FABIANE DÖRR

**TÍTULO: CONSÓRCIOS DEGRADADORES DE BTEX:
ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Biotecnologia USP/Instituto de Ciências
Biomédicas, para obtenção do Título de mestre em
Biotecnologia.

São Paulo
2008

CONSÓRCIOS DEGRADADORES DE BTEX: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO

FABIANE DÖRR

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Biotecnologia USP/Instituto de Ciências Biomédicas,
para obtenção do Título de mestre
em Biotecnologia.

Área de concentração:
Biotecnologia

Orientador:
Prof. Dr. René Peter Schneider

São Paulo
2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Dörr, Fabiane.

Consórcios degradadores de BTEX: identificação, caracterização e avaliação do potencial de degradação / Fabiane Dörr. -- São Paulo, 2008.

Orientador: René Peter Schneider.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biorremediação.

Versão do título para o inglês: BTEX degrading consortia: identification, characterization and degradation potential evaluation.

Descritores: 1. Biorremediação 2. Hidrocarbonetos 3. Biodegradação 4. BTEX 5. Sequenciamento genético I. Schneider, René Peter II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB155/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Fabiane Dörr.

Título da Dissertação: Consórcios degradadores de BTEX identificação, caracterização e avaliação do potencial de degradação.

Orientador(a): René Peter Schneider.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

*Àqueles que me deram a vida
e me ensinaram a vivê-la com dignidade...
...que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos
para que eu pudesse realizar os meus.
Aos meus heróicos e insubstituíveis pais...
...pais por natureza, por opção e amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao meus pais, guerreiros incansáveis, fonte de orgulho e inspiração, pelo amor incondicional, apoio e incentivo constantes.

Ao meu orientador, René, pela oportunidade e confiança no meu trabalho. Pelos 4 anos de ensinamentos de inenarrável valor... E por tornar possível um sonho...

À Karina, pela amizade e preciosa ajuda nos momentos de aperto (pessoalmente, por telefone ou msn, sempre me auxiliando na compreensão de conhecimentos específicos de biomol e microbiologia, limitados em função da minha formação de Química Industrial).

À Fátima, Namy, Roberta e Paulo Fonseca que, mais do que colegas, foram grandes amigos... Ensinando e aprendendo, contribuíram significativamente no desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais colegas de laboratório: Paulo Mendez, Rodolfo, Ney, Júnior, Fernando, Thiago, Dani, Maria do Carmo e Bianca, pela amizade e momentos de descontração.

Aos novos colegas, e àqueles que passaram...

À Rita, pela amizade que excedeu os tempos de laboratório e perdura até hoje.

Ao meu irmão Felipe, pela presença e apoio constantes. De Santa Maria a São Paulo, desde sempre deu sentido à palavra "família".

Ao Nando e à Mari que, mais do que família, são verdadeiros amigos... Mesmo de longe, sempre torceram por mim.

À Vanessa, Nena, Lisi, Renata, Fabiana, Dani, Melissa e Thaís, pelo carinho e amizade.

Ao Ronaldo, por me ensinar a querer ser melhor, por acreditar no meu potencial e por mostrar que (quase) tudo é possível.

Aos professores Maurício Yonamine e Pio Colepicolo, pelas oportunidades e por permitirem a continuidade deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Análises Toxicológicas e do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular e à todos aqueles que estiveram ao meu lado e que, embora não citados nominalmente, contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

*"Bom mesmo é ir a luta com determinação,
abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia,
pois o triunfo pertence a quem se atreve...
A vida é muita para ser insignificante."*

Charles Chaplin

RESUMO

DÖRR, F. **Consórcios degradadores de BTEX: isolamento, caracterização e avaliação do potencial de degradação**. 2008. 176 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Amostras de água subterrânea provenientes de uma área industrial contaminada por hidrocarbonetos monoaromáticos foram utilizadas para a obtenção de bactérias degradadoras de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xileno), com o intuito de realizar sua identificação, caracterização e avaliação do potencial de degradação. Foram estudados os perfis de crescimento dos consórcios de bactérias enriquecidos em BTEX, isoladamente e com diferentes substratos. Apenas parte das cepas isoladas apresentaram capacidade de crescimento quando expostas individualmente aos compostos em que foram previamente adaptadas. Foram identificadas, por análises de ácidos graxos e seqüenciamento do DNAr 16S, as espécies *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter* sp., *Bacillus cereus* e *Bacillus tropicalis*.

Palavras-chave: BTEX; biodegradação; consórcios microbianos; biorremediação; hidrocarbonetos aromáticos.

ABSTRACT

DÖRR, F. **BTEX degrading consortia: isolation, characterization and degradation potential evaluation.** 2008. 176 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Groundwater samples from an industrial area contaminated with monoaromatic hydrocarbons were used to obtain BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers) degrading bacteria, for the purpose of do their identification, characterization and evaluate their degradation potential. The growth rate of bacterial consortia enriched on BTEX was studied, individually and with different substrates. Just some of the strains isolated showed growth capacity when individually exposed to the compounds in which they were previously adapted. Were identified, by fattv acid analysis and 16S rDNA sequencing, the species *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*, *Enterobacter* sp., *Bacillus cereus* and *Bacillus tropicalis*.

Key words: BTEX; biodegradation; microbial consortia; bioremediation; aromatic hydrocarbons.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição de fontes de contaminação, por atividade, no Estado de São Paulo, em novembro de 2007.....	18
Figura 2.	Principais xenobióticos encontrados nas áreas contaminadas em São Paulo, em novembro de 2007.....	19
Figura 3.	Técnicas de remediação usadas em áreas contaminadas no estado de São Paulo, em novembro de 2007.....	20
Figura 4.	Esquema do destino de contaminantes orgânicos no ambiente.....	24
Figura 5.	Diferentes fases dos hidrocarbonetos nas zonas insaturada e saturada.....	25
Figura 6.	Via de degradação aeróbia do benzeno.....	37
Figura 7.	Vias de degradação aeróbia do tolueno (pela ação das enzimas tolueno 2- e 3-monooxigenases e tolueno dioxigenase).....	39
Figura 8.	Via de degradação aeróbia de tolueno (pela ação da enzima tolueno 4-monooxigenase).....	40
Figura 9.	Via de degradação aeróbia do tolueno (pela ação da enzima xileno monooxigenase).....	41
Figura 10.	Vias de degradação aeróbia do etilbenzeno.....	42
Figura 11.	Vias de degradação aeróbia dos isômeros <i>o</i> - e <i>m</i> -xileno.....	43
Figura 12.	Via de degradação aeróbia do <i>p</i> -xileno.....	44
Figura 13.	Representação esquemática do teste piloto na barreira biológica. BO 01 e BO 02: poços de injeção de nutrientes e oxigênio. PMB 01, PMB 02 e PMB 03: poços de monitoramento do teste.....	51
Figura 14.	Microcosmo montado em Erlenmeyer de 250 mL, no qual a fonte de carbono é fornecida na forma de vapor, no interior de pequenos tubos de ensaio.....	53
Figura 15.	Microcosmos montados em frascos de penicilina de 100 mL, nos quais a fonte de carbono foi fornecida na forma líquida, diretamente ao meio mínimo.....	54

Figura 16.	Curvas de crescimento em (A) benzeno, (B) tolueno, (C) etilbenzeno e (D) xileno dos consórcios das amostras ambientais AAx1 (usada prontamente para a montagem dos microcosmos), AAx2 (mantida quiescente, a temperatura ambiente, por 3 semanas) e AAx3 (mantida quiescente, a 4 °C, por 3 semanas), onde x = B: benzeno, T: tolueno, E: etilbenzeno e X: xileno. Crescimento verificado por densidade ótica (DO), a 520 nm. Subcultivos realizados quando a DO era de aproximadamente 0,4. n=1.....	64
Figura 17.	Curvas de crescimento do consórcio previamente enriquecido em benzeno, exposto a benzeno (B-B); tolueno (B-T); etilbenzeno (B-E) e xileno (B-X). Crescimento determinado por densidade ótica, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.....	70
Figura 18.	Curvas de crescimento do consórcio AAB1 - exposto a benzeno, benzeno + xileno, e xileno. Crescimento verificado por DO, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.....	71
Figura 19.	Curvas de crescimento do consórcio previamente enriquecido em tolueno, exposto a benzeno (T-B); tolueno (T-T); etilbenzeno (T-E) e xileno (T-X). Crescimento determinado por densidade ótica, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.....	72
Figura 20.	Curvas de crescimento do consórcio AAT1 - exposto a tolueno, tolueno + xileno, e xileno. Crescimento verificado por DO, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.....	73
Figura 21.	Curvas de crescimento do consórcio previamente enriquecido em etilbenzeno, exposto a benzeno (E-B); tolueno (E-T); etilbenzeno (E-E) e xileno (E-X). Crescimento determinado por densidade ótica, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.....	73

Figura 22.	Curvas de crescimento do consórcio AAE1 – exposto a etilbenzeno, etilbenzeno + xileno, e xileno. Crescimento verificado por DO, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.....	74
Figura 23.	Curvas de crescimento do consórcio previamente enriquecido em xileno, exposto a benzeno (X-B); tolueno (X-T); etilbenzeno (X-E) e xileno (X-X). Crescimento determinado por densidade ótica, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.....	75
Figura 24.	Curvas de crescimento do consórcio AAX1 - exposto a xileno, xileno + benzeno, e benzeno. Crescimento verificado por DO, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.....	75
Figura 25.	Imagens obtidas por MEV das cepas RBA, RBB, RBC, RBD, RBE, RBF, TBA e TBB, isoladas do consórcio enriquecido em benzeno. Aumento de 30000 vezes.....	81
Figura 26.	Imagens obtidas por MEV das cepas RTA, RTB, RTC, RTD, TTA e TTB, isoladas do consórcio enriquecido em tolueno. Aumento de 30000 vezes.....	83
Figura 27.	Imagens obtidas por MEV das cepas REA, REB, REC, TEA, TEB e TEC, isoladas do consórcio enriquecido em etilbenzeno. Aumento de 30000 vezes.....	84
Figura 28.	Imagens obtidas por MEV das cepas RXA, RXB, RXC, TXA e TXB, isoladas do consórcio enriquecido em xileno. Aumento de 30000 vezes.....	85
Figura 29.	Imagens obtidas por MEV dos consórcios AAB1, AAT1, AAE1 e AAX1. Aumento de 30000 vezes.....	86
Figura 30.	Curvas de crescimento das culturas (A) RBB, (B) RBF e (C) TBB, isoladas a partir do consórcio AAB1, enriquecido em benzeno, expostas a B: benzeno, T: tolueno, E: etilbenzeno e X: xileno. Crescimento determinado por densidade ótica (520 nm). As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.....	91

Figura 31.	Curvas de crescimento das culturas (A) RTC, (B) TTA e (C) TTB, isoladas a partir do consórcio AAT1, enriquecido em tolueno, expostas a B: benzeno, T: tolueno, E: etilbenzeno e X: xileno. Crescimento determinado por densidade ótica (520 nm). As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.....	92
Figura 32.	Curvas de crescimento das culturas (A) REB, (B) REC e (C) TEC, isoladas a partir do consórcio AAE1, enriquecido em etilbenzeno, expostas a B: benzeno, T: tolueno, E: etilbenzeno e X: xileno. Crescimento determinado por densidade ótica (520 nm). As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.....	94
Figura 33.	Curva de crescimento da cultura RXB, isolada a partir do consórcio AAX1, enriquecido em xileno, exposta a B: benzeno, T: tolueno, E: etilbenzeno e X: xileno. Crescimento determinado por densidade ótica (520 nm). As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.....	96
Figura 34.	Eletroforese em gel de agarose 4% do fragmento DNAr 16S de cada linhagem digerido com as enzimas <i>HaeIII</i> e <i>HhaI</i> . Marcador (MRC): <i>Pbr/HaeIII</i> (8 a 587 pb).....	97
Figura 35.	Eletroforese em gel de agarose 4% do fragmento DNAr 16S de cada linhagem digerido com as enzimas <i>HhaI</i> , <i>RsaI</i> e <i>Bsh1236I</i> . Marcador (MRC): <i>Pbr/HaeIII</i> (8 a 587 pb).....	98
Figura 36.	Árvores filogenéticas geradas pelo método de <i>Neighbor-joining</i> com a utilização do programa Mega4, baseada nas seqüências de DNAr 16S das cepas selecionadas. Análise de <i>bootstrap</i> de 1000 réplicas.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características e propriedades físico-químicas dos compostos BTEX.....	22
Tabela 2.	Indutores requeridos para degradação de substratos específicos por bactérias dos gêneros <i>Pseudomonas</i> e <i>Burkholderia</i>	35
Tabela 3.	Composição dos meios de cultura complexos.....	50
Tabela 4.	Sítios de corte das endonucleases testadas.....	60
Tabela 5.	Composição dos reagentes utilizados na extração de ácidos graxos.....	62
Tabela 6.	Crescimento bacteriano observado pela DO para os consórcios em diferentes concentrações de BTEX.....	67
Tabela 7.	Características macro e microscópicas das cepas isoladas.....	78
Tabela 8.	Crescimento dos isolados frente a diferentes formas de fornecimento de BTEX, no 1º, 2º e 3º subcultivos.....	87
Tabela 9.	Grupos gerados a partir dos perfis de ARDRA.....	98
Tabela 10.	Diferentes perfis de restrição observados nas cepas isoladas a partir do consórcio AAB1.....	99
Tabela 11.	Diferentes perfis de restrição observados nas cepas isoladas a partir do consórcio AAT1.....	99
Tabela 12.	Diferentes perfis de restrição observados nas cepas isoladas a partir do consórcio AAE1.....	100
Tabela 13.	Diferentes perfis de restrição observados nas cepas isoladas a partir do consórcio AAX1.....	101
Tabela 14.	Matriz de similaridade das cepas identificadas como <i>Serratia marcescens</i>	104
Tabela 15.	Matriz de similaridade das cepas identificadas como <i>Burkholderia cepacia</i>	104
Tabela 16.	Parâmetros de identificação pela análise do perfil de ácidos graxos.....	106
Tabela 17.	Comparação dos resultados obtidos nas análises DNAr 16S e ácidos graxos.....	110

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	17
1.1	Crescimento populacional x impacto ambiental.....	14
1.1.1	Cenário atual no Brasil.....	17
1.2	Hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX).....	20
1.2.1	Dinâmica dos hidrocarbonetos no subsolo.....	23
1.3	Biorremediação como um método alternativo de atenuação.....	26
1.3.1	Fatores determinantes ao crescimento microbiano.....	27
1.3.1.1	Disponibilidade de macronutrientes.....	27
1.3.1.2	Disponibilidade de micronutrientes.....	28
1.3.1.3	Potencial hidrogeniônico (pH).....	28
1.3.1.4	Aceptores finais de elétrons.....	28
1.3.1.5	Temperatura.....	29
1.3.1.6	Natureza e concentração do substrato.....	29
1.3.2	Etapas do processo de biorremediação.....	30
1.3.2.1	Avaliação da natureza do ambiente contaminado.....	30
1.3.2.2	Caracterização da contaminação.....	31
1.3.2.3	Avaliações biológicas.....	31
1.3.2.4	Introdução da técnica de remediação na área contaminada.....	33
1.3.2.5	Monitoramento do processo e intervenções para ajuste.....	33
1.4	Microrganismos degradadores de BTEX.....	33
1.5	Vias metabólicas de degradação de BTEX.....	34
1.6	Consórcios degradadores BTEX.....	45
1.7	Emprego de técnicas moleculares em biorremediação.....	46
2	OBJETIVOS.....	48
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1	Vidrarias.....	49
3.2	Reagentes.....	49
3.3	Meio mínimo líquido.....	49
3.4	Meios complexos.....	50
3.5	Caracterização da área.....	51
3.6	Coleta das amostras de água subterrânea.....	51

3.7	Montagem dos microcosmos e verificação da adaptação bacteriana e influência da temperatura sobre seu crescimento.....	52
3.8	Verificação do crescimento dos consórcios em BTEX em sistema fechado.....	53
3.9	Análise do perfil de crescimento dos consórcios microbianos com diferentes substratos.....	54
3.10	Isolamento das bactérias degradadoras de BTEX.....	54
3.11	Caracterização macroscópica dos isolados.....	55
3.12	Caracterização microscópica dos isolados por coloração de Gram	55
3.13	Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	55
3.14	Verificação de crescimento dos isolados com o composto usado para seu enriquecimento.....	56
3.15	Análise do perfil de crescimento dos isolados com diferentes substratos.....	57
3.16	Identificação dos isolados pelo emprego de técnicas moleculares	57
3.16.1	Extração do DNA total dos isolados.....	57
3.16.2	Amplificação da região DNAr 16S.....	58
3.16.3	Análise de restrição dos DNAr 16S amplificados (ARDRA).....	59
3.16.4	Seqüenciamento do DNAr 16S.....	60
3.17	Identificação do perfil de ácidos graxos de membrana.....	61
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
4.1	Verificação da adaptação bacteriana e influência da temperatura sobre seu crescimento.....	63
4.2	Verificação do crescimento dos consórcios em BTEX em sistema fechado.....	67
4.3	Análise do perfil de crescimento dos consórcios microbianos com diferentes substratos.....	69
4.4	Isolamento e caracterização macro e microscópica das bactérias	76
4.5	Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	80
4.6	Verificação de crescimento dos isolados com o composto usado para seu enriquecimento.....	87

4.7	Análise do perfil de crescimento dos isolados com diferentes substratos.....	90
4.8	Análise de restrição dos DNAr 16S amplificados (ARDRA).....	96
4.9	Seqüenciamento do DNAr 16S.....	101
4.10	Identificação do perfil de ácidos graxos de membrana.....	105
4.11	Comparação dos resultados obtidos com os diferentes métodos de identificação.....	108
4.12	Microrganismos identificados.....	111
4.12.1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	111
4.12.2	<i>Enterobacter</i> sp.....	111
4.12.3	<i>Pandoraea</i>	112
4.12.4	<i>Burkholderia cepacia</i>	113
4.12.5	<i>Serratia marcescens</i>	113
4.12.6	<i>Bacillus cereus</i>	114
5	CONCLUSÕES.....	115
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
	ANEXOS.....	133

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Crescimento populacional x impacto ambiental

Nos últimos 200 anos verificou-se um rápido crescimento populacional por todo o planeta, resultando na necessidade de quantidades cada vez maiores de combustíveis, no desenvolvimento da indústria química, farmacêutica, de fertilizantes e pesticidas, para sustentar e melhorar a qualidade de vida. Embora muitas dessas substâncias químicas sejam utilizadas ou destruídas, um grande percentual é lançado na atmosfera, água e solo.

A persistência de xenobióticos orgânicos (substâncias químicas sintéticas encontradas num sistema biológico, mas de origem não biogênica) no ambiente é um problema de importância pública, científica e legislativa, devido ao potencial tóxico e habilidade que alguns destes compostos têm de se acumular na cadeia trófica. No passado, a poluição química no solo foi tratada através de processos físicos e químicos, que provaram ser muito dispendiosos e, muitas vezes, ineficientes. Já os microrganismos, por sua vez, têm a habilidade única de interagir química e fisicamente com uma grande variedade de compostos naturais e sintéticos, levando à sua mudança estrutural ou completa degradação.

1.1.1 Cenário atual no Brasil

A indústria do petróleo possui considerável importância na economia brasileira, sendo o Brasil um dos maiores produtores da América do Sul. No ano de 2007, o país atingiu uma produção de petróleo refinado de 1.772.092 barris/dia (Agência Nacional do Petróleo, 2008). Produtos derivados do petróleo são misturas complexas de compostos orgânicos, na maior parte alcanos e hidrocarbonetos aromáticos, com pequenas quantidades de oxigênio, nitrogênio e enxofre (FETTER, 1993). Dentre os hidrocarbonetos aromáticos estão o benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xileno, representados pelo acrônimo BTEX, amplamente usados em combustíveis e processos de manufatura.

No Estado de São Paulo, a Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB), agência responsável pelo controle, fiscalização,

monitoramento e licenciamento de atividades geradoras de poluição, registrou, em novembro de 2007, 2272 áreas contaminadas com diversos xenobióticos. Os postos de combustíveis destacam-se na lista, com 1745 registros (77% do total), seguidos das atividades industriais, comerciais e das instalações para destinação de resíduos. Os casos de acidentes e fonte de contaminação de origem desconhecida perfazem 1%, conforme pode ser visualizado na figura 1.

Figura 1. Distribuição de fontes de contaminação, por atividade, no Estado de São Paulo, em novembro de 2007 (CETESB, 2008).

O grupo de solventes aromáticos, no qual está inserido o BTEX, apresenta-se como o principal grupo de contaminantes encontrado nas áreas impactadas, seguido dos combustíveis líquidos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), metais e solventes halogenados (Figura 2).

Figura 2. Principais xenobióticos encontrados nas áreas contaminadas em São Paulo, em novembro de 2007 (CETESB, 2008).

Nas áreas que se encontram em remediação ou a remediação foi finalizada, verifica-se que o bombeamento e tratamento, e a recuperação de fase livre foram as técnicas mais empregadas no tratamento das águas subterrâneas, enquanto a extração de vapores e a remoção de solo/resíduo destacam-se como as técnicas mais utilizadas para os solos. O emprego da biorremediação, por sua vez, tem crescido e se mostrado bastante eficaz na recuperação de áreas impactadas por hidrocarbonetos (Figura 3).

Figura 3. Técnicas de remediação usadas em áreas contaminadas no estado de São Paulo, em novembro de 2007 (CETESB, 2008).

A maior parte das contaminações ocorre devido a derramamentos acidentais durante o transporte de combustíveis por navios e caminhões, e vazamentos de oleodutos e tanques de armazenamento subterrâneos, sujeitos a processos de corrosão (SPILBORGH, 1997; GOUDAR e STREVEIT, 1998). Somente nos Estados Unidos, estima-se que 600.000, dentre os 2.000.000 tanques existentes, vazaram, causando sérios danos ao meio ambiente. No Brasil há aproximadamente 100.000 tanques subterrâneos de estocagem, no entanto, o número de tanques que possam ter apresentado vazamento é desconhecido (FLATHMAN et al., 1993).

1.2 Hidrocarbonetos monoaromáticos (BTEX)

O grupo dos hidrocarbonetos monoaromáticos, principais constituintes da gasolina, óleo diesel e creosoto (HU et al., 2007), recebe redobrada atenção pelo

fato destes compostos serem contaminantes ambientais freqüentemente encontrados em solos e águas impactados com solventes e combustíveis.

O benzeno é empregado na produção de compostos orgânicos, inseticidas, fumigantes, solventes, borrachas sintéticas, plásticos, nylon e tintas. No setor sucroalcooleiro, é utilizado para a produção do álcool anidro. O tolueno é usado na gasolina de aviação e como agente de elevação da octanagem, como matéria-prima para benzeno, fenol e caprolactama, solvente para tintas e revestimentos, gomas elásticas, resinas, borrachas, diluente e solvente para lacas a base de nitrocelulose. O etilbenzeno é utilizado como um aditivo na gasolina de aviação e pode estar presente em produtos de consumo, como tintas, plásticos e pesticidas. É também usado como intermediário na produção de estireno. O *o*-xileno é empregado como matéria-prima na produção de anidrido ftálico, gasolina de aviação, solvente para resinas alquílicas, laca, corantes e inseticidas. É constituinte de asfalto e nafta. O *m*-xileno, por sua vez, tem emprego como intermediário para corantes e sínteses orgânicas, solvente, inseticida e combustível para aviação. O *p*-xileno, por fim, como matéria-prima para ácido tereftálico, síntese farmacêutica e na produção de inseticidas (CETESB, 2008).

A exigência de remediação de áreas contaminadas com estes poluentes ocorre devido à sua elevada toxicidade e ao fato de estes compostos serem os hidrocarbonetos de maior solubilidade em água (GOUDAR e STREVETT, 1998). As propriedades físico-químicas dos compostos BTEX estão representadas na tabela 1.

Tabela 1. Características e propriedades físico-químicas dos compostos BTEX.

	benzeno ^(a)	tolueno ^(b)	etilbenzeno ^(c)	o-xileno ^(d)	m-xileno ^(d)	p-xileno ^(d)
Sinônimos	benzol	metilbenzeno fenilmetano toluol	feniletano etilbenzol	1,2-dimetilbenzeno o-metiltolueno 1,2-xileno	1,3-dimetilbenzeno m-metiltolueno 1,3-xileno	1,4-dimetilbenzeno p-metiltolueno 1,4-xileno
Estrutura química
CAS number	71-43-2	108-88-3	100-41-4	95-47-6	108-38-3	106-42-3
Massa molecular (g/mol)	78,11	92,14	106,17	106,17	106,17	106,17
Solubilidade em água (20 °C) (mg/L)	1770	520	150	170	200	200
Densidade específica (20 °C) (g/mL)	0,877	0,867	0,867	0,880	0,864	0,861
Pressão de vapor (25 °C) (mmHg)	74.6	22	7	7	8,29	9
Viscosidade (20 °C) (cP)	0,647	0,580	0,678	0,802	0,608	0,635
Ponto de fusão (°C)	5,5	-95	-95	-25,2	-47,8	13,2
Ponto de ebulição (°C)	80,1	110,6	136	144,5	139,1	138,4
Temperatura de ignição (°C)	498	480	432	463	527	528
Classificação de risco	classe 3 carcinogênico	classe 3	classe 3	classe 3	classe 3	classe 3
Características	inflamável tóxico	inflamável nocivo	inflamável nocivo	Inflamável nocivo irritante	inflamável nocivo irritante	inflamável nocivo irritante

Fonte: (a) ATSDR (2007a); (b) ATSDR (2000); (c) ATSDR (2007b) e (d) ATSDR (2007c).

Todos compostos BTEX são poderosos depressores do sistema nervoso central (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996), sendo o benzeno o mais tóxico deles. De acordo com o *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o benzeno é classificado como pertencente ao Grupo 1, por ser uma substância reconhecidamente cancerígena para humanos. Pelo fato de não existirem evidências suficientes que comprovem a carcinogenicidade do tolueno e isômeros de xileno a humanos e animais experimentais, estes compostos estão classificados no Grupo 3. O etilbenzeno, por sua vez, pertence ao Grupo 2B, sendo descrito como um possível carcinógeno para humanos (IARC, 1999). Com relação à classificação de risco, segundo a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR, 2004), todos pertencem à classe 3 (Tabela 1).

No Brasil, o Ministério da Saúde estipula, na Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano (Portaria MS nº 518/2004), como padrão de aceitação, concentrações de 5 µg/L, 170 µg/L, 200 µg/L e 300 µg/L para benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno total, respectivamente.

1.2.1 Dinâmica dos hidrocarbonetos no subsolo

O possível destino dos contaminantes orgânicos e seus metabólitos no meio ambiente, conforme ilustrado na figura 4, inclui a volatilização, biodegradação, transferência para organismos, ligações entre as partículas do solo e percolação para o lençol freático (SEMPLE et al., 2001).

Figura 4. Esquema do destino de contaminantes orgânicos no ambiente (SEMPLE et al., 2001).

Ao serem liberados para o ambiente, através de vazamentos de tanques de armazenamento subterrâneos, os hidrocarbonetos migram verticalmente no solo sob a influência das forças gravitacional e capilar e, horizontalmente, devido à atração das forças capilares. O termo “forças capilares” refere-se às forças que influenciam o movimento dos hidrocarbonetos em fase líquida pelos interstícios do solo (GUIGUER, 1996).

O transporte dos hidrocarbonetos no solo é caracterizado pela formação de quatro fases distintas que regulam o processo de migração: fase líquida residual, fase líquida livre, fase dissolvida e fase de vapor (Figura 5). A partição entre as fases é determinada pela dissolução, volatilização e adsorção. A fase líquida residual pode existir no solo como resíduos relativamente imóveis, adsorvidos ou retidos entre os sólidos do solo. O líquido livre não residual que passa pelo solo é chamado “fase livre”. Quando este atinge o nível d’água subterrâneo, passa a flutuar sobre o mesmo. Hidrocarbonetos em fase dissolvida podem estar presentes na superfície sólida do solo formando películas, ou na água do solo. Quando eles atingem o nível d’água subterrâneo, formam a chamada pluma de contaminação. Os hidrocarbonetos em fase de vapor podem existir como componentes do vapor do solo, podendo também se condensar e serem adsorvidos na superfície sólida ou dissolver-se na água do solo (GUIGUER, 1996).

A fase composta pelos hidrocarbonetos aromáticos, por possuir densidade menor do que a água, recebe a denominação de LNAPL (*light non-aqueous phase liquid*) ou fase líquida não aquosa leve. Pelo fato de apresentarem baixa miscibilidade em água, o escoamento dos hidrocarbonetos em meio saturado é sempre bifásico (USEPA, 1995).

Figura 5. Diferentes fases dos hidrocarbonetos nas zonas insaturada e saturada (adaptado de GUIGUER, 1996).

