



## XII-095 - UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH) PARA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO ANAERÓBIO DE CULTURAS MICROBIANAS EM MEIO CONTENDO BTEX

**Ednaldo Gomes da Silva<sup>(1)</sup>**

Biólogo Licenciado pelo Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Mestre em Genética/Biologia Molecular pelo Departamento de Genética da UFPE. Doutorando em Engenharia Civil/Tecnologia Ambiental pelo Centro de Tecnologia e Geociências da UFPE.

**Sávia Gavazza dos Santos**

Engenheira Civil pela Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Doutora em Engenharia Civil, Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo (USP) /Escola de Engenharia de São Carlos (EESC). Professora do Departamento de Engenharia Ambiental (LEA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), campus Caruaru.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Av. Acadêmico Hélio Ramos, s/n Cidade Universitária - Recife - Pernambuco - CEP: 50740-530 - Brasil - Tel: +55 (81) 2126-8229 - Fax: +55 (81) 2126-8229 - e-mail: [ednaldo\\_gomes@yahoo.com.br](mailto:ednaldo_gomes@yahoo.com.br).

### RESUMO

Nas últimas décadas, vários microrganismos têm sido citados como capazes de sobreviver em ambientes contaminados por compostos recalcitrantes como os monoaromáticos BTEX em condições anaeróbias. A fim de verificar a capacidade de adaptação da biomassa microbiana obtida a partir do lodo proveniente do efluente de reator UASB de abatedouro de aves, foi realizado o procedimento de purificação das culturas, que cresceram em meio contendo inicialmente 460 mg/L de etanol e 10mg/L de BTEX, quando separados, e 5mg/L quando em associação. As constantes cinéticas obtidas para as culturas crescidas em BTEX separados e no mix foram de, respectivamente, 27,82; 45,84; 54,17; 51,82 e 23,54, sugerindo que tanto benzeno quanto tolueno e xileno (quando juntos) interferiram no processo de biodegradação. A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) revelou a presença de microrganismos pertencentes aos domínios Eubactéria e Arquea, sendo a maioria das eubactérias identificadas como pertencentes à classe  $\alpha$ -proteobactéria.

**PALAVRAS-CHAVE:** FISH, BTEX, RNAr,  $\alpha$ -proteobactéria, digestão anaeróbia

### INTRODUÇÃO

Os monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) são frequentemente encontrados em produtos derivados do petróleo, tais como óleo cru, gasolina, óleo diesel e lubrificantes (Nardi, et al., 2005). Sua presença no ambiente pode se dar por vazamento de tanques de armazenamento de postos de gasolina, cuja constituição, no Brasil, apresenta aproximadamente um quarto de etanol, aumentando a solubilidade desses compostos nas águas subterrâneas (Corseuil et al., 2004). Vários efeitos são associados à exposição aos BTEX, dentre eles a sua comprovada carcinogenicidade (Reutman et al., 2002; Alexopoulos et al., 2006).

Nas últimas décadas, vários microrganismos têm sido relatados como capazes de degradar compostos aromáticos em condições anaeróbias (Chakraborty e Coates, 2004) e metanogênicas (Reinhard et al., 2005). Uma das ferramentas utilizadas para identificação das populações microbianas envolvidas nos processos de biodegradação tem sido a análise de seqüências de RNA ribossomal (RNAr), em substituição às técnicas tradicionais de cultivo (Amann et al., 2001).

O RNA ribossomal (RNAr) é um importante componente estrutural dos ribossomos. Nos organismos procarióticos são encontrados três tipos de RNAr, classificados segundo o coeficiente de sedimentação em 5S, 16S e 23S. O RNAr 16S, juntamente com 21 proteínas ribossomais, constitui a subunidade menor dos ribossomos procariotos (Moter e Göbel, 2000). Por ser abundante nas células, aparentemente não apresentar transferência lateral de genes, ter tamanho pequeno (1500 a 3000 nucleotídeos), possuir elevado grau de conservação em mais de uma região e a disponibilidade de bancos de dados que possibilitam a análise comparativa de seqüências, o RNAr 16S vem sendo amplamente utilizado nos estudos de relações filogenéticas (Amann e Ludwig, 2000).



