UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LEANDRO BARDIVIESSO GODOI

Busca por espécies da classe Thermotogae a partir de fluidos de um reservatório de petróleo *onshore* com alta temperatura e salinidade

São Carlos
2015

LEANDRO BARDIVIESSO GODOI

Busca por espécies da classe Thermotogae a partir de fluidos de um reservatório de petróleo *onshore* com alta temperatura e salinidade

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Física.

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientadora: Profa. Dra. Nelma Regina Segnini Bossolan

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Godoi, Leandro Bardivieso

Busca por espécies da classe Thermotogae a partir
de fluidos de um reservatório de petróleo onshore com
alta temperatura e salinidade / Leandro Bardivieso
Godoi; orientador Nelma Regina Segnini Bossolan -
versão corrigida -- São Carlos, 2015.
116 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Petrotoga. 2. Petróleo. 3. Termófilos. I.
Bossolan, Nelma Regina Segnini, orient. II. Título.

*Aos meus pais,
Durcelino Godoi e Leonor Bardiviesso.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela educação, pelo respeito, e por todos os valores que me ensinaram durante a vida.

À Profa. Dra. Nelma Regina Segnini Bossolan pelo apoio, dedicação, orientação e pela imensurável ajuda na finalização deste trabalho.

À Julia Mara Martins por ter me ensinado como trabalhar com as amostras de petróleo (fluidos produzidos) recebidas, recuperando e identificando as mesmas. Pela sua paciência e esforço.

À Dra. Antonia Garcia Torres Volpon e ao CENPES-Petrobras pela cessão das amostras de fluidos produzidos concedidas para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Biofísica - Grupo Sérgio Mascarenhas e ao Instituto de Física de São Carlos-USP pela infra-estrutura apoio ao desenvolvimento deste trabalho. Aos técnicos José Fernando de Lima, Andressa Alves Pinto e Derminda Isabel de Moraes pela ajuda em resolver problemas do dia-a-dia, pela orientação frente às dificuldades, pela amizade e carinho.

À Profa. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche do Laboratório de Processos Biológicos, do Departamento de Sistemas Hidráulicos e Saneamento da Escola de Engenharia de São Carlos-USP, e às técnicas Isabel K. Sakamoto e Eloísa Pozzi, que sempre contribuíram com o projeto cedendo o uso do microscópio de contraste de fase e inúmeros compostos que somente encontrávamos lá.

À Profa. Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo, do Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) do Instituto de Física de São Carlos-USP, pelo apoio com os testes do antibiograma e pela orientação sobre os mesmos.

À Valeria Spolon Marangoni e Juliana Cancino Bernardi do Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia-USP-Campus 1, e às técnicas responsáveis no Laboratório de Química Medicinal e Computacional-USP-Campus 2, Renata Krogh e Simone M. Duarte por disponibilizarem o espectrofotômetro de placas, pela ajuda no manuseio do mesmo e obtenção das medidas.

Ao Dr. Homero Ferracini Gumerato, pelos esclarecimentos e sugestões quanto aos métodos de análise de crescimento bacteriano.

Ao Serviço de Pós graduação, Silvio César Athayde, Ricardo Vital do Prado e Patricia Giannini Ferreira, pelas orientações, conselhos e sugestões acadêmicas.

Ao Setor de Informática-Scinfor e ao técnico José Roberto Sabadini pela presteza e excelência em resolver problemas inimagináveis em nossos computadores.

Ao Serviço de Biblioteca e Informação do Instituto de Física de São Carlos-USP e a bibliotecária Maria Neusa de Aguiar Azevedo, pela imensa ajuda com a correção do trabalho de acordo com as normas da ABNT e do Instituto.

Aos amigos e amigas do laboratório que transformam os momentos de fracasso em gargalhadas, superação e motivação.

Aos amigos e amigas do Alojamento Estudantil - Bloco-B - Ala-2 - USP.

E a todas as pessoas, profissionais e amigos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

A todos vocês, meu sincero agradecimento.

*Tudo é loucura ou sonho no começo. Nada do que o homem fez no mundo
teve início de outra maneira - mas tantos sonhos se realizaram que não temos o
direito de duvidar de nenhum.*

(Monteiro Lobato)

RESUMO

GODOI, L. B. **Busca por espécies da classe Thermotogae a partir de fluidos de um reservatório de petróleo *onshore* com alta temperatura e salinidade.** 2015. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Reservatórios de petróleo são ambientes únicos por apresentarem uma combinação de condições extremas referentes à temperatura, pressão e salinidade, e que sustentam o desenvolvimento de procariotos. Várias espécies dos Domínios Bactéria e Archaea têm sido isoladas deste ambiente, com destaque aos microrganismos redutores de sulfato (BRS), metanogênicos e fermentadores. Estes últimos utilizam como fonte de energia uma grande variedade de compostos orgânicos e uma grande parte de seus representantes em reservatórios pertence ao Filo Thermotogae. Estas bactérias apresentam uma estrutura característica envolvendo a célula, semelhante a uma bainha, chamada toga. Alguns gêneros deste Filo são habitantes exclusivos de reservatórios, como por exemplo, o gênero *Petrotoga*. O presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias da classe Thermotogae a partir de fluidos de água/óleo de poços de um reservatório de petróleo localizado na região Nordeste, com vistas a contribuir para o conhecimento da diversidade e metabolismo microbianos deste tipo de ambiente. O reservatório tem salinidade média de 7%, temperatura média de 60°C, o pH dos fluidos situa-se entre 6,6-6,8, e a profundidade média dos poços é de 1.100 metros. Dois meios propostos na literatura para o cultivo de *Petrotoga* foram testados para o isolamento deste gênero: meio P-mexicana e meio P. olearia. Os meios foram preparados em anaerobiose, sob atmosfera de N₂ e salinidade de 70g/L de NaCl. Inóculos de cultivos pré-existent em meios enriquecidos foram feitos nestes meios e incubados a 60°C. Ambos os meios se mostraram seletivos para linhagens de *Petrotoga*. Os isolados foram identificados pelo sequenciamento do gene RNAr 16S, e um deles, o isolado MG414-03, foi submetido a testes de crescimento sob as variáveis temperatura, salinidade e fonte de carbono. MG414-03 pertence ao gênero *Petrotoga*, com similaridade de 99,2% com a espécie *Petrotoga miotherma*. Suas células têm forma de bastonete e são envolvidas por toga; são Gram-negativas; têm comprimento médio de 1,8±0,9 µm e largura média de 0,7±0,1 µm, podendo ser individuais ou formar filamentos. Motilidade foi observada em células individuais e

em arranjos de dois. Endósporos não foram observados em nenhuma fase de crescimento. Forma colônias circulares lisas, com borda lisa, transparentes, com diâmetro máximo de 1,0 mm. O isolado apresentou temperatura e salinidade ótimas de 60°C e 4%, respectivamente. Utiliza glicose, xilose, maltose e sacarose como fontes de carbono, mas não utiliza xilana e carboximetilcelulose (CMC). É inibido pelos antibióticos canamicina e cloranfenicol nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. As atividades enzimáticas sobre os substratos xilana e carboximetilcelulose (CMC) foram testadas para o isolado MG414-03 e para as linhagens *Petrotoga mobilis*-DSM10674 e *Petrotoga mexicana*-DSM14811. O método utilizado foi o ensaio colorimétrico com DNS (Ácido Dinitrossalicílico) e o isolado MG414-03 não apresentou atividade enzimática sobre os substratos testados. *Petrotoga mobilis*-DSM10674 e *Petrotoga mexicana*-DSM14811 foram utilizadas como padrões no ensaio pois ambas são descritas como produtoras de xilanases, fato confirmado pelos resultados apresentados no teste. *Petrotoga mobilis*-DSM10674 apresentou atividade enzimática sobre o CMC, na ordem de 73±18 U/L, fato não registrado na literatura para esta espécie.

Palavras-chave: *Petrotoga*. Petróleo. Termófilos.

ABSTRACT

GODOI, L. B. **Searching for Thermotogae species from fluids of an oil reservoir onshore with high temperature and salinity.** 2015. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Oil reservoirs are unique environments for having a combination of extreme conditions relating to temperature, pressure, salinity, and that support the growth of microorganisms. Several species of Domains Bacteria and Archaea have been recovered from oil reservoirs, especially the sulfate-reducing microorganisms (SRB), methanogens and fermenters. The latter use as a carbon source a wide variety of organic compounds and a large fraction of the strains are members of the Phylum Thermotogae. Thermotogae species share a common characteristic: a balloon-like sheath or “toga” present outside the cell membrane. Some genera of the phylum have been exclusively recovered from oil reservoirs, as the genus *Petrotoga*. This study aimed to isolate and characterize strains members of Thermotogae from water/oil fluids of an onshore oil reservoir located in the Northeast of Brazil, in order to contribute to the knowledge of diversity and microbial metabolism of this type of environment. The reservoir has an average salinity of 7%, an average temperature of 60 ° C, the pH of the fluid is between 6.6-6.8 and the average depth of the wells is 1,100 meters. Two culture media proposed in the literature for *Petrotoga* cultivation were tested: P-mexicana Medium and P. olearia medium. The media was prepared anaerobically under N₂ flush and salinity adjusted for 70g/L NaCl. Aliquots from pre-existing enriched cultures were inoculated in those media and incubated at 60 ° C. Both media proved to be selective for *Petrotoga* strains. The isolates were identified by 16S rRNA gene sequencing, and the isolate MG414-03 was tested for the growth under variable temperature, salinity and carbon source. MG414-03 belongs to the genus *Petrotoga*, with 99.2% similarity with *Petrotoga miotherma* species. Cells are rods, 1.8 (± 0.9) x 0.7 (± 0.1) µm in size, with an outer sheath-like structure (toga), occurring singly or in sheaths. It stains Gram-negative. Motility was observed in single or in double cells. No spore formation was detected. Colonies are circular, with a smooth edge, transparent, with a maximum diameter of 1.0 mm. Optimum salinity at 4% and optimum temperature at 60°C. Ferments glucose, xylose, maltose and sucrose, but not xylan and carboxymethylcellulose (CMC). It is inhibited by the

antibiotics kanamycin and chloramphenicol at concentrations of 10 µg/mL and 100 µg/mL, respectively. The enzymatic activity on xylan and carboxymethylcellulose (CMC) were tested for isolate MG414-03, *Petrotoga mobilis* DSM10674 and *Petrotoga mexicana* DSM14811. The method used was the colorimetric assay with DNS (dinitrosalicylic acid) and isolate MG414-03 showed no enzymatic activity on the tested substrates. *Petrotoga mobilis* DSM10674 and *Petrotoga mexicana* DSM14811 were used as standards in the DNS assay, as both strains are described as xylanase producers, and this ability was confirmed by the results presented in the test. *Petrotoga mobilis*-DSM10674 showed enzymatic activity on CMC, of 73 ± 18 U/L, which was not recorded in the literature for this species.

Keywords: *Petrotoga*. Oil reservoir. Thermophiles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema dos tipos de rochas em um sistema petrolífero.....	29
Figura 2 - Fotomicrografias de células de <i>Petrotoga mexicana</i> -DSM14811, com destaque para a estrutura toga (indicadas pelas setas). (a) e (b) Microscopia de contraste de fase de cultivo em meio P.mexicana, com 10 dias (aumento 1000x). (c) e (d) Microscopia eletrônica de varredura de cultivo em meio P.mexicana, com 3-4 dias.....	39
Figura 3 - Coleta de amostra de fluido produzido no Campo de Miranga, em setembro de 2011. (a) Coleta da amostra sendo realizada. (b) Detalhe da amostra no frasco de coleta. (c) Tanques de armazenamento da água que será injetada nos poços.....	46
Figura 4 - Imagem da Câmara de Neubauer e suas unidades. Os campos quadrados numerados foram os utilizados para a contagem das células.	61
Figura 5 - Ensaio com reagente DNS. Densidade Óptica x Concentração de Glicose (g/L).	65
Figura 6 - Fotomicrografia de contraste de fase de cultivo da amostra do poço MG414 em meio Zinder, com 64 dias de incubação (1500x). As células estão em cor escura, envolvidas pela toga, porção mais clara que alonga-se sobre as células, característica essa típica da classe Thermotogae.....	71
Figura 7 - Fotomicrografia de contraste de fase de cultivo em meio Postgate E-modificado. (a) Cultivo da amostra do poço MG414-F2 - 33 dias de incubação (1000x); (b) Cultivo da amostra do poço MG414-F2 - 63 dias de incubação (1500x).	72
Figura 8 - Fotomicrografia de contraste de fase de cultivo em meios seletivos para <i>Petrotoga</i> . (a) Cultivo em meio-P.mexicana - 14 dias de incubação (600x); (b) Cultivo em meio-P.olearia - 14 dias de incubação (600x). As setas indicam os morfotipos com toga.....	74
Figura 9 - Colônias crescidas em meio P.mexicana-sólido após 35 dias de incubação, em anaerobiose, a 60°C. (a) Imagem da placa de semeadura, aberta em fluxo laminar. (b) Aumento da imagem “a”	

com destaque para região delimitada, demonstrando as colônias obtidas.	75
Figura 10 - Fotomicrografia do isolado MG414-01 cultivado em meio P.mexicana - 10 dias de incubação (1000X).	75
Figura 11 - Fotomicrografia do isolado MG414-02 cultivado em meio P.mexicana - 10 dias de incubação (1000X).	76
Figura 12 - Fotomicrografia do isolado MG414-03 cultivado em meio P.mexicana - 10 dias de incubação (1000X).	76
Figura 13 - Microscopia de campo claro do isolado MG414-03, corado pela Técnica de Coloração Diferencial de Gram (1000x).	82
Figura 14 - Microscopia de campo claro da linhagem <i>Petrotoga mexicana</i> (DSM 14811) corada pela Técnica de Coloração Diferencial de Gram (1600x).	82
Figura 15 - Comparação entre os cultivos do isolado MG414-03 nas temperaturas de 40°C, 60°C e 80°C.	84
Figura 16 - Comparação dos cultivos do isolado MG414-03 nas salinidades de 20 g/L, 40 g/L, 70 g/L e 100 g/L de NaCl. Cultivos incubados em anaerobiose e a 60°C.	86
Figura 17 - Comparação dos cultivos do isolado MG414-03 em diferentes fontes de carbono (sacarose, xilose, maltose e xilana). Cultivos incubados em anaerobiose e a 60°C. A linha na cor preta representa o cultivo-controle, sem fonte de carbono principal adicionada ao meio.	88
Figura 18 - Comparação entre cultivos do isolado MG414-03 em meio com diferentes concentrações de Ampicilina (10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL). CN(-) = controle negativo, sem adição de inóculo. CN(+) = controle positivo, com inóculo, sem antibiótico.	92
Figura 19 - Comparação entre cultivos do isolado MG414-03 em meio com diferentes concentrações de Cloranfenicol (10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL). CN(-) = controle negativo, sem adição de inóculo. CN(+) = controle positivo, com inóculo, sem antibiótico.	93
Figura 20 - Comparação entre cultivos do isolado MG414-03 em meio com diferentes concentrações de Canamicina (10 µg/mL, 25 µg/mL, 50	

µg/mL, 100 µg/mL). CN(-) = controle negativo, sem adição de inóculo. CN(+) = controle positivo, com inóculo, sem antibiótico.....94

Figura 21 - Comparação entre cultivos do isolado MG414-03 em meio com diferentes concentrações de Vancomicina (10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL). CN(-) = controle negativo, sem adição de inóculo. CN(+) = controle positivo, com inóculo, sem antibiótico.....95

Figura 22 - Fotomicrografia de contraste de fase do isolado MG414-03 em 3-4 dias de cultivo em meio P. miotherma-DSMZ. Aumento: 1600x. 106

Figura 23 - Fotomicrografia de contraste de fase do isolado MG414-03 em 3-4 dias de cultivo em meio P. miotherma-DSMZ. Aumento: 640x. As setas indicam as formas esféricas do isolado. 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Gêneros do Filo Thermotogae habitantes exclusivos de reservatórios de petróleo.....	41
Tabela 2 - Pontos amostrados no Campo de Miranga (PETROBRAS) para coleta de fluidos produzidos e água de injeção.....	45
Tabela 3 - Composição do meio Zinder-modificado para recuperação de bactérias heterotróficas totais e arqueas.....	49
Tabela 4 - Composição do meio Postgate E-modificado para recuperação de bactérias redutoras de sulfato – BRS.....	49
Tabela 5 - Meio P.olearia - Enriquecimento.	50
Tabela 6 - Solução de Vitaminas - modificada utilizada nos preparo de meios para o isolamento de <i>Petrotoga</i>	51
Tabela 7 - Solução de metais-traço utilizada nos preparo de meios para o isolamento de <i>Petrotoga</i>	51
Tabela 8 - Meio P.mexicana - Enriquecimento.....	52
Tabela 9 - Composição dos meios indicados para o cultivo e manutenção das espécies <i>Petrotoga mexicana</i> , <i>Petrotoga mobilis</i> e <i>Petrotoga miotherma</i> , conforme indicado pela coleção alemã de culturas DSMZ.	53
Tabela 10 - Reagentes usados nas reações de PCR do fragmento de 16S DNAr. 57	
Tabela 11 - Composição do meio Ágar LB.....	58
Tabela 12 - Soluções usadas na extração do DNA plasmideal por lise alcalina.	59
Tabela 13 - Variáveis aferidas nos testes de crescimento do isolado MG414-03.	60
Tabela 14 - Dados do Ensaio com DNS para construção da curva-padrão de glicose. 65	
Tabela 15 - Parâmetros para conversão de Densidade Óptica em Concentração de Glicose (g/L).....	66
Tabela 16 - Dados do Ensaio com DNS para Curva-Padrão de Glicose.....	67
Tabela 17 - Parâmetros para conversão de Densidade Óptica em Concentração de Glicose (g/L).....	67

Tabela 18 - Identidade das sequências do DNAr 16S dos clones obtidos a partir dos cultivos preparados com os meios P.olearia e P.mexicana, analisadas no Banco Genômico NCBI.....	77
Tabela 19 - Identidade das sequências do DNAr 16S dos isolados MG414-01, MG414-02, MG414-03, analisadas no Banco Genômico NCBI.	79
Tabela 20 - Valores de similaridade do gene DNAr 16S para o isolado MG414-03 (ID 13-938) e linhagens relacionadas, com base na comparação da sequência completa.	81
Tabela 21 - Comparação dos Parâmetros Microbiológicos das Curvas de Crescimento do Teste de Temperaturas, por contagem de células totais em Câmara de Neubauer.....	85
Tabela 22 - Comparação dos Parâmetros Microbiológicos das Curvas de Crescimento do Teste de Temperaturas, por Densidade Óptica.	85
Tabela 23 - Comparação dos Parâmetros Microbiológicos das Curvas de Crescimento do Teste de Salinidade - NaCl, por Densidade Óptica.	87
Tabela 24 - Comparação dos Parâmetros Microbiológicos das Curvas de Crescimento do Teste com Fontes de Carbono Principal, por Densidade Óptica.	89
Tabela 25 - Comparação entre fontes de carboidratos consumidas pelas espécies de <i>Petrotoga</i> e o isolado MG414-03.	90
Tabela 26 - Influência dos antibióticos ampicilina, cloranfenicol, canamicina e vancomicina no crescimento do isolado MG414-03.	96
Tabela 27 - Comparação entre espécies do gênero <i>Petrotoga</i> e o isolado MG414-03, quanto à sensibilidade apresentada a alguns antibióticos.....	97
Tabela 28 - Dados do Ensaio DNS dos cultivos da linhagem <i>P. mexicana</i> (DSM14811) com CMC.....	99
Tabela 29 - Dados do Ensaio DNS dos cultivos da linhagem <i>P. mexicana</i> (DSM14811) com Xilana.....	99
Tabela 30 - Dados do Ensaio DNS dos cultivos com CMC da linhagem <i>P. mobilis</i> (DSM10674).	100
Tabela 31 - Dados do Ensaio DNS dos cultivos da linhagem <i>P. mobilis</i> (DSM10674) em meio com Xilana.	100

Tabela 32 - Comparação entre as quantidades de glicose liberada (g/L) nas reações dos extratos livres de células de <i>P. mexicana</i> (DSM 14811) e <i>P. mobilis</i> (10674) com os substratos CMC e xilana.	101
Tabela 33 - Atividade enzimática das linhagens <i>P. mexicana</i> DSM14811 e <i>P. mobilis</i> DSM10674 sobre os substratos xilana e CMC, expressas em [U/L].	102
Tabela 34 - Dados do Ensaio DNS dos cultivos do isolado MG414-03 em meio com CMC.	103
Tabela 35 - Dados do Ensaio DNS dos cultivos do isolado MG414-03 em meio com Xilana.	104
Tabela 36 - Comparação de algumas características fisiológicas e morfológicas entre espécies de <i>Petrotoga</i> e o isolado MG414-03.	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Ampicilina
BANHT	Bactérias Anaeróbias Heterotróficas Totais
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento de Bases Locais)
BRS	Bactérias Redutoras de Sulfato
BSA	Albumina do Soro Bovino
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Cálcio Diidratado
CFC	Cloranfenicol
CH_4	Metano
CM	Controle do Meio
CMC	Carboximetil Celulose
CO_2	Dióxido de Carbono
$\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Cobalto Heptaidratado
CS	Controle do Substrato
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Cobre Pentaidratado
D.O.	Densidade Óptica
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAr 16S	Ácido Desoxirrinucleico Ribossomal componente da subunidade 30S em ribossomos procariotos
DNS	Ácido Dinitrosalicílico
DNTP	Nucleotídeos Desoxirribonucleicos Trifosfato
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GMBH (Coleção Alemã de Microrganismos e Culturas Celulares GMBH)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio imunoabsorvente com ligação enzimática)
FB27	Primer Fowrrard Bacteriano 27
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Sulfato Ferroso Amoniacal Hexaidratado
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Ferro II Heptaidratado
$\text{H}_2\text{-CO}_2$	Mistura dos gases hidrogênio e dióxido de carbono
H_2O	água destilada
H_3BO_3	Ácido Bórico
HCl	Ácido Clorídrico
HM	Metanogênicos hidrogenotróficos
HPB-HD	Grupos microbianos produtores e consumidores de hidrogênio
IFSC -USP	Instituto de Física de São Carlos - Universidade de São Paulo
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosideo

