

USO DE FERRAMENTA DE BIOLOGIA MOLECULAR NA INVESTIGAÇÃO DE ÁREAS IMPACTADAS POR DERIVADOS DE PETRÓLEO

Lorena Bittencourt Guimarães¹; Suhita Monteiro Ramos; Helen Simone Chiaranda; Melissa Paola Mezzari; Márcio Luís Busi da Silva e Henry Xavier Corseuil

Resumo – Áreas experimentais contaminadas com as misturas, gasolina - etanol (10% v/v) (E10) e diesel – biodiesel (20% v/v) (B20), foram avaliadas com o auxílio da biologia molecular. Foi realizado o monitoramento tradicional das concentrações dos BTEX para acompanhar o transporte destes contaminantes. PCR em tempo real foi utilizado para quantificar a presença de bactérias totais, nitrato-, ferro- e sulfato-redutoras no aquífero. As bactérias nitrato-redutoras não foram detectadas corroborando com a ausência de nitrito. As análises das bactérias ferro-, sulfato-redutoras comprovaram a degradação anaeróbia característica de ambientes subterrâneos, além da presença dos metabólitos ferro (II) e sulfeto. As maiores concentrações de bactérias totais foram observadas nos pontos com as maiores concentrações do substrato BTEX, indicando intensa atividade de biodegradação. Tanto no transporte vertical dos contaminantes quanto no horizontal, notou-se um aumento de duas ordens de grandeza no número de células de bactérias totais nos poços com as maiores concentrações de BTEX em relação ao controle (poço sem contaminação). Portanto, este estudo mostra a importância da biologia molecular não só para indicar a ocorrência de processos de biodegradação quanto para identificar regiões onde estão localizadas as fontes de contaminação.

Abstract – Contaminated experimental areas with mixtures, gasoline - ethanol (10% v / v) (E10) and diesel - biodiesel (20% v / v) (B20), were evaluated with the aid of molecular biology. We carried out the traditional monitoring of concentrations of BTEX to monitor the transport of contaminants. Real-time PCR was used to quantify the presence of total bacteria, nitrate-, iron- and sulfate reducers in the aquifer. Nitrate-reducing bacteria were not detected corroborating the

¹ Universidade Federal de Santa Catarina / Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental Campus Universitário - Trindade Florianópolis/ SC- 88040-970. Tel.: (48) 3721-7569 / Fax: (48) 3234-6459. Email: lo_bitt@hotmail.com

absence of nitrite. The analysis of iron bacteria, sulfate reducers demonstrated the anaerobic degradation characteristic of the underground, and the presence of metabolites iron (II) and sulfide. The highest concentrations of total bacteria were observed in sections with the highest concentrations of BTEX substrate, indicating intense biodegradation. Both the vertical transport of contaminants and in the horizontal, it was noted an increase of two orders of magnitude in cell number of total bacteria in wells with the highest concentrations of BTEX as compared to control (well without contamination). Therefore, this study shows the importance of molecular biology to indicate the occurrence of biodegradation processes and to identify regions where are located the sources of contamination.

Palavras-Chave – BTEX, Investigação, Real-time PCR.

INTRODUÇÃO

A contaminação do solo e das águas subterrâneas por compostos derivados de petróleo tem sido objeto de grande preocupação em países industrializados. Um dos primeiros problemas a ser reconhecido como de grande importância é a contaminação das águas subterrâneas utilizadas para abastecimento público e domiciliar, além do comprometimento de aquíferos ou reservas importantes de águas subterrâneas. Com isso, o gerenciamento das áreas contaminadas se faz necessário para minimizar os riscos a que estão sujeitos a população e o meio ambiente. O processo de identificação de áreas contaminadas tem como objetivo a localização das áreas contaminadas, e com a confirmação da contaminação, inicia-se o processo de recuperação, que tem como meta a adoção de medidas corretivas nessas áreas (CETESB, 2001).

A escolha das técnicas de investigação de uma área contaminada é realizada em função das características específicas de cada área a ser estudada. Os métodos geoquímicos e os geofísicos são os mais utilizados para identificar áreas contaminadas por compostos orgânicos provenientes de indústrias petroquímicas. Estas técnicas são geralmente dispendiosas e normalmente utilizadas conjuntamente para identificar os locais onde estão as fontes de contaminação.