A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) vem sendo amplamente empregada para esta finalidade, por fazer uso de sondas oligonucleotídicas que ligam-se a regiões específicas do RNAr (Moter e Göbel, 2000).

A seleção de culturas enriquecidas capazes de degradar BTEX é bem descrita na literatura (Evans et al., 1991a; Evans et al., 1991b; Edwards et al., 1992; Harms et al., 1999; Ahad et al., 2000; Wilkes et al., 2000). Contudo, poucos estudos relacionados à degradação compostos BTEX e à avaliação da diversidade microbiana têm sido realizados no Brasil (Silva et al., 2002; Nardi et al., 2005; Gusmão et al., 2006). Neste sentido, este estudo objetivou avaliar o crescimento e a diversidade de populações microbianas em meio anaeróbio contendo BTEX em condições mesofílicas (30°C), por meio da técnica de FISH. Foram visadas as estimativas de quantificação, direcionadas aos Domínios Archaea e Eubacteria e às subdivisões  $\alpha$ -proteobactéria e  $\gamma$ -proteobactéria.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Para obtenção dos resultados, este trabalho realizou-se em duas etapas. A primeira foi a purificação do inóculo em função de sua adaptação aos BTEX como tipo de substrato. Este inóculo foi escolhido por sua aos BTEX como substrato, realizada em estudos anteriores. A segunda foi a utilização da técnica de hibridização propriamente dita, visando as proporções entre os grupos microbianos mediante as condições impostas.

Ambas as etapas são mais detalhadamente expostas a seguir:

### PRIMEIRA ETAPA: INÓCULO E ENSAIOS DE PURIFICAÇÃO

O inóculo escolhido para análise experimental foi obtido do lodo coletado de efluente de reator anaeróbio de fluxo ascendente, instalado em abatedouro de aves do município de Tietê (SP). A escolha desse inóculo foi feita com base nos trabalhos de Hirasawa (2003) e Gusmão (2005), cujos resultados mostraram a capacidade de adaptação dessa biomassa a processos de biodegradação de BTEX. A purificação do inóculo foi feita pelo método das diluições seriadas. O procedimento foi realizado para cada um dos monoaromáticos BTEX em separado e em conjunto.

Inicialmente foram utilizados frascos de antibiótico para um volume final de 10mL, previamente esterilizados em autoclave (30 min) e luz U.V. (30 min), nesta ordem, selados com tampa de teflon e lacre de alumínio, previamente acrescidos de 9mL de substrato sintético previamente descrito (Florencio et al., 1995), solução etanólica (10), e solução com cada monoaromático (B~0,13; T~0,11; E~0,09; X~0,09). O meio foi inoculado com 1mL da amostra do efluente. A maior diluição que apresentou crescimento foi concentrada e transferida após um período de quinze dias para um volume final de 25mL, sendo novamente diluída serialmente. Posteriormente, as culturas que cresceram nas maiores diluições tiveram sua biomassa aumentada para os volumes finais de 50mL e 100mL, respectivamente.

O experimento foi realizado em triplicata para todos os monoaromáticos e em todas as etapas manteve-se sempre constante o headspace (em 50%) e a concentração do substrato sintético. A atividade das populações microbianas foi monitorada, por meio das determinações de consumo de matéria orgânica (DQO), nitrogênio amoniacal e alcalinidades total e parcial. Para tanto, foram coletadas alíquotas a cada 72h durante um período total de 15 dias. Todas as determinações foram realizadas segundo o Standard Methods for the examination of Water and Wastewater (1998).