K_2HPO_4	Fosfato de Potássio - Di básico
$KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$	Alúmen de Potássio
KAN	Kanamicina
KCl	Cloreto de Potássio
KH_2PO_4	Fosfato de Potássio - Mono básico
KOH	Hidróxido de Potássio
log	Logaritmo
M (mM)	Concentração Molar (mili-Molar)
MG377	Ponto de coleta de petróleo 377 - Campo de Miranga
MG414	Ponto de coleta de petróleo 414 - Campo de Miranga
MG495	Ponto de coleta de petróleo 495 - Campo de Miranga
MG-AI	Aguá de Injeção - Campo de Miranga
$MgCl_2.6H_2O$	Cloreto de Magnésio Hexaidratado
$MgSO_4$	Sulfato de Magnésio
$MgSO_4 \times 7 H_2O$	Sulfato de Magnésio Heptaidratado
$MnSO_4 \times H_2O$	Sulfato de Manganês Monoidratado
N	Número de Células por ml
N_2	Nitrogênio gasoso
Na_2HPO_4	Fosfato de Sódio - Di básico
$Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$	Molibdato de Sódio Diidratado
$Na_2S.9H_2O$	Sulfeto de Sódio Nonaidratado
$Na_2SeO_3 \times 5 H_2O$	Selenito de Sódio Pentaidratado
Na_2SO_4	Sulfato de Sódio - Di básico
NaCl	Cloreto de Sódio
$NaHCO_2$	Bicarbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)
NH_4Cl	Cloreto de Amônio
$NiCl_2 \times 6 H_2O$	Cloreto de Níquel Hexaidratado
O_2	Oxigênio gasoso
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PETROBRAS	Petróleo Brasileiro S.A.
RJ	Rio de Janeiro
RPM	Rotações por minuto
RU1492	Primer Reverse Universal 1492
SDS	Dodecil-Sulfato de Sódio
SFC	Cultivo sem adição de fonte de carbono
SORVAL	Tubo para centrifugação
Tris-HCl	Trisaminometano-Hidrocloreto

UO-BA	Unidade Operacional da Bahia - PETROBRAS
VAN	Vancomicina
Vol.	Volume
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-piranoside
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	Sulfato de Zinco Heptaidratado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	27
1.1 Contexto e justificativa	27
1.2 O petróleo e sua formação	27
1.3 As comunidades microbianas de reservatório de petróleo	30
1.4 O filo Thermotogae e o gênero <i>Petrotoga</i>	37
2 OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo geral.....	43
2.2 Objetivos específicos	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1 Caracterização dos pontos de amostragens.....	45
3.2 Preparo dos meios líquidos e sólidos para os cultivos em anaerobiose.	46
3.3 Meios de cultura utilizados e finalidades.....	48
3.3.1 Meios enriquecidos e seletivos para o crescimento bacteriano a partir das amostras dos fluidos produzidos.....	48
3.3.2 Meios de cultura para isolamento de bactérias do gênero <i>Petrotoga</i>	50
3.3.3 Meios de cultura para manutenção de espécies do gênero <i>Petrotoga</i>	52
3.4 Método de Coloração Diferencial de Gram.....	54
3.5 Teste de sensibilidade a antibióticos	54
3.6 Identificação dos isolados a partir da análise do DNAr 16S.	55
3.6.1 Extração do DNA dos meios.....	55
3.6.2 Reações em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do DNAr 16S.	57
3.6.3 Clonagem, sequenciamento e identificação dos microrganismos.	57
3.6.4 Identificação confirmatória dos isolados pela DSMZ.	59
3.7 Testes de crescimento do isolado MG414-03 frente a algumas variáveis	59
3.7.1 Método de análise de desempenho dos cultivos frente às variáveis testadas	62

3.8	Detecção de atividade enzimática sobre os substratos xilana e carboximetilcelulose (CMC) a partir de extratos de cultivos bacterianos.	62
3.8.1	Calibração do reagente DNS pela curva-padrão da glicose para o ensaio com <i>Petrotoga mexicana</i> -DSM14811 e <i>Petrotoga mobilis</i> -DSM 10674.	64
3.8.2	Calibração do reagente DNS pela curva-padrão da glicose para o ensaio com o isolado MG414-03.	67
3.8.3	Cálculo para estimativa da Atividade Enzimática (U/L).	68
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
4.1	Crescimento dos meios de cultura testados.....	71
4.1.1	Cultivos em meios líquidos enriquecidos e seletivos para a recuperação das bactérias dos fluidos produzidos.	71
4.1.2	Cultivos e isolamento em meios seletivos para morfotipos com toga - meio P.olearia e meio P.mexicana.	73
4.2	Identificação e caracterização das linhagens isoladas.....	77
4.2.1	Identificação e caracterização do isolado MG414-03 pelo Instituto Leibniz-DSMZ.....	80
4.2.2	Caracterização por técnica de coloração diferencial de Gram.	81
4.3	Testes de crescimento do isolado MG414-03 frente a algumas variáveis.	83
4.3.1	Teste com diferentes temperaturas.....	83
4.3.2	Teste com diferentes concentrações de NaCl.....	86
4.3.3	Teste com diferentes fontes de carbono.	87
4.4	Teste de sensibilidade a antibióticos.....	90
4.5	Testes de degradação de Xilana e CarboxiMetilCelulose.....	97
4.5.1	Ensaio com <i>Petrotoga mexicana</i> (DSM14811) e <i>Petrotoga mobilis</i> (DSM10674).....	98
4.5.2	Ensaio com o Isolado MG414-03.	103
4.6	Descrição do Isolado MG414-03.....	105
5	CONCLUSÕES.....	109
	REFERÊNCIAS	111

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contexto e justificativa

A presente dissertação derivou de um projeto fruto de uma parceria entre o IFSC-USP e a PETROBRAS S/A, intitulado “Caracterização da comunidade microbiana de reservatório de petróleo e possíveis efeitos da injeção de CO₂ nessa comunidade – Fase 2”, coordenado pela Profa. Nelma Regina Segnini Bossolan (IFSC-USP). Este projeto teve como objetivo geral a caracterização da comunidade microbiana de um reservatório de alta salinidade e alta temperatura, candidato à injeção de CO₂ para processos de recuperação de petróleo. A observação microscópica dos cultivos realizados no projeto indicou a presença de espécies bacterianas da ordem Thermotogales. Estes cultivos foram realizados em meios líquidos, em condições de anaerobiose e de temperatura e salinidade elevadas. Os membros desta ordem são considerados como microrganismos exclusivamente termofílicos e são conhecidos como habitantes comuns de reservatórios de petróleo. Desse modo, a identificação e a caracterização dos isolados desta ordem podem contribuir para a análise da diversidade e relações microbiológicas existentes neste tipo de ambiente. Além disso, o conhecimento de espécies bacterianas nativas de ambiente extremos, em termos de temperatura e salinidade, por exemplo, abre perspectivas para a exploração biotecnológica de suas células e/ou produtos celulares.

1.2 O petróleo e sua formação

O petróleo é predominantemente encontrado em rochas reservatório de bacias sedimentares e pode ser definido como “uma mistura complexa de hidrocarbonetos, além de outros compostos contendo enxofre, oxigênio, nitrogênio e constituintes organometálicos complexados com níquel e vanádio.” (1) O petróleo geralmente se apresenta associado à água, que contém sais minerais em solução. O estado físico do petróleo, considerando condições normais de temperatura e pressão, é predominantemente líquido, podendo assumir o estado gasoso quando a mistura contém uma porcentagem maior de componentes com baixo peso

molecular. (2) Desse modo, o petróleo varia amplamente em suas propriedades físicas e de composição, dependendo do reservatório de onde é extraído.

De acordo com o documento “Geologia do Petróleo,” (74) a formação e o acúmulo de petróleo em uma bacia sedimentar requer a associação de uma série de fatores:

- (a) a existência de rochas ricas em matéria orgânica, denominadas de rochas geradoras;
- (b) as rochas geradoras devem ser submetidas às condições adequadas (tempo e temperatura) para a geração do petróleo;
- (c) a existência de uma rocha com porosidade e permeabilidade necessárias à acumulação e produção do petróleo, denominada de rocha reservatório;
- (d) a presença de condições favoráveis à migração do petróleo da rocha geradora até a rocha reservatório;
- (e) a existência de uma rocha impermeável que retenha o petróleo, denominada de rocha selante ou capeadora; e
- (f) um arranjo geométrico das rochas reservatório e selante que favoreça a acumulação de um volume significativo de petróleo.

A figura 1 traz um esquema da localização destes tipos de rochas em um sistema petrolífero.

O tipo de petróleo gerado depende do tipo de matéria orgânica preservada na rocha geradora. Matérias orgânicas derivadas de vegetais superiores tendem a gerar gás, enquanto o material derivado de zooplâncton e fitoplâncton, marinho ou lacustre, tende a gerar óleo. A temperatura na qual a rocha geradora está gerando petróleo também irá influenciar o tipo de petróleo formado. Em condições normais, uma rocha geradora começa a transformar seu querogênio (matéria orgânica fóssil preservada e sedimentada na rocha) em petróleo em torno de 600°C. À medida que a temperatura aumenta, o óleo gerado vai ficando mais fluido e a quantidade de gás vai aumentando. Uma vez gerado o petróleo, ele passa a ocupar um espaço/volume maior na rocha geradora e a pressão excessiva do mesmo faz com que a rocha-fonte se fracture, permitindo a expulsão dos fluidos para zonas de pressão mais baixa. O trajeto dos fluidos petrolíferos até a chegada em um local portador de espaço poroso, selado e apto para armazená-los, é denominado de migração. (3)

Figura 1 - Esquema dos tipos de rochas em um sistema petrolífero

Fonte: PETROGASNEWS (75)

Como já indicado, os fluidos de petróleo são compostos principalmente de hidrocarbonetos (HC), pertencentes às seguintes classes químicas: alcanos ou parafinas, podendo apresentar-se na forma gasosa, líquida ou viscosa, dependendo do número de átomos de carbono nos alcanos normais; cicloalcanos ou naftenos, que incluem todos os HC cíclicos saturados e seus derivados; aromáticos, caracterizados pela presença de pelo menos um anel benzênico, ocorrendo sempre no estado líquido, e tendo o tolueno como o composto aromático mais comum no petróleo. (4)

A densidade do óleo fornece uma indicação da sua qualidade e está diretamente ligada ao seu valor comercial. Os produtores utilizam a escala do *American Petroleum Institute* e por isso denominada API, para qualificar o petróleo. Quanto maior for o valor API, mais leve é o óleo e, em geral, melhor o seu valor comercial. Uma API de 40, por exemplo, corresponde ao óleo leve, enquanto que uma API de 10 ou menos caracteriza um óleo pesado. (4)

1.3 As comunidades microbianas de reservatório de petróleo

O trabalho publicado por Bastin e colaboradores (76) é considerado por Magot (5) o primeiro sobre ecologia microbiana de reservatórios de petróleo. Os autores realizaram um estudo microbiológico das águas de produção de mais de 60 poços de petróleo dos Estados de Illinois e Califórnia nos Estados Unidos, mostrando que as bactérias redutoras de sulfato estavam presentes neste tipo de amostra e sugerindo que a origem das mesmas era a água conata.

O microbiologista americano Claude ZoBell também é reconhecido como um dos pioneiros no estudo da ecologia bacteriana de reservatórios de petróleo bem como na aplicação deste conhecimento nos processos de recuperação de petróleo e na compreensão da sua biodegradação. Em 1941 apresentou um trabalho¹ no encontro da Associação Americana de Geologistas do Petróleo (AAPG) que chamou a atenção destes profissionais para o assunto, levando-o a liderar, no ano seguinte, uma equipe de pesquisadores no *Scripps Institute of Oceanography* (Califórnia, EUA). No período de 1942 a 1954, esta equipe publicou uma série de artigos tratando de temas como o papel das bactérias na formação e transformação dos hidrocarbonetos do petróleo, dentre outros temas relacionados. (6)

Desde então, a microbiologia do petróleo vem se dividindo nas seguintes áreas de interesse: processos de diagênese² e oleogênese³ na formação do petróleo, biorrefinamento do petróleo (p.e., dessulfurização), biodegradação do petróleo, recuperação de petróleo dos reservatórios melhorada por microrganismos (MEOR, ou *microbial enhanced oil recovery*), mitigação dos problemas causados por microrganismos e/ou seus produtos durante a produção do petróleo (p.e., corrosão de tubulações, acidificação do óleo), e biorremediação de locais contaminados por petróleo e seus derivados. (6-7)

À parte a constituição do petróleo, as características físicas e químicas do reservatório podem determinar a presença e o desenvolvimento de microrganismos

¹ ZOBELL, C.E. Inferences on the possible role of microorganisms in the genesis of petroleum based upon recent observations. In: Proceedings Conference on the Origins of Oil. **Amer Assoc Petrol Geol**, Tulsa Oklahoma 39-44, 1941.

² Diagênese: processo de degradação química e biológica da matéria orgânica depositada na rocha sedimentar até a formação do querogênio.

³ Oleogênese: posterior soterramento e degradação térmica deste querogênio até sua transformação em óleo.

autóctones ou introduzidos. A temperatura é o principal fator limitante para o crescimento dos microrganismos em reservatórios de petróleo. Nestes locais, conforme a profundidade avança, a temperatura aumenta, em média, 3°C a cada 100 metros, podendo alcançar temperaturas de 130 a 150°C em reservatórios profundos. Entretanto, diferentes tipos de dados sugerem que a presença de bactérias autóctones em reservatórios pode ser limitada pelo intervalo de temperatura entre 80 e 90°C. A biodegradação de petróleo *in situ*, por exemplo, nunca foi observada em reservatórios cuja temperatura ultrapassou 82°C. A salinidade e pH das águas de formação também podem limitar a atividade bacteriana. A salinidade pode variar dentro do intervalo de 0,5 a 36% e o pH geralmente de 3 a 7. A pressão dentro dos reservatórios, que pode alcançar até 500 atm, não é considerada um impedimento ao desenvolvimento de bactérias, embora possa influenciar as suas propriedades fisiológicas ou metabólicas. (5,8)

As densidades populacionais observadas nas águas de produção de reservatórios geralmente não são elevadas. Contagens microscópicas indicam densidades desde algumas células até 10^4 bactérias por mililitro; excepcionalmente, podem chegar a 10^5 – 10^6 bactérias por mililitro. Estas densidades populacionais baixas indicam que este tipo de ambiente impõe limites nutricionais ao desenvolvimento de bactérias ou que este é limitado por outros parâmetros físico-químicos. (5)

Os tipos de processos metabólicos que ocorrem em reservatórios de petróleo dependem, em grande medida, da disponibilidade de aceptores de elétrons. O oxigênio dissolvido é ausente mesmo em reservatórios rasos e alcançados por água meteórica. Desse modo, apenas microrganismos com metabolismo anaeróbio podem prosperar em reservatórios de petróleo. O nitrato também é limitante na maioria dos reservatórios de petróleo a menos que adicionado com os fluidos injetados. Algumas linhagens isoladas de reservatório usam o Fe(III) comoceptor de elétrons, mas não está claro a origem e a permanência deste íon em reservatórios de petróleo. Sulfato e minerais de carbonato estão presentes nas águas de formação de reservatórios, sendo por isso, aceptores de elétrons importantes nestes ambientes. Assim, pode-se supor que os principais processos metabólicos em reservatórios são a redução de sulfato, a metanogênese e a fermentação. Os doadores de elétrons em reservatórios de petróleo incluem hidrogênio, ácidos graxos voláteis (tais como acetato, propionato e benzoato),

hidrocarbonetos de petróleo (aromáticos, com variado número de anéis, e alifáticos de vários comprimentos de cadeia) e doadores de elétrons inorgânicos (por exemplo, o sulfeto). (5,9)

A seguir faremos uma breve descrição dos grupos bacterianos encontrados em reservatórios, considerando os principais processos metabólicos ali ocorrentes: bactérias redutoras de sulfato (BRS), bactérias metanogênicas e bactérias fermentadoras.

Bactérias redutoras de sulfato (BRS) constituem um grupo grande e heterogêneo de procariotos estritamente anaeróbios que partilham a capacidade de respiração anaeróbica utilizando sulfato comoceptor terminal de elétrons e compostos orgânicos ou hidrogênio como doadores de elétrons (AH_2), de acordo com a seguinte reação: $4AH_2 + SO_4^{-2} + H^+ \rightarrow 4A + HS^- + 4H_2O$ (10). BRS foram os primeiros microrganismos recuperados a partir de reservatórios de petróleo; desde então, as bactérias redutoras de sulfato isoladas de reservatório pertencem aos seguintes táxons: ordens Desulfovibrionales, Desulfobacterales e Syntrophobacterales (classe β -Proteobacteria); ordem Clostridiales (filo Firmicutes); filo *Thermodesulfobacterium*; gênero *Archaeoglobus* (domínio Archaea). (9) O estudo das BRS em reservatórios é de especial importância pois elas estão associadas a um problema denominado “Acidificação” (*Souring*), decorrente da injeção de água salina em reservatórios nos processos de recuperação secundária de petróleo.

Acidificação do reservatório é caracterizada por um aumento na produção de gás sulfídrico (H_2S), resultante da injeção de água salgada ou do mar com altos níveis de sulfato. A presença de sulfato, de nitrogênio e fontes de fósforo na água de injeção, a redução da temperatura do reservatório devido à injeção de fluidos frios de deslocamento, e os doadores de elétrons presentes no reservatório (ácidos orgânicos e hidrocarbonetos) criam condições favoráveis para o crescimento de BRS com consequente produção de H_2S como parte de seu metabolismo. O aumento de H_2S (conhecido como acidulante) no reservatório está associado com a corrosão das tubulações, estruturas de plataforma e outros equipamentos; com o aumento nos custos de refino de petróleo e gás; com o entupimento de reservatórios pelo acúmulo de minerais sulfurosos; e com o aumento dos riscos de saúde humana devido à toxicidade do H_2S . (9)

O isolamento de procariotos metanogênicos a partir de fluidos de poços de petróleo com salinidades variadas e na faixa mesofílica de temperatura tem sido bem sucedido. A metanogênese é um processo onipresente nos campos de petróleo, que foi relatado pela primeira vez no início dos anos 1950 e foi bem documentado por microbiologistas russos. (11) Os metanogênicos metabolizam hidrogênio e CO₂, acetato, metilamina e dimetilsulfeto, com a concomitante produção de metano (CH₄). Os metanogênicos isolados de reservatório pertencem a quatro ordens do filo Euryarchaeota (domínio Archaea): Methanomicrobiales, Methanobacteriales, Methanosarcinales e Methanococcales. (9) Em vários reservatórios de petróleo estudados, observou-se que as condições metanogênicas predominam na ausência de aceptores de elétrons como o sulfato, por exemplo. Em reservatórios de baixa temperatura, a presença de metano biogênico muitas vezes tem sido associada com a biodegradação do óleo. (11)

Bactérias fermentadoras mesófilicas, termofílicas e hipertermofílicas constituem uma importante comunidade microbiana de reservatórios de petróleo. A energia que estas bactérias obtêm através da fosforilação em nível de substrato pode ser adquirida a partir de uma grande variedade de compostos orgânicos, incluindo açúcares, peptídeos, aminoácidos ou ácidos orgânicos. Algumas destas bactérias podem utilizar compostos inorgânicos de enxofre (enxofre elementar ou tiosulfato), ferro férrico ou nitrato como aceptores de elétrons para oxidar seus substratos, realizando, portanto, a respiração. Elas também podem crescer em uma faixa ampla de salinidade, dentro dos limites de halofilia discreta ou moderada. (12)

Uma grande parte das bactérias fermentadoras termofílicas recuperadas a partir de amostras de água/óleo de reservatório de petróleo são membros ou do filo Thermotogae ou da ordem Thermoanaerobacteriales (classe Clostridia, filo Firmicutes). Thermotogae é um filo exclusivo de bactérias fermentadoras anaeróbias termofílicas. Os membros de Thermotogae podem degradar carboidratos complexos, gerando acetato e hidrogênio como produtos finais. Algumas espécies de Thermotogae têm sido frequentemente isoladas de reservatórios de petróleo de alta temperatura, sugerindo uma origem exclusiva deste tipo de ambiente. (9) Dentre os dez gêneros reconhecidos deste filo (13), *Geotoga*, *Petrotoga* e *Oceanotoga* são considerados exclusivos deste ambiente. O filo Thermotogae será abordado com mais detalhes no item 1.3. Membros da ordem Thermoanaerobacteriales (Firmicutes) pertencentes aos gêneros *Thermoanaerobacter*,

Thermoanaerobacterium, *Caldanaerobacter* e *Mahella* são também comumente isolados de reservatório, todos eles fermentadores de carboidratos. Da ordem Clostridiales, destacam-se as espécies *Anaerobaculum thermoterrenum*, fermentadora de ácidos orgânicos, e *Thermovirga lienii*, degradadora de aminoácidos. (9)

Estudos para a caracterização da comunidade microbiana de ambientes de subsuperfície (solo, sedimento e água) tem se valido das ferramentas moleculares (ou “independentes de cultivo”), uma vez que somente uma pequena parte dos microrganismos (0,0001-0,1%) ali presentes pode ser recuperada por meio de cultivo – muitos têm velocidades de crescimento baixas e/ou são de difícil cultivo em laboratório. (14-15) Estudos baseados na análise do gene do rRNA 16S têm se mostrado importantes para reservatórios de petróleo, contribuindo para a compreensão da estrutura e metabolismo das comunidades microbianas ali presentes. Desde 1996, vários estudos de diversidade microbiana baseados no rRNA 16S foram conduzidos em reservatórios de petróleo, continentais e marinhos, de baixas e altas temperaturas. (16-21) Comparados aos estudos realizados em outros ecossistemas, as informações disponíveis (número de estudos e número de sequências analisadas) ainda são esparsas. No entanto, estes estudos baseados no rRNA 16S não alteraram de forma significativa a noção prevalente da composição da comunidade microbiana de reservatórios, mas sim confirmaram muitos dos resultados obtidos com os métodos dependentes de cultivo. Esse fato reforça a necessidade de se adotar estas duas abordagens na análise da diversidade microbiana deste tipo de ambiente. (9)

Mais recentemente, o sequenciamento em larga escala (NGS, de *Nex Generation Sequencing*) de fragmentos de genes de rRNA 16S de Bacteria e Archaea tem sido utilizado para a caracterização microbiana de subsuperfície, particularmente de reservatórios de petróleo. (22-23) Este tipo de análise permite a leitura de um número maior de fragmentos de DNA obtidos do ambiente, podendo identificar espécies numericamente pouco representativas, e por isso fornecendo uma visão mais ampliada das comunidades microbianas presentes no ambiente estudado. Outra técnica molecular que proporciona a análise da estrutura e composição de espécies em comunidades microbianas é a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (24), que permite a separação de fragmentos de DNA de mesmo tamanho de acordo com a diferença nas sequências de

nucleotídeos. (25) Esta técnica é particularmente interessante para se monitorar mudanças espaciais e temporais da população microbiana no ambiente, afetadas ou não por impactos externos. (26-27)

O interesse da indústria do petróleo na caracterização das comunidades microbianas de reservatórios reside basicamente (a) na compreensão e resolução de problemas advindos da presença ou ação dos microrganismos nos reservatórios e no óleo gerado e (b) na aplicação *in situ* ou *ex situ* de células ou produtos celulares para o biorrefino do óleo e para os processos de recuperação do petróleo. Um dos principais problemas por microrganismos refere-se à acidificação do reservatório e problemas de corrosão associados, como já mencionado anteriormente. Já com relação ao aspecto positivo da ação microbiana nestes ambientes, a utilização de microrganismos em processos de recuperação de petróleo, chamada tecnicamente de MEOR (*microbial enhanced oil recovery*), tem gerado bons resultados em testes de campo. O interesse reside na produção *in situ*, pelos microrganismos, de produtos celulares como exopolissacarídeos (para o bloqueamento de certas zonas-ladrão do reservatório, que desviam a água injetada para auxiliar a extração do óleo) ou de gases, ácidos, biossurfactantes (que alteram viscosidade ou aderência do óleo na rocha, facilitando seu deslocamento). Basicamente, existem três estratégias para a implementação de MEOR em campo: (a) a injeção de nutrientes para estimular populações autóctones de microrganismos; (b) quando da ausência de populações adequadas de microrganismos autóctones, injetar microrganismos exógenos e nutrientes; (c) nos caso onde as condições dos reservatórios são impeditivas ao bom desenvolvimento de microrganismos autóctones ou introduzidos, injetar produtos celulares produzidos *ex situ*. (9)

A seguir destacaremos alguns trabalhos que tratam da caracterização da comunidade microbiana de reservatórios de petróleo e que têm como objetivos a compreensão dos papéis metabólicos desempenhados pelas bactérias autóctones bem como a aplicação direta deste conhecimento em processos de interesse da indústria do petróleo.