1.3 Biorremediação como um método alternativo de atenuação

Dependendo do tipo de contaminante, da área contaminada e dos recursos e tecnologias disponíveis, pode-se optar pelo uso de técnicas de remediação *in situ* ou *ex situ*. A diferença básica entre esses dois processos é o local onde o contaminante vai ser tratado. Tratamentos *ex situ* envolvem a remoção física da matriz contaminada para reatores, pilhas de compostagem ou lagoas. Muitas técnicas (aterro de disposição e incineração, por exemplo) apenas diluem ou seqüestram o contaminante, ou o transferem para outro ambiente. Entretanto, de maneira geral, procuram-se processos que permitam não somente a remoção das substâncias contaminantes, mas sua completa mineralização, ou seja, a degradação da matéria orgânica até CO₂ e H₂O (CUNHA, 1996).

A contaminação de aquíferos por BTEX levou ao desenvolvimento de várias técnicas físicas, químicas e biológicas para sua remoção (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996). Dentre elas, em virtude da potencial eficiência na remediação de áreas contaminadas, a atenuação natural apresenta-se como uma ótima alternativa de tratamento. Dentre os processos de atenuação natural, que incluem biorremediação, diluição, dispersão, adsorção e volatilização, a primeira é a única que resulta na degradação dos hidrocarbonetos, com conseqüente redução de sua massa (BHUPATHIRAJU et al., 2002).

Conforme descrito por Del'Arco e França (1999), além do baixo custo, as vantagens relacionadas a biorremediação incluem, ainda, a possibilidade de tratamento *in situ*, reduzindo assim os riscos de contaminação de outras áreas, e a degradação permanente do resíduo (ou, pelo menos, a sua transformação em produtos de menor toxicidade). No que tange à vantagem econômica, segundo Filho (2003), os custos com a implantação do processo e monitoramento da área demandam 65 a 85% menos recursos do que as tecnologias concorrentes. Para a recuperação de áreas impactadas com BTEX, a biorremediação apresenta-se como uma alternativa promissora, amplamente utilizada em países da Europa e América do Norte pelo fato de se mostrar bastante eficaz na remoção de poluentes solúveis e/ou voláteis (YERUSHALMI et al., 1999; KAMPBELL et al., 1995; PFIFFNER et al., 1997; MISHRA et al., 2001).

A biorremediação pode ser definida como a degradação biológica natural ou controlada de poluição ambiental. É normalmente realizada por microrganismos

naturalmente encontrados no local afetado, capazes de detoxificar ou degradar poluentes orgânicos até níveis indetectáveis ou abaixo dos limites de tolerância estipulados pelas agências regulatórias (ALEXANDER, 1999; SCRAGG, 1999; TORTORA et al., 2000). Esta tecnologia utiliza o potencial fisiológico de bactérias e/ou fungos, que transformam o poluente em biomassa, água, dióxido de carbono e outros compostos. Sua eficácia é testada em laboratório, entre outros fatores, pela determinação das taxas de degradação do composto (CRAPEZ et al., 2002).

Os produtos do metabolismo de um microrganismo podem ser substrato para outros. Este sinergismo metabólico entre microrganismos, praticamente ausente nos organismos mais complexos, é de fundamental importância na biodegradação de xenobióticos.

1.3.1 Fatores determinantes ao crescimento microbiano

Inúmeras variáveis, bióticas e abióticas, que determinam a cinética de crescimento e atividade do metabolismo microbiano e, conseqüentemente, a taxa de degradação dos poluentes, podem influenciar no processo de biodegradação, como por exemplo:

1.3.1.1 Disponibilidade de macronutrientes

Macronutrientes são elementos que os microrganismos necessitam em quantidades relativamente grandes para o seu próprio metabolismo. São classificados como macronutrientes o carbono, nitrogênio, fósforo, potássio e enxofre. Estes elementos são utilizados pelas células para sintetizar compostos orgânicos (carbono), proteínas (enxofre e nitrogênio), aminoácidos e vitaminas (enxofre), DNA e RNA (nitrogênio e fósforo), ATP e fosfolipídios (fósforo). A maioria das bactérias necessita de carbono, nitrogênio e fósforo na razão ótima de 25:1:0,5 (MADIGAN et al., 2000).

1.3.1.2 Disponibilidade de micronutrientes

Os micronutrientes, denominados elementos-traço, são necessários (em pequenas quantidades) para que os microrganismos possam desenvolver certas funções metabólicas, sendo utilizados pelas células como co-fatores essenciais para a atividade enzimática (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996). São classificados como micronutrientes o magnésio, cálcio, sódio, cromo, cobalto, cobre, manganês, molibdênio, níquel, selênio, tungstênio, vanádio, zinco e ferro (MADIGAN et al., 2000).

1.3.1.3 Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH ótimo para a ação da maioria dos microrganismos é próximo da neutralidade, porém, muitos microrganismos presentes em aquíferos adaptam-se bem, sem prejuízo de suas funções, em valores de pH entre 5 e 9 (MADIGAN et al., 2000; CORSEUIL e ALVAREZ, 1996). Águas subterrâneas são tipicamente bem tamponadas dentro destes limites, o que significa que os requerimentos microbiológicos referentes a esta variável são usualmente atendidos (CHAPELLE, 1993). No entanto, normalmente o pH diminui durante a biodegradação devido à produção de metabólitos ácidos e CO_2 , podendo provocar a diminuição da atividade microbiana (MATTNEY, 1994).

1.3.1.4 Aceptores finais de elétrons

A biodegradação de hidrocarbonetos é essencialmente uma reação de oxirredução, na qual o hidrocarboneto é oxidado e umceptor de elétrons é reduzido. Há vários compostos que podem agir como aceptores de elétrons, tais como o oxigênio (O_2) (respiração aeróbia), nitrato (NO_3^-), sulfato (SO_4^{2-}), ferro (Fe^{3+}), manganês (Mn^{4+}) ou bicarbonato (HCO_3^-) (respiração anaeróbia) (MADIGAN et al., 2000; YERUSHALMI et al., 2002). A biodegradação anaeróbia pode ocorrer, ainda, sob condições metanogênicas (SIDDIQUE et al., 2007). Em geral, a cinética de oxidação dos hidrocarbonetos é mais rápida para aceptores de elétrons com potenciais de oxidação mais altos (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

O benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, apesar de serem passíveis de degradação sob condições aeróbias e anaeróbias, são preferencialmente e mais rapidamente degradados na presença de oxigênio como aceptor final de elétrons (SILVA e ALVAREZ, 2004). Embora a degradação anaeróbia seja possível na superfície, é o metabolismo aeróbio o maior responsável pela biodegradação em plumas de água subterrânea, sendo, portanto, o mecanismo de escolha de quase todos os processos de otimização de biorremediação *in situ* (ALAGAPPAN e COWAN, 2004).

1.3.1.5 Temperatura

A temperatura do ambiente influencia tanto na natureza físico-química dos poluentes (a solubilidade dos compostos mais hidrofóbicos depende deste parâmetro, uma vez que o aumento da temperatura provoca diminuição da viscosidade, afetando o grau de dispersão, a volatilização e as taxas de difusão dos compostos orgânicos), quanto na biodisponibilidade e velocidades das reações químicas e enzimáticas das células (MARTÍNEZ-ALONSO e GAJU, 2005). Temperaturas muito acima do valor ótimo podem levar à desnaturação e inativação de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos.

Foram identificados diversos microrganismos adaptados a baixas temperaturas capazes de degradar hidrocarbonetos (WHYTE et al., 1996; MACCORMACK e FRAILE, 1997; MARGESIN e SCHINNER, 1999). Microrganismos termófilos que possuem um determinado potencial para o consumo de hidrocarbonetos foram descritos em dois trabalhos publicados por Chen e Taylor (1997a e 1997b). A maior parte dos microrganismos, entretanto, tem crescimento celular máximo entre 30-40 °C (ROSATO, 1997; MADIGAN et al., 2000).

1.3.1.6 Natureza e concentração do substrato

A estrutura química do substrato exerce profunda influência sobre a habilidade de metabolização do composto pelos microrganismos, principalmente com relação às taxas da biodegradação. Alguns compostos são facilmente degradados, enquanto outros se mostram recalcitrantes. Os *n*-alcanos são considerados os mais facilmente degradáveis dentre os hidrocarbonetos. Quanto

menor o número de anéis aromáticos, mais facilmente o composto é degradado (existem, entretanto, linhagens capazes de degradar compostos com até cinco anéis aromáticos). Além da degradação microbiana, os compostos aromáticos mais leves estão sujeitos à volatilização (ROSATO, 1997).

A concentração, solubilidade, volatilidade, coeficiente de adsorção no solo (K_{oc}), coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) e biodisponibilidade do composto orgânico a ser utilizado como fonte de carbono pelos microrganismos também são fatores relevantes a serem considerados para estimar o sucesso da biodegradação (MATTNEY, 1994).

1.3.2 Etapas do processo de biorremediação

A implementação da biorremediação ocorre em etapas que compreendem um estudo do ambiente, do tipo de contaminante, dos riscos e da legislação pertinente. Inicialmente é necessária a caracterização do tipo e da quantidade de poluente, bem como avaliações de natureza biológica, geológica, geofísica e hidrológica do sítio contaminado.

1.3.2.1 Avaliação da natureza do ambiente contaminado

Uma área é declarada contaminada se as concentrações de contaminantes nas amostras forem superiores aos valores de intervenção estabelecidos pelas agências regulatórias, ou se houver a simples detecção de explosividade ou presença de fase livre do contaminante. Na avaliação de risco é verificada a necessidade de remediação da área, tendo por base a quantificação do risco à saúde humana e ao meio ambiente, em consequência da exposição aos contaminantes presentes. O resultado dessa avaliação deve orientar a definição dos limites de concentração dos contaminantes a serem alcançados para remediação.

A existência de uma área contaminada pode gerar problemas como danos à saúde humana, comprometimento da qualidade dos recursos hídricos, restrições ao uso do solo e danos ao patrimônio público e privado, com a desvalorização das propriedades, além de danos ao meio ambiente.

Apesar da técnica de biorremediação estar sendo amplamente utilizada em áreas contaminadas por hidrocarbonetos, é importante observar que, para cada caso, é necessário que seja feito um estudo minucioso da área (i.e. avaliação da natureza física da matriz onde o composto é encontrado, presença de nutrientes, nível do lençol freático, população bacteriana, entre outros) para que o resultado da aplicação seja o mais eficiente possível.

1.3.2.2 Caracterização da contaminação

A definição da composição e estrutura química do poluente é essencial. Como exemplo da influência da estrutura química na degradação de poluentes, pode-se citar a alta persistência de compostos nitroaromáticos no ambiente, para os quais ainda não foram encontradas e isoladas bactérias capazes de mineralizar estes compostos.

A presença de xenobióticos de estrutura simples na área contaminada pode dificultar o metabolismo de moléculas mais complexas, pois a comunidade microbiana direciona seu metabolismo para degradar, preferencialmente, os menos complexos. Neste sentido, caso o poluente seja recalcitrante, deve-se ter em mente que a técnica de biorremediação tem limitações, sendo necessário, então, lançar mão de outras tecnologias para se alcançar os níveis de descontaminação desejados. Por essa razão, a biorremediação é comumente usada como uma técnica de “polimento” às outras tecnologias.

1.3.2.3 Avaliações biológicas

As avaliações biológicas ocorrem primeiramente em laboratório, e têm como objetivo a otimização da biodegradação do composto. A introdução de nutrientes e/ou surfactantes com o objetivo de aumentar a atividade microbiana ou a biodisponibilidade de poluente é um tipo de biorremediação conhecida como **bioestimulação** (SEABRA, 2001; WIDADA et al. 2002).

Outra opção a ser adotada para melhorar o potencial biodegradador de um ambiente contaminado é a adição de populações de microrganismos degradadores autóctones (já presentes naquele ambiente), ou alóctones (estranhos ao sistema), repicados em laboratório e multiplicados, através de fermentadores, para posterior

inoculação na área contaminada. A técnica na qual promove-se o aumento de populações microbianas degradadoras é denominada **bioaugmentação** (VOGEL, 1996; WIDADA et al., 2002).

Existe, ainda, a alternativa do uso de organismos geneticamente modificados (OGMs) para contornar algumas das limitações dos processos de biorremediação, principalmente as relacionadas à taxa da degradação do poluente. Esta prática, no entanto, assim como a bioaugmentação, requer aprovação de órgãos ambientais (o produto biotecnológico, antes de sua utilização, deve ser identificado, caracterizado e testado com relação à sua toxicidade e ecotoxicidade, bem como comprovada sua eficiência e inocuidade ao ambiente). O Conselho Nacional do Meio Ambiente (Resolução CONAMA 314, de 29 de outubro de 2002) dispõe sobre o registro de produtos destinados a remediação de solos contaminados por vazamentos de petróleo e derivados, e a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) define normas para liberação comercial (Resolução Normativa nº 05, de 12 de março de 2008) e liberação planejada no meio ambiente de organismos geneticamente modificados (Instrução Normativa nº 3, de 12 de novembro de 1996). Com base nos dados obtidos é escolhida a técnica mais adequada para a situação. Posteriormente, testes de campo são realizados para verificar a eficiência do processo *in situ*.

Allard e Neilson (1997) sugerem exemplos que servem como base para preparar a estratégia de execução, que compreende as etapas de estudos básicos de laboratório e microcosmos usando material do local.

Os ensaios de laboratório podem utilizar microrganismos autóctones ou alóctones. Avalia-se o potencial dos microrganismos na degradação do contaminante em estudo levando-se em consideração: (a) a taxa de degradação do composto e determinação dos metabólitos; (b) a parametrização das necessidades nutricionais (N, P, K) para o melhor desempenho dos microrganismos; e (c) o ensaio de ecotoxicidade com os subprodutos da degradação, se houver.

Os experimentos em microcosmos devem ser preparados através da utilização de material coletado do sítio contaminado para simular condições aeróbias, microaerófilas e/ou anaeróbias. As informações mais relevantes são: (a) taxa de degradação do contaminante; (b) estabilidade dos metabólitos e sua toxicidade à biota; (c) determinação de algum composto persistente; e (d) estabilidade do sistema após operação prolongada. Os resultados vão fornecer informação suficiente da cinética de reação, necessária à operação em larga escala.

1.3.2.4 Introdução da técnica de remediação na área contaminada

Nessa etapa é essencial a avaliação de risco ambiental. Ambientes contaminados não possuem as mesmas características e nem o mesmo tipo de exposição. O tratamento individualizado dos sítios possibilita melhor alocação de recursos na remediação e maior proteção ao meio ambiente. A participação de engenheiros e geólogos é fundamental na etapa de execução, principalmente quando se torna necessário otimizar soluções dos ensaios anteriores no campo. É aconselhável avaliar técnicas alternativas de remediação para aplicar no campo.

1.3.2.5 Monitoramento do processo e intervenções para ajuste

É fundamental que se promova o monitoramento da área em estudo durante todo o processo de biorremediação para que os problemas, que porventura possam surgir, sejam resolvidos. Os problemas mais comuns estão associados à mobilidade e abundância dos microrganismos, substrato e nutrientes; transporte de oxigênio ou outro aceptor de elétrons; e a estabilidade do sistema.

Deverão ser avaliadas, ainda, a taxa de degradação e a ausência de formação de metabólitos tóxicos.

1.4 Microrganismos degradadores de BTEX

Os primeiros estudos da utilização de hidrocarbonetos por microrganismos foram realizados por Sohnger e Kaserer em 1906 (BUSHNELL e HAAS, 1941).

Segundo Kataoka (2001), até o ano de 2001, mais de 200 espécies com capacidade de utilização de hidrocarbonetos haviam sido descritas. 7 anos depois, estima-se que este número seja ainda maior. Leahy e Colwell (1990) citam os seguintes gêneros de bactérias como os mais importantes: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas*. Kadri et al. (1986), Shamshoom et al. (1990), Sorkhoh et al. (1990), Al-Hadhrami et al. (1995), no estudo de bactérias degradadoras de hidrocarbonetos, identificaram: *Acinetobacter* sp., *Aeromonas* sp., *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Flavobacterium* sp., *Klebsiella cepacia*, *Micrococcus luteus*, *Moraxella phenylpiruvica*, *Nocardia* sp., *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Pseudomonas sp., *Proteus mirabilis*, *Vibrio* sp., *Rhodococcus* sp., *Streptomyces* sp., *Vibrio fischeri* e *Xanthomonas maltophilia*.

Muitos trabalhos têm demonstrado a capacidade de biorremediação anaeróbia dos hidrocarbonetos de petróleo, tanto no solo quanto no aquífero (SONG et al., 1990; SONG e BARTHA, 1990; MADSEN et al., 1991; DAVIS et al. 1994; KLECKA et al. 1994), utilizando nitrato, manganês (IV), ferro (III), sulfato e dióxido de carbono como aceptores alternativos de elétrons (HOLLIGER e ZEHNDER, 1996, ZENGLER et al., 1999, SO e YOUNG, 1999, EHRENREICH et al., 2000, CUNNINGHAM et al. 2000, CUNNINGHAM et al., 2001, SILVA et al., 2005). Resultados significativamente melhores, entretanto, foram obtidos em condições de aerobiose (CHIANG et al., 1989; BHUPATHIRAJU et al., 2002; SCHREIBER e BAHR, 2002; SILVA e ALVAREZ, 2004).

1.5 Vias metabólicas de degradação de BTEX

A indução de enzimas degradadoras envolve a ativação de regiões específicas do genoma bacteriano. Quando alguns substratos-alvo estão presentes, as bactérias iniciam uma cascata de reações bioquímicas que resultam na transcrição de genes que codificam para a síntese das enzimas necessárias para que ocorra a degradação.

Diversos fatores ambientais podem ativar ou reprimir a expressão gênica e, assim, modular a atividade microbiana (ANDREONI e GIANFREDA, 2007). Com relação à degradação de BTEX, muitas enzimas requerem indução, e o indutor deve estar presente em concentrações maiores do que o limite mínimo de indução necessário (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996). Na tabela 2 estão representados alguns indutores e a proteína reguladora vinculados à degradação de alguns compostos aromáticos por bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*.

Tabela 2. Indutores requeridos para degradação de substratos específicos por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Burkholderia*.

Gênero bacteriano	Substrato (s)	Proteína reguladora	Indutores
<i>Pseudomonas</i>	tolueno, <i>m</i> - e <i>p</i> -xileno	XylR	tolueno, xileno, <i>p</i> -clorobenzaldeído, alquilbenzoil álcoois, <i>m</i> -amino- e <i>o</i> - e <i>p</i> -nitrotolueno
<i>Pseudomonas</i>	tolueno, <i>o</i> -xileno e fenol	TouR	<i>o</i> -, <i>m</i> -, e <i>p</i> -cresol, 2,3-, 2,4-, 2,5- e 3,4-dimetilfenol
<i>Burkholderia</i>	tolueno	TbuT	benzeno, tolueno, etilbenzeno, <i>o</i> -xileno, fenol, <i>o</i> - e <i>m</i> -cresol e tricloroetileno
<i>Burkholderia</i>	Tolueno e benzeno	TbmR	benzeno, tolueno, etilbenzeno, <i>o</i> -xileno, fenol, <i>o</i> - e <i>m</i> -cresol e tricloroetileno

Fonte: Adaptado de Tropel e van der Meer, 2004.

As duas principais vias aeróbias de degradação que levam a mineralização dos compostos BTEX são o ataque de dioxigenases ao anel aromático (via tod) e o ataque das monooxigenases aos substituintes metil (via tol) (MIKESELL et al., 1993; DUETZ et al., 1994). Hidrocarbonetos aromáticos geralmente são hidroxilados a catecóis (WHITED e GIBSON, 1991; CAFARO et al., 2004) e os anéis subsequentelemente degradados a intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico, por *orto*- ou *meta*-dioxigenases (ATLAS, 1995). Segundo Gibson et al. (1974), o benzeno pode ser metabolizado pela via tol, unicamente, enquanto que o tolueno e xilenos podem estar sujeitos à oxidação por ambas as vias. O autor demonstrou, entretanto, que no caso do *p*-xileno, a via tod pode levar ao 3,6-dimetilcatecol como produto final.

No caso do benzeno, especificamente, para que ocorra a quebra do anel e posterior metabolização deste composto é necessária a desestabilização do anel. Isto se dá através de uma reação catalisada por uma dioxigenase, resultando na produção de benzeno dihidrodiol (Figura 6). A aromaticidade é restaurada pela conversão do benzeno dihidrodiol a catecol, pela ação de uma desidrogenase. O catecol é então catabolizado pela quebra do anel, através de duas possíveis vias, ambas catalisadas por dioxigenases. Na via com quebra na posição *orto* o rompimento do anel ocorre entre dois átomos de carbono adjacentes a grupamentos hidroxila, já na via com quebra na posição *meta*, o anel é rompido entre um átomo de carbono hidroxilado e um carbono adjacente não-substituído (GOTTSCALK, 1986).

A metabolização subsequente dessas vias, apesar de distintas, levam à formação de intermediários do ciclo do ácido tricarbóxico (acetato e succinato) ou

substratos que podem ser facilmente convertidos a intermediários deste ciclo (piruvato e acetaldeído).

A biodegradação do tolueno já foi amplamente estudada, a nível molecular, servindo como modelo para a compreensão dos mecanismos de metabolização do anel benzênico por bactérias. Pela ação de diferentes tolueno-monooxigenases, o tolueno é degradado a diferentes isômeros de hidroxitolueno (Figuras 7 e 8). Já na presença de uma xileno-monooxigenase, o ataque enzimático ocorre no grupamento metila do composto, levando à formação de benzoil álcool (Figura 9). Existe, ainda, a via em que uma dioxigenase converte o composto a um dihidrodiol (Figura 7).

O catabolismo aeróbio do etilbenzeno, por sua vez, ocorre através de duas vias principais (Figura 10). A primeira delas foi descrita como a via utilizada pela bactéria *Pseudomonas* sp. NCIB 10643 (SMITH e RATLEDGE, 1989). A degradação é iniciada pela dioxigenação do anel aromático, com posterior clivagem do mesmo, pela ação de uma segunda dioxigenase. Hidrolase, hidratase e aldolase são as enzimas que promovem a conversão do composto a acetaldeído e piruvato.

Lee e Gibson (1996) afirmaram que a enzima naftaleno dioxigenase possui uma afinidade por substratos bastante inespecífica, mostrando-se capaz de degradar aerobicamente etilbenzeno a estireno e/ou 2-hidroxiacetofenona. Informações sobre a posterior degradação da 2-hidroxiacetofenona, no entanto, não estão disponíveis.

A oxidação dos isômeros de xileno ocorre através da formação de metilbenzoil álcoois (pela ação de monooxigenases), metilbenzaldeídos e diferentes isômeros de metilbenzoato (Figuras 11 e 12). A degradação do metilbenzoato a 3 ou 4-metilcatecol se dá através de diferentes carboxi-hidrodióis, por dioxigenação. Ambos os compostos (3 e 4-metilcatecol) são posteriormente degradados a acetaldeído e piruvato pela ação de diferentes dioxigenases, hidrolases, hidratases e aldolases.

Embora enriquecimentos em compostos isolados de BTEX produzam culturas capazes de mineralizar, efetivamente, todos os compostos por ambas as vias, enriquecimentos em misturas de benzeno, tolueno e *p*-xileno, produzem consórcios capazes de mineralizar apenas benzeno e tolueno, enquanto cometabolizam *p*-xileno a produtos de inibição (ALVAREZ e VOGEL, 1991; OH et al., 1994).

Figura 6. Via de degradação aeróbia do benzeno (continua).

Figura 6. Via de degradação aeróbia do benzeno (continuação).

Figura 7. Vias de degradação aeróbia do tolueno (pela ação das enzimas tolueno 2- e 3-monooxigenases e tolueno dioxigenase).

Figura 8. Via de degradação aeróbia de tolueno (pela ação da enzima tolueno 4-monooxigenase).

Figura 10. Vias de degradação aeróbia do etilbenzeno.

Figura 11. Vias de degradação aeróbia dos isômeros *o*- e *m*-xileno.

Figura 12. Via de degradação aeróbia do *p*-xileno.

1.6 Consórcios degradadores BTEX

A biodegradação de misturas de hidrocarbonetos usualmente requer a cooperação de mais de uma única espécie, já que a maior parte das culturas puras são capazes de metabolizar apenas uma gama limitada de substratos. Desta forma, são necessários consórcios, que possuem maior versatilidade metabólica, conferida por uma variedade enzimática muito maior (GHAZALI et al., 2004; DEPPE et al., 2005).

Comunidades de bactérias pertencentes a diferentes gêneros foram detectadas em solos e águas contaminados com hidrocarbonetos de petróleo, indicando que cada espécie ou gênero possui um determinado papel nos processos de degradação destes compostos (SORKHOH et al., 1995). As vantagens do emprego de consórcios sobre culturas puras nos processos de biorremediação têm sido amplamente demonstradas, e podem ser atribuídas ao sinergismo existente entre os membros da associação (RAHMAN et al., 2002; SATHISHKUMAR et al., 2008). No complexo mecanismo de interação entre estes microrganismos, é possível, por exemplo, que uma espécie remova os metabólitos tóxicos gerados por outra espécie, ou degrade compostos que esta metabolizou parcialmente (GHAZALI et al., 2004).

Pelz e colaboradores (1999) provaram que em um consórcio a deficiência metabólica e fisiológica de degradadores primários de hidrocarbonetos era compensada pelo recrutamento de outros organismos do consórcio, que possuíam uma fisiologia complementar apropriada.

Consórcios ou culturas puras de microrganismos capazes de degradar eficientemente hidrocarbonetos de petróleo *in vitro* são freqüentemente isolados de áreas contaminadas e potencialmente usados como inóculo em tratamentos biológicos (MALINA e ZAWIERUCHA, 2007). Estes microrganismos podem ser combinados em culturas mistas, como intuito de aumentar a capacidade e reduzir o tempo de biodegradação destes compostos.

Nem sempre, no entanto, a presença de um número maior de organismos resulta em um processo de degradação mais eficiente. Lal e Khana (1996) demonstraram que a degradação de óleo cru foi mais eficiente pelo emprego de culturas puras do que utilizando uma população mista de microrganismos desconhecidos.

O preparo de consórcios, a partir da seleção de organismos isolados de áreas contaminadas, com habilidade de metabolizar eficientemente os compostos-alvo, foi uma técnica empregada por diversos autores no estudo de degradação de óleo cru (DÍAZ-RAMÍREZ et al., 2008; RAHMAN et al., 2002) e hidrocarbonetos de petróleo (GHAZALI et al., 2004; ARAUJO et al., 2005). Estudos comparativos do crescimento bacteriano e eficiência de degradação de culturas puras isoladas de áreas contaminadas *versus* consórcios contendo uma mistura definida de microrganismos degradadores também foram realizados para óleo cru (FOGHT et al., 1989; SATHISHKUMAR et al., 2008), óleo diesel (RICHARD e VOGEL, 1999) e hidrocarbonetos de petróleo (ADEBUSOYE et al., 2007; VAN HAMME et al., 2000).

Estudos de degradação de BTEX pelo emprego de consórcios bacterianos de bactérias indígenas, adaptadas a partir de uma área contaminada, foram reportados, dentre outros autores, por Alvarez e Vogel (1991), Chang et al. (2001), Chiang et al. (1989) e Deeb e Alvarez-Cohen (1999).

1.7 Emprego de técnicas moleculares em biorremediação

Tradicionalmente, a detecção e quantificação de bactérias são feitas de acordo com os principais meios de obtenção de carbono e energia, suas exigências nutricionais, e meios de cultivo para seu crescimento, além de observação direta por microscopia (GILBRIDE et al., 2006). No entanto, estas metodologias fornecem informações limitadas, com necessidade de maior refinamento, uma vez que populações bacterianas normalmente não são passíveis de serem diferenciadas por microscopia (ZAK et al., 1994). Como alternativa para esses métodos, foram desenvolvidas várias técnicas, destacando-se aquelas baseadas nos ácidos nucleicos.

Os ácidos ribonucleicos ribossomais (RNAr) são considerados os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade. Seus genes (DNAr) são universalmente distribuídos, sendo a molécula com maior grau de conservação existente (LANE et al., 1985) e, ao mesmo tempo, com variabilidade e quantidade de informações suficientes para revelar, claramente, as relações filogenéticas entre as espécies (WOESE, 1987; WEISBURG et al., 1991).

Grande parte das atuais técnicas moleculares utiliza a reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para o estudo da diversidade bacteriana. A reação de

PCR possui a habilidade de produzir milhares de cópias de pequenos e específicos segmentos do genoma de microrganismos pelo uso de *primers* (seqüências iniciadoras) complementares a seqüências localizadas em regiões específicas do genoma (MALIK et al., 2008). O que ocorre é a extensão a partir dos *primers*, pela ação da Taq polimerase (uma DNA polimerase termoestável, isolada do organismo *Thermus aquaticus*). O DNA é desnaturado e o ciclo repetido várias vezes, o que permite a amplificação exponencial da seqüência de interesse (MCDOWELL, 2006).