Em solos e águas subterrâneas os decréscimos das concentrações dos hidrocarbonetos são resultantes da ação microbiológica sobre estes compostos. Portanto, outra abordagem utilizada para detectar a contaminação de uma área é avaliar a dinâmica microbiana do local de interesse (YAGE, et al., 2010). Com o avanço da Biologia molecular, pesquisadores têm descrito a estrutura das comunidades microbianas e a atividade das espécies (CORGIÉ, et al.; 2006) e avaliado a

diversidade, abundância e consistência de comunidades microbianas presentes na biodegradação de hidrocarbonetos em aquíferos (YAGI e MADSEN, 2009). Primeiramente, é realizado o isolamento e amplificação (multiplicação) de DNA e RNA de amostras ambientais, utilizando técnicas como Reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações (convencional, competitivo, em tempo real) seguidas ou não de eletroforese (TTGE ou DGGE). Até o momento as técnicas de biologia molecular têm focado na filogenia e confiado na seqüência 16S rRNA (or 16S rDNA) para identificar espécies bacterianas em amostras ambientais (BELLER, et al., 2002; DA SILVA E ALVAREZ, 2004; BALDWIN et al., 2003).

Neste estudo, foi utilizado o método de PCR em Tempo-Real para identificar e quantificar as comunidades microbiológicas existentes em águas subterrâneas contaminadas com hidrocarbonetos de petróleo. A biologia molecular foi usada para avaliar se esta ferramenta pode ser utilizada na identificação de fontes de contaminação durante a investigação de áreas impactadas por petróleo e seus derivados e também na observação dos processos de biodegradação ocorrentes nestes locais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

A área experimental estudada se situa na Fazenda Ressacada em Florianópolis/SC (UFSC), na região de Tapera, próximo ao aeroporto Hercílio Luz. Foram realizadas liberações controladas de derivados de petróleo em duas diferentes áreas experimentais. Em uma delas foi derramado 100L da mistura de diesel com biodiesel 20% (v/v) (B20), e na outra 100L da mistura de gasolina com etanol 10% (v/v) (E10). Desde então, as áreas vêm sendo monitorada com análises de campo e laboratoriais e avaliada a atenuação natural dos contaminantes injetados. Na área E10 ocorre semanalmente injeções de sulfato de sódio (Na_2SO_4) anidro, a fim de simular aquíferos com elevada concentração de sulfato.

Segundo a CETESB (2001), na etapa de investigação confirmatória, em áreas suspeitas de contaminação, a distribuição das substâncias contaminantes deve ser investigada tanto no plano horizontal quanto no vertical. Dessa forma, devem ser amostradas preferencialmente as profundidades onde os contaminantes apresentem a maior probabilidade de estarem concentrados. Para avaliar a dinâmica microbiana em função do transporte horizontal dos BTEX, na área B20, a água subterrânea foi coletada à 3,0 m de profundidade em cinco poços na região da fonte de contaminação. Os poços analisados na área B20 foram: a fonte (F), onde foi liberado o combustível B20; um poço 1,5m a montante da fonte (M); e três poços a jusante da fonte seguindo a pluma de

contaminação (J1, J2, J3). Estes poços foram escolhidos em função da direção do fluxo da água subterrânea indicada pela seta pontilhada na Figura 1. Na Figura 1 estão representados os poços analisados na área B20, na profundidade em que as amostras foram coletadas, 3,0 m. Para avaliar a dinâmica microbiana em função do transporte vertical dos BTEX, na área E10, a amostragem foi realizada na fonte, poço onde foi liberado o combustível E10, nas diferentes profundidades, 2, 3, 4, 5 e 6m em relação á cota do terreno (F2, F3, F4, F5, F6) (Figura 2). Para se ter o controle, foi coletado amostra em um poço de uma área não contaminada (B).