Korenblum e colaboradores (28) realizaram estudo em amostras das águas de injeção utilizadas em três plataformas de petróleo *offshore* (Bacia de Campos, RJ) com o objetivo de determinar as comunidades bacterianas ali presentes por métodos moleculares e correlacionar sua presença ao tratamento dado a estas águas antes de injetá-las no reservatório. As autoras identificaram nas amostras

espécies bacterianas relacionadas aos processos de acidificação e corrosão, e que potencialmente poderiam estar ativas no reservatório e sistemas de tubulação, mesmo após o tratamento das águas de injeção com biocidas.

Gieg e colaboradores (29), em revisão sobre o tema da acidificação biológica de reservatórios, destacam o potencial do tratamento biológico com nitrato e nitrito no controle deste processo. O nitrato pode ser facilmente transportado em uma formação petrolífera e pode inibir a sulfetogênese microbiana, processo este que pode contribuir para a acidificação dos reservatórios. A caracterização das espécies redutoras de sulfato e redutoras de nitrato de um reservatório pode orientar na escolha do tratamento adequado no controle deste processo.

Ren e colaboradores (30) determinaram a composição bacteriana de dois poços de produção adjacentes e da água de injeção do reservatório de Gudao, na China, com o objetivo de verificar como a estrutura da comunidade microbiana do reservatório é afetada pelos microrganismos injetados. A temperatura média dos poços amostrados era de 69,5°C. Os autores demonstraram que os microrganismos dos poços de produção não estão significativamente relacionados com os presentes na água de injeção, e que as comunidades microbianas dos dois poços adjacentes eram diferentes. Propõem que uma das razões para as diferentes composições microbianas dos poços de produção e da água de injeção pode ser a diferença distinta de temperatura, oxigênio dissolvido e disponibilidade de nutrientes entre o sistema de recirculação de água de injeção e camadas de petróleo do subsolo. Outro fator considerado é o efeito de peneira que a matriz rochosa exerce sobre as células mais volumosas da água de injeção, explicando a sua não detecção nos fluidos produzidos. Os autores concluíram ainda que há um grande número de microrganismos inexplorados no reservatório estudado: a análise da biblioteca de clones mostrou que 44,9% das sequências bacterianas e 20% das sequências de arqueas tinham identidade inferior a 97% com as sequências de referência no banco de dados utilizado.

Sugai e colaboradores (31) realizaram cultivos experimentais sob uma atmosfera de 10% de CO₂ para identificar os grupos microbianos produtores e consumidores de hidrogênio (HPB-HD) e metanogênicos hidrogenotróficos (HM), a partir de amostras de água de produção de reservatório de petróleo no Japão. Este estudo teve como foco verificar a conversão microbiana do CO₂ em metano (CH₄) com o objetivo de se avaliar a recuperação de reservatórios utilizados para

armazenamento geológico de CO₂ sequestrado do ambiente. Espécies como *Thermotoga* sp, *Thermoanaerobacter* sp e *Petrotoga* sp foram isoladas dos cultivos mistos realizados e são reconhecidas como espécies produtoras de hidrogênio. O controle de espécies bacterianas autóctones produtoras de hidrogênio (como por exemplo, *Petrotoga* e *Anaerobaculum*) e das que convertem CO₂ em metano (por exemplo, espécies do gênero *Methanothermococcus*) em reservatórios candidatos a injeção de CO₂ pode dar um indicativo dos processos ali ocorrentes em termos de consumo do CO₂ injetado.

Nazina e colaboradores (32) realizaram estudo para investigar a biodiversidade e o potencial biotecnológico dos microrganismos de um reservatório de petróleo carbonático na Rússia, com vistas à recuperação de petróleo. Em processos de recuperação de petróleo melhorada por microrganismos (MEOR, de *microbial enhancement of oil recovery*), bactérias nativas ou injetadas são estimuladas a crescer no reservatório de modo que seus produtos metabólicos (ácidos, por exemplo) auxiliem na liberação do óleo preso à rocha, diminuindo sua viscosidade, por exemplo. Como resultado da análise das comunidades microbianas recuperadas em cultivos seletivos e enriquecidos, os autores indicaram como adequado o método tradicional, que estimula *in situ* o crescimento de bactérias fermentadoras, por meio da adição de melaço de cana como fonte de carbono, ao invés de injetar no reservatório grandes quantidades de bactérias crescidas em fermentadores. Para suprimir o crescimento das bactérias redutoras de sulfato, os autores sugeriram a adição de altas concentrações de nitrato.

1.4 O filo Thermotogae e o gênero Petrotoga

O filo Thermotogae é compreendido por muitas bactérias termofílicas e hipertermofílicas, juntamente com uma espécie mesófila recentemente identificada (33). A principal característica distintiva das bactérias deste filo é a presença de uma bainha tipo-toga, constituindo-se em uma membrana externa atípica (figura 2). Esta estrutura é formada pela expansão do espaço periplasmático nos pólos das células, em formato semelhante a balões, servindo como barreira para o meio externo e também proporciona uma estrutura para a organização de enzimas

degradadoras de polissacarídeos expostos na superfície da célula, permitindo a utilização de fontes de carbono insolúveis. (78)

O filo é composto por um grupo de bactérias anaeróbias, Gram-negativas, não esporuladoras, organotróficas, fermentadoras de carboidratos simples e complexos e outros compostos orgânicos complexos. As espécies foram isolados a partir de uma variedade de ambientes geotérmicos ou vulcânicos aquecidos, incluindo reservatórios de petróleo, fontes hidrotermais, fontes termais terrestres, etc. (34) Uma grande variedade de enzimas de espécies deste filo, especialmente de *T. maritima*, foram isoladas e estudadas desde 1980, com a característica de exibirem alta termoestabilidade. (35)

Figura 2 - Fotomicrografias de células de *Petrotoga mexicana*-DSM14811, com destaque para a estrutura toga (indicadas pelas setas). (a) e (b) Microscopia de contraste de fase de cultivo em meio P.mexicana, com 10 dias (aumento 1000x). (c) e (d) Microscopia eletrônica de varredura de cultivo em meio P.mexicana, com 3-4 dias.

(a)

(b)

(c)

(d)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os livros de referência de taxonomia bacteriana “Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – volume 1” (36) e “The Prokaryotes – volume 7” (35) apresentam o filo Thermotogae contendo uma classe (Thermotogae), uma ordem (Thermotogales) e uma família (Thermotogaceae). A edição mais recente do “The Prokaryotes” (13) apresenta quarenta e uma espécies para este filo, distribuídas em dez gêneros diferentes: *Defluviitoga*, *Fervidobacterium*, *Geotoga*, *Kosmotoga*, *Marinitoga*, *Mesotoga*, *Oceanotoga*, *Petrotoga*, *Thermosipho* e *Thermotoga*. Esta edição ainda propõe a adição de duas novas ordens– Kosmotogales e Petrotogales - e duas famílias na ordem Thermotogales já existente – Thermotogaceae e Fervidobacteriaceae -, baseado no compartilhamento entre as espécies de diferentes CSI's (*conserved signature inserts and deletions*), que são um tipo de marcador molecular (no caso, são inserções ou deleções de aminoácidos presentes em regiões conservadas de certas proteínas, transferidas à descendência).

A primeira espécie identificada pertencente a este filo foi *Fervidobacterium nodosum*, descrita em 1985 por Patel e colaboradores (37), originalmente isolada de fontes termais da Nova Zelândia. Logo após, em 1986, foi identificada *Thermotoga maritima*, espécie-tipo do gênero *Thermotoga*, isolada de uma fonte geotérmica marinha na Itália. (38) Desde então várias espécies de Thermotogae têm sido isoladas de ambientes termo- e hipertermofílicos.

Membros de *Geotoga* e *Petrotoga* foram isolados pela primeira vez a partir de reservatórios de petróleo (39), sendo classificados como *Geotoga petraea*, *Geotoga subterranea* e *Petrotoga miotherma*. A tabela 1 mostra os gêneros deste filo considerados exclusivos de reservatórios de petróleo. Cabe lembrar que outros gêneros do filo, como *Thermotoga*, *Kosmotoga* (77) e *Thermosipho* (12), contêm espécies que também foram isoladas de reservatórios, porém não são exclusivos deste ambiente.

Tabela 1 - Gêneros do Filo Thermotogae habitantes exclusivos de reservatórios de petróleo.

Gênero	Espécie	Local de isolamento	Referência
Geotoga	<i>G. petrea</i>	Água de produção de reservatório de petróleo de Oklahoma e Texas (EUA).	Davey et al., 1993 (39)
	<i>G. subterranea</i>		
Petrotoga	<i>P. miotherma</i>	Água de produção de poços de reservatório offshore do Mar do Norte.	Lien et al., 1998 (40)
	<i>P. mobilis</i>		
	<i>P. olearia</i>	Fluidos produzidos de reservatório <i>onshore</i> da Sibéria Ocidental (Russia).	L'Haridon et al., 2002 (41)
	<i>P. sibirica</i>		
	<i>P. mexicana</i>	Fluidos produzidos de reservatório no Golfo do México (México).	Miranda-Tello et al., 2004 (42)
	<i>P. halophila</i>	Fluidos produzidos de reservatório offshore do Congo (África Ocidental).	Miranda-Tello et al., 2007 (43)
Oceanotoga	<i>P. japonica</i>	Fluidos produzidos do reservatório Yabase (Japão).	Purwasena et al., 2014 (44)
	<i>O. teriensis</i>	Fluidos produzidos de um reservatório <i>offshore</i> da Índia.	Jayasinghearachchi & Lal, 2011 (45)

Fonte: Elaborada pelo autor.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Isolar e caracterizar bactérias da classe Thermotogae a partir de fluidos de reservatório de petróleo brasileiro, com vistas a contribuir para o conhecimento da diversidade e das relações microbiológicas existentes neste tipo de ambiente.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar bactérias da classe Thermotogae a partir de fluidos de reservatório de petróleo com alta temperatura e alta salinidade;
- Verificar as condições ótimas de crescimento do(s) isolado(s) quanto à fonte de carbono utilizada, temperatura e salinidade do meio;
- Identificar o(s) isolado(s) com base no gene do RNAr 16S;
- Caracterizar o(s) isolado(s) quanto a alguns parâmetros fisiológicos e morfológicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização dos pontos de amostragens

Amostras de fluidos produzidos de reservatório de petróleo foram utilizadas como inóculo para os cultivos e posterior isolamento de gêneros bacterianos da ordem Thermotogales. As amostras foram coletadas em três poços de um reservatório arenítico do Campo de Miranga (PETROBRAS), localizado no estado da Bahia. A produção de petróleo deste reservatório é alcançada por meio da recuperação secundária por injeção de água. Estas amostras coletadas na boca de poço correspondem a uma mistura de água e petróleo, e apresentam uma salinidade média de 70g/L de NaCl. A temperatura média do reservatório é de 60°C e o pH situa-se no intervalo entre 6,6-6,8. A profundidade média dos poços é de 1.100 metros. As amostras bem como as informações a respeito do reservatório foram fornecidas pela equipe técnica da Unidade Operacional da Bahia (UO-BA) da PETROBRAS.

As amostras recebidas foram provenientes dos poços de produção e água de injeção, foram coletadas em 05/09/2011 (tabela 2) e mantidas em refrigeração durante o transporte até o momento do inóculo nos meios de enriquecimento, feitos no dia 08/09/2011. A figura 3 mostra a coleta em um poço de produção, um frasco com amostra de água/óleo e um tanque de armazenamento de água de injeção.

Tabela 2 - Pontos amostrados no Campo de Miranga (PETROBRAS) para coleta de fluidos produzidos e água de injeção.

Pontos Amostrados	
MG AI	Água de Injeção ¹
MG 377	
MG 414	Poços
MG 495	

Fonte: Elaborada pelo autor

1. Água previamente tratada, armazenada em tanques, usada para pressurizar reservatórios de petróleo que não produzem mais espontaneamente. Esta é injetada através de uma perfuração profunda (poço de injeção) e adjacente ao reservatório.

Figura 3 - Coleta de amostra de fluido produzido no Campo de Miranga, em setembro de 2011. (a) Coleta da amostra sendo realizada. (b) Detalhe da amostra no frasco de coleta. (c) Tanques de armazenamento da água que será injetada nos poços.

(a)

(b)

(c)

Fonte: Elaborada pelo autor. Credito: Nelma R. S. Bossolan

3.2 Preparo dos meios líquidos e sólidos para os cultivos em anaerobiose.

Os meios de cultura para cultivo de microrganismos anaeróbios são basicamente semelhantes a qualquer meio de cultura, podendo ser simples ou complexos, mas diferem basicamente quanto à forma de acondicionamento que devem ser feitas em frascos hermeticamente fechados, e isentos de oxigênio (O_2) em suas fases líquidas e gasosas no interior destes recipientes.

Os meios podem ser preparados como uma única mistura que é esterilizada a $121^\circ C$ após eliminar o oxigênio (O_2) interno, substituindo-o por gases como N_2 , H_2 - CO_2 ou Argônio. Também é comum o preparo de três soluções em separado,

contendo respectivamente, a fonte principal de carbono (carboidrato, por exemplo), fatores de crescimento (solução de vitaminas, de elementos-traço, extrato de levedura, aminoácidos) e soluções tamponantes. (46)

Neste trabalho, foram preparados 8 meios de cultura diferentes, cujas composições serão apresentadas ao final deste tópico:

- meio Zinder (47)
- meio Postgate E - modificado (48)
- meio P.mexicana - Enriquecimento (42),
- meio P.olearia - Enriquecimento (41),
- meio P.mexicana-DSMZ (49).
- meio P.mobilis-DSMZ (49).
- meio P.miotherma-DSMZ (49).

Estes meios foram preparados em soluções separadas de alguns de seus compostos como: fontes de carbono (glicose, xilose, sacarose, maltose), extrato de levedura, triptona, vitaminas, metais-traço, agentes redutores (Tioglicolato de Sódio, Sulfeto de Sódio) e aceptores de elétron (tiosulfato de sódio e sulfato ferroso amoniacal), que foram adicionados no momento em que o inóculo ocorreu a partir de soluções estéreis, como sugere a literatura. Todas estas soluções foram esterilizadas por filtração em membrana de celulose regenerada 0,22 μm (Millipore^R), acondicionadas em frascos estéreis, purgadas com N_2 para retirada do O_2 , e armazenadas a 4°C, na geladeira.

Os meios testados tiveram sua concentração salina ajustada para corresponder à salinidade média do reservatório que foram coletadas as amostras, que no caso foi de 70g/L de NaCl.

Os agentes redutores utilizados nos meios preparados foram o tioglicolato de sódio e o sulfeto de sódio. Uma solução preparada com agente redutor normalmente é adicionada a um meio para cultivo para remover oxigênio residual do meio, uma vez que reage com este gás e abaixa o potencial redutor para o nível exigido para o cultivo.

O agente solidificante utilizado nos meios sólidos preparados para o isolamento das linhagens bacterianas foi a agarose. Ágar bacteriológico e Phytigel® também foram testados como agentes solidificantes, porém as condições de temperaturas de incubação e salinidades dos meios testadas nos cultivos impediram uma solidificação homogênea dos meios em placa de Petri. Em testes prévios

realizados para a verificação do comportamento dos agentes solidificantes à temperatura de 60°C e em concentração salina que variou de 0,0 a 7,0 g/L de NaCl, observou-se que o meio não se solidificou em nenhuma concentração salina quando utilizado o ágar bacteriológico. Já com o Phytigel®, observou-se que o composto não formava uma matriz homogênea, apresentando grumos e, muitas vezes, não era obtida a firmeza necessária para o espalhamento das amostras.

3.3 Meios de cultura utilizados e finalidades

3.3.1 Meios enriquecidos e seletivos para o crescimento bacteriano a partir das amostras dos fluidos produzidos.

Os meios utilizados para a recuperação de bactérias dos fluidos produzidos e água de injeção foram o Meio Zinder modificado do autor (47) e meio Postgate E modificado (48) (tabelas 3 e 4). O meio Zinder foi utilizado para recuperação de arqueas e de bactérias heterotróficas totais. Para a recuperação destas últimas, ao meio original foram adicionadas outras fontes de carbono: glicose (10 mM), acetato de sódio (10 mM), formiato de sódio (0,5 mM), metanol (0,5 mM). Essas concentrações foram calculadas de modo a manter uma osmolaridade tolerável para as células bacterianas. O meio Postgate E modificado foi utilizado para recuperar bactérias redutoras de sulfato (BRS), comuns neste tipo de amostra.

Como os fluidos produzidos não contém uma quantidade grande de bactérias viáveis, as amostras foram concentradas em 4X, por centrifugação (10 minutos a 3.000 rpm), e o volume do inóculo aumentado para 20% (em relação ao volume final). Após esse procedimento, 50 mL de inóculo foram adicionados a 200 mL de meio, acondicionados em frasco de 500 mL. Os inóculos foram feitos em réplica.

Tabela 3 - Composição do meio Zinder-modificado para recuperação de bactérias heterotróficas totais e áruqueas.

Composição	g/L
NH ₄ Cl	0,5
KH ₂ PO ₄	0,4
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0,10
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,05
Na ₂ HPO ₄	1,2
NaCl ¹	70
Solução Traço de Metais ²	10 mL
Solução de Vitaminas ²	10 mL
Solução Sulfeto de Sódio (5%) ²	10 mL
Solução de Bicarbonato de Sódio (10%) ²	10 mL
Resazurina (0,1%)	1 mL
Fonte de Carbono ³	11 mL
H ₂ O MiliQ q.s.p.	1000mL

Fonte: Adaptada de ZINDER et al. (47)

1. Salinidade informada como adequada para as amostras de Miranga, respectivamente.
2. Soluções a serem adicionadas no momento do inóculo.
3. Adicionado no momento do inóculo nas quantidades a seguir: 10 mL de Acetato de Sódio 1M (10mM final); 0,5 mL de Formiato de Sódio 1M (0,5mM final); 0,5 mL de Metanol 20% (0,5mM final); Glicose (10 mM).

Tabela 4 - Composição do meio Postgate E-modificado para recuperação de bactérias redutoras de sulfato – BRS.

Composição	g/L
K ₂ HPO ₄	0,5
NH ₄ Cl	1,0
Na ₂ SO ₄	1,0
CaCl ₂ . 6 H ₂ O	1,0
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	1,83
Lactato de Sódio (50% p/v)	7,0 mL
Extrato de levedura	1,0
Ácido ascórbico	0,1
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0 0,5
Agar-agar	1,9
Acetato de sódio 1M	2,0
Resazurina (solução 0,1% p/v)	1,0 mL
NaCl ¹	70
Tioglicolato de Sódio ²	0,124
Água MiliQ	1000 mL
pH	7,6

Fonte: Adaptada de POSTGATE (48)

1. Salinidade informada como adequada para as amostras de Miranga.
2. Este reagente (reduor) deve ser preparado em solução-mãe (1,24g/100mL), sob purga de N₂, e esterilizado separadamente. Posteriormente, adicionar alíquotas de 0,1mL para cada 9,0mL de meio já esterilizado, após resfriamento dos mesmos.