### SEGUNDA ETAPA: HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE

Para este procedimento, foram utilizadas as sondas oligonucleotídicas específicas para o Domínio Bacteria (EUB338) e suas subdivisões alfa (ALF968) e gama-proteobactéria (GAM42a), bem como para o Domínio Archaea (ARC915), marcadas na extremidade 5' com o fluoróforo Cy3 (Tabela 1).

O protocolo de hibridização foi executado segundo Díaz et al. (2003). As amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% (v/v) por 4h a 4°C. Após a hibridização com as sondas da Tabela 1, os exemplares foram corados com 6 $\mu$ L de DAPI (4'-6-diamidino-fenil-indol; Sigma) a 1 mg/mL por três minutos e acondicionados



a -20°C para posterior análise. As imagens foram documentadas em microscópio Leica® DMRB, com sistema de epifluorescência para os cromóforos específicos.

**Tabela 1: Sondas oligonucleotídicas utilizadas na hibridização (Kobabe et al., 2004).**

Sonda	Grupo	Seqüência (5'-3')	Sítio-alvo (posição em pb)
EUB338	Domínio Bacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S (338-355)
ARC915	Domínio Archaea	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	16S (915-934)
ALF68	Subclasse $\alpha$ -proteobactéria	GGTAAGGTTCTGCGCGTT	16S (968-985)
GAM42a	Subclasse $\gamma$ -proteobactéria	GCCTTCCCACATCGTTT	23S (1027-1043)

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados inerentes à utilização de matéria orgânica (expressos em DQO) estão apresentados na Tabela 2. Este consumo foi representado de acordo com o modelo cinético de ordem zero, que melhor se ajustou aos dados experimentais. O etanol foi utilizado como cossolvente devido ao seu efeito de aumentar a solubilidade dos BTEX em água (Corseuil et al., 2004).

**Tabela 2: Consumo de BTEX e Etanol obtidos a partir do modelo cinético de ordem zero**

Substrato	Conc (mg.L <sup>-1</sup> )	Ethanol <sup>c</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	O <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> ) equivalente <sup>a</sup>	K <sub>0</sub> (mg O <sub>2</sub> .l <sup>-1</sup> . dia <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	R <sup>2</sup>	pH		N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	
						Inicial	Final	Inicial	Final
Benzene	10,00	460,00	1021,54	27,82	0.96192	6,16	6,31	48,16	17,36
Toluene	10,00		1022,61	45,84	0.98783	6,21	6,38	57,12	19,04
Ethylbenzene	10,00		1023,40	54,16	0.95123	6,43	6,28	56,56	20,16
Xylene	10,00		1024,30	51,82	0.96540	6,15	6,18	56,60	14,84
Mix BTEX	5,00		1085,92	23,84	0.97456	6,11	6,33	60,48	25,20

<sup>a</sup>consumo esperado durante a assimilação do substrato

<sup>b</sup>consumo diário (em DQO) observado durante a assimilação do substrato

<sup>c</sup>valor teórico para o cossolvente adicionado às culturas (resultando numa DQO de 960 mg/L, em adição aos valores de DQO dos BTEX)