Os maiores avanços na utilização de técnicas de biologia molecular, no entanto, estão sendo obtidos pela comparação das seqüências de nucleotídeos do DNA, em especial na região que codifica o gene 16S RNAr. O seqüenciamento de fragmentos de genes fornece o melhor tipo de dado para inferências filogenéticas e determinação de relações de parentesco entre indivíduos e populações, mostrando-se uma poderosa ferramenta na identificação da diversidade genética de amostras ambientais (BAKER et al., 2003). As seqüências do DNAr 16S são comparadas a seqüências disponíveis nos bancos de dados e a identificação determinada pelo grau de similaridade da seqüência do isolado com a dos organismos catalogados.

Outra estratégia que analisa parte da informação genética dos microrganismos é o ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*). Esta técnica é baseada na restrição enzimática de fragmentos de DNA amplificados pelo emprego de endonucleases, selecionadas com base na sua habilidade em revelar polimorfismos, resultando em padrões filogenéticos distintos (GILBRIDE et al., 2006), ou seja, diferentes seqüências de DNA são clivadas em locais distintos, gerando um perfil de restrição único (MALIK et al., 2008). É uma técnica bastante útil para uma rápida análise da diversidade genética, no entanto, é recomendado cuidado na escolha do fragmento de DNAr a ser amplificado e analisado. No caso da análise de microdiversidade (diversidade abaixo do nível de espécie), que apresenta grupos de indivíduos com elevada afinidade genética, o fragmento amplificado deve incluir o espaço intergênico DNAr 16S-23S. Essa região apresenta maior variabilidade não só na sua composição de bases como também no seu tamanho, quando comparadas às regiões gênicas 16S ou 23S. Quando o estudo em questão tratar da diversidade entre isolados distantes filogeneticamente, os fragmentos amplificados podem ser ou DNAr 16S ou 23S (MALIK et al., 2008). Esses genes geram padrões de bandejamento mais simples, dependendo das enzimas de restrição utilizadas.

2 OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho são:

- a) enriquecer consórcios, de uma área contaminada com hidrocarbonetos aromáticos, capazes de degradar compostos individuais de BTEX;
- b) verificar a capacidade de crescimento em BTEX pelos consórcios;
- c) isolar, identificar e caracterizar culturas puras isoladas a partir dos consórcios.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Vidrarias

Todas as vidrarias utilizadas nos experimentos foram lavadas com detergente neutro Extran[®] (Merck Inc., WhiteHouse Station, NJ, USA), diluído em água, a uma concentração de 5% (v/v). Depois de secas, foram submetidas a posterior tratamento com peróxido de hidrogênio 35% (LabSynth Ltda., Diadema, SP, Brasil), para oxidação de todo material orgânico adsorvido ao vidro. Após remoção do peróxido de hidrogênio com água destilada, as vidrarias foram enxaguadas três vezes em água ultrapura.

Vidrarias utilizadas com fins microbiológicos foram, ainda, autoclavadas a 121 °C por 15 minutos, a uma pressão de 1 atmosfera.

3.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram compostos ultrapuros, exceto quando indicado diferentemente. Para todos os testes foram utilizados os reagentes: benzeno P.A. (≥99,7%, Merck), tolueno P.A. (≥99,9%, Merck), etilbenzeno P.A. (≥99%, Merck) e xileno puríssimo (mistura de isômeros, ≥97,5%, Merck).

3.3 Meio mínimo líquido

Meio mínimo líquido foi utilizado nos ensaios de biodegradação para prover nutrientes inorgânicos essenciais aos microrganismos, e tamponar as soluções aquosas que o constituem a pH 7,0.

Para a preparação de meio mínimo líquido foram adicionados, à água esterilizada: 1,5 g/L de MgSO₄.7H₂O, 0,2 g/L de CaCl₂.2H₂O, 3,0 g/L de (NH₄)₂SO₄, 1,5 g/L de EDTA, 15 mL/L de tampão fosfato de potássio 15 mM (pH 7,0), 1,0 mL de solução estoque de vitaminas e 1,0 mL de solução estoque de elementos-traço.

A solução de vitaminas contém 50 mg/L de ácido *p*-amino benzóico, 100 mg/L de piridoxina, 50 mg/L de tiamina, 50 mg/L de riboflavina, 50 mg/L de ácido nicotínico, 50 mg/L de pantotenato de cálcio, 50 mg/L de ácido lipóico, 50 mg/L de

nicotinamida, 50 mg/L de vitamina B₁₂, 20 mg/L de biotina e 20 mg/L de ácido fólico. A solução de elementos-traço, por sua vez, é composta de 8 g/L de FeCl₃.6H₂O, 70 mg/L de ZnCl₂, 100 mg/L de MnCl₂.4H₂O, 120 mg/L de CoCl₂.6H₂O, 25 mg/L de NiCl₂.6H₂O, 15 mg/L de CuCl₂.2H₂O e 25 mg/L de NaMoO₄.H₂O.

Todas as soluções foram adicionadas à água destilada esterilizada, a temperatura ambiente e com leve agitação para evitar a precipitação.

3.4 Meios complexos

Os meios TSB (*Tryptic Soy Broth*), TSA (*Tryptic Soy Agar*) e R2A Agar (Merck) foram utilizados como meios de cultura complexos. Estes meios, cujas composições estão descritas na tabela 3, foram preparados com água destilada, seguindo as instruções do fabricante.

Os meios sólidos TSA e R2A, logo após autoclavação, foram colocados em placas de Petri descartáveis esterilizadas e mantidos em estufa, a 37 °C, por 24 horas, para assegurar a esterilidade dos mesmos. O meio LB (Luria-Bertani) foi preparado para crescimento microbiano, para posterior extração de DNA total dos microrganismos.

Tabela 3. Composição dos meios de cultura complexos.

Meio Rico	Composição (g/L)
R2A	extrato de levedura (0,5), proteose peptona (0,5), hidrolisado de caseína (0,5), glicose (0,5), amido solúvel (0,5), piruvato de sódio (0,3), fosfato de potássio dibásico (0,3), sulfato de magnésio (0,05) e ágar (12).
TSA	peptona de caseína (15,0), peptona de farinha de soja (5,0), cloreto de sódio (5,0) e ágar (15,0)
TSB	peptona de caseína (17,0), peptona de farinha de soja (3,0), D(+)-glicose (2,5), cloreto de sódio (5,0), fosfato de potássio desidrogenado (2,5)
LB	bactotripton (10), extrato de levedura (5) e NaCl (5); pH 7,0

3.5 Caracterização da área

A indústria, responsável pela produção de tintas imobiliárias, deu início às suas atividades em 1974. Ela encontra-se em uma área de 10,2 ha, próxima à Rodovia Raposo Tavares, no município de Cotia, São Paulo.

A contaminação ocorreu devido a vazamentos dos tanques de armazenamento de solventes e tubulações subterrâneos. Com o objetivo de avaliar a concentração de voláteis, a proximidade das fontes potenciais de vazamento e a tendência do fluxo subterrâneo, durante o período de 1994 a 2000, foram instalados 33 poços de monitoramento (MW).

Em 2006, para realização de um teste piloto na barreira biológica, foram instalados mais 3 poços de monitoramento (PMB), numerados de 1 a 3. O poço PMB 01 foi instalado à montante, e os poços PMB 02 e PMB 03 à jusante de 2 poços pré-existentes, BO 01 e BO 02, usados para injeção de nutrientes e oxigênio. (Figura 13).

Figura 13. Representação esquemática do teste piloto na barreira biológica. BO 01 e BO 02: poços de injeção de nutrientes e oxigênio. PMB 01, PMB 02 e PMB 03: poços de monitoramento do teste.

3.6 Coleta das amostras de água subterrânea

Pelo fato de os poços BO 02 e PMB 02 apresentarem maior contaminação por BTEX, evidenciada pela presença de fase livre, optou-se pelo emprego das amostras dos mesmos para obtenção dos microrganismos utilizados nos

experimentos descritos neste trabalho. As amostras de água foram coletadas por micropurga e armazenadas em frascos esterilizados de borossilicato de 1 L com tampa de rosca, a 0 °C e ao abrigo da luz, durante o transporte. No laboratório, partes iguais de amostras frescas de ambos os poços foram misturadas e mantidas em frascos esterilizados, para a montagem de microcosmos e demais ensaios microbiológicos.

3.7 Montagem dos microcosmos e verificação da adaptação bacteriana e influência da temperatura sobre seu crescimento

Conforme já mencionado, a mistura 1:1 (v/v) das amostras dos poços BO 02 e PMB 02 foi fracionada em 3 partes. Uma delas foi prontamente utilizada para montagem de microcosmos, enquanto que as demais permaneceram estocadas - uma sob refrigeração (a 4 °C) e outra a temperatura ambiente. Os ensaios realizados com a amostra fresca foram denominados AAX1 (amostra ambiental 1, onde x = B: benzeno, T: tolueno, E: etilbenzeno ou X: xileno). A amostra que permaneceu a temperatura ambiente foi denominada AAX2, e a que ficou sob refrigeração, AAX3. Após 3 semanas, foram montados microcosmos com estas duas soluções que permaneceram quiescentes (2 e 3).

Para as três condições descritas, foram preparados cultivos, em triplicata, em Erlenmeyers de 250 mL, esterilizados, contendo 90 mL de meio mínimo e 10 mL de amostra dos poços. Como fonte de carbono, foram fornecidos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, isoladamente, no interior de pequenos tubos de ensaio providos de tampa, com um pequeno orifício (calibre 0,7 cm), permitindo a volatilização destes compostos e, conseqüentemente, sua disponibilização na forma de vapor (Figura 14). Os Erlenmeyers foram mantidos em capela de exaustão, sob agitação constante de 120 rpm, a 22 °C±1 °C.

Figura 14. Microcosmo montado em Erlenmeyer de 250 mL, no qual a fonte de carbono é fornecida na forma de vapor, no interior de pequenos tubos de ensaio.

Após confirmação do crescimento microbiano, por turbidez, os cultivos foram repicados 7 vezes, pela transferência de 1 mL de inóculo para 100 mL de meio mínimo, em um sistema idêntico ao descrito anteriormente. A turbidez foi determinada através de medidas de densidade ótica (DO), em colorímetro (modelo B440, Micronal, São Paulo, SP, Brasil), a 520 nm. Os subcultivos foram realizados ao atingir-se uma DO de aproximadamente 0,4.

3.8 Verificação do crescimento dos consórcios em BTEX em sistema fechado

Os consórcios já enriquecidos em Erlenmeyers foram utilizados como inóculo para verificação do crescimento destes microrganismos frente aos compostos em que foram originalmente aclimatados, em um sistema fechado. Neste sentido, foram montados cultivos em frascos de penicilina de 100 mL, em triplicata. Os compostos foram fornecidos diretamente ao meio mínimo, na forma líquida (Figura 15). Aos frascos foram adicionados 500 μ L de inóculo em 50 mL de meio mínimo e concentrações variáveis de BTEX (aproximadamente 16, 80, 160, 320 e 480 mg/L, que correspondem a 1, 5, 10, 20 e 30 μ L, respectivamente). Os frascos foram vedados com septos de butila com face de teflon e lacres de alumínio para impedir a perda dos compostos por volatilização. Os cultivos foram repicados (3 vezes) para garantir que o crescimento microbiano, evidenciado pela turbidez, não fosse equivocadamente superestimado, uma vez que o inóculo era bastante turvo. Foram feitas análises visuais sobre a intensidade de crescimento a partir do 4º subcultivo.

Figura 15. Microcosmos montados em frascos de penicilina de 100 mL, nos quais a fonte de carbono foi fornecida na forma líquida, diretamente ao meio mínimo.

3.9 Análise do perfil de crescimento dos consórcios microbianos com diferentes substratos

Foram realizados ensaios, sob condições aeróbias, usando culturas microbianas mistas AAB1, AAT1, AAE1 e AAX1, aclimatadas com substratos isolados (BTEX) para avaliar o perfil de crescimento destes microrganismos frente a diferentes substratos.

Para a montagem dos microcosmos, em Erlenmeyers de 250 mL esterilizados, foram adicionados 2 mL de inóculo em 200 mL de meio mínimo. As fontes de carbono (BTEX) foram fornecidas na forma de vapor, no interior de pequenos tubos de ensaio, munidos de tampas perfuradas para garantir o acesso do vapor aos microrganismos. Cada consórcio (AAB1, AAT1, AAE1 e AAX1) foi testado em triplicata, sob os 4 substratos (BTEX), somando um total de 48 ensaios. Como inóculo, foi utilizado o 18^o subcultivo de cada um dos consórcios.

Controles negativos, contendo todos os 4 compostos isoladamente, foram igualmente preparados. Foi montado, ainda, um controle contendo a mesma quantidade de inóculo que os demais frascos, no entanto, sem BTEX. O objetivo deste controle foi verificar se a quantidade de EDTA contida no meio, como agente quelante (para evitar a precipitação de sais no meio mínimo), é suficiente para que os microrganismos possam usá-la como fonte de carbono para seu crescimento. As medições de crescimento foram realizadas por densidade ótica, a 520 nm.

3.10 Isolamento das bactérias degradadoras de BTEX

Após cinco dias de crescimento, 1 mL do 20^o subcultivo das culturas AAB1, AAT1, AAE1 e AAX1 foi submetido a 6 diluições decimais seriadas, em tampão

fosfato 15 mM. 100 µL da amostra original e das respectivas diluições decimais foram plaqueados nos meios sólidos complexos R2A e TSA, utilizando a técnica de espalhamento. As placas foram incubadas de forma invertida a temperatura ambiente.

3.11 Caracterização macroscópica dos isolados

Após o crescimento das colônias, as mesmas foram avaliadas com relação às suas características macroscópicas (morfologia, cor, rugosidade e elevação). As cepas que apresentaram aspecto diferenciado em R2A e TSA foram transferidas para placas de Petri contendo R2A, com auxílio de uma alça de platina, para garantir a pureza das culturas. Transferências sucessivas foram realizadas até que as características apresentadas se mantivessem constantes.

3.12 Caracterização microscópica dos isolados por coloração de Gram

Na caracterização microscópica por coloração de Gram, uma pequena quantidade de células foi transferida diretamente da placa de R2A para uma lâmina de vidro, com o auxílio de uma alça de plástico descartável esterilizada. 2 µL de água destilada esterilizada foram depositados sobre a lâmina para o preparo do esfregaço. Após secagem, o esfregaço foi flambado em bico de Bunsen para fixação das células, corado com solução de cristal violeta, lavado com água corrente e, posteriormente, coberto com solução de Lugol. A lâmina foi novamente lavada com água corrente e descorada com solução de álcool:acetona (4:1, v/v). Uma terceira lavagem foi realizada, e a lâmina, por fim, coberta com fucsina. O excesso de corante foi removido com água corrente e a amostra seca com papel filtro. A observação foi realizada por microscopia (microscópio *Zeiss Axiovert S100*, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemanha) com objetiva de imersão e aumento de 1000 vezes.

3.13 Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As cepas isoladas foram transferidas da placa contendo R2A para meio líquido TSB (30 g/L) com o auxílio de uma alça de platina e, após crescimento,

filtradas em membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,22 μm (Sartorius AG, Göttingen, Alemanha). As amostras de cultura foram então fixadas através do emprego de uma solução de glutaraldeído 8% e formol 4%, na qual permaneceram imersas por 2h. A posterior desidratação foi realizada pela imersão das membranas em concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100%), por 15 minutos cada, sendo a exposição ao etanol 100% repetida por 3 vezes. Por fim, foi promovida a secagem das amostras através do equipamento ponto crítico (*Critical Point Dryer CPD-030*, Oerlikon Balzers, Balzers, Liechtenstein) e metalização da superfície a ouro no equipamento *Sputter Coater SCD-040 Electron Probe Microanalyzer* (Oerlikon Balzers). As etapas de secagem por ponto crítico e metalização foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB III) da Universidade de São Paulo.

As amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (*FEI QuantaTM 600*, FEI Company, Rotterdam, Holanda), no Laboratório de Caracterização Tecnológica (LCT) do Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.

3.14 Verificação do crescimento dos isolados com o composto usado para seu enriquecimento

As cepas isoladas, mantidas em TSB, foram utilizadas como inóculo para verificação do crescimento destes microrganismos com os compostos em que foram originalmente aclimatados, em meio mínimo. Neste sentido, foram montados cultivos em Erlenmeyers (conforme sistema previamente descrito na seção 3.4.1) para exposição dos microrganismos ao vapor de BTEX, e em frascos de penicilina (conforme sistema descrito na seção 3.8), em que estes compostos foram fornecidos diretamente ao meio mínimo, na forma líquida. Aos Erlenmeyers foi adicionado 1 mL de inóculo em 100 mL de meio mínimo. Já ao segundo sistema, em frascos de penicilina de 100 mL, foram adicionados 500 μL de inóculo em 50 mL de meio mínimo e 10 μL de substrato (benzeno, tolueno, etilbenzeno ou xileno). Os frascos foram vedados com septos de butila com face de teflon e lacres de alumínio para impedir a perda dos compostos por volatilização. Os cultivos expostos a ambas as formas de fornecimento de BTEX foram inicialmente repicados (três vezes) para garantir que o crescimento microbiano, evidenciado pela turbidez, não ocorreu

devido à presença de carbono remanescente do TSB. A partir do 4º subcultivo, foram feitas análises visuais sobre a intensidade de crescimento.

3.15 Análise do perfil de crescimento dos isolados com diferentes substratos

De forma idêntica aos testes realizados para os consórcios bacterianos (conforme descrito no item 3.9), foram montados microcosmos com culturas puras para verificar a capacidade de crescimento destes organismos quando expostos, individualmente, a diferentes substratos (além do composto em que foram aclimatados).

Para a montagem dos microcosmos, em Erlenmeyers de 250 mL esterilizados, foram adicionados 2 mL de inóculo em 200 mL de meio mínimo. Os compostos BTEX foram fornecidos na forma de vapor, no interior de pequenos tubos de ensaio (Figura 12). Cada cepa foi testada em triplicata, na presença de 4 diferentes substratos (benzeno, tolueno, etilbenzeno ou xileno), individualmente. Como inóculo, foi utilizado o 15º subcultivo de cada uma das cepas.

Controles abióticos contendo os 4 compostos, isoladamente, foram igualmente preparados. Para verificação do crescimento foram realizadas medições por densidade ótica, a 520 nm.

3.16 Identificação dos isolados pelo emprego de técnicas moleculares

O *fingerprinting* do DNAr dos isolados foi realizado segundo o protocolo de Massol-Deyá et al. (1995). A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com protocolo modificado de Pickup et al. (1995), seguida de amplificação por PCR do gene RNAr 16S e digestão deste fragmento para comparação do padrão de bandas gerados. As cepas consideradas degradadoras e aquelas que apresentaram perfis de restrição diferentes tiveram o fragmento DNAr 16S seqüenciado.

3.16.1 Extração do DNA total dos isolados

O DNA total dos isolados, utilizado como molde para as amplificações específicas via PCR, foi extraído segundo protocolo modificado de Pickup et al.

(1995). As células, previamente cultivadas em 10 mL de LB (Tabela 2), foram separadas por centrifugação durante 6 minutos a 7000 rpm, sendo o sobrenadante descartado. Os *pellets* foram suspensos em 120 µL de solução de lisozima 50 mg/mL em TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM), e incubados a 37 °C por 1 hora. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de solução de lise (tiocianato de guanidina 5 M, EDTA 10 mM e N-lauril sarcosina 0,5%), e os tubos brevemente agitados com vortex. Após incubação no gelo, por 10 minutos, foram adicionados 250 µL de acetato de amônio 7,5 M gelado. Os tubos foram homogeneizados e incubados no gelo por mais 10 minutos. Após a incubação, foram adicionados 500 µL de uma solução de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). As amostras foram misturadas por inversão e centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e meio volume de isopropanol foi adicionado à solução para precipitação do DNA bacteriano. Após incubação (a -80 °C, por 20 minutos), as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm e os sobrenadantes descartados. Para lavagem dos *pellets*, foram adicionados 500 µL de etanol 70% e o material centrifugado durante 3 minutos a 13000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado, os *pellets* secos a 37 °C, por 15 minutos, e o DNA ressuspenso em 50 µL de água destilada ultrapura livre de DNase e RNase (Gibco, Invitrogen Corporation, Auckland, Nova Zelândia).

A confirmação da eficiência da extração de DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1x, com 5 µL de DNA e 2 µL de *Loading Buffer* (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose). Como padrão foi utilizado o λ DNA (Gibco) a 53 ng/µL. Após a corrida eletroforética, a 90 V/cm, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 5 µg/mL, analisado sob luz ultravioleta em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil) e fotografado com o sistema *Gel Logic 100 Imaging* (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA).

3.16.2 Amplificação da região DNAr 16S

O gene RNAr 16S foi amplificado através do emprego dos *primers* 27F (Lane, 1991) e 1401R (Heuer et al., 1997), cujas seqüências são 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3' e 5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3', respectivamente.

As reações de PCR foram realizadas conforme descrito por Lane et al. (1991). Foram misturados 5 µL de tampão de PCR 10X, 1,7 µL de MgCl₂ 50 mM, 1,26 µL de dNTPs 10 mM, 1 U de *Taq Polimerase*, 0,76 µL de cada *primer* (20 mM) (Invitrogen) e 2 µL de DNA molde. Água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen) foi adicionada para completar o volume final de 50 µL.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador (*Eppendorf Mastercycler Gradient*, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha), sob as seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos intermediários (95 °C por 30 segundos, anelamento a 62,5 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 45 segundos) e uma etapa terminal de extensão de 3 minutos, a 72 °C. Ao controle negativo foram adicionados 2 µL de água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen), para verificação da pureza dos reagentes.

5 µL de cada um dos fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em TAE 1x, a 90V/cm, com 2 µL de *Loading buffer*. Como padrão de peso molecular foi utilizado o *1 Kb DNA Plus Ladder* (Invitrogen). As bandas resolvidas no gel foram visualizadas, após coloração com brometo de etídio 5 µg/mL, no transiluminador UV (Loccus Biotecnologia) e fotografadas com o sistema *Gel Logic 100 Imaging* (Eastman Kodak Company).

3.16.3 Análise de restrição dos DNAr 16S amplificados (ARDRA)

Os produtos de amplificação das reações de PCR foram incubados em banho-maria a temperatura de 37 °C, por 2h. Foram testados o emprego de 2 e 3 endonucleases (*HaeIII* e *HhaI*; e *RsaI*, *HhaI* e *Bsh1236I*, respectivamente) para verificar se o bandeamento apresentava perfis diferenciados para as linhagens em estudo. Os sítios de clivagem destas enzimas estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Sítios de corte das endonucleases testadas.

Enzimas	Sítios de corte
<i>HaeIII</i>	5'...A G↓C T...3' 3'...C C↓G G...5'
<i>HhaI</i>	5'...G C G↓C...3' 3'...C↓G C G...5'
<i>RsaI</i>	5'...G T↓A C...3' 3'...C A↓T G...5'
<i>Bsh1236I</i>	5'...C G↓C G...3' 3'...G C↓G C...5'

Do material amplificado, 14 µL foram digeridos em uma reação contendo 0,6 µL (10 U/µL) das enzimas *HaeIII* e *HhaI*, 3,0 µL de *Buffer Tango* e água destilada ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen), para um volume final de 30 µL. A solução foi incubada em banho-maria, a 37 °C, por 2 horas.

A restrição dos produtos de PCR pelo emprego de *HhaI*, *RsaI* e *Bsh1236I* foi realizada utilizando-se as mesmas quantidades de material amplificado, endonucleases, *Buffer Tango* e água livre de DNase e RNase (MOYER et al., 1996). Da mesma forma que no protocolo com 2 enzimas, a restrição foi promovida em banho-maria a 37 °C, por 2 horas.

O volume total dos produtos de ambas as reações (30 µL) foi utilizado para separação dos fragmentos por eletroforese em gel de agarose 4% com 4 µL de *Loading buffer*. O gel permaneceu submerso em TAE 1x, a 90 V/cm. Como padrão foi utilizado o *Pbr/HaeIII* (8 a 587 pb; BioAgency Biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil). O gel foi posteriormente corado em solução de brometo de etídio 5 µg/mL, visualizado no transiluminador UV (Loccus Biotecnologia) e fotografado com o sistema *Gel Logic 100 Imaging* (Eastman Kodak Company).

3.16.4 Seqüenciamento do DNAr 16S

A identificação das cepas isoladas foi obtida através do seqüenciamento do fragmento do gene RNAr 16S. A amplificação do gene foi realizada utilizando dois *primers* externos, 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3', LANE et al., 1991) e 1401R (3'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG- 5', HEUER et al., 1997), e

dois *primers* internos, 338F (5'-ATC CCT ACG GGA GGC AGC-3', AMANN et al., 1995) e 1100R (3'-AGG GTT GCG CTC GTT G-5', WEISBURG et al., 1991). A reação de PCR dos fragmentos foi efetuada conforme descrito no item 3.15.2, e os produtos purificados, para remoção dos nucleotídeos não incorporados e excesso dos *primers*, através do emprego do kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Após purificação, os produtos de PCR foram quantificados por espectrofotometria (*NanoDrop Spectrophotometer ND-1000*, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) e diluídos em água ultrapura livre de DNase e RNase (Invitrogen), quando necessário, para as concentrações apropriadas para o seqüenciamento.

As reações de seqüenciamento foram realizadas no Setor de Seqüenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano – USP, utilizando o *MegaBACE 1000* (Amersham Pharmacia Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). As reações de seqüenciamento são realizadas de acordo com o protocolo para o *MegaBACE 1000*, utilizando o *DYEnamic ET Dye Terminator Kit* (com *Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase*). As seqüências de nucleotídeos obtidas foram analisadas e editadas manualmente através do programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.9.0 (Ibis Biosciences Inc., Carlsbad, CA, EUA) e alinhamentos múltiplos foram realizados através do programa *Clustal W*.

As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências do banco de dados *GenBank*, através do programa *BLAST*, do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Esta comparação possibilitou a montagem de uma matriz de similaridade para o gene RNAr 16S, a fim de comparar as proximidades filogenéticas entre as cepas obtidas no presente trabalho e aquelas disponibilizadas no banco de dados do NCBI.

3.17 Identificação do perfil de ácidos graxos de membrana

Para as análises de ácidos graxos, realizadas junto ao Laboratório de Microbiologia Ambiental, na Embrapa de Jaguariúna, foi utilizada uma metodologia modificada do protocolo descrito no manual MIDI (Microbial Identification Inc., Newark, DE, EUA).

As culturas bacterianas foram estriadas pelo método de esgotamento em meio TSBA (*Tryptic Soy Broth Agar*) e incubadas por 24±2 horas, a 28±1 °C. Após o

período de incubação foram transferidas para um tubo de cultura e a cada um deles adicionado 1 mL do reagente de saponificação (Tabela 5). Os tubos foram então agitados e aquecidos em água fervente, por 5 minutos. Após nova agitação, retornaram ao banho para serem aquecidos por mais 25 minutos. Os tubos foram resfriados e 2 mL do reagente de metilação (Tabela 5) foram adicionados. A mistura foi agitada por inversão e aquecida a 80 °C, por 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1,25 mL do reagente de extração (Tabela 5) aos tubos resfriados, e os mesmos agitados por 10 minutos. A fase aquosa foi descartada, e à fase orgânica foram adicionados 3 mL do reagente de lavagem (Tabela 5). Os tubos foram novamente agitados, por 5 minutos, e cerca de 2/3 da fase orgânica foram transferidos para um frasco específico para cromatografia gasosa.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso *Agilent 6850* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) acoplado a um detector por ionização em chama (FID).

Para a separação dos compostos, 2 µL de amostra foram injetados em coluna capilar Ultra (2,5% fenil-metilsiloxano), com 25 m de comprimento, 0,20 mm de diâmetro interno e 0,33 µm de espessura de filme. Foi utilizada a seguinte rampa térmica: temperatura inicial de 170 °C, aquecimento a 5 °C/min até 260 °C e de 260 °C a 310 °C a 40 °C/min. O injetor foi mantido a 250 °C.

Tabela 5. Composição dos reagentes utilizados na extração de ácidos graxos.

Reagente	Composição
TSBA	TSB (30 g), ágar (15 g), água destilada (1 L)
Reagente de saponificação	NaOH (45 g), metanol (150 mL), água destilada (150 mL)
Reagente de metilação	HCl 6M (325 mL), metanol (275 mL)
Reagente de extração	hexano (200 mL), terc-butil metil éter (MTBE) (200 mL)
Reagente de lavagem	NaOH (10,8 g), água destilada (900 mL)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Verificação da adaptação bacteriana e influência da temperatura sobre seu crescimento

- Adaptação

A adaptação de diferentes consórcios microbianos para a degradação de compostos puros de BTEX foi avaliada em microcosmos incubados com uma amostra ambiental coletada em uma área com histórico de contaminação por mistura de BTEX.