3.3.2 Meios de cultura para isolamento de bactérias do gênero *Petrotoga*.

Dois meios de cultura foram preparados para a tentativa de isolamento de espécies da ordem Thermotogales, após a certificação da presença de morfotipos bacterianos com a presença de toga (estrutura característica das espécies da ordem Thermotogales) nos cultivos com os meios Zinder e Postgate E-modificado. Os meios testados foram os descritos na literatura para o cultivo específico de espécies do gênero *Petrotoga*, a saber: a) meio descrito para o cultivo de *Petrotoga olearia*, conforme o L'Haridon e colaboradores (41) com adaptação das fontes de vitaminas e metais-traço, aqui denominado de meio P.olearia (tabelas 5-7); b) meio descrito para o cultivo de *Petrotoga mexicana*, conforme Miranda-Tello e colaboradores (42), aqui denominado de meio P.mexicana (tabela 8).

O preparo dos meios foi feito de modo a se obter volumes finais de 20 mL, em frascos de penicilina de 40 mL, garantindo um *headspace* de N₂, referente à atmosfera interna do frasco. Após esterilizar os meios de cultura, foram adicionadas as soluções filtradas e mantidas em atmosfera de N₂, correspondentes a cada meio. O inóculo foi feito a partir de uma alíquota retirada de um cultivo rico em células, e representando 10% do volume final do meio de cultura de 20 mL estéril. A observação do crescimento bacteriano nos cultivos foi feita em microscopia de contraste de fase (Olimpus-BX53).

Tabela 5 - Meio P.olearia - Enriquecimento.

Composição	g/L
NaCl	20
NH ₄ Cl	0,33
KH ₂ PO ₄	0,33
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0,33
CaCl ₂ . H ₂ O	0,33
Peptona	1,5
Triptona	1,5
Extrato de Levedura	1,5
Solução de Metais-Traço (52) ¹	10 mL
Solução de Vitaminas (51) ¹	2 mL
NaHCO ₃ ¹ (Solução aquosa - 4%)	25 mL
Na ₂ S . 9 H ₂ O ¹ (Solução aquosa - 5%)	10 mL
Água Mili-Q	1000 mL
pH	(6,8 - 7,0)

Fonte: Adaptada de L'HARIDON et al. (41)

1. O reagente é pesado em condições de esterilidade e dissolvido em água do pré-esterilizada por filtração em membrana Millipore® 0,22µm sob fluxo de N₂. Posteriormente, deve ser adicionado ao meio já esterilizado, através de alíquota calculada e sob purga de N₂ filtrado.

Tabela 6 - Solução de Vitaminas - modificada utilizada nos preparo de meios para o isolamento de *Petrotoga*.

Compostos	L ⁻¹
Biotina	2 mg
Ácido Fólico	2 mg
Pyridoxina-HCl	10 mg
Tiamina-HCl . 2 H ₂ O	5 mg
Riboflavina	5 mg
Ácido Nicotínico	5 mg
D-Ca-Pantotenato	5 mg
Vitamina B12	0,1 mg
Ácido p-Aminobenzoico	5 mg
Ácido Tioctico	5 mg

Fonte: Adaptada de WOLIN et al. (51)

Tabela 7 - Solução de metais-traço utilizada nos preparo de meios para o isolamento de *Petrotoga*.

Compostos	L ⁻¹
Ácido Nitrilotriacético ¹	1,5 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	3 g
MnSO ₄ . H ₂ O	0,5 g
NaCl	1 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,1 g
CoSO ₄ . 7 H ₂ O	0,18 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,10 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,18 g
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,01 g
KAl(SO ₄) ₂ . 12 H ₂ O	0,02 g
H ₃ BO ₃	0,01 g
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,01 g
NiCl ₂ . 6 H ₂ O	0,03 g
Na ₂ SeO ₃ . 5 H ₂ O	0,3 g

Fonte: Adaptada de BALCH et al. (52)

1. Dissolver ácido nitrilotriacético e ajustar o pH para 6,5 com KOH, em seguida, adicionar minerais (pH_(final) 7.0 (com KOH)).

Tabela 8 - Meio P.mexicana - Enriquecimento.

Composição	g/L
NH ₄ Cl	1,0
K ₂ HPO ₄	0,3
KH ₂ PO ₄	0,3
KCl	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
Cloridrato de cisteína	0,5
Resazurina	1,0
NaCl	30
Solução traço mineral (52) ¹	10 mL
Peptona ¹ (Solução aquosa - 10%)	50 mL
Extrato de Levedura ¹ (Solução aquosa - 0,4%)	50 mL
Tiosulfato de Sódio (Na ₂ S ₂ O ₃) ¹ (Solução aquosa - 400mM)	50 mL
NaHCO ₃ ¹ (Solução aquosa - 4%)	50 mL
Na ₂ S.9H ₂ O ¹ (Solução aquosa - 5%)	10 mL
Água MiliQ	1000 mL
pH	7,0

Fonte: Adaptada de MIRANDA-TELLO et al. (42)

1. O reagente é pesado em condições de esterilidade e dissolvido em água, em seguida, a solução deve ser esterilizada por filtração em membrana 0,22 µm sob fluxo de N₂. Posteriormente, deve ser adicionado ao meio já esterilizado, através de alíquota calculada e sob purga de N₂ filtrado.

3.3.3 Meios de cultura para manutenção de espécies do gênero *Petrotoga*.

Dois meios de cultura foram utilizados para o cultivo de duas linhagens obtidas a partir da coleção de microrganismos do Instituto Leibniz - DSMZ (Leibniz Institute DSMZ – German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). As linhagens *Petrotoga mobilis* DSM10674 e *Petrotoga mexicana* DSM14811 foram adquiridas para serem usadas como padrão para os testes de atividade enzimática sobre os substratos xilana e carboximetil celulose (CMC) (descritos no item 3.4).

Os meios P.mexicana-DSMZ e P.mobilis-DSMZ foram preparados para o cultivo de *Petrotoga mexicana* e *Petrotoga mobilis*, respectivamente. Estes meios são os indicados pela coleção de culturas alemã DSMZ em seu *website*, com modificações para cada espécie de *Petrotoga* (tabela 9).

Os cultivos de manutenção destas linhagens foram preparados em frascos de 100 mL do tipo Schott, contendo 50 mL de meio de cultura. Para os testes de atividade enzimática, foram preparados cultivos com 20 mL de meio de cultura em

frasco de penicilina de 40 mL, vedados com rolhas de borracha butílica e lacrados com selos de alumínio.

Posteriormente, após a identificação de um dos isolados deste trabalho (MG414-03) como *Petrotoga miotherma*, para sua manutenção e testes de crescimento utilizou-se um meio específico para esta espécie, aqui denominado de meio P.miotherma-DSMZ (tabela 9), conforme o indicado pela Coleção alemã de culturas DSMZ.

Tabela 9 - Composição dos meios indicados para o cultivo e manutenção das espécies *Petrotoga mexicana*, *Petrotoga mobilis* e *Petrotoga miotherma*, conforme indicado pela coleção alemã de culturas DSMZ.

Meio Base		P.mexicana-DSMZ		P.mobilis-DSMZ		P.miotherma-DSMZ	
Compostos	L ⁻¹	Compostos	L ⁻¹	Compostos	L ⁻¹	Compostos	L ⁻¹
KCl	0,335 g	Extrato de Levedura	0,2 g	Extrato de Levedura	0,2 g	Extrato de Levedura	1,0 g
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	4,0 g	Glicose	5,0 g	Glicose	5,0 g	Glicose	5,0 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	3,45 g	Solução de Vitamina ¹	10,0 mL	Solução de Vitamina ¹	10,0 mL	Solução de Vitamina ¹	10,0 mL
NH ₄ Cl	0,25 g	-----	-----	-----	-----	Triptona	1,0 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	0,14 g	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	2,0 g	-----	-----	-----	-----
K ₂ HPO ₄	0,14 g						
NaCl	18,0 g						
Solução de metais-traço ⁴	10,0 mL						
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ . 7 H ₂ O	2,0 mg						
Resazurina	1,0 mg						
NaHCO ₃	1,0 g						
Na ₂ S . 9 H ₂ O	0,5 g						
Água MiliQ	1.000 mL						

Fonte: Adaptada de DSMZ (49).

- Dissolver os ingredientes (exceto bicarbonato e sulfeto), deixe o meio ferver por 1 min, e depois deixe-o resfriar até a temperatura ambiente sob purga da mistura de gás 80% N₂ / 20% CO₂. Neste trabalho foi utilizado o gás N₂ - 100%.
- Adicionar bicarbonato, dispensar o meio sob mesma atmosfera de gás em recipientes de cultura, e esterelize em calor úmido. Após esterelização, adicionar sulfeto e os substratos extrato de levedura, triptona, glicose e solução de vitaminas, a partir de soluções-estoque anóxicas e estéreis. Antes do inóculo ajustar o pH a 6,5-6,7, se necessário.

3.4 Método de Coloração Diferencial de Gram

O método de coloração diferencial de Gram foi realizado com uma linhagem controle - *Petrotoga mexicana* (DSM 14811) – e o isolado MG414-03, cultivado em meio P. miotherma-DSMZ, de acordo com as etapas a seguir:

Limpar uma lâmina de vidro com papel embebido em álcool para remoção completa de gordura e deixá-la secar bem.

- Colocar sobre a lâmina uma gota cultura em meio líquido, após flambar a alça de transferência.
- Fazer um esfregaço espalhando a gota pela lâmina utilizando a própria alça com movimentos circulares.
- Deixar secar ao ar e anotar, com o lápis dermatográfico, o lado da lâmina com o esfregaço e a identificação da bactéria.
- Fixar as células na lâmina passando a superfície inferior (lado oposto do esfregaço) 3 vezes pela chama do bico de Bunsen.
- Cobrir o esfregaço com Solução de Cristal Violeta (0,25%) durante 1 minuto.
- Lavar bem a lâmina em água corrente e deixar escorrer o excesso.
- Cobrir o esfregaço com Lugol durante 1 minuto.
- Retirar o excesso de Lugol e, mantendo a lâmina inclinada, descorar com Álcool a 95% P.A. (pingar o álcool sobre o esfregaço até que não desprenda mais corante).
- Lavar imediatamente em água corrente e deixar escorrer.
- Cobrir o esfregaço com a Solução de Safranina (0,01%) durante 1 minuto, para contracorar.
- Lavar em água corrente e secar a lâmina com papel filtro, com cuidado, sem esfregar.

Após o preparo, as lâminas foram observadas em microscopia de campo claro (microscópio modelo Olympus-BX53), em aumento de 1.600 vezes.

3.5 Teste de sensibilidade a antibióticos

O isolado MG414-03 foi testado quanto à sua sensibilidade aos antibióticos Ampicilina (AMP), Cloranfenicol (CFC), Canamicina (CAN) e Vancomicina (VAN). Os

antibióticos foram selecionados de acordo com seu espectro de ação e segundo os testes de sensibilidade realizados com outras espécies de *Petrotoga*, para efeito comparativo.

O método utilizado foi o ensaio de diluição do antibiótico, baseado em Oliveira e colaboradores. (53) Frascos de penicilina contendo 22 mL do meio de cultura P. miotherma-DSMZ foram preparados e a cada um deles adicionados 200 µl de uma solução do antibiótico testado. Quatro concentrações finais de antibiótico foram testadas: 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. Após a adição do antibiótico, cada frasco foi inoculado com 2 mL de um cultivo do isolado MG414-03 em fase log de crescimento.

Os cultivos para o teste com os antibióticos foram preparados em réplica, assim como os controles positivos (cultivo sem adição de antibiótico) e os controles negativos (meio de cultura sem inóculo), todos mantidos sob mesma condição (incubação em anaerobiose, temperatura de 60°C e sem agitação).

O acompanhamento dos cultivos foi feito até que as medidas de densidade óptica se estabilizassem ou retrocedessem, ou ainda, até que as contagens de células se estabilizassem, indicando que o cultivo havia entrado em fase estacionária. Em média os cultivos eram acompanhados por 10 dias, por meio de densidade óptica: alíquotas de 1 mL, comparadas com o mesmo meio de cultura estéril mantido em refrigeração, foram aferidas em espectrofotômetro de duplo feixe - modelo U 2800 I - Hitachi.

3.6 Identificação dos isolados a partir da análise do DNAr 16S.

3.6.1 Extração do DNA dos meios.

O método utilizado para extração do DNA dos cultivos dos isolados foi o convencional, baseado na precipitação com fenol. (54)

Uma alíquota de 100 mL de cultivo com 30 dias de incubação foi utilizada para a extração do DNA.

A extração ocorreu de acordo com as etapas listadas a seguir:

1. 100 mL do meio de cultura foram transferidos para um tubo de SORVAL de 250 mL e centrifugados por 15 min a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado.

2. O *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de tampão de lise e a ele adicionado 10 μ L de Proteinase K (10 mg/mL). O tubo foi agitado vigorosamente e incubado à 55°C, por 2 horas.
3. Adicionar igual volume da solução estoque Fenol : Clorofórmio : Álcool Isoamílico (25:24:1), e misturar por inversão várias vezes. Em seguida, centrifugar a 16.000 g por 15 min.
4. 1000 μ L da fase aquosa foram transferidos para um tubo limpo e adicionado igual volume da solução estoque Clorofórmio : Álcool Isoamílico (24:1). A solução foi misturada por inversão e centrifugada a 16.000 g por 5 min.
5. Esta extração foi repetida por duas vezes, pipetando um volume menor na segunda vez (aproximadamente 900 μ L) devido à sedimentação que ocorre na interface das fases líquidas formadas.
6. Foram transferidos 800 μ L da fase aquosa para um novo eppendorf, onde foi feita a precipitação do DNA por adição de Solução Acetato de Sódio [3M] na proporção de 1/10 vol. e igual volume de 2-propanol. A solução foi misturada cuidadosamente e incubada à -20°C por 12 horas (overnight).
7. A solução foi então centrifugada a 16.000 g por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi ressuspensionado em 500 μ L de etanol 70%. Este volume foi centrifugado a 16.000g por 5 min, e em seguida, o etanol foi descartado cuidadosamente e deixado secar até que todo o etanol fosse removido.
8. O DNA obtido foi ressuspensionado em uma solução contendo 30 μ L de água Mili-Q estéril e 0,2 μ L de RNase A (10 mg/mL), e deixado em repouso à 37°C por, no mínimo, 3 h.

Tampão de lise (1 mL)

- 50 μ L de 1 M Tris-HCl, pH 8.0 (50 mM final)
- 400 μ L de 50 mM EDTA (20 mM final)
- 375 μ L de 2 M Sucrose (750 mM final)
- 135 μ L de 3 M NaCl (400 mM final)
- 40 μ L de SDS 25% (1% p/v)

3.6.2 Reações em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do DNAr 16S.

O DNA total obtido a partir das alíquotas dos cultivos dos isolados foi amplificado por PCR, tendo como alvo o fragmento de DNAr 16S utilizando-se os pares de *primers* específicos para o Domínio Bacteria: FB27 – **AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG** e RU1492 – **GGT TAC CTT GTT ACG ACT T**. (55)

Os reagentes utilizados nas reações de PCR são indicados na Tabela 10.

Tabela 10 - Reagentes usados nas reações de PCR do fragmento de 16S DNAr.

Reagente	Quantidade (μL)
Buffer 10X	1,0
DNTP's 2,5mM	0,8
MgCl ₂ 25mM	0,6
Primer F (5pmoles)	1,0
Primer R (5pmoles)	1,0
DNA	1,0
BSA (5 mg/mL)	0,2
Taq DNA Polimerase (5U/μL)	0,2
H ₂ O	4,2

Fonte: Elaborada pelo autor.

O termociclador foi programado para desnaturação inicial (94°C) por 5 min, seguido de 30 ciclos de:

1. Desnaturação: 94°C por 30 segundos;
2. Temperatura de anelamento dos *primers*: 53°C por 45 segundos;
3. Extensão: 72°C por 90 segundos.

Ao final dos 30 ciclos, as amostras ainda permaneceram no termociclador por mais 10 minutos, para extensão final a 72°C. Ao termino da reação, as amostras foram armazenadas em freezer, a -20°C.

3.6.3 Clonagem, sequenciamento e identificação dos microrganismos.

Para construção da biblioteca gênica do 16S DNAr, o produto da reação do PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose para seleção do fragmento DNAr 16S. Para purificação deste, foi utilizado o kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* – Promega segundo manual do fabricante. O produto purificado foi ligado no plasmídeo pTZ57R/T (*InsTAclone[®] PCR Cloning Kit* – Fermentas) segundo

manual do fabricante. Após a ligação, realizou-se transformação e plaqueamento conforme Sambrook e colaboradores (56). Os plasmídeos foram inseridos em *E. coli* (DH5-alfa competente) por choque térmico, as quais foram cultivadas em meio Ágar L-B (Luria-Bertani) (tabela 11).

Tabela 11 - Composição do meio Ágar LB.

Reagente	g/L)
Triptona	(10,0)
Extrato de levedura	(5,0)
Cloreto de sódio	(5,0)
Ágar	(15,0)
Ampicilina	(1µg/mL de meio)

Fonte: Adaptado de SAMBROOK et al. (56).

Para detecção das colônias recombinantes, foram adicionados os seguintes compostos em 50 mL de meio-agar LB ainda fluido: 80 µl de Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) [0,5 M], 120 µl de X-Gal (20 mg/mL) e 50µl de Ampicilina (100mg/mL). Este meio suplementado foi vertido em placas de Petri para solidificação. As células transformadas foram espalhadas com auxílio de uma alça de Drigalski.

Após o crescimento das colônias em placa, *overnight* (12 horas) a 37°C, selecionou-se algumas das colônias recombinantes (brancas), que foram inoculadas em 3 mL de meio líquido LB com o antibiótico Ampicilina, nas mesmas condições e proporções anteriores.

Desse crescimento extraiu-se o DNA plasmideal, pelo método de lise alcalina (adaptado de Sambrook (56)). Após concentrar as células por centrifugação e descartar o meio sobrenadante, foram usadas três soluções em sequência (Tabela 12): 200 µL de cada uma, misturando por inversão antes de colocar a próxima. Depois de adicionadas as soluções, o lisado foi centrifugado por 5 minutos a 12.000g, o sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 0,6 vol. de isopropanol, onde se deixou o DNA precipitar por 10 minutos a temperatura ambiente. O DNA foi concentrado por centrifugação a 12.000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi lavado com etanol 70%. Depois de seco a 37°C, o DNA foi ressuspensionado em 20 µL de H₂O MiliQ estéril e armazenado em freezer, a -20°C.

Tabela 12 - Soluções usadas na extração do DNA plasmideal por lise alcalina.

Solução I (20 mL)	Solução II (20 mL)	Solução III (25 mL)
0,4 mL RNase (20mg/mL)	4 mL NaOH 1M	15 mL acetato de potássio
2 mL Tris-HCl 1M	2 mL SDS 10%	2,87 mL ácido acético
0,16 mL EDTA 0,5M	14 mL H ₂ O	7,43 mL H ₂ O

Fonte: Adaptada de SAMBROOK et al. (56).

Para o sequenciamento, os DNAs plasmidiais foram preparados conforme manual do fabricante com o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* – Applied Biosystems, juntamente com os *primers* universais M13forward e M13reverse, em reações separadas. Essas reações foram aplicadas no sequenciador automático *3130 Genetic Analyzer* – Applied Biosystems, pela técnica de laboratório Patrícia Fernandes Matheus (do grupo de Biofísica Molecular IFSC-USP). As sequências obtidas foram analisadas nos programas Phred-Phrap-Consed e cada uma foi submetida ao banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para uma análise preliminar de identificação do microrganismo mais semelhante.

3.6.4 Identificação confirmatória dos isolados pela DSMZ.

Com intuito de confirmar a identificação, o isolado MG414-03 foi enviado a um laboratório especializado, o Instituto Leibniz-DSMZ, na Alemanha, para o sequenciamento de DNAr 16S. Um isolado do Campo de Buracica (UO-Ba PETROBRAS), denominado BA175-01, com características morfológicas semelhantes ao gênero *Petrotoga*, também foi enviado para sequenciamento de DNAr 16S, no mesmo laboratório.

3.7 Testes de crescimento do isolado MG414-03 frente a algumas variáveis

A fim de determinar as melhores condições de cultivo do isolado MG414-03, foram realizados ensaios variando-se a temperatura, a salinidade e a fonte de carbono. Os cultivos-testes foram feitos em frascos de penicilina de 50 mL contendo 35 mL do meio P.miotherma-DSMZ.

As condições testadas para as variáveis são apresentadas na tabela 13.

Tabela 13 - Variáveis aferidas nos testes de crescimento do isolado MG414-03.

Variáveis	Condições Experimentadas
Temperatura (°C) ¹	☐ 40 ☐ 60 ☐ 80
Concentração Salina (g/L de NaCl) ¹	☐ 20 ☐ 40 ☐ 70 ☐ 100
Fonte de Carbono Principal ^{2, 3}	☐ Xilose ☐ Maltose ☐ Sacarose ☐ Xilana ⁴

Fonte: Elaborada pelo autor.

1. Cultivos feitos em triplicatas, incluindo dois controles estéreis na incubação.
2. Testes feitos em duplicatas, incluindo dois controles estéreis na incubação.
3. Foi mantida a molaridade (mol/L) da fonte de carbono, sugerida na literatura para o meio P. miotherma (Tabela 9), M = 28mM.
4. 10 g/L, conforme Miranda-Tello e colaboradores (42).

O acompanhamento dos cultivos realizados no teste de temperatura, salinidade do meio e fonte de carbono foi feito através de medidas diretas da densidade óptica (D.O.) no comprimento de onda $\lambda=580\text{nm}$, em espectrofotômetro de duplo feixe (Mod. 2800, marca Hitachi). O branco utilizado foi o meio de cultura estéril, mantido sob refrigeração. O controle utilizado foi o meio de cultura estéril (em duplicata), mantido sob as mesmas condições testadas, de modo a acompanhar as variações de densidades ópticas sofridas por este ao longo do período de incubação.

Nos cultivos-testes cuja variável foi a temperatura, para cada alíquota coletada foi feita também a contagem bacteriana total em Câmara de Neubauer (50), logo após a retirada da mesma. As células presentes em 9 subunidades “c” da Câmara (conforme figura 4) foram contadas em microscopia de contraste de fase. O cálculo do número de células por amostra foi feito conforme a fórmula abaixo:

$$N = X \times D \times \frac{10^5}{3,6} \text{ Cél/ml} \quad (1)$$

Onde: - N: Número de células por mL

- X: Número de células contadas nas 9 subunidades “c” da Câmara de Neubauer.