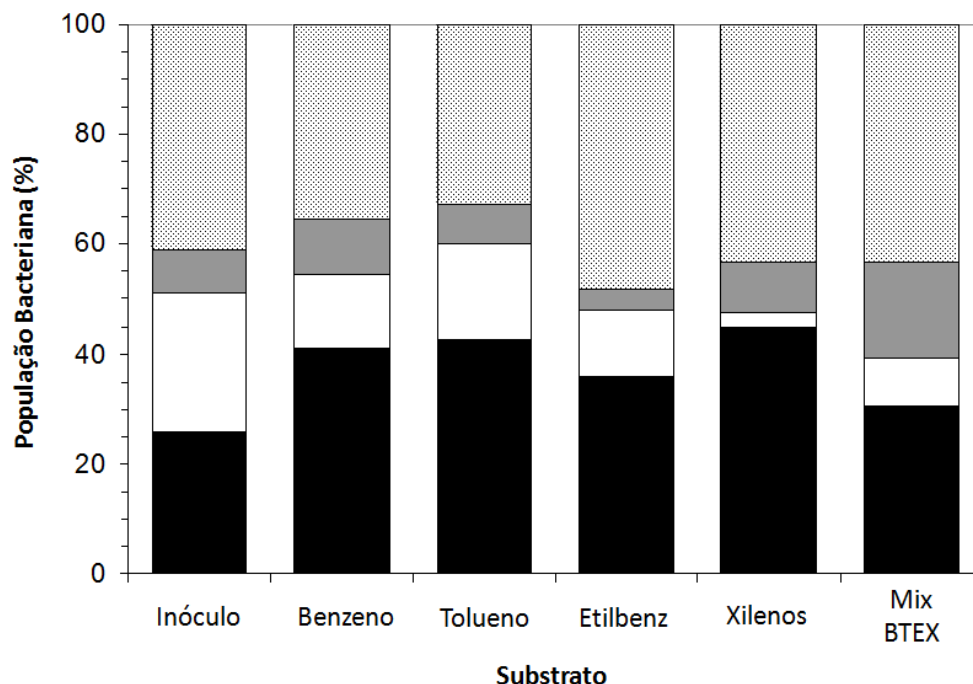
Como o etanol é mais facilmente degradado em relação aos BTEX, os valores de DQO obtidos sugerem que provavelmente o etanol foi a única fonte de carbono utilizada para o crescimento microbiano. Contudo, é importante ressaltar que a presença dos aromáticos exerce influência nesse processo. Levando-se em consideração o papel do etanol como fonte de carbono, o metabolismo metanogênico deve ter sido ativado (Gibson & Harwood 2002). Esta hipótese se apóia na presença de arqueas nas culturas (ver resultados adiante).

Estudos prévios sob condições metanogênicas (Reinhard et al., 2005) mostraram que a remoção completa de tolueno e p-xileno em 25 dias de incubação, ao passo que para a remoção de 50% de benzeno e etilbenzeno foram necessários 75 dias. Períodos de remoção mais curtos (15 dias) foram atingidos apenas quando da presença de aceptores de eletros específicos, tais como perclorato e ferro(III) (Chakraborty et al. 2005). Assim, a via metanogênica deve requerer maiores períodos de exposição para completa mineralização dos BTEX.

Durante o experimento, o pH dos reatores variou entre 6,1 e 6,4 (Tabela 2) e, embora as arqueas mostrem melhor crescimento na faixa de pH entre 6,5 e 8,2, os resultados sugerem a operação satisfatória de reatores anaeróbios em torno de pH 6. Nessas condições, o equilíbrio  $[\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{NH}_3 + \text{H}^+]$  se desloca no sentido do amônio, favorecendo assimilação de nitrogênio e aumento de biomassa (Speece, 1996).

A diversidade microbiana avaliada pela técnica de FISH mostrou um decréscimo em relação ao inóculo e ao tipo de hidrocarboneto exposto (Figura 1). Em média, as arqueas representaram 41% da população (sem mudança significativa em relação ao inóculo), seguidas por 39% de  $\alpha$ -proteobactéria (aumento de 13%), 11%  $\gamma$ -proteobactéria (diminuição de 14%) e 9% de outras classes de proteobactérias (aumento de 2%). Estudos

anteriores que utilizaram a técnica de FISH para degradação de BTEX relatam principalmente a presença de eubactérias, com arqueas e  $\gamma$ -proteobactérias raramente observadas (Rabus et al. 1999).



**Figura 1: Distribuição das  $\alpha$ -proteobactérias (colunas escuras),  $\gamma$ -proteobactérias (colunas brancas), outras eubactérias (colunas cinzas) e arqueas (colunas pontilhadas)**

No presente estudo, a quantidade de arqueas (49%) foi menor que a de eubactérias (69%). Todavia, o grupo de  $\beta$ -proteobactérias, principalmente representadas por bactérias dos gêneros *Azococcus* e *Thauera*, foi maior naquele estudo (Rabus et al., 1999) do que aqui. Representantes das classes beta, delta e épsilon do grupo das proteobactérias foram relatados como participantes na degradação de BTEX (Chakraborty & Coates 2004), embora não pareçam desenvolver papel importante na presente análise.