Para estimular o crescimento de microrganismos com potencial de utilização de compostos puros de BTEX, como única fonte de carbono, foi utilizado um meio de cultura mínimo. Microrganismos capazes de sintetizar biomassa a partir destes compostos foram selecionados em detrimento dos demais, uma vez que microrganismos que apresentam crescimento mais lento acabam sendo eliminados da cultura por diluição nos repiques sucessivos.

A amostra coletada, fracionada em 3 partes, teve uma fração prontamente usada para os ensaios (AAx1). As demais (AAx2, a temperatura ambiente, e AAx3, sob refrigeração) foram armazenadas por um período de 3 semanas sob diferentes condições de temperatura antes que os microcosmos fossem montados. Os 3 sistemas foram avaliados com relação ao tempo necessário para que fosse atingida uma densidade ótica de 0,4. Os resultados estão expressos na figura 16.

Figura 16. Curvas de crescimento em (A) benzeno, (B) tolueno, (C) etilbenzeno e (D) xileno dos consórcios das amostras ambientais AAx1 (usada prontamente para a montagem dos microcosmos), AAx2 (mantida quiescente, a temperatura ambiente, por 3 semanas) e AAx3 (mantida quiescente, a 4 °C, por 3 semanas), onde x = B: benzeno, T: tolueno, E: etilbenzeno e X: xileno. Crescimento verificado por densidade ótica (DO), a 520 nm. Subcultivos realizados quando a DO era de aproximadamente 0,4. n=1 (continua).

Figura 16. Curvas de crescimento em (A) benzeno, (B) tolueno, (C) etilbenzeno e (D) xileno dos consórcios das amostras ambientais AAX1 (usada prontamente para a montagem dos microcosmos), AAX2 (mantida quiescente, a temperatura ambiente, por 3 semanas) e AAX3 (mantida quiescente, a 4 °C, por 3 semanas), onde x = B: benzeno, T: tolueno, E: etilbenzeno e X: xileno. Crescimento verificado por densidade ótica (DO), a 520 nm. Subcultivos realizados quando a DO era de aproximadamente 0,4. n=1 (continuação).

Na presença de benzeno, como fonte de carbono, os tempos de crescimento foram bastante semelhantes para os cultivos AAB1 e AAB2. Enquanto que AAB1 cresceu, a partir do terceiro repique, em um tempo médio de 5 dias, o AAB2 teve seus 2 últimos subcultivos realizados após somente 2 dias de crescimento, cada um. O cultivo AAB3, por sua vez, não apresentou crescimento (Figura 16A).

Nos ensaios contendo tolueno ocorreu uma alteração sutil no tempo de crescimento inicial dos consórcios AAT2 e AAT3, quando comparados ao AAT1. Este fato se deve, possivelmente, ao período em que as amostras AAT2 e AAT3 (também sob refrigeração) permaneceram quiescentes. Os tempos necessários foram de 5, 6 e 8 dias, para os cultivos AAT1, AAT2 e AAT3, respectivamente. A partir do segundo repique, todos os cultivos chegaram a uma média de crescimento de apenas 2 dias (Figura 16B).

Um perfil semelhante ao apresentado pelos cultivos expostos ao tolueno foi observado na presença de etilbenzeno (Figura 16C), enquanto que, para os ensaios contendo xileno, algumas diferenças foram visualizadas. O crescimento inicial do consórcio AAX1 ocorreu em 7 dias, metade do tempo requerido pelos demais (16 dias para o AAX2 e 13 dias para o AAX3). Os cultivos AAX1 e AAX2 apresentaram queda gradativa no tempo de crescimento, ocorrendo estabilização de 2 dias no

sétimo e oitavo subcultivo para o AAX1 e a partir do sexto subcultivo para o AAX2. Crescimento anômalo foi verificado para o terceiro subcultivo do AAX3, que ocorreu em 7 dias (houve um acréscimo de 3 dias com relação ao segundo subcultivo). A partir do quarto subcultivo, o tempo de crescimento decresceu, conforme o esperado (Figura 16D).

De modo geral, uma diminuição progressiva nos tempos de crescimento ocorreu em todos os testes realizados, à medida que novos subcultivos foram feitos, mostrando-se, contudo, mais pronunciada no primeiro subcultivo. Essa aceleração no crescimento microbiano é consequência da adaptação da microbiota às diferentes fontes de carbono. Segundo Spain e van Veld (1983), os três mecanismos responsáveis pela adaptação que podem ocorrer são (a) indução e/ou inibição de enzimas específicas, (b) alterações genéticas que resultam em novas capacidades metabólicas, e (c) enriquecimento seletivo de microrganismos capazes de transformar o(s) composto(s)-alvo. Ascon-Cabrera e Lebeault (1993) citam ainda, como fatores que promovem a adaptação, o suprimento insuficiente de nutrientes inorgânicos e a utilização preferencial de outros compostos orgânicos, antes do xenobiótico de interesse. Leahy e Colwell (1990) verificaram que comunidades adaptadas exibem maiores potenciais de degradação do que comunidades obtidas de áreas sem histórico de contaminação por hidrocarbonetos.

- Temperatura

O objetivo principal da verificação da influência da temperatura sobre o crescimento microbiano se deve ao fato de, freqüentemente, optar-se pelo armazenamento e preservação de amostras sob refrigeração.

Os resultados expressos na figura 16 demonstram que o armazenamento da amostra AAX3 em baixa temperatura afetou significativamente o crescimento microbiano apenas na presença de benzeno. A inabilidade de crescimento do consórcio com este composto pode ter sido provocada por inativação de enzimas necessárias para sua degradação, por morte celular ou conferida pela elevada recalcitrância do benzeno.

Como nos experimentos anteriores os cultivos foram mantidos a temperatura ambiente durante o período de análise da cinética de crescimento (a amostra AAX3 permaneceu refrigerada somente antes do preparo dos microcosmos), para

evidenciar a influência negativa de baixas temperaturas no crescimento dos consórcios, foram montados novos ensaios, em duplicata, em um sistema idêntico ao descrito no item 3.7. Cultivos inoculados com o consórcio AAX1 já adaptado (o inóculo foi realizado com o 8º subcultivo de AAX1), foram mantidos sob refrigeração, a 4 °C, por um período de 15 dias. Foram realizadas leituras de DO, no entanto, nenhum crescimento foi observado (resultados não demonstrados). É geralmente observado que as taxas de degradação diminuem com o decréscimo da temperatura. Acredita-se que isto ocorra em consequência da redução da atividade enzimática (LEAHY e COLWELL, 1990) e da fluidez e permeabilidade da membrana celular, que controla o transporte de nutrientes e contaminantes entre o meio interior e exterior da célula microbiana (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

4.2 Verificação do crescimento dos consórcios em BTEX em sistema fechado

Com o objetivo de determinar a concentração ótima de substrato para que maior crescimento dos consórcios AAB1, AAT1, AAE1 e AAX1 fosse visualizado, foram testados volumes variáveis de BTEX (1, 5, 10, 20 e 30 µL, que correspondem às concentrações de 16, 80, 160, 320 e 480 mg/L, respectivamente), fornecidos na forma líquida, em frascos de penicilina. As intensidades de crescimento, determinadas por densidade ótica, a 520 nm, demonstram que maior crescimento ocorreu na presença de 160 mg/L de BTEX (Tabela 6).

Tabela 6. Crescimento bacteriano observado pela DO para os consórcios em diferentes concentrações de BTEX.

	AAB1 benzeno	AAT1 tolueno	AAE1 etilbenzeno	AAX1 xileno
16 mg/L	+	+	+	+
80 mg/L	++	++	++	++
160 mg/L	++++	++++	++++	+++
320 mg/L	+	+	+	-
480 mg/L	-	-	+	-

-: Sem crescimento (DO entre 0,01 e 0,1); +: pouco crescimento (DO entre 0,1 e 0,3); ++: crescimento médio (DO entre 0,3 e 0,6); +++: bom crescimento (DO entre 0,6 e 0,8); ++++: crescimento excelente (DO maior que 0,8).

Na tentativa de obter-se maior crescimento em uma maior quantidade de substrato (320 mg/L) foi utilizado o dobro de inóculo (1 mL), no entanto, como somente na presença de benzeno essa melhora ocorreu (resultados não demonstrados), optou-se pela padronização de 160 mg/L para os 4 compostos. A concentração de 480 mg/L mostrou-se altamente tóxica para todos os substratos, não sendo visualizado nenhum crescimento em benzeno, tolueno e xileno, e pouca turbidez em etilbenzeno.

Os compostos BTEX, bastante voláteis, possuem pressões de vapor elevadas, e assim, rapidamente atinge-se um equilíbrio dinâmico entre as fases líquida e gasosa. Após a volatilização, os compostos são incorporados e difundidos à fase líquida do meio mineral, e só então fornecidos aos microrganismos. Pode-se inferir, neste sentido, que os microrganismos que crescem nestas condições são capazes de absorver mais eficientemente os compostos na concentração de 160 mg/L.

Sabe-se que uma maior quantidade de substrato leva a um maior crescimento bacteriano e sua aclimação aos compostos, que são progressivamente introduzidos no sistema biológico. Quantidades muito elevadas de BTEX, no entanto, conferem a estes compostos maior toxicidade. Solventes são conhecidos por acumularem-se e promoverem o rompimento da membrana celular, afetando a integridade estrutural e funcional da célula (SIKKEMA et al., 1995).

Segundo Lapertot et al. (2007), quantidades limitantes de carbono provocam danos às células e levam à diminuição de crescimento. Acredita-se, no entanto, que a baixa turbidez verificada em concentrações menores (16 e 80 mg/L) foi consequência de uma quantidade pequena de substrato.

Como todas as concentrações testadas estão abaixo do limite de solubilidade em água dos compostos benzeno e tolueno (que são de 1750 e 520 mg/L, respectivamente), acredita-se que a capacidade de crescimento dos consórcios AAB1 e AAT1 independe deste parâmetro. No caso dos consórcios AAE1 e AAX1, no entanto, não ocorreu crescimento em concentrações superiores ao limite de solubilidade dos compostos etilbenzeno e xileno (150 e 200 mg/L, respectivamente), indicando que a baixa atividade metabólica e/ou ausência de crescimento das células é consequência da elevada toxicidade destes substratos quando insolúveis.

4.3 Análise do perfil de crescimento dos consórcios microbianos com diferentes substratos

Foram analisadas as taxas de crescimento dos consórcios na presença dos substratos usados para seu enriquecimento e dos demais compostos BTEX, para verificar a habilidade de degradação destes organismos.

Além disso, dado que pouca atenção tem sido dada ao estudo da habilidade de compostos individuais de BTEX ativarem ou inibirem processos de biodegradação destes compostos, foram também testadas as interações entre substratos através de montagem de microcosmos contendo misturas binárias. A compreensão da interação entre substratos é uma ferramenta importante para o entendimento do comportamento dos compostos BTEX no ambiente, assim como as semelhanças e diferenças na sua degradação. A presença de um dado composto BTEX pode estimular a degradação de outro pela indução de enzimas catabólicas ou atuando como substrato primário e estimulando o crescimento bacteriano, o que pode aumentar o cometabolismo de outro composto. Em contrapartida, um determinado composto BTEX pode inibir a degradação de outro devido à sua toxicidade, por repressão catabólica, inibição competitiva por enzimas catalisadoras do processo de degradação ou depleção de aceptores de elétrons.

- Consórcio AAB1

O consórcio AAB1, enriquecido em benzeno, apresentou curvas de crescimento estatisticamente iguais na presença dos compostos benzeno, tolueno e etilbenzeno. Não ocorreu crescimento em xileno (Figura 17).

Figura 17. Curvas de crescimento do consórcio previamente enriquecido em benzeno, exposto a benzeno (B-B); tolueno (B-T); etilbenzeno (B-E) e xileno (B-X). Crescimento determinado por densidade ótica, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.

Ausência de crescimento em xileno também foi observada por Alvarez e Vogel (1991), que verificaram que a bactéria *Arthrobacter* sp. HCB, isolada em benzeno como única fonte de carbono, não foi capaz de degradar tolueno ou *p*-xileno, a menos que benzeno estivesse presente. A degradação destes compostos era interrompida quando o benzeno era degradado, sugerindo que tolueno e *p*-xileno eram degradados cometabolicamente.

Pelo fato de o consórcio AAB1 apresentar inabilidade de crescimento com um substrato diferente daquele usado para seu enriquecimento, foram montados ensaios com o intuito de verificar se ocorreu inibição. O consórcio foi testado em triplicata, sob 3 condições: (a) um sistema contendo somente o composto usado para seu enriquecimento (benzeno); (b) outro contendo 2 tubos de ensaio (um contendo benzeno e outro xileno); e (c) um contendo apenas o composto recalcitrante aos organismos (xileno). O sistema foi montado conforme descrito no item 3.8.

Figura 18. Curvas de crescimento do consórcio AAB1 - exposto a benzeno, benzeno + xileno, e xileno. Crescimento verificado por DO, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.

Quando exposto ao benzeno e xileno, conjuntamente, o consórcio AAB1 mostrou capacidade de crescimento idêntica àquela verificada somente na presença de benzeno (Figura 18). Este fato demonstra que o xileno não atuou como inibidor, apenas não foi passível de ser utilizado como fonte de carbono pelos microrganismos, que não cresceram quando este composto foi fornecido individualmente.

Interações negativas entre estes substratos (benzeno e xileno) foram verificadas por Alvarez e Vogel (1991), que reportaram uma diminuição da degradação de benzeno por um consórcio bacteriano e pela cepa *Pseudomonas* sp. CFS-215 na presença de *p*-xileno.

Já Arvin e colaboradores (1989), no estudo das interações entre compostos aromáticos na degradação aeróbia de benzeno, verificaram que a degradação deste composto por consórcios microbianos foi estimulada na presença de tolueno ou *o*-xileno, separadamente. Um efeito antagônico, no entanto, foi observado quando ambos os compostos foram fornecidos conjuntamente.

- Consórcio AAT1

O consórcio AAT1 apresentou crescimento com taxas semelhantes para os compostos tolueno e etilbenzeno. Com benzeno o crescimento foi mais lento e com xileno não foi observado (Figura 19).

Figura 19. Curvas de crescimento do consórcio previamente enriquecido em tolueno, exposto a benzeno (T-B); tolueno (T-T); etilbenzeno (T-E) e xileno (T-X). Crescimento determinado por densidade ótica, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.

Chang e colaboradores (2001), em contrapartida, verificaram que um consórcio microbiano adaptado em tolueno foi capaz de degradar todos os compostos BTEX, com maior crescimento visualizado na presença de tolueno, seguido de benzeno, etilbenzeno e xileno.

Deeb e Alvarez-Cohen (1999) também verificaram crescimento em xileno, como única fonte de carbono, de um consórcio enriquecido em tolueno. Segundo os autores, a presença de tolueno, benzeno ou etilbenzeno, no entanto, teve efeito negativo sobre a degradação de xileno. A ordem de crescimento condiz com a verificada neste trabalho (tolueno > benzeno > etilbenzeno > xileno).

Alvarez e Vogel (1991) observaram que a bactéria *Pseudomonas* sp. CFS-215, isolada em tolueno como única fonte de carbono e energia, foi capaz de crescer em *p*-xileno. Eles verificaram, ainda, que esta cepa degradava preferencialmente tolueno, seguido de benzeno e *p*-xileno. Os autores sugeriram que o aumento da degradação de benzeno, quando pequena quantidade de tolueno foi fornecida, indica que o tolueno promoveu aumento da atividade microbiana pelo fato de afetar a indução enzimática, e que a cepa CFS-215 possivelmente utilizou a mesma enzima para degradar ambos os compostos.

O consórcio AAT1 apresentou excelente crescimento quando exposto à mistura binária de tolueno e xileno. No entanto, assim como no teste anterior, o xileno não interferiu no crescimento dos organismos com tolueno (Figura 20).

Figura 20. Curvas de crescimento do consórcio AAT1 - exposto a tolueno, tolueno + xileno, e xileno. Crescimento verificado por DO, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.

- Consórcio AAE1

O consórcio adaptado em etilbenzeno, conforme esperado, apresentou maior crescimento quando exposto ao composto no qual foi enriquecido. Com tolueno e benzeno o crescimento foi mais lento e em xileno nenhum crescimento foi observado (Figura 21).

Figura 21. Curvas de crescimento do consórcio previamente enriquecido em etilbenzeno, exposto a benzeno (E-B); tolueno (E-T); etilbenzeno (E-E) e xileno (E-X). Crescimento determinado por densidade ótica, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.

Não foram encontrados relatos que descrevam a degradação de BTEX a partir de consórcios ou microrganismos isolados em etilbenzeno como única fonte de carbono. Chang et al. (2001) e Deeb e Alvarez-Cohen (1999), entretanto, afirmaram

que este é o composto mais tóxico e recalcitrante dos BTEX quando fornecido conjuntamente com os demais.

Figura 22. Curvas de crescimento do consórcio AAE1 – exposto a etilbenzeno, etilbenzeno + xileno, e xileno. Crescimento verificado por DO, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.

Quando exposto à mistura binária de xileno e etilbenzeno, o consórcio AAE1 apresentou uma taxa de crescimento similar àquela verificada na presença de etilbenzeno somente (Figura 22). Este consórcio também foi incapaz de metabolizar o xileno. Através destes resultados, pode-se inferir que o xileno não atuou como inibidor de crescimento, apenas mostrou-se recalcitrante.

- Consórcio AAX1

O consórcio enriquecido com xileno apresentou taxas de crescimento idênticas com os substratos xileno e etilbenzeno (Figura 23). Este fato é curioso, uma vez que microrganismos enriquecidos em xileno demonstraram possuir excelente capacidade de crescimento com etilbenzeno, no entanto, o contrário não foi verdadeiro (microrganismos enriquecidos com etilbenzeno não cresceram em xileno). O crescimento com tolueno foi menos acentuado, e com benzeno não foi observado.

Figura 23. Curvas de crescimento do consórcio previamente enriquecido em xileno, exposto a benzeno (X-B); tolueno (X-T); etilbenzeno (X-E) e xileno (X-X). Crescimento determinado por densidade ótica, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.

No estudo das interações entre substratos durante a biodegradação aeróbia de benzeno, Arvin e colaboradores (1989) verificaram que um consórcio degradador de tolueno e xileno foi também capaz de degradar benzeno.

Figura 24. Curvas de crescimento do consórcio AAX1 - exposto a xileno, xileno + benzeno, e benzeno. Crescimento verificado por DO, a 520 nm. As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.

O consórcio AAX1 teve seu crescimento inibido quando exposto à mistura binária contendo xileno e benzeno (Figura 24). Bordel et al. (2007) afirmam que durante a degradação aeróbia de hidrocarbonetos aromáticos são formados intermediários oxigenados que usualmente se acumulam nas etapas iniciais da via de degradação, podendo levar à inibição do processo. Leddy e colaboradores (1995) e Villaverde e Fernández (1997) observaram a redução no número de células

degradadoras devido à presença de intermediários mutagênicos como o benzoil álcool, e Muñoz e colaboradores (2007) reportaram um efeito inibitório provocado pelo catecol, o primeiro intermediário formado na degradação de benzeno em *Pseudomonas putida* F1. Além de efeitos inibitórios provocados pela formação de intermediários tóxicos, a ausência de crescimento na presença de benzeno pode ser justificada pela recalcitrância deste composto, devido à sua estabilidade, conferida pela elevada energia de ressonância do anel benzênico (BOLL, 2005).

4.4 Isolamento e caracterização macro e microscópica das bactérias

Os organismos presentes no 20º subcultivo dos consórcios AAB1, AAT1, AAE1 e AAX1 foram isolados pela técnica de espalhamento em placas contendo os meios sólidos TSA e R2A. Optou-se por iniciar o isolamento após um longo período de adaptação para que somente os organismos com capacidade de utilizar compostos puros de BTEX como única fonte de carbono fossem obtidos. Foram empregados dois meios diferentes no isolamento para que um maior número de morfologias pudesse ser obtido.

A técnica de isolamento empregada permitiu a obtenção de 25 cepas. 6 delas foram isoladas em R2A e 2 em TSA a partir do consórcio AAB1, e 4 em R2A e 2 em TSA, a partir do consórcio AAT1. Do consórcio AAE1 foram isoladas 3 cepas em R2A e 3 em TSA. AAX1, por sua vez, apresentou um número menor de organismos (3 em R2A e 2 em TSA).

A caracterização macroscópica consistiu na definição de algumas propriedades das colônias, em meio sólido. Entre as principais características das células bacterianas estão suas dimensões, forma, estrutura e cor. Estas características muitas vezes auxiliam na caracterização da categoria taxonômica à qual a espécie pertence.

Os resultados, expressos na tabela 7, demonstram que as cepas que apresentaram crescimento nos meios R2A e TSA e foram posteriormente transferidas para placas contendo R2A, não apresentaram muitas diferenças em suas características macroscópicas, tendo a grande maioria das colônias forma circular e elevada, borda lisa e coloração bege e opaca.

A caracterização microscópica foi realizada por coloração de Gram, para avaliar a morfologia e natureza da parede celular das bactérias isoladas. Apenas a

cepa RBD foi caracterizada como Gram positiva (Tabela 7), o que pode ser explicado pelo fato de, em geral, bactérias Gram negativas serem mais tolerantes a elevadas concentrações de compostos lipofílicos do que bactérias Gram positivas (SIKKEMA et al., 1995).

Tabela 7. Características macro e microscópicas das cepas isoladas.

Cepa	fonte de carbono	forma	tamanho^(a)	elevação	borda	característica óptica	cor	morfologia	Gram
RBA	benzeno	circular	média	elevada	lisa	translúcida	bege	bastonete	negativo
RBB	benzeno	circular	média	elevada	irregular	opaca	branca	bastonete	negativo
RBC	benzeno	circular	pequena	elevada	lisa	opaca	bege	bastonete	negativo
RBD	benzeno	irregular	grande	elevada	irregular	opaca	branca	bastonete	positivo
RBE	benzeno	circular	pequena	elevada	lisa	opaca	bege	bastonete	negativo
RBF	benzeno	circular	pequena	elevada	lisa	opaca	bege	bastonete	negativo
TBA	benzeno	circular	média	elevada	lisa	translúcida	bege	bastonete	negativo
TBB	benzeno	circular	pequena	elevada	lisa	opaca	bege	bastonete	negativo
RTA	tolueno	circular	média	elevada	lisa	opaca	branca	bastonete	negativo
RTB	tolueno	irregular	grande	elevada	lisa	opaca	bege	bastonete	negativo
RTC	tolueno	irregular	grande	elevada	irregular	opaca	bege	bastonete	negativo
RTD	tolueno	irregular	média	elevada	irregular	opaca	bege	bastonete	negativo
TTA	tolueno	circular	média	elevada	lisa	opaca	branca	bastonete	negativo

continua

Tabela 7. (continuação)

Cepa	fonte de carbono	forma	tamanho^(a)	elevação	borda	característica óptica	cor	morfologia	Gram
TTB	tolueno	circular	pequena	elevada	lisa	opaca	bege	bastonete	negativo
REA	etilbenzeno	circular	média	elevada	lisa	translúcida	bege	bastonete	negativo
REB	etilbenzeno	circular	pequena	elevada	irregular	opaca	bege	bastonete	negativo
REC	etilbenzeno	circular	pequena	elevada	irregular	opaca	bege	bastonete	negativo
TEA	etilbenzeno	circular	média	elevada	irregular	opaca	bege	bastonete	negativo
TEB	etilbenzeno	circular	média	elevada	lisa	opaca	branca	bastonete	negativo
TEC	etilbenzeno	circular	pequena	elevada	lisa	opaca	bege	bastonete	negativo
RXA	xileno	circular	média	elevada	irregular	opaca	bege	bastonete	negativo
RXB	xileno	circular	pequena	achatada	lisa	opaca	bege	bastonete	negativo
RXC	xileno	circular	pequena	elevada	lisa	opaca	rosa	bastonete	negativo
TXA	xileno	circular	pequena	elevada	lisa	opaca	branca	bastonete	negativo
TXB	xileno	circular	média	elevada	irregular	opaca	bege	bastonete	negativo

conclusão

(a) Pequena: colônias com 0,01 a 0,3 cm de diâmetro; média: 0,31 a 0,6 cm, e grande: 0,61 a 1,0 cm.

Os protocolos de isolamento e detecção de microrganismos que se baseiam em técnicas de enriquecimento e cultivo de células freqüentemente subestimam o número total de bactérias e a diversidade da comunidade microbiana. Embora muitos organismos cresçam bem em um determinado meio de cultura, outros o fazem pobremente ou simplesmente não se desenvolvem, devido a exigências nutricionais específicas. Estima-se que o número de bactérias cultiváveis seja menor que 1% (MALIK et al., 2008), o que sugere que apenas uma pequena fração das bactérias que ocorrem naturalmente no ambiente foi isolada e caracterizada.

Técnicas de análise de comunidades microbianas baseadas em cultivo são consideradas menos eficientes do que os métodos moleculares para análise da composição, da estrutura e da estabilidade de comunidades microbianas, assim como sobre a atividade e função de seus componentes, uma vez que a maioria das bactérias presentes em amostras de solo ou sedimento não pode ser isolada por estas técnicas (TORSVIK et al., 1990).

4.5 Análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Através da análise das fotografias obtidas por MEV (Figuras 25 a 28) foi possível verificar que todas as cepas isoladas apresentaram forma de bastonete, resultado contraditório ao obtido nas análises realizadas em microscópio com aumento de apenas 1000X, nas quais foram visualizadas diversas cepas com forma arredondada e, portanto, erroneamente classificadas como cocos.

Como o aumento adotado para que as imagens fossem fotografadas foi mantido para todos os organismos (30000 vezes), fica facilmente perceptível a diferença entre os tamanhos apresentados, mesmo para organismos isolados a partir de consórcios aclimatados em um mesmo substrato.

Foram fotografados também os consórcios AAB1, AAT1, AAE1 e AAX1 (Figura 29). Em todos eles havia, aparentemente, uma única morfologia presente.

Figura 25. Imagens obtidas por MEV das cepas RBA, RBB, RBC, RBD, RBE, RBF, TBA e TBB, isoladas do consórcio enriquecido em benzeno. Aumento de 30000 vezes (continua).

Figura 25. Imagens obtidas por MEV das cepas RBA, RBB, RBC, RBD, RBE, RBF, TBA e TBB, isoladas do consórcio enriquecido em benzeno. Aumento de 30000 vezes (continuação).

Figura 26. Imagens obtidas por MEV das cepas RTA, RTB, RTC, RTD, TTA e TTB, isoladas do consórcio enriquecido em tolueno. Aumento de 30000 vezes.

Figura 27. Imagens obtidas por MEV das cepas REA, REB, REC, TEA, TEB e TEC, isoladas do consórcio enriquecido em etilbenzeno. Aumento de 30000 vezes.

Figura 28. Imagens obtidas por MEV das cepas RXA, RXB, RXC, TXA e TXB, isoladas do consórcio enriquecido em xileno. Aumento de 30000 vezes.

Figura 29. Imagens obtidas por MEV dos consórcios AAB1, AAT1, AAE1 e AAX1. Aumento de 30000 vezes.

Todas as cepas apresentam a capacidade de formar biofilme, evidenciada pela presença de exopolissacarídeos (material filamentososo visível nas imagens). Exopolissacarídeos são polissacarídeos de cadeia longa, secretados principalmente por bactérias e microalgas durante seu crescimento, conferindo aos microrganismos, muitas vezes, aspecto viscoso ou em forma de muco (LAWS et al., 2001). Eles são excretados por grande parte das bactérias Gram negativas, que gastam mais de 70% de sua energia em sua produção, com 4 finalidades principais: (a) como uma barreira física de proteção; (b) como resposta ao estresse ambiental (e.g. limitação de nutrientes); (c) no reconhecimento e interação célula-célula e; (d) na formação de biofilme (WEINER et al., 1995). O biofilme, definido como uma população de

bactérias aderidas umas às outras ou a uma superfície ou interface (COSTERTON et al., 1995), permite maior facilidade de desenvolvimento de micro-consórcios, uma vez que promove o estabelecimento de relações de simbiose, bem como a utilização de substratos de difícil degradação.

4.6 Verificação de crescimento dos isolados com o composto usado para seu enriquecimento

Os organismos isolados nos meios ricos TSA e R2A foram avaliados com relação ao seu potencial de utilização dos compostos puros BTEX como única fonte de carbono. Neste sentido, foram montados microcosmos, em Erlenmeyers e frascos de penicilina (conforme descrito em 4.4.1 e 4.8, respectivamente), sendo as fontes de carbono fornecidas na forma de vapor e na forma líquida, respectivamente. Optou-se por ambos os tipos de cultivo uma vez que algumas delas poderiam apresentar dificuldades de crescimento quando expostas diretamente ao composto, na forma líquida.

Como o inóculo foi feito a partir das culturas puras em TSB, rico em carbono, foram realizados 3 subcultivos antes de confirmar a capacidade de crescimento dos isolados com os compostos-alvo. Os resultados, expressos por medições de densidade ótica (520 nm), estão representados na tabela 8.