- D: Fator de diluição da amostra (se necessária).

- $10^5 / 3,6$: Fator de conversão para expressão do resultado em células/mL.

As diluições das amostras para a contagem, quando necessárias, foram feitas em solução de tampão fosfato de sódio (50mM; pH=7,0), mantendo a salinidade de 18 g/L (equivalente a do meio de cultura). Esta solução-tampão foi armazenada em atmosfera anaeróbia de N₂, e em condição redutora, adicionando 10 mL de solução de sulfeto de sódio (5%) por litro (L).

Figura 4 - Imagem da Câmara de Neubauer e suas unidades. Os campos quadrados numerados foram os utilizados para a contagem das células.

Fonte: Adaptada de LUCARINI et al. (57)

3.7.1 Método de análise de desempenho dos cultivos frente às variáveis testadas

O método de análise de desempenho dos cultivos foi feito por meio de gráficos semilogarítmicos, gerados no programa Origin (Versão 8), aplicando-se a função logarítmica sobre os dados de contagem de células totais ou densidade óptica, verificando as variações de Células/mL e/ou Unidades de Densidade Óptica (U.D.O.) ao longo do Tempo de Incubação.

O desempenho entre os cultivos frente às variáveis testadas foi analisado pela comparação das *Taxas de Crescimento* (μ), calculadas pela equação 2. Para o cálculo, foram escolhidos pontos da fase Log de crescimento. (58) Também foi observado o ponto de saturação de cada cultivo, referente ao maior valor atingido de Células/mL e/ou Densidade Óptica.

$$\mu = \frac{\ln(x_f) - \ln(x_i)}{t_f - t_i} ; [\mu] = h^{-1} \quad (2)$$

Onde: “x” é um valor representando a contagem de Células/mL [log (N)], ou Densidade Óptica (D.O.).

3.8 Detecção de atividade enzimática sobre os substratos xilana e carboximetilcelulose (CMC) a partir de extratos de cultivos bacterianos.

A atividade enzimática do isolado MG414-03 sobre os carboidratos xilana e carboximetilcelulose (CMC) foi medida por meio de um teste colorimétrico realizado com alíquotas de cultivos desta bactéria em meio líquido adicionado dos substratos. O teste utilizado - Ensaio Colorimétrico com Reagente Ácido Dinitrossalicílico (DNS), proposto por Miller (60), afere indiretamente a atividade enzimática, medindo a quantidade de produtos gerados após a reação entre as enzimas presentes na amostra e os substratos testados, no caso, os carboidratos xilana e CMC.

O isolado MG414-03 foi cultivado em meio P.miotherma-DSMZ adicionado do substrato, à temperatura de 60°C, em anaerobiose, durante 3-4 dias. Um controle do meio também foi preparado e incubado nas mesmas condições, porém sem inóculo.

Após o período de incubação, uma alíquota de 1 mL do cultivo foi centrifugada a 13.000 rpm por 13 min para a obtenção de um extrato livre de células (sobrenadante) e outro com células (*pellet*). Este mesmo procedimento de centrifugação também foi repetido para o meio controle, separando-o em duas fases.

Em uma placa de PCR (96 poços) foram preparadas as seguintes reações, realizadas em quadruplicatas:

- Branco: 20 µL de Tampão Acetato de Sódio 300 mM + 40 µL de H₂O Milli-Q;
- Controle do Substrato: 20 µL de solução de substrato (Xilana - 30 g/L; ou CMC⁵ - 12,31 g/L) + 20 µL de Tampão Acetato de Sódio 300 mM + 20 µL de H₂O Milli-Q.;
- Controle do meio de cultura: 20 µL do sedimentado + 20 µL de Tampão Acetato de Sódio 300 mM + 20 µL de Água MiliQ;
(Extrato Sedimentado)
- Reação Amostra-Substrato: 40 µL da amostra sedimentada (1,5x concentrada)
(Extrato Com Células) ressuspensa em Tampão Acetato de Sódio (na concentração final de 150mM) + 20 µL do Substrato (Xilana-30g/L ou CMC-12,31 g/L).
- Controle do meio de cultura: 20 µL do sobrenadante + 20 µL de Tampão Acetato de Sódio 300 mM + 20 µL de Água MiliQ;
(Extrato Sobrenadante)
- Reação Amostra-Substrato: 40 µL da amostra sobrenadante (não concentrada e não tamponada) + 20 µL do Substrato (Xilana-30g/L ou CMC-12,31 g/L).
(Extrato Livre de Células)

- As concentrações finais das reações foram:
 - Solução Tampão de Acetato de Sódio: 100mM. (61)
 - Solução Substrato-Xilana: 10 g/L. (42)
 - Solução Substrato-CMC: 4,1 g/L

Após o preparo das reações na placa de PCR, esta passou pelo seguinte tratamento térmico no Termociclador (Veriti^R Biosystems Thermal Cycles):

⁵ Não foi possível adicionar maior quantidade de CMC em solução aquosa, devido à viscosidade que a solução adquire.

- Período de atividade enzimática: temperatura de incubação testada (40°C, 55°C ou 60°C) por 30 minutos;
- Adição de 120 µL da Solução do Reagente DNS (60) por reação. Adição feita com a placa de PCR em banho de gelo;
- Período da Reação Colorimétrica: temperatura de 95°C, por 15 minutos.

Terminado o tratamento térmico, foi feita a transferência de 20 µL de cada reação da placa de PCR para uma placa ELISA, já preparada com 180 µL de H₂O Milli-Q, em cada poço correspondente. A leitura das reações foi feita em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 Microplate Reader, com leitor de placas de 96 poços, no comprimento de onda $\lambda=540$ nm.

Em posse dos dados coletados no aparelho, foram calculadas as concentrações de açúcares redutores presentes na amostra, usando-se como referência uma curva-padrão da solução de DNS feita com concentrações de glicose que variaram de 0,1 g/L a 1,0 g/L.

A detecção da atividade enzimática sobre os mesmos substratos também foi realizada com as linhagens *P. mobilis* (DSM10674) e *P. mexicana* (DSM14811), descritas como consumidoras de xilana.

3.8.1 Calibração do reagente DNS pela curva-padrão da glicose para o ensaio com *Petrotoga mexicana*-DSM14811 e *Petrotoga mobilis*-DSM 10674.

Uma curva de calibração do reagente DNS com várias concentrações de glicose (0,1 g/L a 1,0 g/L) foi realizada para ser utilizada como padrão nos ensaios de degradação dos substratos xilana e carboximetilcelulose (CMC). A tabela 14 mostra os dados de densidade óptica obtidos a partir da reação do DNS com a glicose presente na solução. Estes dados foram tratados no Origin 8 (figura 3 - gráfico da curva-padrão do reagente DNS) e, a partir dos parâmetros recuperados com a melhor reta ajustada sobre os pontos (figura 5), demonstrados na tabela 15, foi elaborada a equação 3 para o cálculo de conversão de Densidade Óptica em Concentração de Glicose.

Tabela 14 -Dados do Ensaio com DNS para construção da curva-padrão de glicose.

Glicose (g/L)	Densidade Óptica	Desvio-Padrão
0,0	0,000	0,001
0,1	0,014	0,002
0,2	0,040	0,002
0,4	0,105	0,003
0,6	0,143	0,005
0,8	0,223	0,008
1,0	0,260	0,010

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 5 - Ensaio com reagente DNS. Densidade Óptica x Concentração de Glicose (g/L).

Fonte: Elaborada pelo autor.

No gráfico da figura 5 são observados os valores da densidade óptica em função da concentração de glicose em g/L, obtidos para a calibração do reagente DNS. Na tabela 15, estão apresentados os parâmetros da melhor reta ajustada sobre os pontos.

Tabela 15 - Parâmetros para conversão de Densidade Óptica em Concentração de Glicose (g/L).

Equação da reta	Parâmetros	Valores	Erro Padrão
$y = a + bx$	a	-0,008	0,006
	b	0,27	0,01

Fonte: Elaborada pelo autor.

Esta equação da tabela 15 será utilizada como método indireto para aferir a concentração de glicose, liberada nas reações do teste com os substratos xilana e CMC.

Portanto,

Se,

$$(y \pm \Delta y) = (a \pm \Delta a) + (b \pm \Delta b) \times (x \pm \Delta x),$$

onde: y é a *Densidade Óptica* e x é a *Concentração de Glicose* em gramas por litro (g/L),

Então,

$$(y \pm \Delta y) = (a \pm \Delta a) + [(b \pm \Delta b) \times (x \pm \Delta x)] \Leftrightarrow (x \pm \Delta x) = \frac{(y \pm \Delta y) - (a \pm \Delta a)}{(b \pm \Delta b)}$$

Fazendo a propagação dos erros para a expressão acima, tem-se:

$$(x \pm \Delta x) = \frac{(y \pm \Delta y) - (a \pm \Delta a)}{(b \pm \Delta b)} \pm \frac{[(y - a) \times (\Delta b)] + [(b) \times (\Delta y + \Delta a)]}{(b)^2}$$

Por fim, substituindo os valores temos:

$$x \pm \Delta x = \frac{(y) - (-0,008)}{(0,27)} \pm \frac{(y + (-0,008)) \times (0,01) + (0,27) \times (\Delta y + 0,006)}{(0,27)^2} \quad (3)$$

Através da equação 3, os dados de Densidade Óptica ($y \pm \Delta y$) são convertidos em estimativas de Concentração de Glicose (g/L) ($x \pm \Delta x$), para o teste com as linhagens *Petrotoga mexicana*-DSM14811 e *Petrotoga mobilis*-DSM 10674.

3.8.2 Calibração do reagente DNS pela curva-padrão da glicose para o ensaio com o isolado MG414-03.

O teste com o isolado MG414-03 para a degradação dos substratos xilana e CMC foi realizado em momento diferente do teste realizado com as linhagens *Petrotoga mexicana*-DSM14811 e *Petrotoga mobilis*-DSM 10674 e, por isso, foi necessário fazer uma nova curva-padrão da glicose com o reagente DNS.

A tabela 16 mostra os dados do ensaio da curva-padrão da glicose.

Tabela 16 - Dados do Ensaio com DNS para Curva-Padrão de Glicose.

Glicose (g/L)	Densidade Óptica	Desvio Padrão
0,0	0,0000	0,0006
0,1	0,0099	0,0032
0,2	0,0346	0,0024
0,4	0,0931	0,0038
0,6	0,1507	0,0043
0,8	0,2079	0,0095
1,0	0,2622	0,0149

Fonte: Elaborada pelo autor.

De maneira análoga ao procedimento desenvolvido no item 3.8.1, os dados da tabela 16 foram tratados no Origin 8 e foram recuperados os parâmetros demonstrados na tabela 17. Assim, foi elaborada a Equação 4 para o cálculo de conversão de Densidade Óptica em Concentração de Glicose, usada para aferir a concentração de glicose liberada nas reações do teste de degradação de substrato feito com o isolado MG414-03.

Tabela 17 - Parâmetros para conversão de Densidade Óptica em Concentração de Glicose (g/L).

Equação da reta	Parâmetros	Valores	Erro Padrão
$y = a + bx$	a	-0,012	0,004
	b	0,273	0,008

Fonte: Elaborada pelo autor.

Reordenando os parâmetros e propagando os erros, tem-se a equação seguinte :

$$x \pm \Delta x = \frac{(y) - (-0,012)}{(0,273)} \pm \frac{(y + (-0,012)) \times (0,008) + (0,273) \times (\Delta y + 0,004)}{(0,273)^2} \quad (4)$$

Através da Equação 4, os dados de Densidade Óptica ($y \pm \Delta y$) são convertidos em estimativas de Concentração de Glicose (g/L) ($x \pm \Delta x$), para o teste com o isolado MG414-03.

3.8.3 Cálculo para estimativa da Atividade Enzimática (U/L).

Para o cálculo da atividade enzimática, a partir dos valores da glicose liberada nas reações, considerou-se uma unidade de atividade enzimática (U) como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar (glicose equivalente) por minuto. (62) A atividade enzimática deste trabalho foi calculada de maneira correspondente, de modo que: uma unidade de enzima corresponde a 1 μmol de glicose liberado por minuto, na temperatura de 60°C (temperatura ótima do isolado MG414-03), expressa como:

$$U = \frac{1\mu\text{mol}}{\text{min}} \quad , \text{ liberados na temperatura de } 60^\circ\text{C}$$

Sabendo que 1 mol de glicose corresponde a massa de 180,16 g ($1M_{(\text{GLICOSE})} = 180,16 \text{ g}$), para encontrar a molaridade (M) correspondente em cada reação do DNS, basta operar os valores recuperados de concentração de glicose ($x \pm \Delta x$), expressos em g/L, dividindo por 180,16 (gramas)⁶. E para transformar *mol* em μmol , basta multiplicar resultado da divisão acima por 10^6 ($1 \text{ mol} = 10^6 \mu\text{mol}$)⁶, como apresentado a seguir:

$$M = (x \pm \Delta x) \times \frac{10^6 \mu\text{mol}}{180,16 \text{ g}} \quad ; \text{ valores expressos em } [\mu\text{mol/Litros}]$$

Considerando-se que a medida de densidade óptica é feita após 30 minutos⁶ de reação, assim, deve-se dividir o cálculo de atividade por este período. Desta

⁶ Valores considerados constantes a propósito de cálculos e propagações de erros.

forma, os valores de atividades enzimáticas recuperados estarão expressos em U/L $[(\mu\text{mol}/ \text{minuto})/ \text{Litro}]$ e a equação pode ser escrita como demonstrada abaixo:

$$\text{Atividade Enzimática (U/L)} = (x \pm \Delta x) \times \left(\frac{10^6 \mu\text{mol}}{180,16 \text{ g}} \right) \times \left(\frac{1}{30 \text{ min}} \right)$$

Ainda, é necessário fazer a correção do Fator de Diluição para as reações do Extrato Livre de Células, o qual foi adicionado 40 μl em cada reação do ensaio para o volume final de 60 μl , neste trabalho. Portanto:

$$\begin{array}{ll} \text{Fator de Diluição para o Extrato Livre de} & \frac{(60 \pm 1) \mu\text{l}}{(40 \pm 1) \mu\text{l}} \\ \text{Células do teste DNS:} & \end{array}$$

Inserindo o Fator de Diluição e fazendo a propagação do erro existente na estimativa da concentração de glicose $(x \pm \Delta x)$ nas operações anteriores, encontramos a equação final para estimativa da atividade enzimática.

- Inserindo o Fator de Diluição:

$$\text{Atividade Enzimática (U/L)} = (x \pm \Delta x) \times \left(\frac{10^6 \mu\text{mol}}{180,16 \text{ g}} \right) \times \left(\frac{1}{30 \text{ min}} \right) \times \frac{(60 \pm 1 \mu\text{l})}{(40 \pm 1 \mu\text{l})}$$

- Propagando os erros:

$$\begin{aligned} \text{Atividade Enzimática (U/L)} &= \left((x) \times \left(\frac{10^6}{180,16} \right) \times \left(\frac{1}{30} \right) \times \frac{(60)}{(40)} \right) \pm \\ &\left(\left(\frac{10^6}{180,16} \times \frac{1}{30} \right) \times \left(\left((x) \times \left(\frac{(60 \times 1) + (40 \times 1)}{(40^2)} \right) \right) + \left(\left(\frac{60}{40} \right) \times (\Delta x) \right) \right) \right) \end{aligned} \quad (5)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento dos meios de cultura testados

4.1.1 Cultivos em meios líquidos enriquecidos e seletivos para a recuperação das bactérias dos fluidos produzidos.

Alíquotas dos fluidos produzidos (mistura água/óleo) e de água de injeção (AI) foram inoculadas nos meios Zinder e Postgate E modificado. O crescimento microbiano nos cultivos, incubados à temperatura de 60°C, foi acompanhado por microscopia de contraste de fase (Microscópio Olympus-BX53). A partir das observações microscópicas verificou-se que não foi possível recuperar morfotipos do gênero *Petrotoga* a partir dos cultivos em meio Zinder, exceto para o cultivo com amostras do fluido do poço MG414. Na figura 3, nota-se uma estrutura ao redor da célula - a toga - que é característica dos microrganismos da ordem Thermotogales. Entretanto, este cultivo não se manteve viável.

Figura 6 - Fotomicrografia de contraste de fase de cultivo da amostra do poço MG414 em meio Zinder, com 64 dias de incubação (1500x). As células estão em cor escura, envolvidas pela toga, porção mais clara que alonga-se sobre as células, característica essa típica da classe Thermotogae.

Fonte: Elaborada pelo autor

Do mesmo modo, nos cultivos em meio Postgate E-modificado, observou-se morfotipos com togas nos cultivos feitos com inóculos do poço MG414. Na figura 7 são observadas células com toga a partir do 33º dia de cultivo.

Dos poços amostrados, conclui-se que bactérias do gênero *Petrotoga* estiveram presentes apenas nas amostras do poço MG414. A recuperação destas bactérias pelos meios Zinder e Postgate E-modificado provavelmente ocorreu pela presença do extrato de levedura na composição de ambos os meios e, no caso do meio Zinder, também pela adição de glicose. Não há estudos do uso exclusivo de extrato de levedura como fonte de carbono pelas espécies de *Petrotoga*, mas apenas de favorecimento do crescimento quando adicionado a um meio que já contenha uma fonte de carbono. Para algumas espécies de Thermotogae, há registros de crescimento com extrato de levedura como fonte única de carbono, como *Thermotoga petrophila* (63), isolada de reservatório de petróleo, e *Thermotoga marítima* (38), *Marinitoga piezophila*, *Thermosipho africanus* e *Thermosipho japonicus* (35), isoladas de fontes hidrotermais marinhas. As outras fontes de carbono presentes nos dois meios (acetato e lactato no meio Postgate E-modificado e acetato, formiato e metanol, no meio Zinder) não sustentam o crescimento de espécies de *Petrotoga* como *P. mobilis* (40), *P. miotherma* (39) e *P. mexicana*. (42)

Figura 7 - Fotomicrografia de contraste de fase de cultivo em meio Postgate E-modificado. (a) Cultivo da amostra do poço MG414-F2 - 33 dias de incubação (1000x); (b) Cultivo da amostra do poço MG414-F2 - 63 dias de incubação (1500x).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2 Cultivos e isolamento em meios seletivos para morfotipos com toga - meio *P.olearia* e meio *P.mexicana*.

Constatado o crescimento dos morfotipos de interesse no meio Postgate E-modificado, a partir do inóculo do fluido do poço MG414, dois meios seletivos para espécies da ordem Thermotogales foram escolhidos para a tentativa de isolamento: meio-*P.olearia* (41) e meio-*P.mexicana*. (42) Alíquotas do cultivo em meio Postgate E-modificado (MG414-F2) foram inoculadas nos dois meios escolhidos e incubadas em anaerobiose, por 14 dias, a 60°C. Nos dois meios houve recuperação e crescimento dos morfotipos esperados, como demonstrado nas imagens da figura 8, onde .

As espécies do gênero *Petrotoga* são fermentadoras, podendo utilizar uma ampla variedade de carboidratos simples e complexos como fonte de carbono, bem como alguns substratos orgânicos complexos como peptona e extrato de levedura. (35) A presença do extrato de levedura e peptona, bem como de uma fonte de enxofre inorgânico, podem ter selecionado e favorecido o crescimento destes morfotipos nos dois meios escolhidos - meio-*P. mexicana* e meio-*P. olearia*.

O extrato de levedura é indicado como necessário para o crescimento de *Petrotoga miotherma*-ATCC 51224 (39), *Petrotoga sibirica*-DSM 13575 e *Petrotoga olearia*-DSM13574 (41); para *Petrotoga mobilis*-DSM 10674 (40), este composto apenas estimula o crescimento quando na presença de um carboidrato. *Petrotoga mexicana*-DSM14811 (42), *Petrotoga sibirica*-DSM 13575 e *Petrotoga olearia*-DSM13574 (41), crescem na presença de peptona como fonte de carbono; para *Petrotoga miotherma*-ATCC 51224 este substrato não foi testado. (39)

Alguns autores têm sugerido que a adição de enxofre elementar ou de compostos inorgânicos de enxofre (como tiosulfato, sulfato e sulfeto) pode acelerar o crescimento de espécies de Thermotogales, pois, além de atuar como aceptor de elétrons, diminui o efeito inibidor do H₂ acumulado durante a fermentação, formando H₂S. (35) Em estudo com *Petrotoga miotherma*-ATCC 51224, Davey e colaboradores (39) não observaram aumento na taxa de crescimento após a adição de enxofre elementar ao meio de cultura.

Figura 8 - Fotomicrografia de contraste de fase de cultivo em meios seletivos para *Petrotoga*. (a) Cultivo em meio-P.mexicana - 14 dias de incubação (600x); (b) Cultivo em meio-P.olearia - 14 dias de incubação (600x). As setas indicam os morfotipos com toga.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O isolamento dos morfotipos de interesse crescidos nos meios líquidos P.olearia e P.mexicana foi feito nos mesmos meios, porém sólidos.

As placas inoculadas foram incubadas por aproximadamente 35 dias, em jarra de anaerobiose (Oxoid - 2,5 litros) com atmosfera gerada por sachê AnaeroGen (Oxoid). Após esse período foi verificado o surgimento de colônias isoladas nas sementeiras feitas em meio P.mexicana-sólido.

Das colônias isoladas (figura 9), três foram escolhidas para posterior cultivo e foram nomeadas como segue: MG414-01, MG414-02 e MG414-03. Estes isolados foram semeados em meio P.mexicana-líquido, tendo apresentado crescimento abundante, como se pode observar nas figuras 10, 11 e 12.

Figura 9 - Colônias crescidas em meio P.mexicana-sólido após 35 dias de incubação, em anaerobiose, a 60°C. (a) Imagem da placa de semeadura, aberta em fluxo laminar. (b) Aumento da imagem “a” com destaque para região delimitada, demonstrando as colônias obtidas.