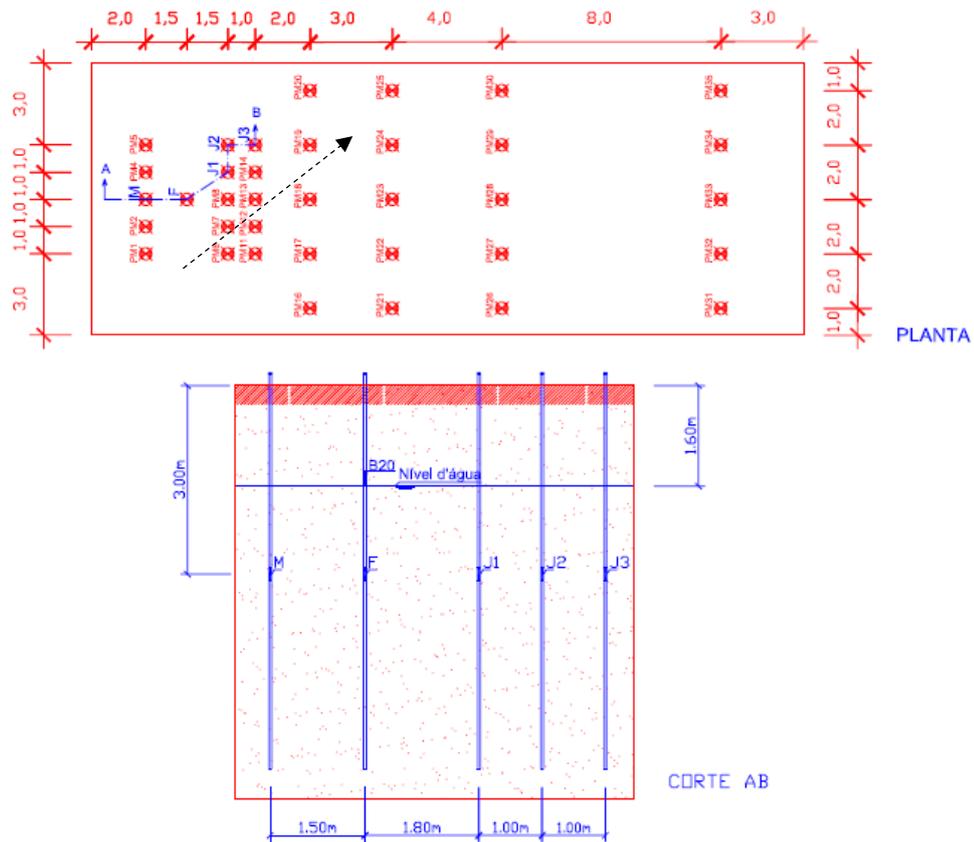


Figura 1: Planta e corte da área B20 (80% de diesel e 20% de biodiesel). Poços analisados: Fonte (F), poços a jusante (J) de F (J1 a 1,5m de F; J2 a 2,5m de F; e J3 a 3,5m de F) e um poço a montante de F (M a 1,5m de F). A profundidade da amostragem foi de 3m em relação á cota do terreno. Comportamento horizontal.

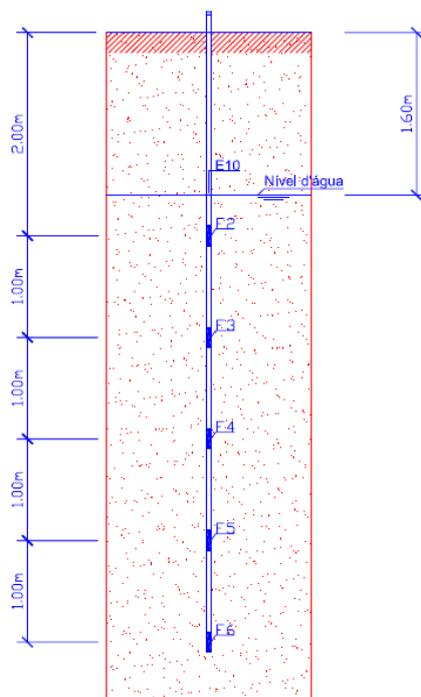


Figura 2: Área E10, a amostragem foi realizada na fonte, poço onde foi liberado o combustível E10, nas diferentes profundidades, 2m (F2), 3m (F3), 4m (F4), 5m (F5) e 6m (F6) em relação à cota do terreno. Comportamento vertical.

Análises químicas

Para a avaliação do processo de biorremediação, os seguintes parâmetros foram analisados: etanol, metano, sulfato (SO_4^{2-}), brometo (Br^-), cloreto (Cl^-), nitrato (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}), acetato (CH_3COO^-) íon ferro (II), sulfeto, oxigênio dissolvido (OD), potencial de oxidação-redução (POR), pH, e alcalinidade. As amostras dos compostos voláteis (BTEX, etanol e metano) foram analisadas em um cromatógrafo a gás (HP modelo 6890 – série II) com Headspace Autosampler HP – estático (modelo 7694) equipado com detector por ionização em chama (FID). O método empregado para os compostos voláteis foram EPA 5021A combinado com o método EPA/8015D.