Tabela 8. Crescimento dos isolados frente a diferentes formas de fornecimento de BTEX, no 1º, 2º e 3º subcultivos.

cepa	fonte de carbono	gasosa (Erlenmeyers)			dissolvida (frascos de penicilina)		
		subcultivos			subcultivos		
		1º	2º	3º	1º	2º	3º
RBA	benzeno	+	-	-	+	-	-
RBB	benzeno	+++	++++	++++	++	+++	+++
RBC	benzeno	+	-	-	+	-	-
RBD	benzeno	+	-	-	+	-	-
RBE	benzeno	+	-	-	+	-	-

continua

Tabela 8. (continuação)

cepa	fonte de carbono	gasosa (Erlenmeyers)			dissolvida (frascos de penicilina)		
		subcultivos			subcultivos		
		1º	2º	3º	1º	2º	3º
RBF	benzeno	++++	++++	++++	++	+++	+++
TBA	benzeno	+	-	-	+	-	-
TBB	benzeno	++++	++++	++++	+++	++	+++
RTA	tolueno	+	-	-	+	-	-
RTB	tolueno	+	-	-	+	-	-
RTC	tolueno	++++	++++	++++	++	++	+++
TTA	tolueno	++++	++++	++++	+	-	-
TTB	tolueno	++++	++++	++++	++	++	++
REA	etilbenzeno	+	-	-	+	-	-
REB	etilbenzeno	++++	++++	++++	+++	++	+++
REC	etilbenzeno	++++	++++	++++	+++	+++	+++
TEA	etilbenzeno	+	-	-	+	-	-
TEB	etilbenzeno	+	-	-	+	-	-
TEC	etilbenzeno	++++	++++	++++	++	+++	+++
RXA	Xileno	+	-	-	+	-	-
RXB	Xileno	++++	++++	++++	+++	-	-
RXC	Xileno	+	-	-	+	-	-
TXA	Xileno	+	-	-	+	-	-
TXB	Xileno	+	-	-	+	-	-

conclusão

-: Sem crescimento (DO entre 0,01 e 0,1); +: pouco crescimento (DO entre 0,1 e 0,3); ++: crescimento médio (DO entre 0,3 e 0,6); +++: bom crescimento (DO entre 0,6 e 0,8); ++++: crescimento excelente (DO maior que 0,8). n=3.

Foram confirmadas como degradadoras as cepas RBB, RBF e TBB (isoladas em benzeno), RTC, TTA e TTB (isoladas em tolueno), REB, REC e TEC (isoladas em etilbenzeno) e RXB (isolada em xileno). TTA e RXB, entretanto, apresentaram

capacidade de crescimento somente quando expostas ao substrato na fase gasosa, em Erlenmeyers.

Dado que a pressão parcial dos compostos diminui gradativamente com o seu consumo, poderia ter sido atingido um nível de oxigênio dissolvido (OD) capaz de limitar a atividade enzimática requerida para a degradação aeróbia de tolueno e xileno por TTA e RXB, respectivamente. No entanto, apesar de os frascos de penicilina terem sido mantido fechados, a ausência de crescimento destas cepas não pode ser atribuída à limitação de oxigênio, já que houve crescimento de outras cepas em um sistema idêntico. Não foram realizadas, desta forma, medidas para quantificar a concentração de oxigênio.

Outro fator limitante ao crescimento de alguns organismos reside na natureza do composto a ser degradado, uma vez que os substratos devem estar acessíveis do ponto de vista físico-químico, estrutural (as ligações a serem clivadas devem estar expostas e não estericamente bloqueadas por grupamentos grandes) e bioquímico - os compostos devem ser passíveis de atravessar a membrana celular dos microrganismos degradadores (CORSEUIL e ALVAREZ, 1996).

Chrzanowski et al. (2005) demonstraram que o potencial de biodegradação dos organismos está diretamente relacionado com as propriedades da superfície celular, uma vez que a hidrofobicidade de grande parte dos microrganismos pode ser atribuída às proteínas e lipídios da parede celular. Variações fenotípicas na estrutura superficial entre membros de uma mesma espécie e, conseqüentemente, diferenças na hidrofobicidade destes organismos, podem ocorrer por mecanismos genéticos (rearranjos genômicos randômicos), como resultado da exposição contínua dos organismos ao substrato (OBUEKWE et al., 2007). Segundo Ascon-Cabrera e Lebeault (1995), a hidrofobicidade das células pode variar de acordo com as condições do meio de cultura, com as fases de crescimento e com as etapas do ciclo celular, sendo as células cultivadas em hidrocarbonetos mais hidrofóbicas do que aquelas que crescem em substratos solúveis. Enquanto alguns microrganismos com elevada hidrofobicidade aderem aos hidrocarbonetos antes de metabolizá-los, outros produzem agentes emulsificantes extracelulares para solubilizá-los e torná-los biodisponíveis (OBUEKWE et al., 2007).

No caso dos cultivos em que o substrato foi fornecido diretamente ao meio, na forma líquida, os processos de degradação podem requerer interfaces e/ou gradientes, já que os compostos são tóxicos e parcialmente solúveis no meio aquoso. Os microrganismos promovem a conversão do substrato na área interfacial e/ou na fase aquosa (as células suspensas na fase aquosa estão em contato com baixas concentrações do substrato dissolvido, enquanto que outras estão aderidas a gotas insolúveis do substrato). Em ambos os casos, as células exibem baixa atividade metabólica devido à baixa concentração do substrato dissolvido ou à toxicidade na interface líquido-líquido (ASCON-CABRERA e LEBEAULT, 1993).

Gibson e colaboradores (1970) descreveram a inibição de crescimento bacteriano com adição de benzeno na forma líquida ao meio de cultura, enquanto que o fornecimento deste composto na fase de vapor permitiu um crescimento normal. Desta forma, devido à elevada toxicidade de alguns hidrocarbonetos aromáticos voláteis, muitos pesquisadores optam pelo fornecimento indireto destes substratos, prevenindo assim a inibição do crescimento no isolamento de novos microrganismos degradadores (SIKKEMA et al., 1995).

A ausência de crescimento de algumas cepas, isoladas de consórcios que metabolizavam eficientemente os compostos puros de BTEX, pode também ser explicada pelo fato de estes organismos não possuírem todas as características necessárias que conferem a eles habilidade de degradação destes compostos. Os plasmídios que codificam as enzimas que conferem às cepas capacidade de degradação podem ter sido perdidos durante os subcultivos. Além disso, algumas vezes os compostos são passíveis de degradação apenas por co-oxidação ou cometabolismo, o que requer a presença de um substrato adicional.

4.7 Análise do perfil de crescimento dos isolados com diferentes substratos

As cepas capazes de crescer isoladamente no substrato em que seu consórcio de origem foi enriquecido foram testadas com relação à sua capacidade de utilização de diferentes substratos como fonte de carbono. Assim como para os consórcios, o crescimento foi verificado por densidade ótica, a 520 nm.

(A)

(B)

(C)

Figura 30. Curvas de crescimento das culturas (A) RBB, (B) RBF e (C) TBB, isoladas a partir do consórcio AAB1, enriquecido em benzeno, expostas a B: benzeno, T: tolueno, E: etilbenzeno e X: xileno. Crescimento determinado por densidade ótica (520 nm). As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.

O perfil de crescimento das 3 cepas RBB, RBF e TBB, isoladas a partir do consórcio enriquecido em benzeno, foi praticamente idêntico (Figura 30). Comparando-se os perfis dos isolados com aquele obtido para o consórcio AAB1, com os diferentes substratos (Figura 17), pode-se verificar que o crescimento também foi semelhante – para os isolados, no entanto, curiosamente, a fase exponencial foi mais curta. No caso do consórcio (Figura 17), ainda, o crescimento foi bastante similar na presença de benzeno, tolueno e xileno; para os isolados, entretanto, o crescimento em etilbenzeno foi menor do que em benzeno e tolueno. Nenhum organismo, isolado ou consorciado, foi capaz de crescer utilizando xileno como única fonte de carbono.

Figura 31. Curvas de crescimento das culturas (A) RTC, (B) TTA e (C) TTB, isoladas a partir do consórcio AAT1, enriquecido em tolueno, expostas a B: benzeno, T: tolueno, E: etilbenzeno e X: xileno. Crescimento determinado por densidade ótica (520 nm). As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas (continua).

(B)

(C)

conclusão

Figura 31. Curvas de crescimento das culturas (A) RTC, (B) TTA e (C) TTB, isoladas a partir do consórcio AAT1, enriquecido em tolueno, expostas a B: benzeno, T: tolueno, E: etilbenzeno e X: xileno. Crescimento determinado por densidade ótica (520 nm). As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas (continuação).

O perfil de crescimento dos organismos RTC, TTA e TTB, isolados a partir do consórcio enriquecido em tolueno, também foi bastante semelhante (Figura 31). Na presença de benzeno, entretanto, TTB apresentou crescimento menor do que aquele verificado para RTC e TTA.

Quando comparado à curva de crescimento obtida para o consórcio AAT1 (Figura 19), uma diferença não significativa é perceptível entre os compostos benzeno e etilbenzeno (ao contrário dos isolados, o consórcio cresce melhor em etilbenzeno do que benzeno). A ordem de crescimento para os isolados foi tolueno >

benzeno > etilbenzeno > xileno, enquanto que para o consórcio foi tolueno > etilbenzeno > benzeno > xileno. Mais uma vez, assim como o consórcio, os isolados não apresentaram capacidade de crescimento na presença de xileno.

Figura 32. Curvas de crescimento das culturas (A) REB, (B) REC e (C) TEC, isoladas a partir do consórcio AAE1, enriquecido em etilbenzeno, expostas a B: benzeno, T: tolueno, E: etilbenzeno e X: xileno. Crescimento determinado por densidade ótica (520 nm). As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas (continua).

(C)

conclusão

Figura 32. Curvas de crescimento das culturas (A) REB, (B) REC e (C) TEC, isoladas a partir do consórcio AAE1, enriquecido em etilbenzeno, expostas a B: benzeno, T: tolueno, E: etilbenzeno e X: xileno. Crescimento determinado por densidade ótica (520 nm). As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas (continuação).

As cepas REB, REC e TEC, isoladas a partir do consórcio AAE1, apresentaram crescimento similar na presença de etilbenzeno e tolueno. O crescimento de REC em tolueno, no entanto, foi menor (Figura 32). Quando expostas ao benzeno, pode-se verificar uma fase lag bastante pronunciada para as 3 linhagens, sendo que REC passou a atingir a fase exponencial no 9º dia.

Através da análise do perfil de crescimento do consórcio AAE1 (Figura 21) fica visível que a comunidade bacteriana demonstrou menor capacidade de metabolização de tolueno do que as culturas puras.

O perfil de crescimento em benzeno foi semelhante para o consórcio e cepas isoladas. Para ambos os casos, nenhum crescimento foi observado em xileno.

Figura 33. Curva de crescimento da cultura RXB, isolada a partir do consórcio AAX1, enriquecido em xileno, exposta a B: benzeno, T: tolueno, E: etilbenzeno e X: xileno. Crescimento determinado por densidade ótica (520 nm). As barras de erro demonstram os desvios padrões das triplicatas.

Apenas a cepa RXB apresentou capacidade de crescer isoladamente na presença de xileno (Figura 33). Quando aos organismos, consorciados ou isolados, foi fornecido xileno ou etilbenzeno, perfis de crescimento praticamente idênticos foram verificados. Foi na presença de tolueno que a diferença mais significativa foi obtida, uma vez que o consórcio se mostrou mais lento na degradação deste composto (Figura 23).

Todas as cepas isoladas cresceram em um tempo menor do que o tempo necessário para que os seus respectivos consórcios atingissem a mesma densidade ótica. Atribui-se essa diminuição do tempo de crescimento à adaptação das cepas, como consequência dos repiques sucessivos aos quais as mesmas foram submetidas.

4.8 Análise de restrição do DNAr 16S amplificado (ARDRA)

A técnica de ARDRA apresenta a vantagem de ser um método rápido de análise dos padrões filogenéticos de cepas de microrganismos, no entanto, os resultados obtidos com este método devem ser interpretados com cautela, uma vez que organismos com similaridade elevada do gene-alvo podem produzir perfis de restrição semelhantes (COUTINHO et al., 1999). Dado que não era conhecida a

heterogeneidade das linhagens, além das enzimas *HhaI* e *HaeIII*, que geram padrões mais simples de ARDRA (em torno de 3 a 5 bandas por bactéria, MASSOL-DEYÁ et al., 1995), foi utilizado um número maior de endonucleases (*HhaI*, *RsaI* e *Bsh1236I*) para verificar se maior poder discriminatório poderia ser obtido.

Todas as 25 cepas isoladas foram utilizadas para a realização da análise de restrição do gene DNAr 16S amplificado (ARDRA), com o objetivo de agrupá-las por padrões de similaridade filogenética. Os padrões de restrição obtidos pelo emprego das enzimas *HaeIII* e *HhaI* (Figura 34), assim como para as enzimas *HhaI*, *RsaI* e *Bsh1236I* (Figura 35), permitiram condensar estas cepas em 7 diferentes grupos (Tabela 9).

Figura 34. Eletroforese em gel de agarose 4% do fragmento DNAr 16S de cada linhagem digerido com as enzimas *HaeIII* e *HhaI*. Marcador (MRC): *Pbr/HaeIII* (8 a 587 pb).

Figura 35. Eletroforese em gel de agarose 4% do fragmento DNAr 16S de cada linhagem digerido com as enzimas *HhaI*, *RsaI* e *Bsh1236I*. Marcador (MRC): *Pbr/HaeIII* (8 a 587 pb).

Tabela 9. Grupos gerados a partir dos perfis de ARDRA.

Grupo ARDRA	Organismos
G1	RBA, RBB*, TBA, RTA, TTA*, REA, TEA, TEB, RXA, TXA, TXB
G2	RBC, RBF*, TBB*, TTB*, REB*, REC*, TEC*
G3	RBD
G4	RBE
G5	RTB, RTC*, RTD
G6	RXB*
G7	RXC

(*) Cepas que apresentaram crescimento na presença dos substratos em que foram previamente adaptadas.

Pelos perfis apresentados foi possível verificar que o emprego de um número maior de endonucleases resultou em um número maior de bandas polimórficas, sem apresentar, entretanto, maior poder discriminatório.

As tabelas 10 a 13, apresentam uma síntese das semelhanças e diferenças macro e microscópicas e capacidade de crescimento em BTEX das culturas isoladas, em função dos diferentes grupos de ARDRA.

Tabela 10. Diferentes perfis de restrição observados nas cepas isoladas a partir do consórcio AAB1.

Grupo ARDRA	Cepa	Características
G1	RBA, RBB, TBA	RBA e TBA possuem as mesmas características macro e microscópicas. RBB é macroscopicamente diferente. Apenas RBB cresceu em benzeno.
G2	RBC, RBF, TBB	Características macro e microscópicas idênticas. RBF e TBB cresceram em benzeno, RBC não.
G3	RBD	Perfil único de restrição. Não cresceu em benzeno.
G4	RBE	Perfil único de restrição. Não cresceu em benzeno.

Pela análise dos perfis obtidos para 10 cepas isoladas em benzeno (Tabela 10), pode-se verificar que as mesmas podem ser condensadas em 4 grupos.

Os grupos G1 e G2 possuem 3 cepas cada um, com organismos com algumas características macroscópicas distintas. No que tange à caracterização microscópica, todas as cepas foram identificadas como bacilos Gram negativos. Das 10 cepas, apenas 3 (RBB, RBF e TBB) foram capazes de crescer isoladamente quando expostas ao benzeno.

Os grupos G3 e G4 possuem apenas uma cepa, com perfil de restrição único, indicando que esta cepa não se assemelha a nenhuma outra isolada.

Tabela 11. Diferentes perfis de restrição observados nas cepas isoladas a partir do consórcio AAT1.

Grupo ARDRA	Cepa	Características
G1	RTA, TTA	Características macro e microscópicas idênticas. Apenas TTA cresceu em tolueno.
G6	TTB	Perfil único de restrição. Cresceu em tolueno.
G7	RTB, RTC, RTD	Características macroscópicas distintas. Apenas RTC cresceu em tolueno.

A tabela 11 demonstra que apenas TTB apresenta perfil de restrição único (esta cepa, entretanto, pertence a um grupo com organismos isolados a partir de

consórcios enriquecidos em diferentes substratos) . De um total de 6 cepas isoladas, 3 delas (TTA, RTC e TTB) cresceram na presença de tolueno. Os perfis de restrição distintos, associados às diferenças macroscópicas entre elas, podem ser um indicativo de que, pelo menos, 3 diferentes cepas estão presentes no consórcio enriquecido em tolueno. Todas elas foram identificadas como bastonetes Gram negativos.

Tabela 12. Diferentes perfis de restrição observados nas cepas isoladas a partir do consórcio AAE1.

Grupo ARDRA	Cepa	Características
G1	REA, TEA, TEB	Características macroscópicas distintas. Nenhuma delas cresceu em etilbenzeno.
G8	REB, REC, TEC	REB e REC possuem as mesmas características macro e microscópicas. TEC é macroscopicamente diferente. Todas cresceram em etilbenzeno.

Com relação às cepas isoladas em etilbenzeno, apenas 2 perfis de restrição diferentes foram obtidos (Tabela 12).

Como em ambos os grupos as únicas diferenças entre estas cepas residem nas propriedades macroscópicas, possivelmente elas sejam o mesmo organismo, uma vez que a diferenciação da diversidade microbiana através de caracterização macroscópica pode levar a erros, por ser bastante variável e subjetiva (estas características são, ainda, dependentes do tipo e quantidade de meio complexo em que o microrganismo é isolado, podendo assumir coloração, tamanho e forma diversos).

Tabela 13. Diferentes perfis de restrição observados nas cepas isoladas a partir do consórcio AAX1.

Grupo ARDRA	Cepa	Características
G1	RXA, TXA, TXB	RXA e TXB possuem as mesmas características macro e microscópicas. TXA é macroscopicamente diferente. Não cresceram em xileno.
G6	RXB	Perfil único de restrição. Cresceu em xileno.
G7	RXC	Perfil único de restrição. Não cresceu em xileno.

Pela análise da tabela 13, é possível verificar que, das 5 cepas isoladas em xileno, 2 delas (RXB e RXC) possuem perfis de restrição únicos. As cepas RXA, TXA e TXB, apesar de pertencerem ao mesmo grupo, possuem características macroscópicas distintas (nenhuma delas, no entanto, apresentou capacidade de crescimento quando expostas ao xileno).

4.9 Seqüenciamento do DNAr 16S

Para o seqüenciamento do DNAr 16S e identificação dos organismos, foram escolhidos aqueles que se mostraram degradadores, pelo fato de apresentarem capacidade de crescimento na presença do substrato em que foram enriquecidos, e um representante de cada grupo gerado a partir do perfil de ARDRA, num total de 15 cepas.

Após edição e alinhamento das seqüências obtidas com seqüências disponíveis no banco de dados *GenBank* (Anexo A), foi possível identificar, dentre os organismos analisados, as espécies *Stenotrophomonas maltophilia* (RBE), *Serratia marcescens* (RBB, TTA, TEA e RXA), *Burkholderia cepacia* (RBF, TBB, TTB, REB, REC e TEC), *Enterobacter* sp. (RTC), *Bacillus cereus* (RBD), *Bacillus tropicalis* (RXB) e uma bactéria não-cultivável (RXC). As árvores filogenéticas construídas a partir das seqüências obtidas estão representadas na figura 36.

Figura 36. Árvores filogenéticas geradas pelo método de *Neighbor-joining* com a utilização do programa *Mega4*, baseada nas seqüências de DNAr 16S das cepas selecionadas. Análise de *bootstrap* de 1000 réplicas (continua).

conclusão

Figura 36. Árvores filogenéticas geradas pelo método de *Neighbor-joining* com a utilização do programa *Mega4*, baseada nas seqüências de DNAr 16S das cepas selecionadas. Análise de *bootstrap* de 1000 réplicas (continuação).

As cepas RBB, TTA, TEA e RXA, identificadas como *Serratia marcescens*, apresentaram mesmo perfil de restrição e foram classificadas, juntamente com RBA,

TBA, RTA, REA, TEB, TXA e TXB, como pertencentes ao grupo G1 (Tabela 10). A matriz de similaridade das cepas identificadas e da cepa AY551938.1, usada para alinhamento e edição das demais seqüências, está representada na tabela 14.

Tabela 14. Matriz de similaridade das cepas identificadas como *Serratia marcescens*.

	RBB	TTA	TEA	RXA	AY551938.1
RBB	ID	0,988	0,980	0,986	0,985
TTA	0,988	ID	0,992	0,994	0,997
TEA	0,980	0,992	ID	0,989	0,990
RXA	0,986	0,994	0,989	ID	0,993
AY551938.1	0,985	0,997	0,990	0,993	ID

Apesar de não haver 100% de similaridade entre nenhum dos organismos (similaridade igual a 1,000 indica que as linhagens têm seqüências completamente idênticas), foram encontrados números de similaridade bastante elevados.

As cepas RBF, TBB, TTB, REB, REC e TEC, identificadas como *Burkholderia cepacia*, tiveram mesmo perfil de restrição que RBC, única cepa pertencente a este grupo (G2) que não foi identificada, pelo fato de não apresentar capacidade de crescimento quando exposta ao benzeno. A matriz de similaridade das seqüências do DNAr das cepas EU21412.1 e as identificadas neste trabalho está representada na tabela 16.

Tabela 15. Matriz de similaridade das cepas identificadas como *Burkholderia cepacia*.

	RBF	TBB	TTB	REB	REC	TEC	EU214612.1
RBF	ID	0,998	0,997	0,997	0,996	0,998	0,997
TBB	0,998	ID	0,997	0,999	0,998	1,000	0,999
TTB	0,997	0,997	ID	0,996	0,996	0,997	0,996
REB	0,997	0,999	0,996	ID	0,997	0,999	0,998
REC	0,996	0,998	0,996	0,997	ID	0,998	0,997
TEC	0,998	1,000	0,997	0,999	0,998	ID	0,999
EU214612.1	0,997	0,999	0,996	0,998	0,997	0,997	ID

Pela análise da tabela 15 pode-se verificar que o grau de similaridade entre as cepas de cada um dos grupos foi bastante elevado, sendo idêntico no caso das cepas TBB e TEC, isoladas em benzeno e etilbenzeno, respectivamente.

4.10 Identificação do perfil de ácidos graxos de membrana

O único sistema comercial disponível para identificação de microrganismos através da análise de ácidos graxos é o *Microbial Identification System* (MIDI, Microbial Identification Inc.), porém, não é um método muito sensível, fazendo com que seja necessário o emprego de uma grande quantidade de biomassa para a realização das análises (BUYER, 2002). Este método caracteriza os tipos e proporções de ácidos graxos presentes na membrana celular.

Os ácidos graxos, extraídos de hidrolisados celulares das culturas, desenvolvidas em condições padronizadas, foram derivatizados para a obtenção dos seus metil-ésteres correspondentes e posterior análise por cromatografia gasosa. O cromatograma gerado foi comparado com um banco de dados que contém perfis de ácidos graxos de milhares de cepas-referência, cultivadas nas mesmas condições (testes estatísticos identificam os organismos do banco de dados com o perfil de ácidos graxos que mais se assemelha ao organismo em análise).

Os ácidos graxos estão localizados principalmente na membrana citoplasmática, como componentes de fosfolipídios e lipopolissacarídeos da membrana externa de bactérias Gram negativas, assim como nos ácidos lipoteicóicos de bactérias Gram positivas. Pelo fato de a composição dos ácidos graxos de procariontes ser tão variável, sendo estas diferenças relacionadas ao comprimento da cadeia, à presença ou ausência de grupos insaturados, anéis, cadeias ramificadas ou grupamentos hidróxi, o perfil de ácidos graxos de determinada bactéria pode ser utilizado para identificação taxonômica (BUSSE et al., 1996). Os microrganismos possuem, no entanto, a habilidade de variarem a composição lipídica de suas membranas em resposta a variações do ambiente, como estresse químico e flutuações de temperatura (FROSTEGARD et al., 1993).

Pela análise dos cromatogramas obtidos (Anexo 1), pode-se verificar que a detecção dos picos foi de 100% para as cepas RBD, RBF, TTB, REB e RXB (Tabela 16). TEC foi o organismo que apresentou o menor percentual de detecção dos picos (96,67%). A análise da amostra RXC não foi boa o suficiente para que o resultado pudesse ser comparado à biblioteca.

Tabela 16. Parâmetros de identificação pela análise do perfil de ácidos graxos (continua).

Isolados	Índice de similaridade	Cepa referência do MIS (Microbial Identification System)	Diferença entre os índices de similaridade	Leitura dos picos
RBB	0,774	<i>Serratia marcescens</i> GC subgrupo B	-	98,87%
	0,770	<i>Enterobacter pyrinus</i>	0,004	
	0,752	<i>Cedecea davisae</i>	0,018	
	0,679	<i>Proteus vulgaris</i>	0,073	
	0,677	<i>Kluyvera cryocrescens</i> GC subgrupo B	0,002	
RBD	0,568	<i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo B	-	100%
	0,428	<i>Bacillus cereus</i> GC subgrupo A	0,14	
RBE	0,809	<i>Stenotrophomonas maltophilii</i>	-	99,82%
RBF	0,819	<i>Pandoraea pulmonicola</i>	-	100%
	0,801	<i>Pandoraea pnomenusa</i>	0,018	
	0,691	<i>Burkholderia cepacia</i> GC subgrupo B	0,110	
	0,688	<i>Burkholderia cepacia</i> GC subgrupo A	0,003	
	0,598	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	0,090	
TBB	0,834	<i>Pandoraea pnomenusa</i>	-	99,06%
	0,809	<i>Pandoraea pulmonicola</i>	0,025	
	0,683	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	0,126	
	0,681	<i>Burkholderia cepacia</i> GC subgrupo B	0,002	
	0,663	<i>Burkholderia cepacia</i> GC subgrupo A	0,018	
RTC	0,695	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	-	97,62%
	0,649	<i>Enterobacter hormaechei</i>	0,046	
	0,589	<i>Salmonella choleraesuis</i> GC subgrupo B	0,060	
TTA	0,838	<i>Escherichia coli</i> GC subgrupo D	-	98,54%
	0,808	<i>Serratia rubidaea</i>	0,03	
	0,733	<i>Cedecea davisae</i>	0,075	
	0,699	<i>Salmonella typhi</i> GC subgrupo A	0,034	
	0,676	<i>Serratia marcescens</i> GC subgrupo B	0,023	
TTB	0,880	<i>Pandoraea pulmonicola</i>	-	100%
	0,831	<i>Pandoraea pnomenusa</i>	0,049	
	0,704	<i>Burkholderia cepacia</i> GC subgrupo A	0,127	
	0,695	<i>Burkholderia cepacia</i> GC subgrupo B	0,009	
	0,597	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	0,098	

continua

Tabela 16. (continuação)

Isolados	Índice de similaridade	Cepa referência do MIS (Microbial Identification System)	Diferença entre os índices de similaridade	Leitura dos picos
REB	0,701	<i>Pandoreae apista</i>	0,057	100%
	0,590	<i>Pandoreae pulmonicola</i>	0,111	
	0,578	<i>Burkholderia cepacia</i> GC subgrupo B	0,012	
	0,474	<i>Burkholderia gladioli</i> GC subgrupo A	0,104	
REC	0,766	<i>Cedecea davisae</i>	-	98,09%
	0,720	<i>Escherichia coli</i> GC subgrupo D	0,046	
	0,694	<i>Serratia rubidaea</i>	0,026	
	0,647	<i>Enterobacter aerogenes</i> GC subgrupo B	0,047	
	0,640	<i>Salmonella bongori</i>	0,007	
TEA	0,850	<i>Escherichia coli</i> GC subgrupo D	-	98,00%
	0,839	<i>Serratia rubidaea</i>	0,011	
	0,806	<i>Salmonella typhi</i> GC subgrupo B	0,033	
	0,732	<i>Cedecea davisae</i>	0,074	
	0,696	<i>Serratia marcescens</i> GC subgrupo B	0,036	
TEC	0,685	<i>Ewingella americana</i>	-	96,67%
	0,622	<i>Morganella morganii</i>	0,063	
	0,549	<i>Shigella sonnei</i> GC subgrupo B	0,073	
	0,487	<i>Cedecea davisae</i>	0,062	
	0,428	<i>Salmonella typhi</i> GC subgrupo A	0,059	
RXA	0,832	<i>Escherichia coli</i> GC subgrupo D	-	98,14%
	0,773	<i>Serratia rubidaea</i>	0,059	
	0,739	<i>Salmonella typhi</i> GC subgrupo A	0,034	
	0,727	<i>Cedecea davisae</i>	0,012	
	0,692	<i>Enterobacter aerogenes</i> GC subgrupo B	0,035	
	0,669	<i>Serratia marcescens</i> GC subgrupo B	0,023	
RXB	0,796	<i>Burkholderia cepacia</i> GC subgrupo B	-	100%
	0,485	<i>Burkholderia gladioli</i> GC subgrupo A	0,311	

conclusão

A amostra RBE foi a única que apresentou similaridade com apenas uma cepa referência (*Stenotrophomonas maltophilia*). Esta variabilidade na expressão de ácidos graxos das demais cepas pode estar relacionada com a variação na temperatura de cultivo, pH e no estágio de crescimento, alterando assim o perfil de

ácidos graxos da membrana celular (GILAROVA et al., 1994). Além disso, o número de variantes de uma mesma espécie no banco de dados do MIDI é limitado.