(a)

(b)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 - Fotomicrografia do isolado MG414-01 cultivado em meio P.mexicana - 10 dias de incubação (1000X).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 11 -Fotomicrografia do isolado MG414-02 cultivado em meio P.mexicana - 10 dias de incubação (1000X).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 12 -Fotomicrografia do isolado MG414-03 cultivado em meio P.mexicana - 10 dias de incubação (1000X).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Posteriormente, foram cultivados outros dois isolados desta sementeira, MG414-04 e MG414-05, mantidos também à temperatura de 60°C.

Destes cinco isolados obtidos, apenas MG414-03 permaneceu viável ao até o término deste trabalho.

A manutenção das culturas-estoque por criopreservação (alíquotas acondicionadas em frascos de vidro, adicionados de glicerol estéril na proporção de 1:1 e mantidos a -20°C) não mostrou-se adequada, visto que não houve recuperação das mesmas. Desse modo, optou-se por manter as culturas-estoque em meio líquido, incubadas a 60°C, sendo renovadas a cada dois meses. Futuramente será testada a preservação das mesmas por liofilização, conforme Paoli (64)

4.2 Identificação e caracterização das linhagens isoladas.

O DNA dos cultivos iniciais realizados com os meios seletivos P.olearia e P.mexicana foi extraído para a análise do DNAr 16S com o objetivo de se avaliar a eficiência dos meios quanto à seleção e possível isolamento de bactérias do filo Thermotogae.

Dez clones obtidos a partir do cultivo em meio P.olearia e 10 clones a partir do meio P.mexicana foram sequenciados e analisados, como apresentado na tabela 18.

Tabela 18 - Identidade das sequências do DNAr 16S dos clones obtidos a partir dos cultivos preparados com os meios P.olearia e P.mexicana, analisadas no Banco Genômico NCBI.

Cultura	Clone	Similaridade	Query Coverage (%)	Identidade (%)
Cultivo em meio P.olearia	C1	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C2	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C3	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	98	99
	C4	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99

(Continua)

Tabela 18 - Identidade das sequências do DNAr 16S dos clones obtidos a partir dos cultivos preparados com os meios P.olearia e P.mexicana, analisadas no Banco Genômico NCBI.

(Continuação)

Cultura	Clone	Similaridade	Query Coverage (%)	Identidade (%)
Cultivo em meio P.olearia	C5	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C6	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C7	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C8	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	95	99
	C9	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C10	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
Cultivo em meio P.mexicana	C1	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C2	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	97
	C3	Esta sequencia não foi gerada.	-	-
	C4	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	99	99
	C5	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C6	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C7	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C8	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C9	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C10	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	98	99

Fonte: Elaborada pelo autor.

Constatou-se que os meios de cultura P.olearia e P.mexicana favoreceram a seleção exclusiva de bactérias do gênero *Petrotoga*, possivelmente da espécie *P. miotherma* (DSM 10691), uma vez que as sequências analisadas acusaram identidade de 97% a 99% com a referida espécie.

A análise do DNAr 16S dos isolados MG414-01, MG414-02, MG414-03 (já apresentados no item 4.2.1) também foi realizada. Cinco clones de cada isolado foram escolhidos para a análise das sequências, conforme mostrado na tabela 19.

Tabela 19 - Identidade das sequências do DNAr 16S dos isolados MG414-01, MG414-02, MG414-03, analisadas no Banco Genômico NCBI.

Isolado	Clone	Similaridade	Query Coverage (%)	Identidade (%)
MG01	C1	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	98	99
	C2	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C3	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C4	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C5	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
MG02	C1	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C2	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C3	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	95	99
	C4	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C5	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
MG03	C1	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C2	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	98
	C3	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99
	C4	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	98
	C5	<i>Petrotoga miotherma</i> partial 16S rRNA gene, type strain DSM10691T	97	99

Fonte: Elaborada pelo autor.

Verificou-se que todos os clones sequenciados, obtidos a partir dos isolados MG414-01, MG414-02, MG414-03, acusaram similaridade com a espécie *Petrotoga miotherma* (DSM 10691), apresentando identidade que variou de 98% a 99%.

Ainda que a uma identidade maior que 97% entre as sequências de DNAr 16S de dois espécimes seja necessária para a confirmação de mesma espécie, a classificação neste nível taxonômico exige também a realização de outros testes fisiológicos, bioquímicos, morfológicos, quimiotaxonômicos, bem como outros testes genotípicos, como o de hibridização DNA-DNA. (65) Deste modo, com base no sequenciamento DNAr 16S realizado pelo presente trabalho, por ora pode-se afirmar que os isolados MG414-01, MG414-02 e MG414-03 são membros do gênero *Petrotoga*.

4.2.1 Identificação e caracterização do isolado MG414-03 pelo Instituto Leibniz-DSMZ.

Posteriormente ao sequenciamento do DNA 16S dos isolados realizado neste trabalho, uma amostra do isolado MG414-03 foi encaminhada ao Instituto Leibniz-DSMZ, na Alemanha, para a mesma análise. O resultado desta análise constatou que esta linhagem possui semelhança de 99,2% com a espécie *Petrotoga miotherma* (tabela 20).

Tabela 20 - Valores de similaridade do gene DNAr 16S para o isolado MG414-03 (ID 13-938) e linhagens relacionadas, com base na comparação da sequência completa.

Linhagens testadas	Similaridade da sequência para o gene DNAr 16S do isolado (%)
Isolado MG414-03 (ID 13-938)	100.0
<i>Petrotoga mexicana</i> MET12 ^T (42)	98.1
<i>Petrotoga halophila</i> MET-B ^T (43)	98.9
<i>Petrotoga miotherma</i> DSM 10691 ^T (39)	99.2
<i>Petrotoga mobilis</i> DSM 10674 ^T (40)	97.6
<i>Petrotoga sibirica</i> SL25 ^T (41)	97.9
<i>Petrotoga olearia</i> SL24 ^T (41)	98.3

Fonte: DSMZ (79).

4.2.2 Caracterização por técnica de coloração diferencial de Gram.

Seguindo o protocolo para o teste de coloração diferencial de Gram, constatou-se que MG414-03 é uma bactéria Gram-negativa, conforme as imagens obtidas por microscopia de campo claro (figura 13). A linhagem *Petrotoga mexicana*-DSM14811 foi usada como padrão de comparação, demonstrada na figura 14, e é descrita como espécie Gram-negativa. (42)

Os outros isolados MG414-01, MG414-02 e MG414-04 não se mantiveram viáveis até a data da caracterização pela coloração de Gram.

Figura 13 - Microscopia de campo claro do isolado MG414-03, corado pela Técnica de Coloração Diferencial de Gram (1000x).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 14 - Microscopia de campo claro da linhagem *Petrotoga mexicana* (DSM 14811) corada pela Técnica de Coloração Diferencial de Gram (1600x).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 14 pode-se perceber que a linhagem de *Petrotoga mexicana* - DSM 14811, descrita como Gram-negativa, adquire a coloração rosada do contracorante safranina, através do método de Gram. A mesma coloração pode ser observada para MG414-03 (Figura 13), indicando que esta também é Gram-negativa.

As espécies do filo Thermotogae são todas descritas como Gram-negativas; entretanto, apesar de serem didérmicas, suas membranas externas não contêm lipolissacarídeos. (66)

4.3 Testes de crescimento do isolado MG414-03 frente a algumas variáveis.

Os testes de crescimento do isolado MG414-03 frente às variáveis temperatura, salinidade e fonte de carbono, foram realizados em meio P.miotherma-DSMZ, em condições de anaerobiose. Os dados demonstrados nos gráficos de Densidade Óptica - D.O. em função do Tempo de Incubação são os valores absolutos de D.O.. As Taxas de Crescimento (μ) foram obtidas a partir da conversão destes valores em logaritmos neperianos - $\ln$ (D.O.), e analisadas em gráfico semilogarítmico - $\ln$ (D.O.) x Tempo (h).

4.3.1 Teste com diferentes temperaturas.

Os cultivos do isolado MG414-03 nas temperaturas de 40°C, 60°C e 80°C foram acompanhados pela contagem do número total de células e pela correspondente densidade óptica do meio de cultura (figura 15) ao longo de nove dias.

Figura 15 - Comparação entre os cultivos do isolado MG414-03 nas temperaturas de 40°C, 60°C e 80°C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com o gráfico da figura 15, pode-se perceber que os cultivos incubados à temperatura de 60°C favoreceram o crescimento de MG414-03, devido à maior Taxa de Crescimento observada em ambos os métodos de acompanhamento (Contagem de Células e medida da Densidade Óptica).

Nas tabelas 21 e 22 podem ser comparados os valores de *Taxa de Crescimento* e *Saturação*, calculados para as três temperaturas testadas a partir da variação do número de células e da densidade óptica ao longo do tempo.

Tabela 21 - Comparação dos Parâmetros Microbiológicos das Curvas de Crescimento do Teste de Temperaturas, por contagem de células totais em Câmara de Neubauer.

Parâmetros	T=40°C	T=60°C	T=80°C
Taxa de Crescimento [(log (Cél/mL))/h]	0,010 ± 0,001	0,026 ± 0,001	-
Saturação [log (Cél/mL)]	7,42 ± 0,01	8,79 ± 0,02	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 22 - Comparação dos Parâmetros Microbiológicos das Curvas de Crescimento do Teste de Temperaturas, por Densidade Óptica.

Parâmetros	T=40°C	T=60°C	T=80°C
Taxa de Crescimento [(log (U.D.O/mL))/h]	0,03 ± 0,07	0,06 ± 0,09	-
Saturação (U.D.O)	0,272 ± 0,063314	0,562 ± 0,124105	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Observamos que o isolado MG414-03 apresentou crescimento nas temperaturas de 40°C e 60°C, mas não em 80°C. Na temperatura de 60°C observou-se a maior taxa de crescimento e saturação do cultivo, assim, esta temperatura foi fixada para os demais testes de crescimento, nos quais a salinidade e a fonte de carbono foram variadas. Esse resultado permite classificar o isolado MG414-03 como termofílico, uma vez que apresentou temperatura ótima acima de 45°C e abaixo de 80°C. (59)

O isolado MG414-03 se desenvolveu em temperatura semelhante às das outras espécies de *Petrotoga*, descritas na literatura como termofílicas. As linhagens como *Petrotoga mobilis*-DSM 10674 (40) e *Petrotoga halophila*-DSM 16923 (43) também apresentaram a temperatura de 60°C como ótima de crescimento. *Petrotoga olearia*-DSM 13574 (41), *Petrotoga sibirica*-DSM 13575 (41), *Petrotoga miotherma*- ATCC 51224 (39) e *Petrotoga mexicana*-DSM14811 (42) apresentaram uma temperatura ótima de 55°C.

4.3.2 Teste com diferentes concentrações de NaCl.

Os cultivos do isolado MG414-03 nas concentrações de NaCl de 20 g/L, 40 g/L, 70 g/L e 100 g/L, foram acompanhados pela Densidade Óptica do meio ao longo de nove dias (figura 16).

Figura 16 - Comparação dos cultivos do isolado MG414-03 nas salinidades de 20 g/L, 40 g/L, 70 g/L e 100 g/L de NaCl. Cultivos incubados em anaerobiose e a 60°C.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Comparando o comportamento dos cultivos demonstrados no gráfico acima, percebe-se que houve crescimento de MG414-03 nas concentrações de 20 g/L, 40 g/L e 70 g/L e um crescimento discreto na concentração de 100 g/L.

Na tabela 23 podem ser comparados os valores de *Taxa de Crescimento* e *Saturação*, para as quatro salinidades testadas.

Tabela 23 - Comparação dos Parâmetros Microbiológicos das Curvas de Crescimento do Teste de Salinidade - NaCl, por Densidade Óptica.

Parâmetros	20g/L	40 g/L	70g/L	100g/L
Taxa de Crescimento [(log (U.D.O/mL))/h]	0,05 ± 0,06	0,1 ± 0,2	0,04 ± 0,05	0,01 ± 0,06
Saturação (U.D.O)	0,53 ± 0,07	0,5 ± 0,1	0,35 ± 0,01	0,19 ± 0,04

Fonte: Elaborada pelo autor.

De acordo com os dados acima, o isolado MG414-03 apresentou crescimento nas salinidades de 20 a 70 g/L de NaCl, sendo que na salinidade de 40g/L (4%) observou-se a maior taxa de crescimento, com saturação de $0,5 \pm 0,1$ (U.D.O.). Esse dado permite afirmar que este isolado é um halófilo discreto, definido como aquele que requer uma concentração baixa de NaCl (1 a 6%) para seu crescimento. O discreto aumento da densidade óptica no cultivo a 100g/L de NaCl juntamente com a baixa densidade celular observada na microscopia não permitem afirmar que houve crescimento nesta concentração. Nesse caso, para confirmação do crescimento, seria necessário realizar a contagem de células totais e viáveis.

As bactérias *Petrotoga olearia*-DSM 13574 (41) e *Petrotoga miotherma*-ATCC 51224 (39) apresentaram crescimento ótimo quando cultivadas em salinidade de 2% de NaCl. Outras espécies de *Petrotoga* apresentaram crescimento ótimo em diferentes salinidades (% de NaCl): *P. sibirica*-DSMZ 13575, a 1% (41); *P. mobilis*-DSM 10674 (40), a 3-4%; *P. halophila*-DSM 16923 (43), 4-6%; *P. mexicana*-DSM14811, (42) a 3%; *P. japonica* sp. nov.-NBRC 108752 (44), a 0,5%.

4.3.3 Teste com diferentes fontes de carbono.

A figura 17 apresenta as curvas de crescimento do isolado MG414-03, acompanhadas pelas variações da densidade óptica, quando cultivado com as seguintes principais fontes de carbono: maltose, sacarose, xilose, xilana. Também foram preparados cultivos sem adição de fonte de carbono principal.

Figura 17 - Comparação dos cultivos do isolado MG414-03 em diferentes fontes de carbono (sacarose, xilose, maltose e xilana). Cultivos incubados em anaerobiose e a 60°C. A linha na cor preta representa o cultivo-controle, sem fonte de carbono principal adicionada ao meio.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pela comparação da densidade óptica dos cultivos, demonstrada no gráfico acima, percebe-se que houve crescimento nos meios de cultura preparados com xilose, maltose e sacarose. O cultivo com xilana não apresentou crescimento detectável, observando apenas uma pequena variação da densidade óptica ao longo das medidas; além disso, a xilana, quando adicionada ao meio, causou turbidez, dificultando a precisão das medidas de densidade óptica. Nota-se que, além da densidade óptica inicial dos cultivos não ser idêntica, a densidade óptica inicial para o cultivo-teste com sacarose apresenta valor negativo, em relação aos demais testes com fontes de carbono principais.

Na tabela 24 podem ser comparados os valores de *Taxa de Crescimento* e *Saturação*, para as cinco fontes de carbono testadas.

Tabela 24 - Comparação dos Parâmetros Microbiológicos das Curvas de Crescimento do Teste com Fontes de Carbono Principal, por Densidade Óptica.

Parâmetros	Xilose	Maltose	Sacarose	Xilana	SFC ¹
Taxa de Crescimento [(log (U.D.O/mL))/h]	0,03 ± 0,03	0,08 ± 0,18	0,044 ± 0,002	-	0,1 ± 0,2
Saturação (U.D.O.)	0,9 ± 0,1	0,58 ± 0,07	0,64 ± 0,02	-	0,20 ± 0,02

Fonte: Elaborada pelo autor.

1. SFC: Cultivo Sem Fonte de Carbono Principal.

O isolado MG414-03 utilizou pelo menos três das quatro fontes testadas, apresentando maior taxa de crescimento nos cultivos suplementados com maltose. O valor recuperado nas análises dos cultivos sem fontes de carbono principal (SFC) de $0,1 \pm 0,2$ [(log (U.D.O/mL)h⁻¹), foi desprezado devido ao baixo rendimento obtido no cultivo, com saturação de apenas $0,20 \pm 0,02$ (U.D.O.). Os altos valores observados nos erros das taxas de crescimento são provocados pelas propagações de erros nos cálculos efetuados.

Segundo a literatura, as linhagens *Petrotoga olearia*-DSM 13574 (41), *Petrotoga mexicana*-DSM14811, (42), *Petrotoga mobilis*-DSM 10674 (40) e *Petrotoga halophila*-DSM 16923 (43), também utilizam xilose, maltose e sacarose como fonte de carbono. Todas estas, exceto *Petrotoga miotherma*-ATCC 51224 (39), utilizam xilana. *Petrotoga sibirica*-DSM 13575 (41) não utiliza apenas xilose dos carboidratos testados neste trabalho. Todas as linhagens citadas, inclusive o isolado MG414-03, utilizam glicose. A tabela 25 compara os dados obtidos para o isolado MG414-03 com os registrados na literatura para as espécies de *Petrotoga*, quanto ao crescimento observado em meios com diversas fontes de carbono.

Tabela 25 - Comparação entre fontes de carboidratos consumidas pelas espécies de *Petrotoga* e o isolado MG414-03.

Espécies	Glicose	Xilose	Maltose	Sacarose	Xilana	Celulose ^a
<i>P. olearia</i> (41)	+	+	+	+	+	-
<i>P. sibirica</i> (41)	+	-	+	+	+	-
<i>P. mexicana</i> (42)	+	+	+	+	+	nd
<i>P. mobilis</i> (40)	+	+	+	+	+	-
<i>P. halophila</i> (43)	+	+	+	+	+	nd
<i>P. japonica</i> (44)	+	+	+	+	+	nd
<i>P. miotherma</i> (39)	+	+	+	+	nd	nd
Isolado MG414-03	+	+	+	+	-	- ^b

Fonte: Elaborada pelo autor.

+. crescimento em meio contendo a fonte de carbono; -. ausência de crescimento em meio contendo a fonte de carbono; nd. não determinado.

^a. Os artigos não discriminam o tipo de celulose utilizada.

^b. Resultado apresentado no item 4.5.2 deste trabalho.

De acordo com a tabela acima, comparando os dados disponíveis na literatura para as espécies de *Petrotoga* com o dados obtidos para o isolado MG414-03, percebe-se que MG414-03 cresce em adição dos mesmos substratos que as outras espécies descritas, com exceção a xilana substrato que também não é utilizado por *P. miotherma*.

4.4 Teste de sensibilidade a antibióticos

Os antibióticos testados têm espectro de ação sobre bactérias gram-negativas e gram-positivas e mecanismos de ação variados, conforme descrição a seguir, baseada em Brooks e colaboradores. (67)

Cloranfenicol: originalmente produzido por *Streptomyces venezuelae*, hoje é fabricado sinteticamente. Liga-se a subunidade 50S do ribossomo, interferindo na ligação de novos aminoácidos à cadeia peptídica em formação, devido à inibição da peptiltransferase. É bacteriostático e o crescimento recomeça quando se interrompe a administração. Não é mais o antibiótico de escolha para nenhuma infecção. A resistência ao cloranfenicol é decorrente da destruição do fármaco por uma enzima (cloranfenicol acetiltransferase) que está sob controle de plasmídeos.

Ampicilina: um tipo de penicilina, atua na inibição da parede celular, inibindo as enzimas da transpeptidação. Tem atividade relativamente alta contra microrganismos gram-positivos e gram-negativos, porém é destruída pelas β -lactamases.

Vancomicina: um glicopeptídeo, é produzido pelo *Streptomyces orientalis*. É bactericida contra estafilococos, alguns clostrídeos e certos bacilos. Inibe os estágios iniciais da síntese do peptídeoglicano da parede celular.

Canamicina: um aminoglicosídeo, inibe a síntese de proteínas das bactérias por sua ligação com a subunidade 30S do ribossomo, impedindo a síntese correta do peptídeo com consequente formação de uma proteína não funcional. Este e outros aminoglicosídeos são mais utilizados contra bactérias gram-negativas ou quando há suspeita de sepse. Limita-se principalmente ao uso tópico em superfícies infectadas.

Os testes de sensibilidade aos antibióticos descritos foram avaliados pela variação da densidade óptica em cultivos em meio líquido *P. miotherma*-DSMZ, ao longo de oito dias.

As figuras 18 à 21 apresentam os resultados observados nos cultivos com a adição de diferentes concentrações dos antibióticos ampicilina, cloranfenicol, canamicina e vancomicina, respectivamente.

Pode-se notar nos gráficos seguintes a diferença entre os valores iniciais de densidade óptica. Desta forma, foi comparado o comportamento de cada cultivo-teste com o comportamento dos cultivos Controle Positivo - CP(+) e Controle Negativo - CN(-), sendo analisada a ausência de crescimento, a inibição temporária do crescimento ou o crescimento discreto, frente às diferentes concentrações do antibiótico testado. Também serão consideradas as medidas de D.O. efetuadas até o tempo aproximado de 79 horas de cultivo. Neste mesmo período de 79 horas, a maioria dos cultivos acompanhados nos testes anteriores já haviam atingido fases avançadas de crescimento, nas quais era evidente a adaptação do isolado à condição testada. Assim, se houver inibição do isolado pelo antibiótico, poderá ser observada neste período.

Figura 18 - Comparação entre cultivos do isolado MG414-03 em meio com diferentes concentrações de Ampicilina (10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL). CN(-) = controle negativo, sem adição de inóculo. CN(+) = controle positivo, com inóculo, sem antibiótico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

No gráfico acima, para o teste realizado com o antibiótico ampicilina (AMP), pode-se notar que em todas as concentrações houve crescimento caracterizado como discreto, com aumento sutil da D.O. no decorrer do teste, quando comparado com o controle positivo - CP(+).

Figura 19 - Comparação entre cultivos do isolado MG414-03 em meio com diferentes concentrações de Cloranfenicol (10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL). CN(-) = controle negativo, sem adição de inóculo. CN(+) = controle positivo, com inóculo, sem antibiótico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o teste realizado com o antibiótico cloranfenicol (CFC), nota-se que houve crescimento nos cultivos adicionados de 10 µg/mL, porém, observando as barras de erros deste acompanhamento, esse crescimento não pode ser confirmado.

Os cultivos preparados com 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL foram inibidos temporariamente durante as primeiras 61 horas de incubação, apresentando um ligeiro aumento da D.O. no tempo 79h.