Os ânions sulfato, brometo (Br^-), cloreto (Cl^-), nitrato (NO_3^-), fosfato (PO_4^{3-}), sulfato (SO_4^{2-}) e acetato (CH_3COO^-) são analisados por cromatografia líquida (Dionex, modelo ICS – 1000), equipado com detector de condutividade iônica, e a coluna utilizada foi a AS22 (4x250 mm), empregando-se o método 300,0 - USEPA.

As análises de ferro (II) e sulfeto foram conduzidas em espectrofotômetro HACH – DR/2500, seguindo o método 3500 - Fe D (método 1,10 fenantrolina) para o ferro (II) e o método 4500 – S2- D (método colorimétrico azul de metileno) para o sulfeto, conforme o Standard Methods - APHA.

Para a determinação do oxigênio dissolvido e pH na água subterrânea foram utilizado um analisador de água Micropurge® Flow Cell, modelo MP20-1380 e estes parâmetros foram medidos em campo.

Análises microbiológicas

Para a caracterização da população microbiana, após a liberação dos combustíveis nas áreas experimentais, aproximadamente, 1 L de água subterrânea foram coletados nos poços de interesse. Visto que grande parte da comunidade microbiana se encontra aderida ao solo, houve a necessidade de se ter grande volume de água subterrânea coletada para se conseguir uma amostra representativa. As amostras de 1L coletadas foram submetidas a uma filtração à vácuo utilizando *Kitasato*, bomba à vácuo usando filtro *Millipore* de 0,22 µm. Os filtros contendo o material microbiológico de interesse foram transferidos para a solução do *Power Bead Tube* do kit de extração de DNA MoBio Power Soil™ kit (Carlsbad, CA) para então ser extraído o DNA.

Extração do DNA

De cada amostra de água subterrânea, os filtros contendo o material retido foram utilizados para a extração de DNA. Nesta etapa, foi utilizado o *DNA MoBio Power Soil™ kit (Carlsbad, CA)* e o DNA foi extraído de acordo com as recomendações do kit. Após o processo de extração, 100 µL de DNA foi obtido e armazenado em frascos de 2 mL (*Eppendorf*), livres de DNA e RNA, e estocados em freezer (-30°C, *MidSci*) para análises em PCR quantitativo (qPCR).

PCR em Tempo Real

As análises de biologia molecular foram realizadas utilizando os métodos de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real-time quantitative polymerase chain reaction – RTQ-PCR*). RTQ-PCR foi utilizado para quantificar bactérias totais, Nitrato-redutoras, Ferro-redutoras (gêneros *Geobacter* e *Pellobacter*) e Sulfato-redutoras (*δ-Proteobacteria* como *Desulfovibrio*, *Desulfomicrobium*, *Desulfuromosa*, e *Desulfuromonas*)

A quantificação das bactérias totais foi determinada utilizando os *primers* BACT1369F e PROK1492R e *probe* TM1389F os quais foram desenvolvidos por Suzuki et al., 2000. A quantificação das bactérias redutoras de ferro (III) foi obtida utilizando-se os *primers* 561F e 825R. Bactérias redutoras de sulfato foram quantificadas utilizando os *primers* 361F e 685R. A concentração das bactérias redutoras de nitrato foi estimada utilizando os *primers* nirK1F/ nirK5R e nirS1F/ nirS6R. As seqüências dos primers utilizados estão mostradas na Tabela 1. As análises

foram realizadas no equipamento *Mastercycler ep realplex* (Eppendorf). Os kits para reação de PCR foram o *Taqman* e *Sybr-Green* (Applied Biosystems, EUA). Todos os *primers* e sondas foram obtidos da empresa *Integrated DNA Technologies* (Coralville, IA, EUA). A concentração de bactérias por amostra foi determinada de acordo com Da Silva e Alvarez (2004).

Tabela 1: Sequência de primers utilizados para detectar bactérias totais, sulfato-redutoras e ferro-redutoras, juntamente com referências que utilizaram estes primers

Primer	Seqüência	Probe	Referência
PROK1492R	5'-GGW TAC CTT GTT ACG ACT T -3'	TM1389F 5'- /56-	Suzuki et
BACT1369F	5'-CGG TGA ATA CGT TCY CGG -3'	FAM/CTT GTA CAC ACC	al., 2000
685R	5'-ATC TAC GGA TTT CAC TCC TAC	GCC CGT C/3BHO 1/-3'	Stults et al.,
361F	5'- [^] AAG CCT GAC GCA SCA A -3'		2001
561F	5'-GCG TGT AGG CGG TTT CTT AA -3'		Stults et al.,
825R	5'-TAC CCG CRA CAC CTA GTT CT -3'		2001
NIRS6-R	5'-CGT TGA ACT TRC CGG T -3'		
NIRS1-F	5'-CCT AYT GGC CGC CRC ART -3'		Braker et al.,
NIRK5-R	5'- GCC TCG ATC AGR TTR TGG -3'		1998
NIRK1-F	5'-GGM ATG GTK CCS TGG CA -3'		