Quando a similaridade é maior que 0,700, com uma diferença entre os valores dos índices de similaridade da 1ª e 2ª cepas-referência de 0,200, a identificação é considerada excelente. Se o índice de similaridade está entre 0,500 e 0,700, com a diferença entre a 1ª e a 2ª cepas-referência de 0,100, a identificação é considerada boa. Valores de similaridade entre 0,300 e 0,500 podem ser admitidos, mas esse pode ser um indicativo de uma cepa atípica. Já valores abaixo de 0,300 indicam que o padrão de ácidos graxos da cepa não corresponde a nenhum dos perfis armazenados na base de dados (BROWN e LEFF, 1996). Neste sentido, foi obtida uma identificação considerada excelente apenas para as cepas RBE e RXB. RTC e TEC apresentaram um bom índice de similaridade, porém diferenças entre as cepas-referência muito baixas. Boa identificação também foi verificada para as cepas RBB, RBF, TBB, TTA, TTB, REB, REC, TEA e RXA, que apresentaram excelente índice de similaridade, no entanto, baixa diferença entre as cepas-referência. Esta diferença foi alta apenas para RBD, que apresentou, no entanto, um índice de similaridade não muito alto (0,568).

4.11 Comparação dos resultados obtidos com os diferentes métodos de identificação

Os resultados estão demonstrados na tabela 17, que compara as identidades das cepas analisadas pelas técnicas de ácidos graxos e seqüenciamento do DNAr 16S.

Segundo Petti (2007), a principal limitação da técnica de seqüenciamento do DNAr 16S reside na sua inabilidade de discriminar alguns organismos pertencentes à mesma classe taxonômica. O autor usa como exemplo as bactérias *Bacillus cereus* e *Bacillus anthracis* que, por possuírem seqüências do DNAr 16S idênticas, não podem ser separadas de forma confiável a nível molecular pelo seu DNA genômico. Petti (2007) afirma, ainda, que genes-alvo alternativos ao RNAr 16S podem prover melhor separação entre espécies muito próximas.

Erros em análises filogenéticas podem ser introduzidos durante a amplificação na cinética da reação de PCR. Como consequência, muitas bibliotecas de DNAr 16S não são totalmente representativas de comunidades microbianas (BAKER et al., 2003).

Haack et al. (1994) determinaram a acurácia e reprodutibilidade das análises de ácidos graxos utilizando a mesma ferramenta de identificação microbiana (MIDI). Os autores sugerem que interpretações taxonômicas baseadas no perfil de ácidos graxos devem ser abordadas com cuidado e suportadas com dados obtidos através de métodos alternativos.

Deve-se observar, ainda, que ácidos graxos individuais não podem ser usados para representar espécies específicas, uma vez que um único organismo pode possuir inúmeros ácidos graxos e o mesmo ácido graxo pode ocorrer em mais de uma espécie (KIRK et al., 2004).

Das 15 cepas analisadas 13 apresentaram resultados coerentes em ambas as técnicas de identificação empregadas (Tabela 17). REC e TEC, no entanto, identificadas como *Ewingella americana* e *Cedecea davisae*, respectivamente, pelas análises de ácidos graxos, foram identificadas, segundo o seqüenciamento do DNAr 16S, como *Burkholderia cepacia*. É relativamente comum a identificação errônea dos organismos pela técnica de ácidos graxos (muitas vezes, provocada pela presença de contaminantes), sendo necessárias reanálises das cepas em questão. Como o tempo para que estas reanálises pudessem ser feitas foi insuficiente, foram admitidos como verdadeiros os resultados obtidos através do seqüenciamento do DNAr 16S dos produtos de amplificação das cepas.

Tabela 17. Comparação dos resultados obtidos nas análises DNAr 16S e ácidos graxos.

cepa	análise de ácidos graxos		seqüenciamento do DNAr 16S	
	organismo	sim.	organismo	sim.
RBB	<i>Serratia marcescens</i>	0,774	<i>Serratia marcescens</i>	98%
RBD	<i>Bacillus cereus</i>	0,568	<i>Bacillus cereus</i>	99%
RBE	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0,809	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99%
RBF	<i>Pandoraea pulmonicola</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	0,819 0,691	<i>Burkholderia cepacia</i>	99%
TBB	<i>Pandoraea pnomenusa</i>	0,834	<i>Burkholderia cepacia</i>	99%
RTC	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	0,695	<i>Enterobacter</i> sp.	98%
TTA	<i>Escherichia coli</i> <i>Serratia marcescens</i>	0,838 0,676	<i>Serratia marcescens</i>	99%
TTB	<i>Pandoraea pulmonicola</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	0,880 0,704	<i>Burkholderia cepacia</i>	99%
REB	<i>Burkholderia cepacia</i>	0,758	<i>Burkholderia cepacia</i>	99%
REC	<i>Cedecea davisae</i>	0,766	<i>Burkholderia cepacia</i>	99%
TEA	<i>Escherichia coli</i> <i>Serratia marcescens</i>	0,850 0,696	<i>Serratia marcescens</i>	99%
TEC	<i>Ewingella americana</i>	0,685	<i>Burkholderia cepacia</i>	99%
RXA	<i>Escherichia coli</i> <i>Serratia marcescens</i>	0,832 0,669	<i>Serratia marcescens</i>	99%
RXB	<i>Burkholderia</i> sp.	0,796	<i>Burkholderia tropicalis</i>	99%
RXC	Não identificado	-	Não cultivável	99%

4.12 Microrganismos identificados

A seguir há uma descrição detalhada sobre as características e relatos do potencial de degradação de cada um dos organismos identificados no presente trabalho.

4.12.1 *Stenotrophomonas maltophilia*

Stenotrophomonas maltophilia é uma bactéria Gram negativa, encontrada no ambiente e que vem sendo amplamente estudada em função de sua patogenicidade - é um patógeno oportunista associado a infecções hospitalares (ORTÍN et al., 2007; FOUHY et al., 2007).

Apesar de a cepa RBE, identificada como *S. maltophilia*, não se mostrar capaz de crescer isoladamente em benzeno, esta bactéria já foi descrita como degradadora de benzeno por vários autores: Vallejo e colaboradores (2005) isolaram-na de solo contaminado; Mariano e colaboradores (2007) e Perriello (2000) utilizaram-na no processo de bioaugmentação para tratamento de solos contaminados; e Lee e colaboradores (2002) confirmaram que, além do benzeno, esta bactéria degrada outros hidrocarbonetos monoaromáticos, como tolueno e etilbenzeno. Boonchan et al. (1998) verificaram que esta bactéria degrada eficientemente os hidrocarbonetos poliaromáticos fenantreno, fluoreno, pireno, criseno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(a)antraceno.

Kumar et al. (2007) e Barragán-Huerta et al. (2007) relataram recentemente a eficácia da *S. maltophilia* como degradadora de pesticidas, e Siddique et al. (2007), como redutora de selênio (Se^{6+}).

4.12.2 *Enterobacter* sp.

Bactérias do gênero *Enterobacter* são bastonetes Gram negativos, classificados como patógenos associados a infecções hospitalares. Muitos destes organismos são resistentes a agentes antimicrobianos mais antigos, e têm a

habilidade de desenvolver facilmente resistência a novos agentes (Sanders e Sanders, 1997).

A bactéria *Enterobacter cancerogenus*, raramente associada a infecções em humanos, é geralmente encontrada no ambiente e em vegetais, sendo considerada fitopatogênica. Esta espécie, também conhecida por *Enterobacter taylorae*, foi recentemente classificada como taxonomicamente idêntica a *Erwinia cancerogena*, identificada por Urosevic em 1966 (GARAZZINO et al., 2005).

Foi identificada como *Enterobacter* sp. a cepa RTC, que cresce isoladamente na presença de tolueno como única fonte de substrato. Bactérias pertencentes a este gênero foram descritas como degradadoras de hidrocarbonetos aromáticos (ADOKI e ORUGBANI, 2007; OJO, 2006; TOLEDO et al., 2006), piridina (ADAV et al., 2007), pesticidas (SINGH et al., 2006), inseticida (KARPOUZAS et al., 2000) e di- e triclorobenzeno (ADEBUSOYE et al., 2007). Siddique et al. (2007) caracterizam a bactéria *Enterobacter hormaechei* como redutora de selênio (Se^{6+}).

4.12.3 *Pandoraea*

As cepas RBF e TTB (*Pandoraea pulmonicola*) e TBB (*Pandoraea pnomenusa*) foram identificadas, segundo o MIDI, como pertencentes ao gênero *Pandoraea*. Este gênero, composto por bactérias aeróbias, Gram negativas e que não são formadoras de esporos (STRYJEWSKI et al., 2003), freqüentemente está envolvido em infecções em pacientes com fibrose cística. No ambiente, *Pandoraea* sp. foi descrita como degradadora de clorobenzeno (BAPTISTA et al., 2008) e hidrocarbonetos aromáticos (OZAKI et al., 2006).

Em função da similaridade fenotípica e de características bioquímicas entre ambas, estas bactérias são algumas vezes erroneamente identificadas como *Burkholderia* (COENYE et al., 2001; HENRY et al., 2001). Como RBF, TTB e TBB apresentaram 99% de similaridade com a bactéria *Burkholderia cepacia*, segundo resultados obtidos através do seqüenciamento do DNAr 16S destas cepas, admitiu-se que as mesmas pertenciam a esta espécie.

4.12.4 *Burkholderia cepacia*

O complexo *Burkholderia cepacia* é um grupo de bactérias altamente heterogêneo que, assim como a *Pandoraea*, tem se mostrado um patógeno oportunista a humanos, causando infecções severas em pacientes imunossuprimidos e com fibrose cística (FERA et al., 2007).

As bactérias pertencentes a este gênero possuem um genoma complexo e plástico, que favorece sua adaptação a diferentes ambientes. Por esta razão, são encontradas nos mais variados habitats, como solo, plantas, animais e água (RAMETTE et al., 2005).

Foram identificadas como *B. cepacia* as cepas TBB, TTB, REB, REC e TEC. Pelo fato de todas elas serem capazes de crescer isoladamente, utilizando como única fonte de carbono o substrato em que foram enriquecidas, pode-se inferir que as mesmas são potenciais degradadoras de benzeno, tolueno e etilbenzeno.

Estas bactérias foram descritas por Massol-Deyá et al. (1997) como capazes de recuperar água subterrânea contaminada por BTX e, por Leahy et al. (1996), como degradadora de tricloroetileno. Machín-Ramírez e colaboradores (2008) e Abu e Dike (2008) caracterizaram bactérias pertencentes a este gênero como degradadoras de hidrocarbonetos de petróleo.

4.12.5 *Serratia marcescens*

Espécie Gram negativa, facultativamente anaeróbia e em forma de bastonete, a bactéria *Serratia marcescens* é encontrada no solo, água, alimentos e amostras clínicas. É proeminente patógeno oportunista a pacientes hospitalizados. Sua habilidade de formar biofilmes e vasta diversidade metabólica conferem a este organismo elevada resistência a antimicrobianos e agentes de desinfecção (KALIVODA et al., 2008).

Foram identificadas como *S. marcescens* as cepas RBB, TTA, TEA e RXA, isoladas a partir dos consórcios enriquecidos em benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno, respectivamente, no entanto, somente RBB e TTA apresentaram capacidade de crescer isoladamente no composto em que foram aclimatadas.

Degradadoras de amplo espectro, bactérias pertencentes ao gênero *Serratia* foram identificadas como capazes de utilizar hidrocarbonetos de petróleo por Machín-Ramírez et al. (2008) e Abu e Dike (2008). A bactéria *Serratia marcescens*, especificamente, foi descrita, dentre outros compostos, como degradadora de gasolina, querosene, óleo diesel e óleo lubrificante (WONGSA et al., 2004), dibenzofurano (JAISWAL e THAKUR, 2007), pentaclorofenol (SINGH et al., 2008), dos herbicidas glufosinato (HSIAO et al., 2007) e 2,4-D (SILVA et al., 2007), e do pesticida diclorodifeniltricloroetano (DDT) (BIDLAN e MANONMANI, 2002).

4.12.6 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é uma bactéria Gram positiva, aeróbia e em forma de bastonete; é formadora de esporos e pode ser encontrada em diversos ambientes (SLABBINCK et al., 2008), incluindo água, solo, e muitos tipos de alimentos crus e processados. Esta bactéria, associada a infecções clínicas, produz uma série de enterotoxinas e fatores de virulência que contribuem para seu potencial patogênico (AL-KHATIB et al., 2007).

A cepa RBD, identificada como *Bacillus cereus*, não foi capaz de crescer isoladamente na presença do composto em que foi previamente adaptada (benzeno). Resultado distinto foi observado por Gigena (2005), que isolou, a partir de amostras provenientes da mesma área contaminada, cepas pertencentes à mesma espécie, e verificou que as mesmas apresentaram crescimento na presença de BTEX. Segundo Cunha et al. (2006), sete cepas pertencentes a este gênero (porém não à mesma espécie) demonstraram capacidade de degradar óleo cru, no entanto, biodegradação não ocorreu no caso do *Bacillus cereus*, especificamente. Consórcios contendo *Bacillus cereus* mostraram-se eficientes na degradação de antraceno, pireno e fenantreno (JACQUES et al., 2008) e óleo diesel (BENTO et al., 2005). Esta espécie também foi descrita como degradadora de vapores de tolueno (LI et al., 2008), 2,4-diclorofenol (MATAFONOVA et al., 2007) e azobenzeno (WACKEROW-KOUZOVA, 2005), dentre diversos outros compostos.

5 CONCLUSÕES

Através do estudo dos perfis de crescimento de consórcios de bactérias obtidas de uma área industrial com histórico de contaminação por hidrocarbonetos monoaromáticos, enriquecidos em BTEX, isoladamente, frente a diferentes substratos, verificou-se que consórcios previamente adaptados em benzeno, tolueno e etilbenzeno não possuem capacidade de crescimento quando expostos ao xileno. O consórcio obtido pela aclimação em xileno, por sua vez, não apresentou crescimento em benzeno.

Das comunidades bacterianas citadas, foram isoladas 25 cepas. O número de cepas isolado em meio de cultura sólido rico para cada tipo de substrato monoaromático foi 8 para benzeno, 6 para tolueno, 6 para etilbenzeno e 5 para xileno. 10 destas cepas apresentaram capacidade de crescimento quando expostas isoladamente aos compostos monoaromáticos em que foram previamente adaptadas (3 em benzeno, 3 em tolueno, 3 em etilbenzeno e apenas 1 em xileno), indicando que parte dos integrantes dos consórcios não possui capacidade de degradação dos compostos-alvo. Todas as cepas foram caracterizadas macro e microscopicamente, e agrupadas em 7 grupos de similaridade filogenética, de acordo com seu perfil de restrição (ARDRA). 15 cepas foram selecionadas para identificação por caracterização de ácidos graxos de membrana e identificação por seqüenciamento do fragmento DNAr 16S, sendo identificadas como *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus cereus*, *Burkholderia cepacia* e *Enterobacter* sp.

Quando a amostra ambiental, contendo os microrganismos de estudo, foi submetida a diferentes condições de armazenamento, foi verificada diminuição progressiva nos tempos de crescimento para todos os testes realizados, à medida que novos subcultivos eram feitos. Essa aceleração no crescimento microbiano e aumento do potencial de oxidação dos hidrocarbonetos é consequência da adaptação da microbiota aos substratos. Os resultados obtidos demonstram, também, que a temperatura foi um agente limitante de crescimento microbiano significativo, capaz de promover a inibição de um consórcio mantido quiescente, sob refrigeração, por um período de 3 semanas, apenas quando exposto ao benzeno como única fonte de carbono. Essa influência negativa sobre o crescimento

possivelmente foi provocada pela inibição da atividade de enzimas responsáveis pela metabolização deste composto.

A montagem de microcosmos contendo misturas binárias dos compostos nos quais não ocorreu crescimento e aqueles nos quais os consórcios foram previamente adaptados, com o objetivo de elucidar o tipo de interações que ocorrem entre estes substratos quando fornecidos conjuntamente, indicou que nenhum dos compostos atuava como inibidor de crescimento (mostrando-se, apenas, recalcitrantes).

Apesar da semelhança na estrutura química dos compostos BTEX, os resultados obtidos e comparações com os diversos trabalhos já descritos na literatura sugerem que a degradação destes poluentes com consórcios deve ser analisada com cautela, dado que os perfis obtidos diferem significativamente de um sistema para outro, em função das diferenças entre as espécies de microrganismos presentes e complexas interações enzimáticas possíveis em um único organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU, G. O.; DIKE, P. O. A study of natural attenuation processes involved in a microcosm model of a crude oil-impacted wetland sediment in the Niger Delta. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4761-4767, 2008.
- ADAV, S. S.; LEE, D.-J.; REN, N. Q. Biodegradation of pyridine using aerobic granules in the presence of phenol. **Water Research**, v. 41, p. 2903-2910, 2007.
- ADEBUSOYE, S. A.; ILORI, M. O.; AMUND, O. O.; TENIOLA, O. D.; OLATOPE, S. O. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1149-1159, 2007.
- ADEBUSOYE, S. A.; PICARDAL, F. W.; ILORI, M. O.; AMUND, O. O.; FUQUA, C.; GRINDLE, N. Aerobic degradation of di- and trichlorobenzenes by two bacteria isolated from polluted tropical soils. **Chemosphere**, v. 66, p. 1939-1946, 2007.
- ADOKI, A.; ORUGBANI T. Removal of crude petroleum hydrocarbons by heterotrophic bacteria in soils amended with nitrogenous fertilizer plant effluents. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 13, p. 1529-1535, 2007.
- ALAGAPPAN, G.; COWAN, R. M. Effect of temperature and dissolved oxygen on the growth kinetics of *Pseudomonas putida* F1 growing on benzene and toluene. **Chemosphere**, v. 54, p. 1255-1265, 2004.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1999. 424 p.
- AL-HADHRAMI, M. N.; LAPPIN-SCOTT, H. M.; FISHER, P. J. Bacterial survival and *n*-alkane degradation within Omani crude oil and a mousse. **Marine Pollution Bulletin**, v. 30, n. 6, p. 403-408, 1995.
- AL-KHATIB, M. S.; KHYAMI-HORANI, H.; BADRAN, E.; SHEHABI, A. A. Incidence and characterization of diarrheal enterotoxins of fecal *Bacillus cereus* isolates associated with diarrhea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 59, p. 383-387, 2007.
- ALLARD, A. S.; NEILSON A. H. Bioremediation of organic waste sites: a critical review of microbiological aspects. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 39, n. 4, p. 253-285, 1997.
- ALVAREZ, P. J. J.; VOGEL, T. M. Substrate interactions of benzene, toluene and *para*-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2981-2985, 1991.

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.

ANDREONI, V.; GIANFREDA, L. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 287-308, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/petro/dados_estatisticos.asp>. Acesso em: 08 maio 2008.

ARAUJO, I.; MONTILLA, M.; CÁRDENAS, C.; HERRERA, L.; ANGULO, N.; MORILLO, G. Lodos estabilizados y cepas bacterianas en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. **Interciencia**, v. 31, n. 4, p. 268-275, 2006.

ARVIN, E.; JENSEN, B. K.; GUNDERSEN, A. T. Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3221-2219, 1989.

ASCON-CABRERA, M. A.; LEBEAULT, J.-M. Selection of xenobiotic-degrading microorganisms in a biphasic aqueous-organic system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1717-1724, 1993.

ASCON-CABRERA, M. A.; LEBEAULT, J.-M. Cell hydrophobicity influencing the activity/stability of xenobiotic-degrading microorganisms in a continuous biphasic aqueous-organic system. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, n. 3, p. 270-275, 1995.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Interaction profile for benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX). Atlanta, 2004. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/IP-btex/ip05.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2007.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for Benzene. Atlanta, 2007a. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp3.pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2007.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for Toluene. Atlanta, 2000. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp56.pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2007.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Draft Toxicological Profile for Ethylbenzene. Atlanta, 2007b. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp110.pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2007.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. Toxicological Profile for Xylene. Atlanta, 2007c. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp71.pdf>>. Acesso em: 25 mar. 2007.

ATLAS, R. M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 4-12, p. 178-182, 1995.

BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 541-555, 2003.

BAPTISTA, I.; ZHOU, N.; EMANUELSSON, E.; PEEVA, L.; LEAK, D.; MANTALARIS, A.; LIVINGSTON, A. Evidence of species succession during chlorobenzene biodegradation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 1, p. 68-74, 2008.

BARRAGÁN-HUERTA, B. E.; COSTA-PÉREZ, C.; PERALTA-CRUZ, J.; BARRERA-CORTÉS, J.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean coffee. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 239-244, 2007.

BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGE, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 9, p. 1049-1055, 2005.

BHUPATHIRAJU, V. K.; KRAUTER, P.; HOLMAN, H. N.; CONRAD, M. E.; DALEY, P. F.; TEMPLETON, A. S.; HUNT, J. R.; HERNANDEZ, M.; COHEN, L. A. Assessment of *in situ* bioremediation at a refinery waste-contaminated site and an aviation gasoline contaminated site. **Biodegradation**, v. 13, p. 79-90, 2002.

BIDLAN, R.; MANONMANI, H. K. Aerobic degradation of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) by *Serratia marcescens* DT-1P. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 49-56, 2002.

BOLL, M. Dearomatizing benzene ring reductases. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 2-4, p. 132-142, 2005.

BOONCHAN, S.; BRITZ, M. L.; STANLEY, G. A. Surfactant enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n. 4, p. 482-494, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Portaria MS 518/2004. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/portaria_518_2004.pdf>. Acesso em: 14 ago. 2007.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Resolução CONAMA 314/2002. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=336>>. Acesso em: 30 jan. 2008.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Resolução Normativa nº 05, de 12 de março de 2008. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/11444.html>>. Acesso em: 30 jan. 2008.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). Instrução Normativa nº 3, de 12 de novembro de 1996. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3491.html>>. Acesso em: 30 jan. 2008.

BROWN, B. J.; LEFF, L. G. Comparison of fatty acid methyl ester analysis with the use of API20E and NFT strips for identification of aquatic bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 2183-2185, 1996.

BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 41, p. 653-673, 1941.

BUSSE, H.; DENNER, E. B. M.; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria; current approaches to an old problem; overview of methods used in bacterial systematic. **Journal of Bacteriology**, v. 47, p. 3-38, 1996.

BUYER, J. S. Identification of bacteria from single colonies by fatty acid analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 48, p. 259-265, 2002.

CAFARO, V.; IZZO, V.; SCOGNAMIGLIO, R.; NOTOMISTA, E.; CAPASSO, P.; CASBARRA, A.; PUCCI, P.; DONATO, A. Phenol hydroxylase and toluene / o-xylene monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: interplay between two enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 2211-2219, 2004.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. O gerenciamento de áreas contaminadas no Estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 25 abr. 2008.

CHANG, S. W.; LA, H. J.; LEE, S. J. Microbial degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers (BTEX) contaminated groundwater in Korea. **Water Science and Technology**, v. 44, n. 7, p. 165-171, 2001.

CHAPELLE, F. H. **Ground-water microbiology and geochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1993. 424 p.

CHEN, C.-I.; TAYLOR, R. T. Batch and fed-batch bioreactor cultivations of a *Thermus* species with thermophilic BTEX-degrading activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, n. 6, p. 726-733, 1997a.

CHEN, C. I.; TAYLOR, R. T. Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 121-128, 1997b.

CHIANG, C.; SALANITRO, J.; CHAI, E.; COLTHART, J.; KLEIN, C. Aerobic biodegradation of benzene, toluene and xylene in sandy aquifer: data analysis and computer modeling. **Groundwater**, v. 27, n. 6, p. 826-834, 1989.

CHYZANOWSKI, L.; KACZOREK, E.; OLSZANOWSKI, A. Relation between *Candida maltosa* hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1273-1277, 2005.

COENYE, T.; LIU, L.; VANDAMME, P.; LIPUMA, J. J. Identification of *Pandora* species by 16S ribosomal DNA-based PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4452-4455, 2001.

CORSEUIL, H. X.; ALVAREZ, J. J. Natural bioremediation perspective for BTX-contaminated groundwater in Brazil: effect of ethanol. **Water Science and Technology**, v. 34, n. 7-8, p. 311-318, 1996.

COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annuary Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 3-II, p. 491-503, 1999.

CRAPEZ, M. A. C.; BORGES, A. L. N.; BISPO, M. G. S.; PEREIRA, D. C. Biorremediação - Tratamento para derrames de petróleo. **Ciência Hoje**, v. 30, p. 32-36, 2002.

CUNHA, C. D. **Avaliação da biodegradação de gasolina em solo**. 1996. 97 f., Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

CUNHA, C. D.; ROSADO, A. S.; SEBASTIAN, G. V.; SELDIN, L.; VON DER WEID, I. Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 4, p. 949-959, 2006.

CUNNINGHAM, J. A.; RAHME, H.; HOPKINS, G. D.; LEBRON, C.; REINHARD, M. Enhanced *in situ* bioremediation of BTEX-contaminated groundwater by combined injection of nitrate and sulfate. **Environmental Science Technology**, v. 35, p. 1663-1670, 2001.

CUNNINGHAM, J. A.; HOPKINS, G. D.; LEBRON, C. A.; REINHARD, M. Enhanced anaerobic bioremediation of ground water contaminated by fuel hydrocarbons at Seal Beach, California. **Biodegradation**, v. 11, p. 159-170, 2000.

DAVIS, J. W.; KLIER, N. J.; CARPENTER, C. L. Natural biological attenuation of benzene in groundwater beneath a manufacturing facility. **Groundwater**, v. 32, p. 215-226, 1994.

DEEB, R. A.; ALVAREZ-COHEN, L. Temperature effects and substrate interactions during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, n. 5, p. 526-536, 1999.

DEPPE, U.; RICHNOW, H.-H.; MICHAELIS, W.; ANTRANIKIAN, G. Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. **Extremophiles**, v. 9, p. 461-470, 2005.

DEL'ARCO, J. P.; FRANÇA, F. P. Biodegradation of crude oil in sandy sediment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 44, p. 87-92, 1999.

DÍAZ-RAMÍREZ, I. J.; ESCALANTE-ESPINOSA, E.; FAVELA-TORRES, E.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; RAMÍREZ-SAAD, H. Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, p. 21-30, 2008.

DUETZ, W. A.; JONG, C.; WILLIAMS, P. A.; VAN ANDEL, J. G. Competition in chemostat culture between *Pseudomonas* strains that use different pathways for the degradation of toluene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 8, p. 2858-2863, 1994.

EHRENREICH, P.; BEHRENDTS, A.; HARDER, J.; WIDDEL, F. Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 173, n. 1, p. 58-64, 2000.

FERA, M. T.; MAUGERI, T. L.; GUGLIANDOLO, C.; BONANNO, D.; LA CAMERA, E.; PAPASERGI, S.; CARBONE, M. Occurrence of *Burkholderia cepacia* complex, *Ralstonia* and *Pandoraea* species DNAs in the coastal environment of the Straits of Messina (Italy). **Marine Pollution Bulletin**, v. 54, p. 803-808, 2007.

FETTER, C. W. **Contaminant hydrogeology**. New York: Macmillan, 1993.

FILHO, M. A. A legião microbiana avança contra os poluentes. **Jornal da Unicamp**, v. 215, p. 12, 2003.

FLATHMAN, P. E.; JERGER, D. E.; EXNER, J. H. **Bioremediation - Field experience**. Ann Arbor: CRC Press, 1993. 560 p.

FOGHT, J. M.; GUTNICK, D. L.; WESTLAKE, D. W. S. Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 36-42, 1989.

FOUHY, Y.; SCANLON, K.; SCHOUDEST, K.; SPILLANE, C.; CROSSMAN, L.; AVISON, M. B.; RYAN, R. P.; DOW, J. M. Diffusible signal factor-dependent cell-cell signaling and virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 13, p. 4964-4968, 2007.

FROSTEGARD, A.; TUNLID, A.; BAATH, E. Phospholipid fatty acid composition, biomass and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3605-3617, 1993.

GARAZZINO, S.; APRATO, A.; MAIELLO, A.; MASSÉ, A.; BIASIBETTI, A.; DE ROSA, F. G.; DI PERRI, G. Osteomyelitis caused by *Enterobacter cancerogenus* infection following a traumatic injury: case report and review of the literature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 1073-1078, 2001.

