikaido, 1988. "Microbial Biotechnology", W.H. Freeman and Company.
24. Anne Bogardt, Barbara Hemmingsen, 1992. "Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites", Appl. Environ. Microbiol., 58:2579-2582.
25. Hohzoh Kiyohara, Kazutaka Nagao, Keiji Yana, 1982. "Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates", Appl. Environ. Microbiol., 43:454-457.
26. Allison Geiselbrecht, Russel Herwig, Jody Deming, J. T. Staley, 1996. "Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from puget sound sediments", Appl. Environ. Microbiol., 62:3344-3349.
27. I. Wiesel, S. M. Wübker, H. J. Rehm, 1993. "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by an immobilized mixed bacterial culture", Appl. Microbiol. Biotechnol., 39:110-116.
28. Viggo Lindahl, 1996. "Improved soil dispersion procedures for total bacterial counts, extraction of indigenous bacteria and cell survival", J. Microbiol. Meth., 25:279-286.

29. John Dunbar, Diana Wong, Michael Yarus, Larry Forney, 1996. "Autoradiographic method for isolation of diverse microbial species with unique catabolic traits", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:4180-4185.
30. D. K. Banerjee, P. M. Fedorak, A. Hashimoto, J. H. Masliyah, M. A. Pickard, M. R. Gray, 1995. "Monitoring the biological treatment of anthracene-contaminated soil in a rotating-drum bioreactor", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43:521-528.
31. C. P. Leslie Grady, 1984. "Biodegradation: its measurement and microbiological basis", *Biotechnol. Bioeng.*, 27:660-674.
32. William Stringfellow, Michael Aitken, 1995. "Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes and fluorene by phenanthrene-degrading Pseudomonads", *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:357-362.
33. F. Volkering, A. M. Breure, A. Sterkenburg, J. G. van Andel, 1992. "Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36:548-552.
34. D. Dean-Ross, C. E. Cerniglia, 1996. "Degradation of pyrene by a *Mycobacterium flavescens*", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46:307-312.
35. Beate Boldrin, Andreas Thiehm, Christian Fritzsche, 1993. "Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene and pyrene by a *Mycobacterium* sp..", *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(6):1927-1930.
36. Walter Weissenfels, Michael Beyer, Jürgen Klein, 1990. "Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene by pure bacterial cultures", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32:479-484.
37. Eduardo Filipe, 1996. "Quando as moléculas se auto-organizam: micelas e outras estruturas supramoleculares", *Colóquio/Ciências.*, ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 18:25-38.
38. Shonali Laha, Richard Luthy, 1992. "Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water systems", *Biotechnol. Bioeng.*, 40:1367-1380.
39. David Edwards, Richard Luthy, Zhongbao Liu, 1991. "Solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbons in micellar nonionic surfactant solutions", *Environ. Sci. Technol.*, 25:127-133.
40. James Pankow, 1991. "Aquatic Chemistry Concepts", Cap. 15., Lewis Publishers, U. S. A..

41. S. Grimberg, J. Nagel, M. Aitken, 1995. "Kinetics of phenanthrene dissolution into water in the presence of nonionic surfactants", *Environ. Sci. Technol.*, 29:1480-1487.
42. Frank Volkering, Anton Breure, Johan Andel, Wim Rulkens, 1995. "Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons", *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:1699-1705.
43. John Woodley, Malcolm Lilly, 1992. "Process engineering of two-liquid phase biocatalysis", in "Biocatalysis in Non-Conventional Media", ed. J. Tramper, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 147-154.
44. Koei Kawakami, Takehiko Nakahara, 1993. "Importance of solute partitioning in biphasic oxidation of benzyl alcohol by free and immobilized whole cells of *Pichia pastoris*", *Biotechnol. Bioeng.*, 43:918-924.
45. Miguel Ascon-Cabrera, Jean-Michel Lebeault, 1993. "Selection of xenobiotic-degrading microorganisms in a biphasic aqueous-organic system", *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:1717-1724.
46. P. Fernandes, H. M. Pinheiro, 1996. "Biocatálise em solventes orgânicos utilizando células inteiras", *Boletim de Biotecnologia*, 55:25-32.
47. Hermann Heipieper, Frans Weber, Jan Sikkema, Heribert Keweloh, Jan de Bont, 1994. "Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents", *Tibtech.*, 12:409-415.
48. Rebecca Efrogmson, Martin Alexander, 1991. "Biodegradation by na *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into na organic solvent", *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:1441-1447.
49. Ilia Jimenez, Richard Bartha, 1996. "Solvent-augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium* sp.", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:2311-2316.
50. Kurt Kosswig, 1994. "Surfactants", in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, ed. Barbara Elvers, Stephen Hawkins, William Kussey, Vol. A25, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
51. Hans-Heinrich Moretto, Manfred Schulze, Gebhard Wagner, 1994. "Silicones", in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, ed. Barbara Elvers, Stephen Hawkins, William Kussey, Vol. A24, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
52. Miguel Ascon-Cabrera, Jean-Michel Lebeault, 1995. "Cell hydrophobicity influencing the activity/stability of xenobiotic-degrading microorganisms in a continuous biphasic aqueous-organic system", *J. Ferment. Technol.*, 80:270-275.

53. R. Wodzinski, D. Bertolini, 1972. "Physical state in which naphthalene and bibenzyl are utilized by bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, 23:1077-1081.
54. R. Wodzinski, D. Bertolini, 1974. "Physical state of phenanthrene for utilization by bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, 27:1081-1084.
55. J. Michele Thomas, Jerry Yordy, Jose Amador, Martin Alexander, 1986. "Rates of dissolution and biodegradation of water-insoluble organic compounds", *Appl. Environ. Microbiol.*, 52:290-296.
56. William Stringfellow, Michael Aitken, 1994. "Comparative physiology of phenanthrene degradation by two dissimilar pseudomonads isolated from a creosote-contaminated soil", *Can. J. Microbiol.*, 40:432-438.
57. William Guerin, Stephen Boyd, 1997. "Bioavailability of naphthalene associated with natural and synthetic sorbents", *Water Res.*, 31:1504-1512.
58. Zhongbao Liu, Annette Jacobson, Richard Luthy, 1995. "Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant systems", *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:145-151.
59. Stephen Grimberg, William Stringfellow, Michael Aitken, 1996. "Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant", *Appl. Environ. Microbiol.*, 62:2387-2392.
60. Saumyen Guha, Peter Jaffé, 1996. "Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants", *Environ. Sci. Technol.*, 30(2):605-611.
61. Mel Rosenberg, 1984. "Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity", *FEMS Microbiol. Lett.*, 22:289-295.
62. Richard Wodzinski, David Larocca, 1977. "Bacterial growth kinetics on diphenylmethane and naphthalene-heptamethylnonane mixtures", *Appl. Environ. Microbiol.*, 33:660-665.
63. W. Vishniac, M. Santer, 1995. "The Thiobacilli", *Bacteriol. Rev.*, 21:95-113.
64. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, 1951. "Protein measurement with the Folin phenol reagent", *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
65. J. K. Haken, 1977. "Polysiloxane stationary phases in gas chromatography", *J. Chromat.*, 141:247-288.
66. "The Merck Index", 1989. Ed. Susan budavari, 11^a ed., Merck & Co.