Figura 20 - Comparação entre cultivos do isolado MG414-03 em meio com diferentes concentrações de Canamicina (10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL). CN(-) = controle negativo, sem adição de inóculo. CN(+) = controle positivo, com inóculo, sem antibiótico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o teste realizado com o antibiótico canamicina (CAN) pode-se notar que não houve crescimento sob as concentrações do antibiótico testadas, observando que houveram variações mínimas de D.O. ao longo de todos os acompanhamentos, mesmo durante o período de 79 horas.

Figura 21 - Comparação entre cultivos do isolado MG414-03 em meio com diferentes concentrações de Vancomicina (10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL). CN(-) = controle negativo, sem adição de inóculo. CN(+) = controle positivo, com inóculo, sem antibiótico.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o teste realizado com o antibiótico vancomicina (VAN), pode-se notar que houve crescimento na concentração de 10 µg/mL, com recuperação de valores idênticos de D.O. para os três primeiros pontos do gráfico deste cultivo com o Controle Positivo - CP(+).

Nos demais cultivos feitos com 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL de vancomicina, pode-se notar um pequeno crescimento observando-se os três primeiros pontos dos gráficos. Assim, o comportamento destes pode ser caracterizado como crescimento discreto.

Para facilitar, esta análise foi sintetizada como apresentado na tabela 26.

Tabela 26 - Influência dos antibióticos ampicilina, cloranfenicol, canamicina e vancomicina no crescimento do isolado MG414-03.

Antibiótico	Concentração final do antibiótico no meio de cultura (em µg/mL)			
	10	25	50	100
Ampicilina	(+)	(+)	(+)	(+)
Cloranfenicol	*	(-)	(-)	(-)
Canamicina	--	--	--	--
Vancomicina	+	(+)	(+)	(+)

Fonte: Elaborada pelo autor.

-- ausência de crescimento; (-) inibição temporária; (+) crescimento discreto;

+ não inibiu crescimento; * não confirmado;

A ausência de crescimento do isolado MG414-03 em todas as concentrações testadas foi observada somente para a canamicina. O isolado mostrou ser sensível ao cloranfenicol, na concentração de 100 µg/mL. Nos cultivos com ampicilina, observou-se um crescimento discreto em todas as concentrações testadas. Para vancomicina não houve inibição a 10 µg/mL, e crescimento discreto para as demais concentrações.

Comparando os resultados apresentados pelo isolado MG414-03 com os descritos na literatura para a espécie *Petrotoga miotherma*, observamos que esta teve seu crescimento inibido por Cloranfenicol e Vancomicina na concentração de 100 µg/mL. (39). As espécies *P. mexicana* (42) e *P. halophila* (43) foram testadas com os mesmos antibióticos e concentrações que o presente trabalho utilizou. Ambas as espécies foram inibidas pelo cloranfenicol, canamicina e vancomicina a partir da concentração de 25µg/mL. *P. mexicana* foi inibida pela ampicilina a partir de 50µg/mL. A tabela 27 compara as respostas a alguns antibióticos apresentadas pelas espécies de *Petrotoga* e pelo isolado MG414-03.

Para efeito de comparação admitiu-se que, tanto para o crescimento discreto quanto para a inibição temporária, houve crescimento do isolado mesmo que em menor taxa quando comparado com o cultivo sem adição de antibióticos.

Tabela 27 - Comparação entre espécies do gênero *Petrotoga* e o isolado MG414-03, quanto à sensibilidade apresentada a alguns antibióticos.

Espécie	Antibiótico [] µg/mL	Ampicilina	Cloranfenicol	Canamicina	Vancomicina	Ripamficina	Streptomicina	Penicilina	
<i>P. olearia</i> (41)	10	+	+	nd	+	+	+	nd	
	25	+	+		+	+	+		
	50	+	+		+	+	+		
	100	+	+		+	+	+		
<i>P. sibirica</i> (41)	10	-	-	nd	+	+	+	nd	
	25	-	-		+	+	+		
	50	-	-		-	+	+		
	100	-	-		-	-	-		
<i>P. mexicana</i> (42)	10	+	+	+	+	+	nd	nd	
	25	+	-	-	-	+			
	50	-	-	-	-	-			
	100	-	-	-	-	-			
<i>P. mobilis</i> (40)	10	-	-	nd	-	-	-	-	
	25	nd	nd		nd	nd	nd	nd	nd
	50								
	100								
<i>P. halophila</i> (43)	10	nd	+	+	+	-	nd	nd	
	25		-	-	-	-			
	50		-	-	-	+			
	100		-	-	-	+			
<i>P. japônica</i> (44)	10	nd	-	-	-	+	nd	nd	
	25		-	-	-	+			
	50		-	-	-	-			
	100		-	-	-	-			
<i>P. miotherma</i> (39)	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
	25		-	-	-	-	+		
	50								
	100								
Isolado MG414-03	10	+	nd	-	+	nd	nd	nd	
	25	+	+	-	+				
	50	+	+	-	+				
	100	+	-	-	+				

Fonte: Elaborada pelo autor.

+ crescimento

- ausência de crescimento

nd - não determinado

4.5 Testes de degradação de Xilana e CarboxiMetilCelulose

Dois polissacarídeos complexos - xilana e carboximetilcelulose (CMC) - foram escolhidos para a realização de testes de degradação enzimática, tendo em vista a prospecção da atividade xilanolítica e celulolítica dentre as espécies do gênero *Petrotoga*. A escolha da xilana para a realização do teste de degradação enzimática pelo isolado MG414-03 foi feita com base nos resultados registrados na literatura para as linhagens *Petrotoga mexicana*-DSM14811 (42) e *Petrotoga mobilis*-DSM 10674. (40) Ambas as linhagens apresentaram crescimento na presença de xilana em meio basal contendo extrato de levedura, e a atividade xilanolítica foi medida pelo método do ácido dinitrossalicílico (DNS), o mesmo utilizado no presente trabalho. A linhagem *Petrotoga miotherma*-ATCC 51224 não foi testada quanto a

este substrato em seu artigo de descrição (39) porém foi utilizada no teste comparativo feito por Lien e colaboradores (40), na caracterização da linhagem *P. mobilis*-DSM 10674, apresentando resultado negativo para a degradação da xilana.

A degradação de celulose em *Petrotoga* foi avaliada para todas as espécies descritas, sendo ausente o crescimento de todas elas em meio contendo esta fonte de carbono. Dentre as *Thermotogae*, há registros de crescimento em meios contendo compostos de celulose como fonte de carbono para as linhagens *Thermotoga marítima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermotoga petrophila*, *Fervidobacterium islandicum*, *Marinotiga camini* (35) e *Thermosipho* sp strain 3. (68)

4.5.1 Ensaio com *Petrotoga mexicana* (DSM14811) e *Petrotoga mobilis* (DSM10674).

As linhagens foram cultivadas por 3-4 dias em meio de cultura com os substratos, após o qual foram retiradas alíquotas para serem testadas frente à reação colorimétrica com o DNS para verificação do consumo do substrato. O ensaio foi realizado com dois tipos de amostras: livres de células e com células. Conforme já descrito no Item 3.6, também foram incluídos controles: controle do substrato utilizado (C.S) e controle do meio (C.M.).

As tabelas 28 e 29 apresentam os dados do Ensaio DNS e os cálculos das concentrações de glicose liberadas durante o teste, para a linhagem *P. mexicana* (DSM 14811), referentes ao substrato CMC e xilana, respectivamente.

Tabela 28 - Dados do Ensaio DNS dos cultivos da linhagem *P. mexicana* (DSM14811) com CMC.

Reação		Densidade Óptica	Desvio Padrão	Glicose liberada (g/L)*	Desvio Padrão
Branco		5,421E-20	0,003	0,04	0,03
C.S. - CMC		0,001	0,002	0,05	0,03
Com Células**	C.M.	0,0008	0,002	0,04	0,02
	Amostra + CMC	0,0013	0,0009	0,04	0,02
Livre de Células	C.M.	0,036	0,006	0,16	0,04
	Amostra + CMC	0,033	0,006	0,15	0,04

Fonte: Elaborada pelo autor.

* Os valores de glicose foram calculados a partir da equação 3 resultante da curva de calibração DNS-glicose (item 3.8.1).

** Extrato do cultivo contendo células ressuspensas em solução Acetato de Sódio - concentração final do tampão de 100mM.

Tabela 29 - Dados do Ensaio DNS dos cultivos da linhagem *P. mexicana* (DSM14811) com Xilana.

Reação		Densidade Óptica	Desvio Padrão	Glicose liberada (g/L)*	Desvio
Branco		5,421E-20	0,003	0,05	0,06
C.S. - Xilana		0,03	0,005	0,16	0,06
Com Células**	C.M.	0,0007	0,002	-0,06	0,02
	Amostra + Xilana	0,04	0,003	0,06	0,02
Livre de Células	C.M.	0,02	0,008	-0,0002	0,04
	Amostra + Xilana	0,09	0,008	0,25	0,05

Fonte: Elaborada pelo autor.

* Os valores de glicose foram calculados a partir da equação 3 resultante da curva de calibração DNS-glicose (item 3.8.1).

** Extrato do cultivo contendo células ressuspensas em solução Acetato de Sódio - concentração final do tampão de 100mM.

De acordo com os cálculos, infere-se que houve atividade enzimática do Extrato Livre de Células de *P. mexicana* (DSM 14811) sobre a fonte de carbono Xilana, com a liberação de $0,25 \pm 0,05$ g/L de glicose no meio (este é 1,56 vezes maior que o controle do mesmo substrato no teste). O valor do controle do meio correspondente a este ensaio é ínfimo quando comparado ao valor da reação da amostra + xilana.

Não foi detectada atividade de *P. mexicana* (DSM 14811) sobre o substrato CMC em nenhum dos extratos testados.

As tabelas 30 e 31 apresentam os dados do Ensaio DNS e os cálculos das concentrações de glicose liberadas durante o teste, para a linhagem *P. mobilis* (DSM 10674), referentes ao substrato CMC e xilana, respectivamente.

Tabela 30 - Dados do Ensaio DNS dos cultivos com CMC da linhagem *P. mobilis* (DSM10674).

Reação		Densidade Óptica	Desvio Padrão	Glicose liberada (g/L)*	Desvio
Branco		5,421E-20	0,003	0,05	0,06
C.S. - CMC		0,001	0,002	0,05	0,05
Com Células**	C.M.	0,0006	0,002	0,05	0,02
	Amostra + CMC	0,001	0,001	0,05	0,02
Livre de Células	C.M.	0,027	0,002	0,13	0,02
	Amostra + CMC	0,07	0,009	0,26	0,05

Fonte: Elaborada pelo autor.

* Os valores de glicose foram calculados a partir da equação 3 resultante da curva de calibração DNS-glicose (item 3.8.1).

** Extrato do cultivo contendo células ressuspensas em solução Acetato de Sódio - concentração final do tampão de 100mM.

Tabela 31 - Dados do Ensaio DNS dos cultivos da linhagem *P. mobilis* (DSM10674) em meio com Xilana.

Reação		Densidade Óptica	Desvio Padrão	Glicose liberada (g/L)*	Desvio
Branco		5,421E-20	0,003	0,05	0,06
C.S. - Xilana		0,03	0,005	0,16	0,06
Com Células**	C.M.	-0,0006	0,0008	-0,07	0,02
	Amostra + Xilana	0,033	0,005	0,05	0,04
Livre de Células	C.M.	0,025	0,005	0,02	0,03
	Amostra + Xilana	0,156	0,002	0,46	0,04

Fonte: Elaborada pelo autor.

* Os valores de glicose foram calculados a partir da equação 3 resultante da curva de calibração DNS-glicose (item 3.8.1).

** Extrato do cultivo contendo células ressuspensas em solução Acetato de Sódio - concentração final do tampão de 100mM.

Ao analisar os valores calculados para o teste com a linhagem *P. mobilis* (DSM 10674), pode-se observar atividade sobre o substrato CMC, no Extrato Livre de Células, ao valor de $0,26 \pm 0,05$ g/L de glicose liberada na reação. Este valor é aproximadamente 2 vezes maior que o valor calculado para o controle do meio (C.M.= $0,13 \pm 0,02$ g/L), e 5,2 vezes maior que o valor calculado para o controle do mesmo substrato (C.S.= $0,05 \pm 0,05$ g/L). A literatura registra a ausência de crescimento desta mesma linhagem - *Petrotoga mobilis*-DSM 10674 - em meio com celulose (40), sem especificar o tipo de celulose usado, ou seja, se foi na forma solúvel, como é o caso da carboximetilcelulose (CMC), um polímero derivado da celulose. A maior parte dos ensaios de atividade celulolítica por microrganismos utiliza CMC (celulose amorfa) ou Avicel (celulose microcristalina) (62) para a busca de, respectivamente, endoglucanases ou exoglucanases (ambas são tipos de celulasas). (69-70) Desse modo, seria necessário repetir os ensaios de degradação de CMC, testando-se também outras condições de salinidade e temperaturas, por exemplo, para a confirmação da degradação da CMC por esta linhagem.

Ao analisar os valores calculados para o ensaio com substrato xilana, constatou-se que houve atividade enzimática no Extrato Livre de Células de *P.mobilis* (DSM 10674), num valor de $0,46 \pm 0,04$ g/L de glicose. Este valor é aproximadamente 23 vezes maior que o controle do mesmo meio de cultura ($0,02 \pm 0,03$ g/L), e 2,87 vezes maior que o controle de substrato ($0,16 \pm 0,06$ g/L) correspondente.

Para fins de comparação, a tabela 32 foi elaborada contrapondo as linhagens *P. mexicana* (DSM 14811) e *P. mobilis* (DSM 10674) com relação ao açúcar redutor liberado nas reações dos Extratos Livre de Células.

Tabela 32 - Comparação entre as quantidades de glicose liberada (g/L) nas reações dos extratos livres de células de *P. mexicana* (DSM 14811) e *P. mobilis* (10674) com os substratos CMC e xilana.

Amostra verificada	Substrato	<i>P. mexicana</i> (DSM 14811) (Glicose em g/L)	<i>P. mobilis</i> (DSM 10674) (Glicose em g/L)
Extrato livre de células	CMC	$0,15 \pm 0,04$ (*C.M.= $0,16 \pm 0,04$)	$0,26 \pm 0,5$ (*C.M.= $0,13 \pm 0,02$)
Extrato livre de células	Xilana	$0,36 \pm 0,07$ (*C.M.= $0,11 \pm 0,07$)	$0,46 \pm 0,04$ (*C.S.= $0,16 \pm 0,06$)

Fonte: Elaborada pelo autor.

* Os valores entre parênteses referem-se aos valores dos controles do Meio (C.M.) ou do substrato (C.S.), para efeito de comparação.

A tabela 33 apresenta os valores de atividade enzimática expressos em unidade de atividade enzimática (U), cuja equação utilizada no cálculo está demonstrada no item 3.8.3.

Tabela 33 - Atividade enzimática das linhagens *P. mexicana* DSM14811 e *P. mobilis* DSM10674 sobre os substratos xilana e CMC, expressas em [U/L].

Amostra verificada (extrato livre de células)	Substrato	Atividade enzimática (U/L)
<i>P. mexicana</i> (DSM 14811)	Xilana	70 ± 17
<i>P. mobilis</i> (DSM 10674)	Xilana	127 ± 16
	CMC	73 ± 18

Fonte: Elaborada pelo autor.

A atividade enzimática sobre a xilana com valores expressos em U, dentre as Thermotogae, foi relatada para *Thermotoga hypogea* (61), uma espécie isolada de reservatório de petróleo, cujos extratos livre de células e com células apresentaram valores de atividade de 93 U/L e 81 U/L, respectivamente. Estes valores, em termos de grandeza, são próximos dos obtidos neste trabalho, para *P. mobilis* (DSM 10674). Outras espécies bacterianas, como *Thermomonospora sp* (71), um actinomiceto alcalo-termofílico, e *Bacillus subtilis* (72), isolado a partir de sedimento estuarino na Índia, apresentaram atividade xilanólítica 125 U/mL e 126 U/mL (extratos livre de células) em cultivos aeróbios, respectivamente. A espécie *Thermomonospora sp.* também demonstrou atividade celulolítica de 23 U/mL em substrato CMC. (73) Comparado com estes valores, as atividades enzimáticas observada em *T. hypogea* por Fardeau e colaboradores (61) e em *P. mobilis*, no presente trabalho, parecem ser discretas. Ainda que discreta, os resultados obtidos neste trabalho com *Petrotoga mobilis* (DSM 10674) fornecem uma evidência para a atividade celulolítica desta espécie, que poder ser por uma celulase do tipo endoglucanase, já que atuou sobre uma celulose amorfa (carboximetilcelulose).

4.5.2 Ensaio com o Isolado MG414-03.

O ensaio DNS para degradação de substratos foi realizado com o isolado MG414-03, seguindo o mesmo planejamento descrito no item 4.5.1, exceto a inclusão de mais um controle no ensaio: a amostra, na forma de extrato com células ou sem células, sem a adição do substrato.

As tabelas 34 e 35 apresentam os dados do Ensaio DNS e os cálculos das concentrações de glicose liberadas durante o teste, para o isolado MG414-03, referentes ao substrato CMC e xilana, respectivamente.

Tabela 34 - Dados do Ensaio DNS dos cultivos do isolado MG414-03 em meio com CMC.

Reação		Densidade Óptica	Desvio Padrão	Glicose liberada (g/L)*	Desvio Padrão
Branco		-5,3571E-06	0,001094	0,04	0,02
C.S. - CMC		0,001	0,003	0,05	0,03
Com Células**	C.M.	0,0026	0,0006	0,05	0,02
	Amostra sem CMC	0,005	0,002	0,06	0,02
	Amostra + CMC	0,004	0,001	0,05	0,02
Livre de Células	C.M.	0,05	0,01	0,22	0,07
	Amostra sem CMC	0,12	0,03	0,5	0,1
	Amostra + CMC	0,027	0,005	0,14	0,04

Fonte: Elaborada pelo autor.

* Os valores de glicose foram calculados a partir da equação 4 resultante da curva de calibração DNS-glicose (item 3.8.2).

** Extrato do cultivo contendo células ressuspensas em solução Acetato de Sódio - concentração final do tampão de 100mM.

Tabela 35 - Dados do Ensaio DNS dos cultivos do isolado MG414-03 em meio com Xilana.

Reação		Densidade Óptica	Desvio Padrão	Glicose liberada (g/L)*	Desvio Padrão
Branco		-5,3571E-06	0,001094	0,04	0,02
C.S. - Xilana		0,0311	0,0006	0,16	0,02
Com Células**	C.M.	0,001	0,001	0,05	0,02
	Amostra sem Xilana	-8,7E-05	0,00127	0,04	0,02
	Amostra + Xilana	0,037	0,003	0,18	0,03
Livre de Células	C.M.	0,20	0,07	0,8	0,3
	Amostra sem Xilana	0,102	0,009	0,41	0,06
	Amostra + Xilana	0,27	0,03	1,0	0,2

Fonte: Elaborada pelo autor.

* Os valores de glicose foram calculados a partir da equação 4 resultante da curva de calibração DNS-glicose (Item 3.8.2).

** Extrato do cultivo contendo células ressuspensas em solução Acetato de Sódio - concentração final do tampão de 100mM.

Analisando os dados apresentados na tabela 34, verificou-se que não houve atividade enzimática de nenhum dos extratos do isolado MG414-03 sobre o CMC. Os valores de glicose liberada nestas reações foram baixos e muito próximos aos valores dos controles (do meio e do substrato). O mesmo foi observado no teste com a xilana (tabela 35), cujos valores de glicose detectados nas reações da xilana com os extratos livre e com células foram muito próximos aos detectados nos controles.

Com base nestes resultados, conclui-se que o isolado MG414-03, nas condições testadas, não degradou os substratos xilana e CMC.

Dentre as seis bactérias do gênero *Petrotoga* citadas na literatura, cinco delas degradam xilana em suas reações metabólicas. Como já comentado no início do item 4.5, a linhagem *Petrotoga mobilis*-DSM10674, em teste realizado por Lien e colaboradores (40), não degradou a xilana em condições ótimas de crescimento.

4.6 Descrição do Isolado MG414-03.

Isolado a partir do fluído água-óleo do reservatório de Miranga (UO-PETROBRAS). As células de MG414-03 têm forma de bastonete e são envolvidas por uma estrutura semelhante a uma bainha, chamada toga, que é característica da ordem Thermotogales (figura 22). Células coram como Gram-negativas. Suas células medem de 0,8-4,0 μm de comprimento (comprimento médio: $1,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$) por 0,4-1,1 μm de largura (largura média: $0,7 \pm 0,1 \mu\text{m}$), podendo ser individuais ou formar filamentos. Motilidade foi observada em células individuais e em arranjos de dois. Células e togas desenvolvem formas esféricas na fase estacionária (figura 23). Endósporos não foram observados em nenhuma fase de crescimento ou em qualquer meio testado. Forma colônias circulares lisas, com borda lisa, transparentes, com diâmetro máximo de 1,0 mm. O isolado é anaeróbio estrito e se desenvolve nas temperaturas de 40°C e 60°C, com melhor crescimento em 60°C, e em concentração de cloreto de sódio de 2% até 7%, com ótimo de crescimento em 4%. Utiliza glicose, xilose, maltose e sacarose como fontes de carbono, mas não utiliza xilana e carboximetilcelulose (CMC). É inibido pelos antibióticos canamicina, e cloranfenicol nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A tabela 36 compara algumas das características do isolado MG414-03 com outras espécies de *Petrotoga*.

Figura 22 - Fotomicrografia de contraste de fase do isolado MG414-03 em 3-4 dias de cultivo em meio P. miotherma-DSMZ. Aumento: 1600x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 23 - Fotomicrografia de contraste de fase do isolado MG414-03 em 3-4 dias de cultivo em meio P. miotherma-DSMZ. Aumento: 640x. As setas indicam as formas esféricas do isolado.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 36 - Comparação de algumas características fisiológicas e morfológicas entre espécies de *Petrotoga* e o isolado MG414-03.