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Monitoramento da pluma de contaminação

Os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos de duas áreas experimentais após uma liberação controlada dos combustíveis E10 e B20. Na área E10, as amostras foram coletadas aproximadamente 150 dias após o derramamento, e na área B20, 530 dias. Os dados foram obtidos através do monitoramento da água subterrânea na região da fonte das duas áreas. Em B20 a água subterrânea foi coletada à 3,0 m de profundidade em cinco poços na região da fonte de contaminação (M, F, J1, J2, J3) . Na área E10, a amostragem foi realizada na fonte nas diferentes profundidades, 2, 3, 4, 5 e 6m (F2, F3, F4, F5, F6). Amostras de poços de uma área não contaminada (B) foram utilizadas como controle (testemunha). Estes pontos foram escolhidos para ser observado o comportamento vertical e horizontal das comunidades microbianas em função da concentração de BTEX.

A Figura 3 B mostra que a pluma de BTEX da área B20 ainda se encontra na fonte e chega até o terceiro poço, 2,5 m à jusante da fonte (J3). As maiores concentrações de BTEX foram nos poços J2 e J3, com 1,24 a 1,39 mg/L, respectivamente. Já na área E10, onde se tem uma comparação entre os níveis de profundidade, encontraram-se valores de BTEX mais elevados. Isto porque é um derramamento mais recente e a gasolina apresenta uma maior porcentagem de BTEX do que o diesel liberado na área B20. Observa-se na Figura 3A que os compostos BTEX ainda estão sendo liberados (solubilizados) na área E10, com maiores concentrações nos níveis superiores da fonte (86,06 mg/L à 2 m) e menores nos níveis mais profundos (9,44 mg/L à 6 m). O nível F4 foi o único ponto observado com alta concentração de etanol (5,05 mg/L). No poço controle não foi detectado BTEX.

Biologia Molecular

As análises de biologia molecular foram realizadas em amostras de água subterrânea utilizando qPCR. As comunidades microbianas avaliadas neste trabalho referem-se a grupos de bactérias associadas com a biodegradação dos BTEX. Por exemplo, o benzeno, que é o composto mais tóxico e recalcitrante entre os BTEX pode ser biodegradado anaerobicamente em condições desnitrificantes (RABUS e HEIDER, 1998), redutoras de ferro (KANE, et al., 2002) e redutoras de sulfato (ANDERSON e LOVLEY, 2000; COATES et al., 1996). Portanto, análises de bactérias totais (16S rDNA), redutoras de ferro, redutoras de sulfato e redutoras de nitrato foram utilizadas para a caracterização molecular de aquíferos contaminados. Com este estudo também há a tentativa de demonstrar que os decréscimos das concentrações dos contaminantes nas águas subterrâneas são resultantes da ação microbiológica ao invés de ocorrer exclusivamente por processos abióticos.

Na Figura 3C, está representada a quantidade de bactérias totais nas diferentes profundidades da região da fonte da área E10. Nos níveis F2 e F4 foram observados os maiores números de células por mL. Nas amostras dos poços mais profundos, F5 e F6, detectou-se um menor número de bactérias totais, com duas ordens de grandeza abaixo dos níveis superiores. No controle foi observada a menor concentração de bactérias totais. Este resultado, ao ser comparado com as concentrações de BTEX, mostrou forte correlação. Notou-se que, quanto maior a concentração de BTEX (Figura 3 A), maior foi a quantidade de bactérias totais encontradas (Figura 3C). No estudo de Baldwin e colaboradores (2008) foi observada positiva correlação entre cópias de genes aromáticos oxigenases com a concentração total de BTEX. Estes genes não foram detectados em poços fora da pluma de contaminação.

Em B20, as bactérias totais foram detectadas em maiores concentrações no ponto onde foi liberado o contaminante (F) e em dois poços a jusante (J1 e J3) desta fonte. No poço a montante

(M) e um a jusante (J1), observou-se as menores quantidades de bactérias totais. O controle apresentou a menor concentração de bactérias totais. Quando relaciona este resultado com as concentrações de BTEX, percebe-se que comunidades microbianas acompanham o fluxo e direção da contaminação e se encontram dentro e nas bordas da pluma. Hendrickx et al. (2006), demonstraram transferência horizontal dos genes catabólicos de degradação dos BTEX (*tmoA* e *xylM*) no aquífero.