A maior população foi representada pelo grupo das  $\alpha$ -proteobactérias, o que pode ser atribuído à capacidade de metabolização mais eficiente do etanol em relação às  $\gamma$ -proteobactérias, caiu drasticamente (Figura 1). Em condições de anaerobiose,  $\alpha$ -proteobactérias acetogênicas como *Acetobacter* convertem etanol a acetato, pela presença da família de genes *adh*, que codificam a enzima álcool-desidrogenase (Takemura et al. 1993). Assim, ao ser assimilado como fonte de carbono, o etanol poderia ativar o metabolismo oxidativo das bactérias, de modo a induzir a degradação de BTEX – fenômeno observado em solos contaminados com estes monoaromáticos (Schneider et al. 2005).

A alta incidência de arqueas em todas as culturas sugere a ocorrência de atividade metanogênica (Collins et al. 2003). Este fenômeno ocorre em reatores operando em pH 6-8, onde o acetato é o principal precursor do metano (Akarsubasi et al. 2006), como fora aqui observado. Em condições de anaerobiose, o consórcio metanogênico pode ter se associado às  $\alpha$ -proteobactérias, viabilizando a produção de metano.

A cultura crescida diante de benzeno foi a que apresentou menor degradação, ao passo que as culturas crescidas na presença de tolueno e xilenos mostraram desempenhos próximos (Tabela 2), mesmo com as diferenças populacionais (Figura 1). Levando em consideração os resultados obtidos em relação às taxas de degradação obtidas na presença de benzeno e tolueno/xilenos, pode-se supor que o nitrato deva ser mais importante para a degradação do benzeno (Gusmão et al., 2006). A degradação de todos os BTEX pode ocorrer na presença de ferro(III) (Janh et al. 2005). Por outro lado, Alvarez e Voguel (1991) isolaram linhagens de *Pseudomonas*, uma  $\gamma$ -proteobactéria degradadora de benzeno e p-xilenos. Levando em consideração as condições experimentais e estas informações, pode-se inferir que as  $\gamma$ -proteobactérias são importantes para degradação desses compostos. Recentemente foi relatado (Gusmão, et al., 2007) que sob condições anóxicas, a remoção de compostos BTEX é independente e pode se dar isoladamente. Dessa forma,



tanto os aspectos químicos quanto biológicos devem ser levados em consideração para adequada remoção de BTEX de estações de tratamento e ambientes contaminados.

## CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado, concluiu-se que:

Embora não se possa constatar a ocorrência de degradação de BTEX, os microrganismos foram capazes de crescer em sua presença.

Até o presente, a maior parte da literatura científica sobre degradação anaeróbia de BTEX pouco menciona a participação de indivíduos pertencentes à classe  $\alpha$ -proteobactéria no processo de biodegradação. Embora esses organismos possam estar mais diretamente relacionados à degradação de etanol, estudos posteriores e de maior duração são necessários para averiguar se a possibilidade deste grupo também degradar BTEX é viável.

As velocidades de degradação obtidas nesse trabalho sugerem que exista toxicidade do benzeno e que esse monoaromático interfira na dinâmica dos processos catabólicos dos microrganismos estudados.