GHAZALI, F. M.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p. 61-67, 2004.

GIBSON, D. T.; CARDINI, G. E.; MASELES, F. C.; KALLIO, R. E. Incorporation of oxygen-18 into benzene by *Pseudomonas putida*. **Biochemistry**, v. 12, p. 1520-1528, 1970.

GIBSON, D. T.; MAHADEVAN, V.; DAVEY, J. F. Bacterial metabolism of *para*- and *meta*-xylene: oxidation of the aromatic ring. **Journal of Bacteriology**, v. 119, n. 3, p. 930-936, 1974.

GIGENA, A. C. **Comparação de estratégias de isolamento de microrganismos degradadores de tolueno**. 2005. 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GILAROVA, R.; VOLDRICH, M.; DEMNEROVÁ, K.; CEROVSKÝ, M.; DOBIÁS, J. Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, n. 1-2, p. 315-319, 1994.

GILBRIDE, K. A.; LEE, D.-Y.; BEAUDETTE, L. A. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 1-20, 2006.

GOTTSCHALK, G. **Bacterial Metabolism**. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1986. 359 p.

GOUDAR, C. T.; STREVETT, K. A. Comparison of relative rates of BTEX biodegradation using respirometry. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 11-18, 1998.

GUIGUER, N. **Poluição das águas subterrâneas e do solo causada por vazamentos em postos de abastecimento**. Ontário: Waterloo Hydrogeologic, 1996. 356 p.

HAACK, S. K.; GARCHOW, H.; ODELSON, D. A.; FORNEY, L. J.; KLUG, M. J. Accuracy, reproducibility and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 2483-2493, 1994.

HENRY, D. A.; MAHENTHIRALINGAM, E.; VANDAMME, P.; COENYE, T.; SPEERT, D. P. Phenotypic methods for determining genomovar status of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1459-1461, 2001.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.

HOLLIGER, C.; ZEHNDER, A. J. B. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 326-330, 1996.

HSIAO, C.-L.; YOUNG, C.-C.; WANG, C.-Y. Screening and identification of glufosinate-degrading bacteria from glufosinate-treated soils. **Weed Science**, v. 55, n. 6, p. 631-637, 2007.

HU, Z.; DOU, J.; LIU, X.; ZHENG, X.; DENG, D. Anaerobic biodegradation of benzene series compounds by mixed cultures based on optimal electronic acceptors. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 1049-1054, 2007.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Carcinogenicity evaluation of BTEX, v. 71, p. 829, 1999. Disponível em: <<http://www.iarc.fr>>. Acesso em: 10 fev. 2007.

JACQUES, R. J. S.; OKEKE, B. C.; BENTO, F. M.; TEIXEIRA, A. S.; PERALBA, M. C. R.; CAMARGO, F. A. O. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2637-2643, 2008.

JAISWAL, P. K.; THAKUR, I. S. Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading *Serratia marcescens* from alkalophilic bacterial consortium of the chemostat. **Current Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 447-454, 2007.

KADRI, M. H.; SALEM, A. A.; SALMA, M. Oil degrading bacteria in Kuwait Bay. **Journal of Marine Science**, v. 15, p. 50-51, 1986.

KALIVODA, E. J.; STELLA, N. A.; O'DEE, D. M.; NAU, G. J.; SHANKS, R. M. Q. The cyclic AMP-dependent catabolite repression system of *Serratia marcescens*

mediates biofilm formation through regulation of type 1 fimbriae. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 11, p. 3461-3470, 2008.

KAMPBELL, D. H.; WIEDEMEIER, T. H.; HANSEN, J. E. Intrinsic bioremediation of fuel contamination in ground water at a field site. **Journal of Hazardous Materials**, v. 49, p. 197-204, 1995.

KARPOUZAS, D. G.; MORGAN, J. A. W.; WALKER, A. Isolation and characterization of ethoprophos-degrading bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 33, p. 209-218, 2000.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de "landfarming"**. 2001. 202 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2001.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.

KLECKA, G. M.; DAVIS, J. W.; GRAY, D. R.; MADSEN, S. S. Natural bioremediation of organic contaminants in groundwater: cliffs-dow superfund site. **Groundwater**, v. 28, p. 534-543, 1994.

KUMAR, K.; DEVI, S. S.; KRISHNAMURTHI, K.; KANADE, G. S.; CHAKRABARTI, T. Enrichment and isolation of endosulfan degrading and detoxifying bacteria. **Chemosphere**, v. 68, p. 317-322, 2007.

LAL, B.; KHANNA, S. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 355-362, 1996.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, Chichester: John Wiley & Sons, 1991.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LAPERTOT, M.; SEIGNEZ, C.; EBRAHIMI, S.; DELORME, S.; PERINGER, P. Mass production of bacterial communities adapted to the degradation of volatile organic compounds (TEX). **Biodegradation**, v. 18, p. 343-350, 2007.

LAWS, A.; GU, Y.; MARSHALL, V. Biosynthesis, characterization, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 597-625, 2001.

LEAHY, J. G.; BYRNE, A. M.; OLSEN, R. H. Comparison of factors influencing trichloroethylene degradation by toluene-oxidizing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 825-833, 1996.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.

LEDDY, M. B.; PHIPPS, D. W.; RIDGWAY, H. F. Catabolite-mediated mutations in alternate toluene degradative pathways in *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 16, p. 4713-4720, 1995.

LEE, E. Y.; JUN, Y. S.; CHO, K. Degradation characteristic of toluene, benzene, ethylbenzene and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. **Journal of the Air and Waste Management Association**, v. 52, p. 400-406, 2002.

LEE, K.; GIBSON, D. T. Toluene and ethylbenzene oxidation by purified naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain NCIB 9816-4. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3101-3106, 1996.

LI, G. Y.; HE, Z.; AN, T. C.; ZENG, X.; SHENG, G.; FU, J. Comparative study of the elimination of toluene vapours in twin biotrickling filters using two microorganisms *Bacillus cereus* S1 and S2. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, n. 7, p. 1019-1026, 2008.

MACCORMACK, W. P.; FRAILE, E. R. Characterization of a hydrocarbon degrading psychrotrophic Antarctic bacterium. **Antarctic Science**, v. 9, n. 2, p. 150-155, 1997.

MACHÍN-RAMÍREZ, C.; OKOH, A. I.; MORALES, D.; MAYOLO-DELOISA, K.; QUINTERO, R.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R. Slurry-phase biodegradation of weathered oily sludge waste. **Chemosphere**, v. 70, p. 737-744, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Brock Biology of Microorganisms**. 9th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2000. 1046 p.

MADSEN, E. L.; SINCLAIR, J. L.; GHIORSE, W. G. *In situ* biodegradation: microbiological patterns in a contaminated aquifer. **Science**, v. 252, p. 830-833, 1991.

MALIK, S.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. **Environment International**, v. 34, p. 265-276, 2008.

MALINA, G.; ZAWIERUCHA, I. Potential of bioaugmentation and biostimulation for enhancing intrinsic biodegradation in oil hydrocarbon-contaminated soil. **Bioremediation Journal**, v. 11, p. 141-147, 2007.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biological decontamination of oil spills in cold environments. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, p. 381-389, 1999.

MARIANO, A. P.; KATAOKA, A. P. A. G.; DE ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 346-353, 2007.

MARTÍNEZ-ALONSO, M.; GAJU, N. El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. **Ecosistemas**, v. 14, n. 2, p. 79-91, 2005.

MASSOL-DEYÁ, A.; ODELSON, D. A.; HICKEY, R. F.; TIEDJE, J. M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). **Molecular Microbial Ecology Manual**, v. 3.3.2, p. 1-8, 1995.

MASSOL-DEYÁ, A.; WELLER, R.; RIOS-HERNANDEZ, L.; ZHOU, J. Z.; HICKEY, R. F.; TIEDJE, J. M. Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 270-276, 1997.

MATAFONOVA, G. G.; SHIRAPOVA, G. S.; ZIMMER, C.; KOHRING, G.-W.; GIFFHORN, F.; BATOEV, V. B.; TSYRENOV, V. J. *Bacillus cereus* is a microbial decomposer of 2,4-dichlorophenol. **Biology Bulletin**, v. 34, p. 442-445, 2007.

MATTNEY, G. C. **Assessment and remediation of petroleum contaminated sites**. Flórida: CRC Press, 1994. 384 p.

MCDOWELL, D. The polymerase chain reaction patents: going, going, ... still going. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 99, p. 62-64, 2006.

MIKESELL, M. D.; KUKOR, J. J. OLSEN, R. H. Metabolic diversity of aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from a petroleum-contaminated aquifer. **Biodegradation**, v. 4, p. 249-259, 1993.

MISHRA, S.; IVOT, J.; KUHAD, R. C.; LAL, B. Evaluation of inoculum addition to stimulate *in situ* bioremediation of oily-contaminated soil. **Microbial Biotechnology**, v. 67, n. 4, p. 1675-1681, 2001.

MOYER, C. L.; TIEDJE, J. M.; DOBBS, F. C.; KARL, D. M. A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2501-2507, 1996.

MUÑOZ, R.; BORDEL, S.; DÍAZ, L. F.; VILLAVERDE, S. Inhibitory effects of catechol accumulation on benzene biodegradation in *Pseudomonas putida* F1 cultures. **Chemosphere**, v. 68, n. 2, p. 244-252, 2007.

OBUEKWE, C. O.; AL-JADI, Z. K.; AL-SALEH, E. Insight into heterogeneity in cell-surface hydrophobicity and ability to degrade hydrocarbons among cells of two hydrocarbon-degrading bacterial populations. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 252-260, 2007.

OH, Y-S.; SHAREEFDEEN, Z; BALTZIS, B. C.; BARTHA, R. Interactions between benzene, toluene, and *p*-xylene during their biodegradation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, n. 4, p. 533-538, 1994.

OJO, O. A. Petroleum-hydrocarbon utilization by native bacterial population from a wastewater canal Southwest Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 333-337, 2006.

ORTÍN, X.; JAEN-MARTINEZ, J.; RODRIGUEZ-LUACES, M.; ALVARO, T.; FONT, L. Fatal pulmonary hemorrhage in a patient with myelodysplastic syndrome and fulminant pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. **Infection**, v. 35, p. 201-202, 2007.

OZAKI, S.; KISHIMOTO, N.; FUJITA, T. Isolation and phylogenetic characterization of microbial consortia able to degrade aromatic hydrocarbons at high rates. **Microbes and Environments**, v. 21, n. 1, p. 44-52, 2006.

PELZ, O.; TESAR, M.; WITTICH, R. M.; MOORE, E. R. B.; TIMMIS, K. N.; ABRAHAM, W. R. Towards elucidation of microbial community metabolic pathways: unrevealing the network of carbon sharing in a pollutant-degrading bacterial consortium by immunocapture and isotopic ratio mass spectrometry. **Environmental Microbiology**, v. 1, p. 167-174, 1999.

PERRIELLO, F. A. Bioremediation of petroleum pollutants with alkane-utilizing bacteria. **United States Patent**. Patent number: 6110372, 2000.

PETTI, C. A. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. **Medical Microbiology – Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 1108-1114, 2007.

PIFFNER, S. M.; PALUMBO, A. V.; GIBSON, T.; RINGELBERG, D. B.; MCCARTHY, J. F. Relating ground water and sediment chemistry to microbial characterization at a BTEX-contaminated site. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63, p. 775-778, 1997.

PICKUP, R. W.; RHODES, G.; SAUNDERS, J. R. Extraction of microbial DNA from aquatic sources: Freshwater. **Molecular Microbial Ecology Manual**, v. 1.1.2, p. 1-11, 1995.

RAHMAN, K. S. M.; THAHIRA-RAHMAN, J.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; BANAT, I. M. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. **Bioresource Technology**, v. 85, p. 257-261, 2002.

RAMETTE, A.; LIPUMA, J. J.; TIEDJE, J. M. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1193-1201, 2005.

RICHARD, J. Y.; VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 44, p. 93-100, 1999.

ROSATO, Y. B. Biodegradação do petróleo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1997.

SANDERS, W. E.; SANDERS, C. C. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 2, p. 220-241, 1997.

SATHISHKUMAR, M.; BINUPRIYA, A. R.; BAIK, S.-H.; YUN, S.-E. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. **Clean**, v. 36, n. 1, p. 92-96, 2008.

SCHREIBER, M. E.; BAHR, J. M. Nitrate-enhanced bioremediation of BTEX-contaminated groundwater: parameter estimation from natural-gradient tracer experiments. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 55, p. 29-56, 2002.

SCRAGG, A. **Environmental Biotechnology**. Singapura: Longman, 1999. 264 p.

SEABRA, P. N. Uso da biorremediação em áreas impactadas pela indústria de petróleo. In: MELO, I. S.; SILVA, C. M. M. S.; SCRAMIM, S.; SPESSOTO, A. **Biodegradação**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001.

SEMPLE, K. T.; REID, B. J.; FERMOR, T. R. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. **Environmental Pollution**, v. 112, p. 269-283, 2001.

SHAMSHOOM, S. M.; ZIARA, T. S.; ABDUL-RITHA, A. N.; YACOUN, A. E. Distribution of oil bacteria in the north-west Arabian Gulf. **Marine Pollution Bulletin**, v. 21, p. 38-40, 1990.

SIDDIQUE, T.; FEDORAK, P. M.; MACKINNON, M. D.; FOGHT, J. M. Metabolism of BTEX and naphta to methane in oil sands tailing. **Environmental Science Technology**, v. 41, p. 2350-2356, 2007.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-222, 1995.

SILVA, M. L. B.; ALVAREZ, P. J. J. Enhanced anaerobic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzene-xylene-ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4720-4726, 2004.

SILVA, M. L. B.; RUIZ-AGUILAR, G. M. L.; ALVAREZ, P. J. J. Enhanced anaerobic biodegradation of BTEX-ethanol mixtures in aquifer columns amended with sulfate, chelated ferric iron or nitrate. **Biodegradation**, v. 16, p. 105-114, 2005.

SILVA, T. M.; STETS, M. I.; MAZZETTO, A. M.; ANDRADE, F. D.; PILEGGI, S. A. V.; FAVERO, P. R.; CANTU, M. D.; CARRILHO, E.; CARNEIRO, P. I. B.; PILEGGI M. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 522-525, 2007.

SINGH, B. K.; WALKER, A.; WRIGHT, D. J. Bioremedial potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: Influence of different environmental conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 2682-2693, 2006.

SINGH, S.; CHANDRA, R.; PATEL, D. K.; REDDY, M. M. K.; RAI, V. Investigation of the biotransformation of pentachlorophenol and pulp paper mill effluent decolorisation by the bacterial strains in a mixed culture. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5703-5709, 2008.

SLABBINCK, B.; DE BAETS, B.; DAWYNDT, P.; DE VOS, P. Genus-wide *Bacillus* species identification through proper artificial neural network experiments on fatty acid profiles. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 187-198, 2008.

SMITH, M. R.; RATLEDGE, C. Catabolism of alkylbenzenes by *Pseudomonas* sp. NCIB-10643. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 68-75, 1989.

SO, C. M.; YOUNG, L. Y. Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2969-2976, 1999.

SONG, H. G.; WANG, X.; BARTHA, R. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 652-656, 1990.

SONG, H. G.; BARTHA, R. Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 646-651, 1990.

SORKHOH, N. A.; AL-HASAN, R. H.; KHANAFER, M.; RADWAN, S. S. Establishment of oil-degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil-polluted soil. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, p. 194-199, 1995.

SORKHOH, N. A.; GHANNOUM, M. A.; IBRAIM, A. S.; STRETTON, R. J.; RADWAN, S. S. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochous* isolated from soil and marine environment in Kuwait. **Environmental Pollution**, v. 65, p. 1-17, 1990.

SPAIN, J. C.; VAN VELD, P. A. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum and chemical structure. **Applied Environmental Microbiology**, v. 45, p. 428-435, 1983.

SPILBORGHS, M. C. F. **Biorremediação de aquífero contaminado por hidrocarboneto**. 1997. 147 f. Dissertação (Mestrado em Hidrogeologia) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

STRYJEWSKI, M. E.; LIPUMA, J. J.; MESSIER JR., R. H.; RELLER, B.; ALEXANDER, B. D. Sepsis, multiple organ failure, and death due to *Pandoraea pnomenusa* infection after lung transplantation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 2255-2257, 2003.

TOLEDO, F. L.; CALVO, C.; RODELAS, B.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 244-252, 2006.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 782-787, 1990.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2000. 830 p.

TROPEL, D.; VAN DER MEER, J. R. Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 3, p. 474-500, 2004.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ground Water Issue: Light nonaqueous phase liquids**. EPA/540/S-95/500, 1995. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ahaazvuc/download/issue/lnapl.pdf>>. Acesso em: 03 fev. 2007.

VALLEJO, V.; SALGADO, L.; ROLDAN, F. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 7, n. 2, p. 67-78, 2005.

VAN HAMME, J. D.; ODUMERU, J. A.; WARD, O. P. Community dynamics of a mixed-bacterial culture growing on petroleum hydrocarbons in batch culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 441-450, 2000.

VILLAVERDE, S.; FERNÁNDEZ, M. T. Non-toluene associated respiration in a *Pseudomonas putida* 54G biofilm grown on toluene in a flat plate vapor phase bioreactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 357-362, 1997.

VOGEL, T. M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 311-316, 1996.

WACKEROW-KOUZOVA, N. D. Isolation and study of azobenzene-transforming soil bacteria. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 162-164, 2005.

WEINER, R.; LANGILLE, S.; QUINTERO, E. Structure, function and immunochemistry of bacterial exopolysaccharides. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, p. 339-346, 1995.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.

WHITED, G. M.; GIBSON, D. T. Separation and partial characterization of the enzymes of the toluene-4-monooxygenase catabolic pathway in *Pseudomonas mendocina* KR1. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 3017-3020, 1991.

WHYTE, L. G.; GREER, C. W.; INNIS, W. E. Assessment of the biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 99-106, 1996.

WIDADA, J.; NOJIRI, H.; OMORI, T. Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 45-59, 2002.

WOESE, C. R. Bacteria evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

WONGSA, P.; TANAKA, M.; UENO, A.; HASANUZZAMAN, M.; YUMOTO, I.; OKUYAMA, H. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. **Current Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 415-422, 2004.

YERUSHALMI, L.; LASCOURREGES, J.-F.; GUIOT, S. R. Kinetics of benzene biotransformation under microaerophilic and oxygen-limited conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 3, p. 347-355, 2002.

YERUSHALMI, L.; MANUEL, M. F.; GUIOT, S. R. Biodegradation of gasoline and BTEX in a microaerophilic biobarrier. **Biodegradation**, v. 10, p. 341-352, 1999.

ZAK, J. C.; WILLIG, M. R.; MOORHEAD, D. L.; WILDMAN, H. G. Functional diversity of bacterial communities: a quantitative approach. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 26, p. 1101-1108, 1994.

ZENGLER, K.; RICHNOW, H. H.; ROSSELO-MORA, R.; MICHAELIS, W.; WIDDEL, F. Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. **Nature**, v. 401, n. 6750, p. 266-269, 1999.

ANEXO A – Identificação bacteriana através do sequenciamento do DNAr 16S

ANEXO A.1 – Sequências alinhadas das cepas RBB, TTA, TEA, RXA e AY551938.1, identificadas como *Serratia marcescens*.

		10	20	30	40	50
						
RBB	TGGGCCTCTT	GCCATCAGAT	GTGCCCAGAT	GGGATTAGCT	AGTAGGTGGG	
TTA	CGGGCCTCTT	GCCATCAGAT	GTGCCCAGAT	GGGATTAGCT	AGTAGGTGGG	
TEA	CGGGCCTCTT	GCCATCAGAT	GTGCCCAGAT	GGGATTAGCT	AGTAGGTGGG	
RXA	CGGGCCTCTT	GCCATCAGAT	GTGCCCAGAT	GGGATTAGCT	AGTAGGTGGG	
AY551938.1	CGGGCCTCTT	GCCATCAGAT	GTGCCCAGAT	GGGATTAGCT	AGTAGGTGGG	
		60	70	80	90	100
						
RBB	GTAATGGCTC	ACCTAGTGCG	ACGATCCCTA	GCTGGTCTGA	GAGGATGACC	
TTA	GTAATGGCTC	ACCTAG-GCG	ACGATCCCTA	GCTGGTCTGA	GAGGATGACC	
TEA	GTAATGGCTC	ACCTAG-GCG	ACGATCCCTA	GCTGGTCTGA	GAGGATGACC	
RXA	GTAATGGCTC	ACCTAG-GCG	ACGATCCCTA	GCTGGTCTGA	GAGGATGACC	
AY551938.1	GTAATGGCTC	ACCTAG-GCG	ACGATCCCTA	GCTGGTCTGA	GAGGATGACC	
		110	120	130	140	150
						
RBB	AGCCAGCAGC	TGGAAGTGAG	ACACGGTCCA	GACTCCTACG	GGAGGCAGCA	
TTA	AGCCAC--AC	TGGAAGTGAG	ACACGGTCCA	GACTCCTACG	GGAGGCAGCA	
TEA	AGCCAC--AC	TGGAAGTGAG	ACACGGTCCA	GACTCCTACG	GGAGGCAGCA	
RXA	AGCCAGC-AC	TGGAAGTGAG	ACACGGTCCA	GACTCCTACG	GGAGGCAGCA	
AY551938.1	AGCCAC--AC	TGGAAGTGAG	ACACGGTCCA	GACTCCTACG	GGAGGCAGCA	
		160	170	180	190	200
						
RBB	GTGGGGAATA	TTGCACAATG	GGCGCAAGCC	TGATGCAGCC	ATGCCGCGTG	
TTA	GTGGGGAATA	TTGCACAATG	GGCGCAAGCC	TGATGCAGCC	ATGCCGCGTG	
TEA	GTGGGGAATA	TTGCACAATG	GGCGCAAGCC	TGATGCAGCC	ATGCCGCGTG	
RXA	GTGGGGAATA	TTGCACAATG	GGCGCAAGCC	TGATGCAGCC	ATGCCGCGTG	
AY551938.1	GTGGGGAATA	TTGCACAATG	GGCGCAAGCC	TGATGCAGCC	ATGCCGCGTG	
		210	220	230	240	250
						
RBB	TGTGAAGAAG	GCCTTCGGGT	TGTAAAGCAC	TTTCAGCGAG	GAGGAAGGTG	
TTA	TGTGAAGAAG	GCCTTCGGGT	TGTAAAGCAC	TTTCAGCGAG	GAGGAAGGTG	
TEA	TGTGAAGAAG	GCCTTCGGGT	TGTAAAGCAC	TTTCAGCGAG	GAGGAAGGTG	
RXA	TGTGAAGAAG	GCCTTCGGGT	TGTAAAGCAC	TTTCAGCGAG	GAGGAAGGTG	
AY551938.1	TGTGAAGAAG	GCCTTCGGGT	TGTAAAGCAC	TTTCAGCGAG	GAGGAAGGTG	
		260	270	280	290	300
						
RBB	GTGAGCTTAA	TACGCTCATC	AATTGACGTT	ACTCGCAGAA	GAAGCACC GG	
TTA	GTGAGCTTAA	TACGCTCATC	AATTGACGTT	ACTCGCAGAA	GAAGCACC GG	
TEA	GTGAGCTTAA	TACGCTCATC	AATTGACGTT	ACTCGCAGAA	GAAGCACC GG	
RXA	GTGAGCTTAA	TACGCTCATC	AATTGACGTT	ACTCGCAGAA	GAAGCACC GG	
AY551938.1	GTGAGCTTAA	TACGCTCATC	AATTGACGTT	ACTCGCAGAA	GAAGCACC GG	

	310	320	330	340	350
					
RBB	CTAACTCCGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	GGAGGGTGCA	AGCGTTAA--
TTA	CTAACTCCGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	GGAGGGTGCA	AGCGTTAA-T
TEA	CTAACTCCGT	GCCAGCAGCC	GCGGTA-TAC	GGAGGGTGCA	AGCGTTAA-T
RXA	CTAACTCCGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	GGAGGGTGCA	AGCGTTAAAT
AY551938.1	CTAACTCCGT	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	GGAGGGTGCA	AGCGTTAA-T
	360	370	380	390	400
					
RBB	CGGAATTACT	GGGCGTAAAG	CGCACGCAGG	CGGTTTGTTA	AGTCAGATGT
TTA	CGGAATTACT	GGGCGTAAAG	CGCACGCAGG	CGGTTTGTTA	AGTCAGATGT
TEA	CGGAATTACT	GGGCGTAAAG	CGCACGCAGG	CGGTTTGTTA	AGTCAGATGT
RXA	CGGAATTACT	GGGCGTAAAG	CGCACGCAGG	CGGTTTGTTA	AGTCAGATGT
AY551938.1	CGGAATTACT	GGGCGTAAAG	CGCACGCAGG	CGGTTTGTTA	AGTCAGATGT
	410	420	430	440	450
					
RBB	GAAATCCCCG	GGCTCAACCT	GGGAACTGCA	TTTGAAACTG	GCAAGCTAGA
TTA	GAAATCCCCG	GGCTCAACCT	GGGAACTGCA	TTTGAAACTG	GCAAGCTAGA
TEA	GAAATCCCCG	GGCTCAACCT	GGGAACTGCA	TTTGAAACTG	GCAAGCTAGA
RXA	GAAATCCCCG	GGCTCAACCT	GGGAACTGCA	TTTGAAACTG	GCAAGCTAGA
AY551938.1	GAAATCCCCG	GGCTCAACCT	GGGAACTGCA	TTTGAAACTG	GCAAGCTAGA
	460	470	480	490	500
					
RBB	GTCTCGTAGA	GGGGGGGTAG	AATTCCAGGT	GTAGCGGGTG	AAATGCGTAG
TTA	GTCTCGTAGA	GGGGGG-TAG	AATTCCAGGT	GTAGC-GGTG	AAATGCGTAG
TEA	GTCTCGTAGA	GGGGGG-TAG	AATACCAGGT	GTACC-GGTG	AAATGCGTAG
RXA	GTCTCGTAGA	GGGGGG-TAG	AATTCCAGGT	GTAGC-GGTG	AAATGCGTAG
AY551938.1	GTCTCGTAGA	GGGGGG-TAG	AATTCCAGGT	GTAGC-GGTG	AAATGCGTAG
	510	520	530	540	550
					
RBB	AGATCTGGAG	GAATACCGGT	GGGCGAAGGC	GGCCCCCTGG	ACGAAGACTG
TTA	AGATCTGGAG	GAATACCGGT	GGGCGAAGGC	GGCCCCCTGG	ACGAAGACTG
TEA	AGATCTGGAG	GAATAACGGT	~GGCGAAGGC	GGCCCCCTGG	ACGAAGACTG
RXA	AGATCTGGAG	GAATACCG-T	~GGCGAAGGC	GGCCCCCTGG	ACGAAGACTG
AY551938.1	AGATCTGGAG	GAATACCGGT	GGGCGAAGGC	GGCCCCCTGG	ACGAAGACTG
	560	570	580	590	600
					
RBB	ACGCTCAGGT	GCGAAAGCGT	GGGGAGCAAA	CAGGATAATA	CACCCTGG-T
TTA	ACGCTCAGGT	GCGAAAGCGT	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGG-T
TEA	ACGCTCAGGT	GCGAAAGCGT	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGG-T
RXA	ACGCTCAGGT	GCGAAAGCGT	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGG-T
AY551938.1	ACGCTCAGGT	GCGAAAGCGT	GGGGAGCAAA	CAGGATTAGA	TACCCTGGGT
	610	620	630	640	650
					
RBB	AGTCCACGCT	GTAAACGATG	TCGATTTGG-	AGGTTGTGCC	CTTGAGGCGT
TTA	AGTCCACGCT	GTAAACGATG	TCGATTTGG-	AGGTTGTGCC	CTTGAGGCGT
TEA	AGTCCACGCT	GTAAACGATG	TCGATTTGG-	AG-TTGTGCC	CTTGAGGCGT
RXA	AGTCCACGCT	GTAAACGATG	TCGATTTGG-	AGGTTGTGCC	CTTGAGGCGT
AY551938.1	AGTCCACGCT	GTAAACGATG	TCGATTTGGG	AGGTTGTGCC	CTTGAGGCGT

		660	670	680	690	700
						
RBB		GGCTTCCGGA	GCTAACGCGT	TAAATCGACC	GCCTGGGGAG	TACGGCCGCA
TTA		GGCTTCCGGA	GCTAACGCGT	TAAATCGACC	GCCTGGGGAG	TACGGCCGCA
TEA		GGCTTCCGGA	GCTAACGCGT	TAAATCGACC	GCCTGGGGAG	TACG-CCGCA
RXA		GGCTTCCGGA	GCTAACGCGT	TAAATCGACC	GCCTGGGGAG	TACGGCCGCA
AY551938.1		GGCTTCCGGA	GCTAACGCGT	TAAATCGACC	GCCTGGGGAG	TACGGCCGCA
		710	720	730	740	750
						