As bactérias nitrato-redutoras não foram detectadas, corroborando com a ausência de nitrito nas duas áreas estudadas (dado não mostrado). Em B20, as maiores concentrações de bactérias redutoras de ferro e de sulfato foram também observadas na região de maior massa de contaminante BTEX (Figura 3B e Figura 4B). Nesta região foram detectados ferro (II) e o sulfeto (Figura 4A). Estes resultados sugerem que as atividades de ferro e sulfato redução são existentes nesta região, mas não predominantes, visto que estas comunidades representaram menos de 1 % das bactérias totais. Em E10, não foram encontradas bactérias ferro- e sulfato-redutoras em nenhum nível da fonte, apesar de observar a presença dos compostos ferro (II) e sulfeto. Estes ânions foram detectados em função de dissolução química (acidificação do meio) e da intensa atividade biológica e formação de ácidos orgânicos (e.g. acetato) (DA SILVA e CORSEUIL, 2008).

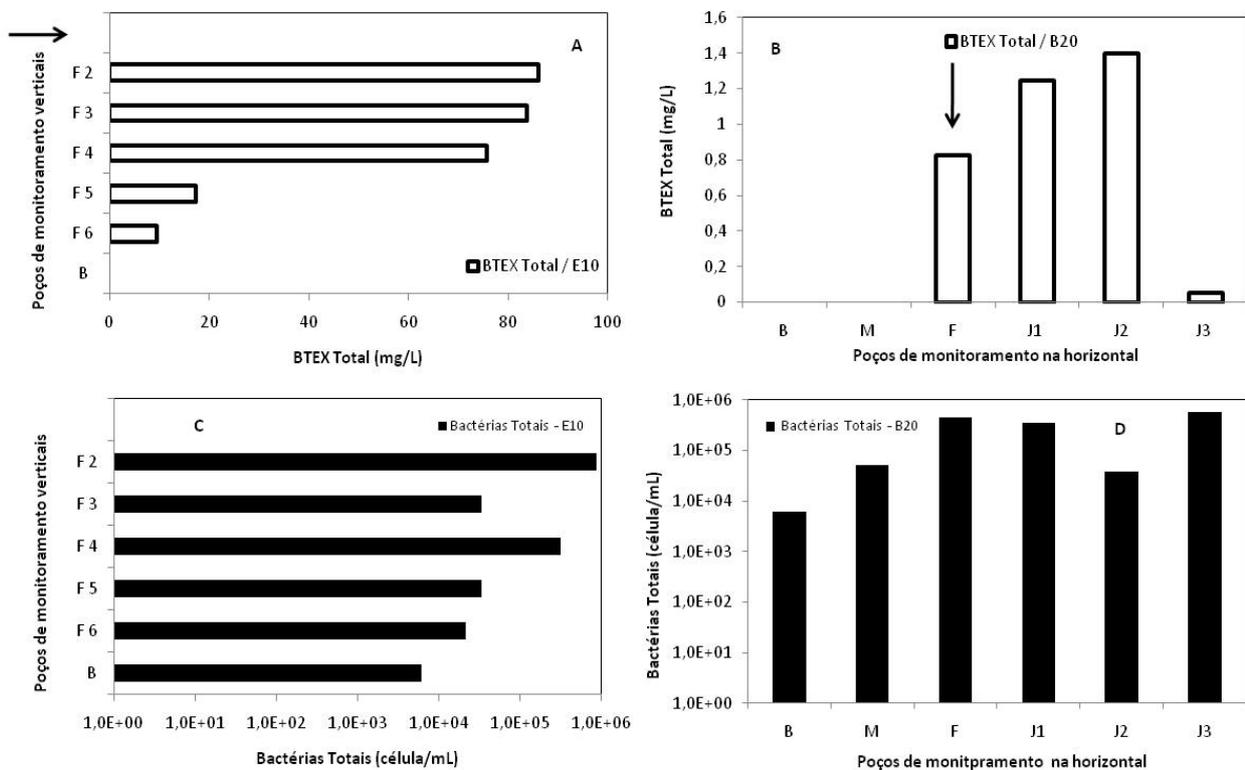


Figura 3: Concentração dos compostos BTEX da área E10 (A) e da área B20 (B); bactérias totais da área E10 (C) e da área B20 (D). As setas indicam o ponto onde foi liberado os contaminantes. Os dois gráficos da esquerda mostram a área em que foi feita a análise vertical com amostras de diferentes profundidades na fonte F (F2 a 0,5m do nível da água, F3 a 1,5m, F4 a 2,5m; F5 a 3,5m e F6 a 4,5m do nível da água). Os gráficos á direita mostram poços a jusante (J) da fonte F (J1 a 1,5m de F; J2 a 2,5m de F; e J3 a 3,5m de F) e um poço a montante (M a 1,5m de F). A letra B (branco) indica o ponto controle dos experimentos.