A técnica de FISH mostrou-se como uma importante ferramenta aplicada ao estudo da microbiologia ambiental, possibilitando a identificação dos principais grupos microbianos metabolicamente ativos em processos de degradação anaeróbia de compostos recalcitrantes, possibilitando a formulação de hipóteses alternativas que permitam a melhor compreensão dos processos metabólicos e da diversidade microbiana neles envolvidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHAD, J.M.E.; LOLLAR, B.S.; EDWARDS, E.A.; SLATER, G.F.; SLEEP, B.E. Carbon isotope fractionation during anaerobic biodegradation of toluene: implications for intrinsic bioremediation. *Environmental Science and Technology*, v. 34, n.5, p. 892-896. 2000.
2. AKARSUBASI, A.T.; INCE, O.; OZ, N.A.; KILDAR, B.; INCE, B.K. Evaluation of performance, acetoclastic methanogenic activity and archeal composition of full-scale UASB reactors treating alcohol distillery wastewaters. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 28-35. 2006.
3. ALEXOPOULOS, E.C; CHATZIS, C.; LINOS, A. An analysis of factors that influence personal exposure to toluene and xylene in residents of Athens, Greece. *BMC Public Health*, v.6, n.50, p. 1-9. 2006.
4. ALVAREZ, P.J.J.; VOGEL, T.M. Substrate interactions of benzene, toluene, and p-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n.10, p. 2981-2985. 1991.
5. AMANN, R.; FUCHS, B.M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. *Current opinion in biotechnology*, v.12, p. 231-236. 2001.
6. AMANN, R.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiology Reviews*, v.24, p. 555-565. 2000.
7. CHAKRABORTY, R.; COATES, J.D. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 64, p. 437-446. 2004.
8. CHAKRABORTY, R.; O'CONNOR, S.M.; CHAN, E.; COATES, J.D. Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene compounds by *Dechloromonas* strain RCB. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.12, p. 8649-8655. 2005.
9. COLLINS, G.; WOODS, A.; MCHUGH, S.; CARTON, M.W.; O'FLAHERTY, V. Microbial community structure and methanogenic activity during start-up of psychrophilic anaerobic digesters treating synthetic industrial wastewaters. *FEMS Microbiology Ecology*, v.46, n.12, p. 159-170. 2003.
10. CORSEUIL, H.X.; KAIPPER, B.I.A.; FERNANDES, M. Cosolvency effect in subsurface systems contaminated with petroleum hydrocarbons and ethanol. *Water Research*, v. 38, p. 1449-1456. 2004.
11. DÍAZ, E.E.; STAMS, A.J.M.; AMILS, R.; SANZ, J.L. Phenotypic Properties and Microbial Diversity of Methanogenic Granules from a Full-Scale Upflow Anaerobic Sludge Bed Reactor Treating Brewery Wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n. 7, p. 4942-4949. 2006.
12. EDWARDS, E.A.; WILLS, L.E.; REINHARD, M.; GALIC, D.G. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 3, p. 794-800. 1992.