Espécies	Salinidade (%) [Ótimo]	Temperatura (°C) [Ótimo]	Comprimento (µm)	Largura (µm)	Mobilidade	Corpos Esféricos	Anaeróbio Estrito	Tiosulfato de Sódio ^(a)	Extrato de Levedura ^(b)
<i>P. olearia</i> (41)	0,5-8 [2]	37-60 [55]	0,9 - 2,5	0,3 - 0,6	+	-	+	-	+ ^(b)
<i>P. sibirica</i> (41)	0,5-7 [1]	37-55 [55]	0,9 - 2,5	0,3 - 0,6	+	-	+	-	+ ^(b)
<i>P. mexicana</i> (42)	1-20 [3]	25-65 [55]	1,4 - 5	0,5 - 0,7	+	nd	+	+	nd
<i>P. mobilis</i> (40)	0,5-9 [3-4]	40-65 [58-60]	1,0 - 50	0,5 - 1,0	+	-	+	+	+ ^(c)
<i>P. halophila</i> (43)	0,5-9 [4-6]	45-65 [60]	2,0 - 45	0,5 - 0,7	-	+	+	-	+
<i>P. japonica</i> (44)	0,5-9 [0,5]	40-65 [60]	2,5 - 7,0	0,25 - 0,75	+	+	nd	+	+ ^(c)
<i>P. miotherma</i> (39)	0,5-10 [2]	35-65 [55]	2 - 7,5	0,6	-	+	+	nd	+ ^(b)
Isolado MG414-03	2,0-7,0 [4]	40- 60 -[60]	0,8 - 4,0	0,4 - 1,1	+	+	+	nd	nd

Fonte: Elaborada pelo autor.

^(a) Usa tiosulfato de sódio como aceptor de elétrons.

^(b) Necessita do extrato de levedura para crescer.

^(c) A adição do composto ao cultivo aumenta o rendimento celular.

5 CONCLUSÕES

- Os meios de cultura selecionados na literatura – meio P.olearia e meio P.mexicana - foram eficientes para o isolamento de linhagens de *Petrotoga* a partir das amostras de fluidos água/óleo do reservatório estudado.
- A análise do DNAr 16S e os resultados obtidos a partir de alguns testes metabólicos realizados permitem concluir que o isolado MG414-03 pertence ao gênero *Petrotoga*. A alta similaridade deste isolado com a espécie *P. miotherma*, observada a partir do DNAr 16S, deve ser confirmada com outros testes genotípicos e fenotípicos.
- O isolado MG414-03 apresentou crescimento ótimo na temperatura de 60°C, salinidade de 40g/L NaCl e utilizando maltose como fonte de carbono (em meio suplementado com extrato de levedura e triptona), podendo-se, por isso, classificá-lo como um microrganismo termofílico e halofílico discreto.
- Sendo *Petrotoga* um gênero exclusivo de reservatório de petróleo, este microrganismo pode ser utilizado como espécie indicadora de processos metabólicos ocorrentes *in situ*. Este fato é de particular interesse em reservatórios candidatos à injeção de CO₂, caso do reservatório de Miranga, de onde MG414-03 foi isolado. A associação de bactérias produtoras de hidrogênio (H₂) (já relatado para *Petrotoga* sp) com as metanogênicas hidrogenotróficas (que convertem CO₂ em CH₄) pode dar uma indicativo do consumo do CO₂ injetado.

Como perspectivas deste trabalho, os resultados obtidos indicam a necessidade de realização de outras análises fenotípicas e genotípicas com vista à identificação do isolado MG414-03 em nível de espécie, existindo ainda a possibilidade do mesmo ser um novo membro do gênero *Petrotoga*.

As condições ótimas de crescimento de MG414-03 necessitam ser mais bem exploradas, sugerindo-se a ampliação dos intervalos de salinidade e temperatura testados. O mesmo se aplica ao método de preservação dos isolados, devendo ser testados outros métodos de criopreservação e/ou a técnica de liofilização.

Estudos relativos à análise da produção de H₂ em cultivos com o isolado MG414-03 (mistos e individuais), incubados em condições de reservatório, poderão

auxiliar estudos futuros sobre o manejo de reservatórios candidatos à injeção de CO₂. Também sugere-se um estudo mais aprofundado sobre os metabólitos gerados pelo isolado MG414-03.

Notou-se que a linhagem *Petrotoga mobilis*-DSM 10674, adquirida de uma coleção de culturas alemã, mostrou degradar a carboximetilcelulose à temperatura de 60°C e salinidade de 1,8%, justificando a realização de mais testes para a confirmação e otimização desta característica.

REFERÊNCIAS

- 1 CRUZ, G. F.; MARSAIOLI, A. J. Processos naturais de biodegradação do petróleo em reservatórios. **Química Nova**, v. 35, n. 8, p. 1628-1634, 2012.
- 2 MORIGAKI, M. K.; CHIMIN, Q. F.; SAD, C. M. S.; FILGUEIRAS, P. R.; CASTRO, E. V. R. Salinidade em petróleo bruto: otimização de metodologia e proposta de um novo método para extração de sais em petróleo. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 607-612, 2010.
- 3 MILANI, E. J.; BRANDAO, J. A. S. L.; ZALAN, P. V.; GAMBOA, L. A. P. Petróleo na margem continental brasileira: geologia, exploração, resultados e perspectivas. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 18, n. 3, p. 352-396, 2000.
- 4 PLANCKAERT, M. Oil reservoirs and oil production. In: OLLIVIER, B.; MAGOT, M. (Ed.) **Petroleum microbiology**. Washington: ASM Press, 2005. p. 3-19.
- 5 MAGOT, M. Indigenous microbial communities in oil fields. In: OLLIVIER, B.; MAGOT, M. (Ed.) **Petroleum microbiology**. Washington: ASM Press, 2005. p. 21-33.
- 6 BASS, C. ZoBell's contribution to petroleum microbiology. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 8., 1999 Halifax. **Proceedings...** Halifax: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, 1999.
- 7 VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 503-549, 2003.
- 8 MAGOT, M.; OLLIVIER, B.; PATEL, B. K. C. Microbiology of petroleum reservoirs. **Antoine van Leeuwenhoek**, v. 77, n. 2, p. 103-116, 2000.
- 9 YOUSSEF, N.; ELSHAHED, M. S.; McINERNEY, M. J. Microbial processes in oil fields: culprits, problems, and opportunities. **Advances in Applied Microbiology**, v.66, p. 141-251, 2009. doi: 10.1016/S0065-2164(08)00806-X.
- 10 VANCE, I.; THRASHER, D. R. Reservoir souring: mechanisms and prevention. In: OLLIVIER, B.; MAGOT, M. **Petroleum microbiology**. Washington, DC: ASM, 2005. cap 7. p. 123-142.
- 11 JEANTHON, C.; NERCESSIAN, O.; CORRE, E.; GRABOESKI-LUX, A. Hyperthermophilic and methanogenic archaea in oil fields. In: OLLIVIER, B.; MAGOT, M. (Ed.) **Petroleum microbiology**. Washington, DC: ASM, 2005. cap. 4. p. 55-70.
- 12 OLLIVIER, B.; CAYOL, J. L. Fermentative, Iron-reducing, and Nitrate-reducing microorganisms. In: OLLIVIER, B.; MAGOT, M. (Ed.) **Petroleum microbiology**. Washington, DC: ASM, 2005. cap. 5. p. 71-88.
- 13 BHANDARI, V.; GUPTA, R. S. The phylum thermotogae. In: ROSENBERG, E.; DELONG, E. F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.; THOMPSON, F. **The Prokaryotes**: other major lineages of Bacteria and the Archaea. 4th ed. Berlin: Springer-Verlag, 2014. p.989-1016.
- 14 AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

- 15 CHANDLER, D. P.; BROCKMAN, F. J.; FREDERICKSON, J. K. Use of 16S DNA clone libraries to study changes in a microbial community resulting from ex situ perturbation of a subsurface sediment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3-4, p. 217-230, 1997.
- 16 VOORDOUW, G.; ARMSTRONG, S. M.; REIMER, M. F.; FOUT, B.; TELANG, A. J.; SHEN, Y.; GEVERTZ, D. Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing, fermentative, and sulfide-oxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1623-1629, 1996.
- 17 ORPHAN, V. J.; TAYLOR, L. T.; HAFENBRADL, D.; DELONG, E. F. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblages associated with high-temperature petroleum reservoirs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 700-711, 2000.
- 18 BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A.; MIROSHNICHENKO, M. L.; LEBEDINSKY, A. V.; CHERNYH, N. A.; NAZINA, T. N.; IVOILOV, V. S.; BELYAEV, S. S.; BOULYGINA, E. S.; LYSOV, YU. P.; PEROV, A. N.; MIRZABEKOV, A. D.; HIPPE, H.; STACHEBRANDT, E.; L'HARIDON, S.; JEANTHON, C. Radioisotopic, culture-based, and oligonucleotide microchip analyses of thermophilic microbial communities in a continental high-temperature petroleum reservoir. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6143–6151, 2003.
- 19 GRABOWSKI, A.; NERCESSIAN, O.; FAYOLLE, F.; BLANCHET, D.; JEANTHON, C. Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 54, n. 3, p. 427-443, 2005.
- 20 DAHLE, H.; GARSHOL, F.; MADSEN, M.; BIRKELAND, N. K. Microbial community structure analysis of produced water from a hightemperature North Sea oil field. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 93, n. 1-2, p. 37-49. 2008.
- 21 PAVLOVA-KOSTRYUKOVA, N. K.; TOUROVA, T. P.; POLTARAUS, T. P.; FENG, Q.; NAZINA, T. N. Microbial diversity in formation water and enrichment cultures from the gangxi bed of the dagang terrigenous oilfield (PRC). **Microbiology**. v. 83, n. 5, p. 616-633. 2014.
- 22 LENCHI, N.; INÇEOĞLU, Ö.; KEBBOUCHE-GANA, S.; GANA, M. L.; LLIRÓS, M.; SERVAIS, P.; GARCÍA-ARMISEN, T. Diversity of microbial communities in production and injection waters of algerian oilfields revealed by 16S rRNA gene amplicon 454 pyrosequencing. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0066588.
- 23 KRYACHKO, Y.; DONG, X.; SENSEN, C.W.; VOORDOUW, G. Compositions of microbial communities associated with oil and water in a mesothermic oil field. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.101, n. 3, p.493–506, 2012.
- 24 MUYZER, G.; DE WALL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel eletrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.
- 25 LERMAN, L.S.; FISHER, S.G.; HURLEY, I.; SILVERSTEIN, K.; LUMELSKY, N. Sequence-determined DNA separations. **Annual Review of Biophysics and Bioengineering**, v. 13, p. 399-423, 1984.
- 26 MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 1, p. 127-141, 1998.

- 27 MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 317–322, 1999.
- 28 KORENBLUM, E.; VALONI, É.; PENNA, M.; SELDIN. Bacterial diversity in water injection systems of Brazilian offshore oil platforms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 791-800, 2010.
- 29 GIEG, L. M.; JACK, T. R.; FOGHT, J. M. Biological souring and mitigation in oil reservoirs. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 92, n. 2, p. 263–282, 2011.
- 30 REN, H-Y.; ZHANG, X-J.; SONG, Z-Y.; RUPERT, W.; GAO, G-J.; GUO, S-X.; ZHAO, L-P. Comparison of microbial community compositions of injection and production well samples in a long-term water-flooded petroleum reservoir. **PLoS ONE**, v.6, n. 8, p. e23258, 2011.
- 31 SUGAI, Y; PURWASENA, I. A.; SASAKI, K.; FUJIWARA, K.; HATTORI, Y.; OKATSU, K. Experimental studies on indigenous hydrocarbon-degrading and hydrogen-producing bacteria in an oilfield for microbial restoration of natural gas deposits with CO₂ sequestration. **Journal of Natural Gas Science and Engineering**, v. 5, n. 1, p. 31-41, 2012.
- 32 NAZINA, T. N.; PAVLOVA, N. K.; TATARKIN, Y. V.; SHESTAKOVA, N. M.; BABICH, T. L.; SOKOLOVA, D. SH.; IVOILOV, V. S.; KHISAMETDINOV, M. R.; IBATULLIN, R. R.; TOUROVA, T. P.; BELYAEV, S. S.; IVANOV, M. V. Microorganisms of the carbonate petroleum reservoir 302 of the Romashkinskoe oilfield and their biotechnological potential. **Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 190-200, 2013.
- 33 BHANDARI, V.; GUPTA, R. S. Molecular signatures for the phylum (class) thermotogae and a proposal for its division into three orders (Thermotogales, Kosmotogales ord. nov. and Petrotogales ord. nov.) containing four families (Thermotogaceae, Fervidobacteriaceae fam. nov., Kosmotogaceae fam. nov. and Petrotogaceae fam. nov.) and a new genus Pseudothermotoga gen. nov. with five new combinations. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.105. n. 1, p. 143-168, 2014.
- 34 GUPTA, R. S.; BANDARI, V. Phylogeny and molecular signatures for the phylum Thermotogae and its subgroups. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 1, p.1-34, 2011.
- 35 HUBER, R.; HANNIG, M. Thermotogales. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes** - a handbook on the biology of bacteria. 3rd ed. New York: Springer, 2006. v. 7. p. 899-922.
- 36 REYSENBACH, A-L. Phylum II. thermotogae *phy.nov.* In: GARRITY, G.; BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology: the archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria**. New York: Springer Science + Business Media, 2001. v. 1. p. 369-387.
- 37 PATEL, B. K. C.; MORGAN, H. W.; DANIEL, R. M. *Fervidobacterium nodosum* gen. nov. and spec. nov., a new chemoorganotrophic, caldoactive, anaerobic bacterium. **Archives of Microbiology**, v. 141, n. 1, p.63-69, 1985.
- 38 HUBER, R.; LANGWORTHY, T.; KONIG, H.; THOMM, M.; WOESE, C.; SLEYTR, U.; STETTER, K. *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. **Archives of Microbiology**, v. 144 n. 4, p. 324–333, 1986.
- 39 DAVEY, M. E.; WOOD, W. A.; KEY, R.; NAKAMURA, K.; STAHL, D. A. Isolation of three species of *Geotoga* and *Petrotoga*: two new genera, representing a new lineage in the

bacterial line of descent distantly related to the “Thermotogales”. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 191–200, 1993.

40 LIEN, T.; MADSEN, M.; RAINEY, F. A.; BIRKELAND, N.-K. *Petrotoga mobilis* sp. nov., from a North Sea oil-production well. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 3, p.1007-1013, 1998.

41 L'HARIDON, S.; MIROSHNICHENKO, M. L.; HIPPE, H.; FARDEAU M.-L.; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A.; STACKEBRANDT, E.; JEANTHON, C. *Petrotoga olearia* sp. nov. and *Petrotoga sibirica* sp. nov., two thermophilic bacteria isolated from a continental petroleum reservoir in western Siberia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1715-1722, 2002.

42 MIRANDA-TELLO, E.; FARDEAU, M. L.; THOMAS, P.; RAMIREZ, F.; CASALOT, L.; CAYOL, J. L.; GARCIA, J. L.; OLLIVIER, B. *Petrotoga mexicana* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic and xylanolytic bacterium isolated from an oil-producing well in the Gulf of Mexico. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 1, p.169-174, 2004.

43 MIRANDA-TELLO, E.; FARDEAU, M.-L.; JOULIAN, C.; MAGOT, M.; THOMAS, P.; THOLOZAN, J.-L.; OLIVER, B. *Petrotoga halophila* sp. nov., a thermophilic, moderately halophilic, fermentative bacterium isolated from an offshore oil well in Congo. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 40–44, 2007.

44 PURWASENA, I. A.; SUGAI, Y.; SASAKI, K. *Petrotoga japonica* sp. nov., a thermophilic, fermentative bacterium isolated from Yabase Oilfield in Japan. **Archives of Microbiology**, v.196, n. 5. p. 313–321, 2014.

45 JAYASINGHEARACHCHI, H. S.; LAL, B. *Oceanotoga teriensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from offshore oil-producing wells. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, n. 3, p. 554–560, 2011.

46 LJUNGDAHL, L. G.; WIEGEL, J. Working with anaerobic bacteria. In: DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. (Ed.) **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. Washington: ASM, 1986. p. 84-96.

47 ZINDER, S. H.; CARDWELL, S. C.; ANGUISH, T.; LEE, M.; KOCH, M. Methanogenesis in a thermophilic (58°C) anaerobic digester - *methanotherix* sp as an important acetoclastic methanogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 796-807, 1984.

48 POSTGATE, J. R. **The sulphate-reducing bacteria**. Cambridge: Cambridge University Press, 1979. 151 p.

49 DSMZ GmbH. **Medium 718** - petrotoga medium. 2010. Disponível em: <http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium718.pdf>. Acesso em: 18 set. 2014.

50 COLLINS, C. H.; LINE, P. M.; GRANGE, J. M. **Collins and Lyne's microbiological methods**. Oxford: CRC Press, 1995. 493 p.

51 WOLIN, E. A.; WOLIN, M. J.; WOLFE, R. S. Formation of methane by bacterial extracts. **Journal of Biological Chemistry**. v. 238, n. 8, p. 2882-2886.1963.

52 BALCH, W. E.; FOX, G. E.; MAGRUM, L. J.; WOESE, C. R.; WOLFE, R. S. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. **Microbiology Reviews**. v. 43, n.2, p. 260–296, 1979.

- 53 OLIVEIRA, T. F. et al **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**: concentração mínima inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. Seropédica: EMBRAPA, 2009. 16 p.
- 54 BENITO, J. M.; LOVRICH, G. A.; SIÑERIZ, F.; ABATE, C. M. Isolation and molecular characterization of seawater bacteria. In: SPENCER, J. F. T.; RAGOUT DE SPENCER, A. L. (Ed.). **Environmental microbiology** - methods and protocols. Totowa: Humana Press, 2004. p.3-9. doi:10.1385/1-59259-765-3:003.
- 55 LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.) **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley, 1991. p. 115-175.
- 56 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor, 1989. v. 1.
- 57 LUCARINI, A. C.; DA SILVA, L. A.; BIANCHI, R. A. C. Uma sistema para contagem semi-automática de microrganismos. **Pesquisa & Tecnologia FEI**, v. 26, p. 36-40, 2004. Disponível em: < <http://fei.edu.br/~rbianchi/publications/RevistaFEI2004-a.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2015.
- 58 WIDDEL, F. Theory and measurement of BacTerial growth. 2010. Disponível em: < <http://www.mpi-bremen.de/Binaries/Binary13037/Wachstumsversuch.pdf>>. Acesso em: 29 maio 2015.
- 59 MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice-Hall, 2004.
- 60 MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- 61 FARDEAU, M.-L.; OLLIVIER, B.; PATEL, B. K. C.; MAGOT, M.; THOMAS, P.; RIMBAULT, A.; ROCCHICCIOLI, F.; GARCIA, J.-L. *Thermotoga hypogaea* sp. nov., a Xylanolytic, Thermophilic Bacterium from an Oil-Producing well. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1013-1019, 1997.
- 62 SERPA, V. **Produção e caracterização de proteínas do complexo celulolítico de Tricoderma harzianum e Tricoderma reesei**. 2012. 166 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 63 TAKAHATA, Y.; NISHIJIMA, M.; HOAKI, T.; MARUYAMA, T. *Thermotoga petrophila* sp. nov. and *Thermotoga naphthophila* sp. nov., two hyperthermophilic bacteria from the Kubiki oil reservoir in Niigata, Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 51, n. 5, p. 1901-1909, 2001.
- 64 PAOLI, P. D. Biobanking in microbiology: from sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 5, p. 897-910, 2005.
- 65 ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.
- 66 SUTCLIFFE, I. C. A phylum level perspective on bacterial cell envelope architecture. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 10, p. 464-470, 2010.

67 BROOKS, G. F.; CARROL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia Médica**: de Jawetz, Melnick e Adelberg. 26. ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2014.

68 DIPASQUALE, L.; ROMANO, I.; PICARIELLO, G.; CALANDRELLI, V.; LAMA, L. Characterization of a native cellulase activity from an anaerobic thermophilic hydrogen-producing bacterium *Thermosipho* sp. strain 3. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 4, p.1493-1503, 2014.

69 PANDEY, S.; SINGH, S.; YADAV, A. N.; NAIN, L.; SAXENA, A. K. Phylogenetic diversity and characterization of novel and efficient cellulase producing bacterial isolates from various extreme environments. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 7, p.1474-1480, 2013.

70 JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial cellulases: engineering, production and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, n. 1, p. 188-203, 2014.

71 GEORGE, S. P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. A novel thermostable xylanase from *thermomonospora* sp.: influência of additives on thermostability. **Bioresource Technology**, v. 78, n. 3, p. 221-224, 2001.

72 AMNAMALAI, N.; THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T. Thermostable and alkaline tolerant xylanase production by *Bacillus subtilis* isolated from marine environment. *Indian Journal of Biotechnology*. v. 8, n. 3, p. 291-297. 2009.

73 GEORGE, S. P.; AHMAD, A.; RAO, M. B. Studies on carboxymethyl cellulase produced by an alkalothermophilic actinomycete. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 2, p. 171-175, 2001.

74 PETROLEUM Geoscience Technology. **Geologia do petróleo**. Disponível em: <https://albertowj.files.wordpress.com/2010/03/geologia_do_petroleo.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2013.

75 PETROGASNEWS. **Geologia do petróleo**. Disponível em: <<https://petrogasnews.wordpress.com/2011/03/14/geologia-do-petroleo/>>. Acesso em 14 mar. 2011.

76 BASTIN, E. S. et al. The presence of sulphate reducing bacteria in oil field waters. **Science**, v. 63, n. 1618, p. 21-24, 1926.

77 DIPIPO, J.L.; NESBO, C.L.; DAHLE, H.; DOOLITTLE, W.F.; BIRKLAND, N.K.; NOLL, K.M. (2009) *Kosmotoga olearia* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, anaerobic heterotroph isolated from an oil production fluid. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.59, n. 12, p.2991–3000, 2009.

78 PETRUS, A. K.; SWITHERS, K. S.; RANJIT, C.; WU, S.; BREWER, H. M.; GOGARTEN, J. P.; PASA-TOLIC, L.; NOLL, K. M. Genes for the major structural components of thermotogales species' togas revealed by proteomic and evolutionary analyses of OmpA and OmpB homologs. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0040236.

79 DSMZ. Identification and characterization of microorganisms and cultures. Disponível em:<<https://www.dsmz.de/services/services-microorganisms/identification.html>>. Acesso em: 04 fev. 2014.