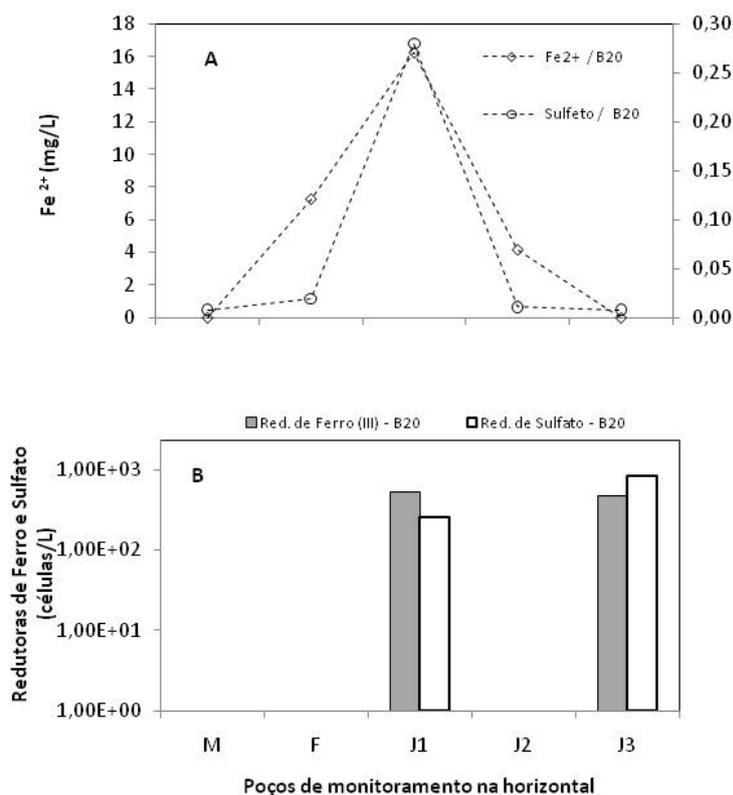


Figura 4: Concentração dos compostos ferro (II) e sulfeto (A) da área B20; bactérias ferro- e sulfato-redutoras da área B20 (B)

CONCLUSÕES

Neste trabalho, duas áreas experimentais contaminadas com mistura de gasolina com etanol (10% v/v) – E10 e outra com mistura de diesel com biodiesel (20% v/v) foram avaliadas. O monitoramento das concentrações dos compostos BTEX foi utilizado para acompanhar o transporte, horizontal e vertical, dos contaminantes. A quantificação das bactérias totais através do PCR quantitativo em tempo real serviu para identificação de contaminantes e também para demonstração dos processos de biodegradação ocorrentes. As análises das bactérias ferro-, sulfato-redutoras comprovaram a degradação anaeróbia característica de ambientes subterrâneos, além de justificar a presença dos metabólitos ferro (II) e sulfeto. Bactérias nitrato-redutoras não foram detectadas, o que corrobora com a ausência de nitrito. Ainda com os resultados obtidos da biologia molecular pode-se observar uma forte correlação entre concentração de BTEX e a quantidade de bactérias totais. Quanto maior a concentração de BTEX detectada, maior foi número de células encontradas. Tanto no transporte vertical dos contaminantes quanto no horizontal, notou-se um aumento de duas ordens de grandeza no número de células de bactérias totais nos poços com as maiores concentrações de BTEX em relação ao controle (poço sem contaminação). Portanto, este estudo mostra a importância da biologia molecular não só para indicar a ocorrência de processos de biodegradação quanto para

identificar regiões onde estão localizadas as fontes de contaminação. Novos estudos estão em andamento na Fazenda Ressacada para demonstrar a importância do biomonitoramento desde o início da investigação até as fases finais de demonstração de que as áreas inicialmente impactadas já foram recuperadas. Estes estudos pretendem indicar a viabilidade da utilização de técnicas de biologia molecular como ferramenta indicativa da presença de fontes de contaminação diminuindo assim os custos da utilização das outras técnicas convencionais de investigação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, R., T.; LOVLEY, D. Anaerobic Bioremediation of Benzene under Sulfate-Reducing Conditions in a Petroleum-Contaminated Aquifer. **Environmental Science and Technology**. v. 34, p. 2261-2266, 2000.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 18th Edition**. Washington, DC. 1992.