13. EVANS, P.J.; MANG, D.T.; KIM, K.S.; YOUNG L.Y. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n.4, p.1139-1145. 1991(b).
14. EVANS, P.J.; MANG, D.T.; YOUNG, Y. Degradation of toluene and m-xylene and transformation of o-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n.2, p. 450-454. 1991(a)
15. FLORENCIO, L.; SANTOS, M.L.F.; FLORENCIO, M.L.; FIELD, J.A.; LETTINGA, G. Substrate Competition Between Methanogens and Acetogens During the Degradation of Methanol in UASB Reactors. *Water Research*, v. 29, n.3, p. 915-922. 1995.
16. GIBSON, J.; HARWOOD, C.S. Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annual Review Microbiology*, v. 56, p. 345-359. 2002.
17. GUSMÃO, V.R.; CHINALIA, F.A.; SAKAMOTO, I.K.; VARESCHE, M.B.A. Performance of a reactor containing denitrifying immobilized biomass in removing ethanol and aromatic hydrocarbons (BTEX) in a short operating period. *Journal of Hazardous Materials*, v. 139, p.301-309. 2007.
18. GUSMÃO, V.R. Caracterização microbiológica de cultura desnitrificante de reator anaeróbio horizontal de leito fixo utilizado na remoção de BTEX. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.
19. GUSMÃO, V.R.; MARTINS, T.H.; CHINALIA, F.A.; SAKAMOTO, I.K.; THIEMANN, O.H.; VARESCHE, M.B.A. BTEX and ethanol removal in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor, under denitrifying condition. *Process Biochemistry*, v. 41, p.1391-1400. 2006.
20. HARMS, G.; ZENGLER, K.; RABUS, R.; AECKERSBERG, F.; MINZ, D.; MÓRA, R.R.; WIDDEL, F. Anaerobic Oxidation of o-Xylene, m-Xylene, and Homologous Alkylbenzenes by New Types of Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 3, p. 999-1004. 1999.
21. HIRASAWA, J.S. Avaliação da comunidade microbiana anaeróbia em reator sulfetogênico utilizando a hibridação *in situ* com sondas fluorescentes. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.
22. JAHN, M.K.; HADERLEIN, S.B.; MECKENSTOCK, R.U. Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene in sediment-free iron reducing enrichment cultures. *Applied and environmental microbiology*, v. 71, n.6, p. 3355-3358. 2005.
23. KOBABE, S.; WAGNER, D.; PFEIFFER, E-M. Characterisation of microbial community composition of a Siberian tundra soil by fluorescence *in situ* hybridization. *FEEMS Microbiology Ecology*, v. 50, p. 13-23. 2004.
24. MOTER, A.; GÖBEL, U.F. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, v.41, p. 85-112. 2000.
25. NARDI, I.R.; RIBEIRO, R.; ZAIAT, M.; FORESTI, E. Anaerobic packed-bed reactor for bioremediation of gasoline-contaminated aquifers. *Process Biochemistry*, v.40, n.2, p. 587-592. 2005.
26. RABUS, R.; WILKES, H.; SCHRAMM, A.; HARMS, G.; BEHREND, A.; AMANN, R.; WIDDEL, F. Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Environmental Microbiology*, v. 1, n. 2, p. 145-157. 1999.
27. REINHARD, M.; HOPKINS, G.D.; DARLING, E.S.; LEBRON, C.A. *In situ* biotransformation of BTEX compounds under methanogenic conditions. *Groundwater Monitoring and Remediation*, v. 25, n. 4, p. 50-59. 2005.
28. REUTMAN, S.R.; LEMASTERS, G.K.; KNECHT, E.A.; SHUKLA, R.; LOCKEY, J.E.; BURROUGHS, G.E.; KESNER, J.S. Evidence of reproductive endocrine effects in women with occupational fuel and solvent exposures. *Environmental Health Perspectives*, v. 110, n. 8, p. 805-811. 2002.
29. SCHNEIDER, M.R.; CORSEUIL, H.X.; ROSÁRIO, M. Weathering of ethanol-blended gasoline in aquifers - a field experiment. In: *The International Conference on Environmental Science and Technology*. New Orleans. The International Conference on Environmental Science and Technology. New Orleans : National Academy of Science, v. 1, p. 100-106. 2005.
30. SILVA, R.L.B.; BARRA, C.M.; MONTEIRO, T.C.N.; BRILHANTE, O.M. Estudo da contaminação de poços rasos por combustíveis orgânicos e possíveis consequências para a saúde pública no Município de Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. *Caderno da. Saúde Pública*, v. 6, p. 1599-1607. 2002.
31. SPEECE, R.E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Nashville, Tennessee, Archae Press. 1996.
32. TAKEMURA, H.; KONDO, K.; HORINOUCI, S.; BEPPU, T. Induction by Ethanol of Alcohol Dehydrogenase Activity in *Acetobacter pasteurianus*. *Journal of Bacteriology*, v. 175, n. 21, p. 6857-6866. 1993.



33. WILKES, H.; BOREHAM, C.; HARMS, G.; ZENGLER, K.; RABUS, R. Anaerobic degradation and carbon isotopic fractionation of alkylbenzenes in crude oil by sulphate-reducing bacteria. *Organic Geochemistry*, v. 31, p. 101-115. 2000.