BALDWIN, B. R.; NAKATSU, C. H.; NIES, L.; Enumeration of aromatic oxygenase genes to evaluate monitored natural attenuation at gasoline-contaminated sites. **Water Research** v. 42, n. 3, p. 723-731, 2008.

BALDWIN, B. R.; NAKATSU, C. H.; NIES, L. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p. 3350–8, 2003.

BRAKER, G. ; FESEFELDT, A. ; WITZEL, K-P. Development of PCR Primer Systems for Amplification of Nitrite Reductase Genes (nirK and nirS) To Detect Denitrifying Bacteria in Environmental Samples. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 64, n. 10, p. 3769-3775, 1998.

BELLER, H. R.; KANE, S. R.; LEGLER, T. C.; ALVAREZ, P. J. J. A Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Monitoring Anaerobic, Hydrocarbon-Degrading Bacteria Based on a Catabolic Gene. **Environmental Science Technology** v. 36, p. 3977-3984, 2002.

CETESB. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas**. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo/ Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit. 2.ed. São Paulo, 2001.

COATES JD, ANDERSON RT & LOVLEY DR Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. **Applied Environmental Microbiology** v. 62, p. 1099–1101, 1996.

CORGÍÉ, S. C., BEGUIRISTAIN, T., LEYVAL, C.; Profiling 16S bacterial DNA and RNA: Difference between community structure and transcriptional activity in phenanthrene polluted sand in the vicinity of plant roots. **Soil Biology & Biochemistry** v. 38, p. 1545–1553, 2006.

DA SILVA, M. L. B.; CORSEUIL, H. X. Monitoramento de áreas impactadas por derramamento de gasolina utilizando biologia molecular. **XV Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas**, 2008.

DA SILVA, M. L. B.; ALVAREZ, P. J. J. Enhanced Anaerobic Biodegradation of Benzene-Toluene-Ethylbenzene-Xylene-Ethanol Mixtures in Bioaugmented Aquifer Columns. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4720–4726, 2004

HENDRICKX, B.; JUNCA, H.; VOSAHLOVA, J.; LINDNER, A.; RÜEGG, I.; BUCHELI-WITSCHER, M.; FABER, F.; EGLI, T.; MAU, M.; SCHLÖMANN, M.; BRENNEROVA, M.; BRENNER, V.; PIEPER, D. H.; TOP, E. M.; DEJONGHE, W.; BASTIAENS, L.; SPRINGAEL, D. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. **Journal of Microbiological Methods**. v. 64, n. 2, p. 250-265, 2006.

KANE, S. R.; BELLER, H. R., LEGLER, T. C.; ANDERSON, R. T. Biochemical and genetic evidence of benzylsuccinate synthase in toluene-degrading, ferric iron-reducing *Geobacter metallireducens*. **Biodegradation**. v. 13, p. 149–154, 2002.

RABUS, R.; HEIDER, J. Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. **Archives of Microbiology**. v. 170, p. 377–384, 1998.

STULTS, J. R. ; SNOEYENBOS-WEST, O. ; METHE, B. ; LOVLEY, D.R. ; CHANDLER, D.P. Application of the 5' Fluorogenic Exonuclease Assay (TaqMan) for Quantitative Ribosomal DNA and rRNA Analysis in Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**. v.67, n.6, p. 2781-2789, June, 2001.

SUZUKI, M. T.; TAYLOR, L. T.; DELONG, E., F.; Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations via 5'-Nuclease Assays. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4605-4614, 2000.

YAGI, J. M., NEUHAUSER, E. F., RIPP, J. A., MAURO, D. M.; MADSEN, E. L. Subsurface ecosystem resilience: long-term attenuation of subsurface contaminants supports a dynamic microbial community. **The International Society for Microbial Ecology Journal**. v. 4, p. 131-143, 2010.

YAGI, J. M.; MADSEN, E. L. Diversity, Abundance, and Consistency of Microbial Oxygenase Expression and Biodegradation in a Shallow Contaminated Aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6478-6487, 2009.