RBB		AGGTTAAAAAC	TCAAATGAAT	TGACGGGGGC	CCGCACAAGC	GGTGGAGCAT
TTA		AGGTTAAAAAC	TCAAATGAAT	TGACGGGGGC	CCGCACAAGC	GGTGGAGCAT
TEA		AGGTTAAAAAC	TCAAATGAAT	TGACGGGGGC	CCGCACAAGC	GGTGGAGCAT
RXA		AGGTTAAAAAC	TCAAATGAAT	TGACGGGGGC	CCGCACAAGC	GGTGGAGCAT
AY551938.1		AGGTTAAAAAC	TCAAATGAAT	TGACGGGGGC	CCGCACAAGC	GGTGGAGCAT
		760	770	780	790	800
						
RBB		GTGGTTTAAT	TCGATGCAAC	GCGAAGAACC	TTACCTACTC	TTGACATCCA
TTA		GTGGTTTAAT	TCGATGCAAC	GCGAAGAACC	TTACCTACTC	TTGACATCCA
TEA		GTGGTTTAAT	TCGATGCAAC	GCGAAGAACC	TTACCTACTC	TTGACATCCA
RXA		GTGGTTTAAT	TCGATGCAAC	GCGAAGAACC	TTACCTACTC	TTGACATCCA
AY551938.1		GTGGTTTAAT	TCGATGCAAC	GCGAAGAACC	TTACCTACTC	TTGACATCCA
		810	820	830	840	850
						
RBB		GAGAACTTTC	CAGAGATGGA	TTGGTGCCTT	CGGGAACCTC	GAGACAGGTG
TTA		GAGAACTTTC	CAGAGATGGA	TTGGTGCCTT	CGGGAACCTC	GAGACAGGTG
TEA		GAGAACTTTC	CAGAGATGGA	TTGGTGCCTT	CGGGAACCTC	GAGACAGGTG
RXA		GAGAACTTTC	CAGAGATGGA	TTGGTGCCTT	CGGGAACCTC	GAGACAGGTG
AY551938.1		GAGAACTTTC	CAGAGATGGA	TTGGTGCCTT	CGGGAACCTC	GAGACAGGTG
		860	870	880	890	900
						
RBB		CTGCATGGCT	GTCGTCAGCT	CGTGTGTGA	AATGTTGGGT	TAAGTCCCGC
TTA		CTGCATGGCT	GTCGTCAGCT	CGTGTGTGA	AATGTTGGGT	TAAGTCCCGC
TEA		CTGCATGGCT	GTCGTCAGCT	CGTGTGTGA	AATGTTGGGT	TAAGTCCCGC
RXA		CTGCATGGCT	GTCGTCAGCT	CGTGTGTGA	AATGTTGGGT	TAAGTCCCGC
AY551938.1		CTGCATGGCT	GTCGTCAGCT	CGTGTGTGA	AATGTTGGGT	TAAGTCCCGC
		910	920	930	940	950
						
RBB		AACGAGCGCA	ACCCTTATCC	TTTGTGCGCA	GCGGTTTCGGC	CGGGAACCTCA
TTA		AACGAGCGCA	ACCCTTATCC	TTTGTGCGCA	GCGGTTTCGGC	CGGGAACCTCA
TEA		AACGAGCGCA	ACCCTTATCC	TTTGTGCGCA	GCGGTTTCGGC	CGGGAACCTCA
RXA		AACGAGCGCA	ACCCTTATCC	TTTGTGCGCA	GCGGTTTCGGC	CGGGAACCTCA
AY551938.1		AACGAGCGCA	ACCCTTATCC	TTTGTGCGCA	GCGGTTTCGGC	CGGGAACCTCA
		960	970	980	990	1000
						
RBB		AAGGAGACTG	CCAGTGATAA	ACTGGAGGAA	GGTGGGGATG	ACGTCAAGTC
TTA		AAGGAGACTG	CCAGTGATAA	ACTGGAGGAA	GGTGGGGATG	ACGTCAAGTC
TEA		AAGGAGACTG	CCAGTGATAA	ACTGGAGGAA	GGTGGGGATG	ACGTCAAGTC
RXA		AAGGAGACTG	CCAGTGATAA	ACTGGAGGAA	GGTGGGGATG	ACGTCAAGTC
AY551938.1		AAGGAGACTG	CCAGTGATAA	ACTGGAGGAA	GGTGGGGATG	ACGTCAAGTC

		1010	1020	1030	
					...
RBB	ATCATGGCCC	TTACGATTAG	GGCTACACAC	GTG	
TTA	ATCATGGCCC	TTACGATTAG	GGCTACACAC	GTG	
TEA	ATCATGGCCC	TTACGATTAG	GGCTACACAC	GTG	
RXA	ATCATGGCCC	TTACGAGTAG	GGCTACACAC	GTG	
AY551938.1	ATCATGGCCC	TTACGAGTAG	GGCTACACAC	GTG	

ANEXO A.2 – Sequências alinhadas das cepas RBF, TBB, TTB, REB, REC, TEC e EU214612.1, identificadas como *Burkholderia cepacia*.

		10	20	30	40	50
						
RBF	TTACACATGC	AAGTCGAACG	GCAGCACGGG	TGCTTGCACC	TGGTGGCGAG	
TBB	TTACACATGC	AAGTCGAACG	GCAGCACGGG	TGCTTGCACC	TGGTGGCGAG	
TTB	TTACACATGC	AAGTCGAACG	GCAGCACGGG	TGCTTGCACC	TGGTGGCGAG	
REB	TTACACATGC	AAGTCGAACG	GCAGCACGGG	TGCTTGCACC	TGGTGGCGAG	
REC	TTACACATGC	A-GTCGAACG	GCAGCACGGG	TGCTTGCACC	TGGTGGCGAG	
TEC	TTACACATGC	AAGTCGAACG	GCAGCACGGG	TGCTTGCACC	TGGTGGCGAG	
EU214612.1	TTACACATGC	AAGTCGAACG	GCAGCACGGG	TGCTTGCACC	TGGTGGCGAG	
		60	70	80	90	100
						
RBF	TGGCGAACGG	GTGAGTAATA	CATCGGAACA	TGTCCTGTAG	TGGGGGATAG	
TBB	TGGCGAACGG	GTGAGTAATA	CATCGGAACA	TGTCCTGTAG	TGGGGGATAG	
TTB	TGGCGAACGG	GTGAGTAATA	CATCGGAACA	TGTCCTGTAG	TGGGGGATAG	
REB	TGGCGAACGG	GTGAGTAATA	CATCGGAACA	TGTCCTGTAG	TGGGGGATAG	
REC	TGGCGAACGG	GTGAGTAATA	CATCGGAACA	TGTCCTGTAG	TGGGGGATAG	
TEC	TGGCGAACGG	GTGAGTAATA	CATCGGAACA	TGTCCTGTAG	TGGGGGATAG	
EU214612.1	TGGCGAACGG	GTGAGTAATA	CATCGGAACA	TGTCCTGTAG	TGGGGGATAG	
		110	120	130	140	150
						
RBF	CCCGGCGAAA	GCCGGATTAA	TACCGCATAC	GATCTACGGA	TGA-AAGCGG	
TBB	CCCGGCGAAA	GCCGGATTAA	TACCGCATAC	GATCTACGGA	TGA-AAGCGG	
TTB	CCCGGCGAAA	GCCGGATTAA	TACCGCATAC	GATCTACGGA	TGAGAAGCGG	
REB	CCCGGCGAAA	GCCGGATTAA	TACCGCATAC	GATCTACGGA	TGA-AAGCGG	
REC	CCCGGCGAAA	GCCGGATTAA	TACCGCATAC	GATCTACGGA	TGA-AAGCGG	
TEC	CCCGGCGAAA	GCCGGATTAA	TACCGCATAC	GATCTACGGA	TGA-AAGCGG	
EU214612.1	CCCGGCGAAA	GCCGGATTAA	TACCGCATAC	GATCTACGGA	TGA-AAGCGG	
		160	170	180	190	200
						
RBF	GGGACCTTCG	GGCCTCGCGC	TATAGGGTTG	GCCGATGGCT	GATTAGCTAG	
TBB	GGGACCTTCG	GGCCTCGCGC	TATAGGGTTG	GCCGATGGCT	GATTAGCTAG	
TTB	GGGACCTTCG	GGCCTCGCGC	TATAGGGTTG	GCCGATGGCT	GATTAGCTAG	
REB	GGGACCTTCG	GGCCTCGCGC	TATAGGGTTG	GCCGATGGCT	GATTAGCTAG	
REC	GGGACCTTCG	GGCCTCGCGC	TATAGGGTTG	GCCGATGGCT	GATTAGCTAG	
TEC	GGGACCTTCG	GGCCTCGCGC	TATAGGGTTG	GCCGATGGCT	GATTAGCTAG	
EU214612.1	GGGACCTTCG	GGCCTCGCGC	TATAGGGTTG	GCCGATGGCT	GATTAGCTAG	
		210	220	230	240	250
						
RBF	TTGGTGGGGT	AAAGGCCTAC	CAAGGCGACG	ATCAGTAGCT	GGTCTGAGAG	
TBB	TTGGTGGGGT	AAAGGCCTAC	CAAGGCGACG	ATCAGTAGCT	GGTCTGAGAG	
TTB	TTGGTGGGGT	AAAGGCCTAC	CAAGGCGACG	ATCAGTAGCT	GGTCTGAGAG	
REB	TTGGTGGGGT	AAAGGCCTAC	CAAGGCGACG	ATCAGTAGCT	GGTCTGAGAG	
REC	TTGGTGGGGT	AAAGGCCTAC	CAAGGCGACG	ATCAGTAGCT	GGTCTGAGAG	
TEC	TTGGTGGGGT	AAAGGCCTAC	CAAGGCGACG	ATCAGTAGCT	GGTCTGAGAG	
EU214612.1	TTGGTGGGGT	AAAGGCCTAC	CAAGGCGACG	ATCAGTAGCT	GGTCTGAGAG	

		260	270	280	290	300
						
RBF	GACGACCAGC	CACACTGGGA	CTGAGACACG	GCCCAGACTC	CTACGGGAGG	
TBB	GACGACCAGC	CACACTGGGA	CTGAGACACG	GCCCAGACTC	CTACGGGAGG	
TTB	GACGACCAGC	CACACTGGGA	CTGAGACACG	GCCCAGACTC	CTACGGGAGG	
REB	GACGACCAGC	CACACTGGGA	CTGAGACACG	GCCCAGACTC	CTACGGGAGG	
REC	GACGACCAGC	CACACTGGGA	CTGAGACACG	GCCCAGACTC	CTACGGGAGG	
TEC	GACGACCAGC	CACACTGGGA	CTGAGACACG	GCCCAGACTC	CTACGGGAGG	
EU214612.1	GACGACCAGC	CACACTGGGA	CTGAGACACG	GCCCAGACTC	CTACGGGAGG	
		310	320	330	340	350
						
RBF	CAGCAGTGGG	GAATTTTGGA	CAATGGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCAATGCC	
TBB	CAGCAGTGGG	GAATTTTGGA	CAATGGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCAATGCC	
TTB	CAGCAGTGGG	GAATTTTGGA	CAATGGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCAATGCC	
REB	CAGCAGTGGG	GAATTTTGGA	CAATGGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCAATGCC	
REC	CAGCAGTGGG	GAATTTTGGA	CAATGGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCAATGCC	
TEC	CAGCAGTGGG	GAATTTTGGA	CAATGGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCAATGCC	
EU214612.1	CAGCAGTGGG	GAATTTTGGA	CAATGGGCGA	AAGCCTGATC	CAGCAATGCC	
		360	370	380	390	400
						
RBF	GCGTGTGTGA	AGAAGGCCTT	CGGGTTGTAA	AGCACTTTTG	TCCGGAAAGA	
TBB	GCGTGTGTGA	AGAAGGCCTT	CGGGTTGTAA	AGCACTTTTG	TCCGGAAAGA	
TTB	GCGTGTGTGA	AGAAGGCCTT	CGGGTTGTAA	AGCACTTTTG	TCCGGAAAGA	
REB	GCGTGTGTGA	AGAAGGCCTT	CGGGTTGTAA	AGCACTTTTG	TCCGGAAAGA	
REC	GCGTGTGTGA	AGAAGGCCTT	CGGGTTGTAA	AGCACTTTTG	TCCGGAAAGA	
TEC	GCGTGTGTGA	AGAAGGCCTT	CGGGTTGTAA	AGCACTTTTG	TCCGGAAAGA	
EU214612.1	GCGTGTGTGA	AGAAGGCCTT	CGGGTTGTAA	AGCACTTTTG	TCCGGAAAGA	
		410	420	430	440	450
						
RBF	AATCCTTGGC	TCTAATACAG	TCGGGGGATG	ACGGTACCGG	AAGAATAAGC	
TBB	AATCCTTGGC	TCTAATACAG	TCGGGGGATG	ACGGTACCGG	AAGAATAAGC	
TTB	AATCCTTGGC	TCTAATACAG	TCGGGGGATG	ACGGTACCGG	AAGAATAAGC	
REB	AATCCTTGGC	TCTAATACAG	TCGGGGGATG	ACGGTACCGG	AAGAATAAGC	
REC	AATCCTTGGC	TCTAATACAG	TCGGGGGATG	ACGGTACCGG	AAGAATAAGC	
TEC	AATCCTTGGC	TCTAATACAG	TCGGGGGATG	ACGGTACCGG	AAGAATAAGC	
EU214612.1	AATCCTTGGC	TCTAATACAG	TCGGGGGATG	ACGGTACCGG	AAGAATAAGC	
		460	470	480	490	500
						
RBF	ACCGGCTAAC	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT	AATACGTAGG	GTGCAAGCGT	
TBB	ACCGGCTAAC	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT	AATACGTAGG	GTGCAAGCGT	
TTB	ACCGGCTAAC	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT	AATACGTAGG	GTGCAAGCGT	
REB	ACCGGCTAAC	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT	AATACGTAGG	GTGCAAGCGT	
REC	ACCGGCTAAC	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT	AATACGTAGG	GTGCAAGCGT	
TEC	ACCGGCTAAC	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT	AATACGTAGG	GTGCAAGCGT	
EU214612.1	ACCGGCTAAC	TACGTGCCAG	CAGCCGCGGT	AATACGTAGG	GTGCAAGCGT	
		510	520	530	540	550
						
RBF	TAATCGGAAT	TACTGGGCGT	AAAGCGTGCG	CAGGCGGTTT	GCTAAGACCG	
TBB	TAATCGGAAT	TACTGGGCGT	AAAGCGTGCG	CAGGCGGTTT	GCTAAGACCG	
TTB	TAATCGGAAT	TACTGGGCGT	AAAGCGTGCG	CAGGCGGTTT	GCTAAGACCG	
REB	TAATCGGAAT	TACTGGGCGT	AAAGCGTGCG	CAGGCGGTTT	GCTAAGACCG	
REC	TAATCGGAAT	TACTGGGCGT	AAAGCGTGCG	CAGGCGGTTT	GCTAAGACCG	
TEC	TAATCGGAAT	TACTGGGCGT	AAAGCGTGCG	CAGGCGGTTT	GCTAAGACCG	
EU214612.1	TAATCGGAAT	TACTGGGCGT	AAAGCGTGCG	CAGGCGGTTT	GCTAAGACCG	

		560	570	580	590	600
						
RBF	ATGTGAAATC	CCCGGGCTCA	ACCTGGGAAC	TGCATTGGTG	ACTGGCAAGC	
TBB	ATGTGAAATC	CCCGGGCTCA	ACCTGGGAAC	TGCATTGGTG	ACTGGCAAGC	
TTB	ATGTGAAATC	CCCGGGCTCA	ACCTGGGAAC	TGCATTGGTG	ACTGGCAAGC	
REB	ATGTGAAATC	CCCGGGCTCA	ACCTGGGAAC	TGCATTGGTG	ACTGGCAAGC	
REC	ATGTGAAATC	CCCGGGCTCA	ACCTGGGAAC	TGCATTGGTG	ACTGGCAAGC	
TEC	ATGTGAAATC	CCCGGGCTCA	ACCTGGGAAC	TGCATTGGTG	ACTGGCAAGC	
EU214612.1	ATGTGAAATC	CCCGGGCTCA	ACCTGGGAAC	TGCATTGGTG	ACTGGCAGGC	

		610	620	630	640	650
						
RBF	TAGAGTATGG	CAGAGGGGGG	TAGAATTCCA	CGTGTAGCAG	TGAAATGCGT	
TBB	TAGAGTATGG	CAGAGGGGGG	TAGAATTCCA	CGTGTAGCAG	TGAAATGCGT	
TTB	TAGAGTATGG	CAGAGGGGGG	TAGAATTCCA	CGTGTAGCAG	TGAAATGCGT	
REB	TAGAGTATGG	CAGAGGGGGG	TAGAATTCCA	CGTGTAGCAG	TGAAATGCGT	
REC	TAGAGTATGG	CAGAGGGGGG	TAGAATTCCA	CGTGTAGCAG	TGAAATGCGT	
TEC	TAGAGTATGG	CAGAGGGGGG	TAGAATTCCA	CGTGTAGCAG	TGAAATGCGT	
EU214612.1	TAGAGTATGG	CAGAGGGGGG	TAGAATTCCA	CGTGTAGCAG	TGAAATGCGT	

		660	670	680	690	700
						
RBF	AGAGATGTGG	AGGAATACCG	ATGGCGAAGG	CAGCCCC-TG	GGCCAATACT	
TBB	AGAGATGTGG	AGGAATACCG	ATGGCGAAGG	CAGCCCCCTG	GGCCAATACT	
TTB	AGAGATGTGG	AGGAATACCG	ATGGCGAAGG	CAGCCCCCTG	GGCCAATACT	
REB	AGAGATGTGG	AGGAATACCG	ATGGCGAATG	CAGCCCCCTG	GGCCAATACT	
REC	AGAGATGTGG	AGGAATACCG	ATGGCGAAGG	CAGCCCCCTG	GGCCAATACT	
TEC	AGAGATGTGG	AGGAATACCG	ATGGCGAAGG	CAGCCCCCTG	GGCCAATACT	
EU214612.1	AGAGATGTGG	AGGAATACCG	ATGGCGAAGG	CAGCCCCCTG	GGCCAATACT	

		710	720	730	740	750
						
RBF	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGG-	
TBB	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGG-	
TTB	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGG-	
REB	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGG-	
REC	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGGG	
TEC	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGG-	
EU214612.1	GACGCTCATG	CACGAAAGCG	TGGGGAGCAA	ACAGGATTAG	ATACCCTGG-	

		760	770	780	790	800
						
RBF	TAGTCCACGC	CCTAAACGAT	GTCAACTAGT	TGTTGGGGAT	TCATTTTCCTT	
TBB	TAGTCCACGC	CCTAAACGAT	GTCAACTAGT	TGTTGGGGAT	TCATTTTCCTT	
TTB	TAGTCCACGC	CCTAAACGAT	GTCAACTAGT	TGTTGGGGAT	TCATTTTCCTT	
REB	TAGTCCACGC	CCTAAACGAT	GTCAACTAGT	TGTTGGGGAT	TCATTTTCCTT	
REC	TAGTCCACGC	CCTAAACGAT	GTCAACTAGT	TGTTGGGGAT	TCATTTTCCTT	
TEC	TAGTCCACGC	CCTAAACGAT	GTCAACTAGT	TGTTGGGGAT	TCATTTTCCTT	
EU214612.1	TAGTCCACGC	CCTAAACGAT	GTCAACTAGT	TGTTGGGGAT	TCATTTTCCTT	

		810	820	830	840	850
						
RBF	AGTAACGTAG	CTAACGCGTG	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGTCGCAA	
TBB	AGTAACGTAG	CTAACGCGTG	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGTCGCAA	
TTB	AGTAACGTAG	CTAACGCGTG	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGTCGCAA	
REB	AGTAACGTAG	CTAACGCGTG	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGTCGCAA	
REC	AGTAACGTAG	CTAACGCGTG	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGTCGCAA	
TEC	AGTAACGTAG	CTAACGCGTG	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGTCGCAA	
EU214612.1	AGTAACGTAG	CTAACGCGTG	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT	ACGGTCGCAA	

	860	870	880	890	900
					
RBF	GATTAAAACT	CAAAGGAATT	GACGGGGACC	CGCACAAAGCG	GTGGATGATG
TBB	GATTAAAACT	CAAAGGAATT	GACGGGGACC	CGCACAAAGCG	GTGGATGATG
TTB	GATTAAAACT	CAAAGGAATT	GACGGGGACC	CGCACAAAGCG	GTGGATGATG
REB	GATTAAAACT	CAAAGGAATT	GACGGGGACC	CGCACAAAGCG	GTGGATGATG
REC	GATTAAAACT	CAAAGGAATT	GACGGGGACC	CGCACAAAGCG	GTGGATGATG
TEC	GATTAAAACT	CAAAGGAATT	GACGGGGACC	CGCACAAAGCG	GTGGATGATG
EU214612.1	GATTAAAACT	CAAAGGAATT	GACGGGGACC	CGCACAAAGCG	GTGGATGATG

	910	920	930	940	950
					
RBF	TGGATTAATT	CGATGCAACG	CGAAAAACCT	TACCTACCCT	TGACATGGTC
TBB	TGGATTAATT	CGATGCAACG	CGAAAAACCT	TACCTACCCT	TGACATGGTC
TTB	TGGATTAATT	CGATGCAACG	CGAAAAACCT	TACCTACCCT	TGACATGGTC
REB	TGGATTAATT	CGATGCAACG	CGAAAAACCT	TACCTACCCT	TGACATGGTC
REC	TGGATTAATT	CGATGCAACG	CGAAAAACCT	TACCTACCCT	TGACATGGTC
TEC	TGGATTAATT	CGATGCAACG	CGAAAAACCT	TACCTACCCT	TGACATGGTC
EU214612.1	TGGATTAATT	CGATGCAACG	CGAAAAACCT	TACCTACCCT	TGACATGGTC

	960	970	980	990	1000
					
RBF	GGAATCCCGC	TGAGAGGTGG	GAGTGCTCGA	AAGAGAACCG	GCGCACAGGT
TBB	GGAATCCCGC	TGAGAGGTGG	GAGTGCTCGA	AAGAGAACCG	GCGCACAGGT
TTB	GGAATCCCGC	TGAGAGGTGG	GAGTGCTCGA	AAGAGAACCG	GCGCACAGGT
REB	GGAATCCCGC	TGAGAGGTGG	GAGTGCTCGA	AAGAGAACCG	GCGCACAGGT
REC	GGAATCCCGC	TGAGAGGTGG	GAGTGCTCGA	AAGAGAACCG	GCGCACAGGT
TEC	GGAATCCCGC	TGAGAGGTGG	GAGTGCTCGA	AAGAGAACCG	GCGCACAGGT
EU214612.1	GGAATCCCGC	TGAGAGGTGG	GAGTGCTCGA	AAGAGAACCG	GCGCACAGGT

	1010	1020	1030	1040	1050
					
RBF	GCTGCATGGC	TGTCGTCAGC	TCGTGTCGTG	AGATGTTGGG	TTAAGTCCCCG
TBB	GCTGCATGGC	TGTCGTCAGC	TCGTGTCGTG	AGATGTTGGG	TTAAGTCCCCG
TTB	GCTGCATGGC	TGTCGTCAGC	TCGTGTCGTG	AGATGTTGGG	TTAAGTCCCCG
REB	GCTGCATGGC	TGTCGTCAGC	TCGTGTCGTG	AGATGTTGGG	TTAAGTCCCCG
REC	GCTGCATGGC	TGTCGTCAGC	TCGTGTCGTG	AGATGTTGGG	TTAAGTCCCCG
TEC	GCTGCATGGC	TGTCGTCAGC	TCGTGTCGTG	AGATGTTGGG	TTAAGTCCCCG
EU214612.1	GCTGCATGGC	TGTCGTCAGC	TCGTGTCGTG	AGATGTTGGG	TTAAGTCCCCG

	1060	1070	1080	1090	1100
					
RBF	CAACGAG-CG	CAACCCTTGT	CCTTAGTTGC	TACGCAAGAG	CACTCTAAGG
TBB	CAACGAG-CG	CAACCCTTGT	CCTTAGTTGC	TACGCAAGAG	CACTCTAAGG
TTB	CAACGAG-CG	CAACCCTTGT	CCTTAGTTGC	TACGCAAGAG	CACTCTAAGG
REB	CAACGAG-CG	CAACCCTTGT	CCTTAGTTGC	TACGCAAGAG	CACTCTAAGG
REC	CAACGAG-CG	CAACCCTTGT	CCTTAGTTGC	TACGCAAGAG	CACTCTAAGG
TEC	CAACGAG-CG	CAACCCTTGT	CCTTAGTTGC	TACGCAAGAG	CACTCTAAGG
EU214612.1	CAACGAG-CG	CAACCCTTGT	CCTTAGTTGC	TACGCAAGAG	CACTCTAAGG

	1110	1120	1130	1140	1150
					
RBF	AGACTGCCGG	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCCTCA
TBB	AGACTGCCGG	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCCTCA
TTB	AGACTGCCGG	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCCTCA
REB	AGACTGCCGG	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCCTCA
REC	AGACTGCCGG	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCCTCA
TEC	AGACTGCCGG	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCCTCA
EU214612.1	AGACTGCCGG	TGACAAACCG	GAGGAAGGTG	GGGATGACGT	CAAGTCCTCA

		1160	1170	1180	1190	1200
						
RBF	TGGCCCTTAT	GGTTAGGGCT	TCACACGTCA	TACAATGGTC	GGAACAGAGG	
TBB	TGGCCCTTAT	GGTTAGGGCT	TCACACGTCA	TACAATGGTC	GGAACAGAGG	
TTB	TGGCCCTTAT	GGTTAGGGCT	TCACACGTCA	TACAATGGTC	GGAACAGAGG	
REB	TGGCCCTTAT	GGTTAGGGCT	TCACACGTCA	TACAATGGTC	GGAACAGAGG	
REC	TGGCCCTTAT	GGTTAGGGCT	TCACACGTCA	TACAATGGTC	GGAACAGAGG	
TEC	TGGCCCTTAT	GGTTAGGGCT	TCACACGTCA	TACAATGGTC	GGAACAGAGG	
EU214612.1	TGGCCCTTAT	GGTTAGGGCT	TCACACGTCA	TACAATGGTC	GGAACAGAGG	

		1210	1220	1230	1240	1250
						
RBF	GTTGCCAACC	CGCGAGGGGG	AGCTAATCCC	AGAAAACCGA	TCGTAGTCCG	
TBB	GTTGCCAACC	CGCGAGGGGG	AGCTAATCCC	AGAAAACCGA	TCGTAGTCCG	
TTB	GTTGCCAACC	CGCGAGGGGG	AGCTAATCCC	AGAAAACCGA	TCGTAGTCCG	
REB	GTTGCCAACC	CGCGAGGGGG	AGCTAATCCC	AGAAAACCGA	TCGTAGTCCG	
REC	GTTGCCAACC	CGCGAGGGGG	AGCTAATCCC	AGAAAACCGA	TCGTAGTCCG	
TEC	GTTGCCAACC	CGCGAGGGGG	AGCTAATCCC	AGAAAACCGA	TCGTAGTCCG	
EU214612.1	GTTGCCAACC	CGCGAGGGGG	AGCTAATCCC	AGAAAACCGA	TCGTAGTCCG	

		1260	1270	1280	1290	1300
						
RBF	GATTGCACTC	TGCAACTCGA	GTGCATGAAG	CTGGAATCGC	TAGTAATCGC	
TBB	GATTGCACTC	TGCAACTCGA	GTGCATGAAG	CTGGAATCGC	TAGTAATCGC	
TTB	GATTGCACTC	TGCAACTCGA	GTGCATGAAG	CTGGAATCGC	TAGTAATCGC	
REB	GATTGCACTC	TGCAACTCGA	GTGCATGAAG	CTGGAATCGC	TAGTAATCGC	
REC	GATTGCACTC	TGCAACTCGA	GTGCATGAAG	CTGGAATCGC	TAGTAATCGC	
TEC	GATTGCACTC	TGCAACTCGA	GTGCATGAAG	CTGGAATCGC	TAGTAATCGC	
EU214612.1	GATTGCACTC	TGCAACTCGA	GTGCATGAAG	CTGGAATCGC	TAGTAATCGC	

ANEXO A.3 – Sequências alinhadas das cepas RBD e EU231628.1, identificadas como *Bacillus cereus*.

	10	20	30	40	50
RBD					
	AACGCTGGCG	GCGTGC-TAA	TACATGCAAG	TCGAGCGAAT	GGATTAAGAG
EU231628.1	AACGCTGGCG	GCGTGCCTAA	TACATGCAAG	TCGAGCGAAT	GGATTAAGAG
	60	70	80	90	100
RBD					
	CTTGCTCTTA	TGAAGTTAGC	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC
EU231628.1	CTTGCTCTTA	TGAAGTTAGC	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC
	110	120	130	140	150
RBD					
	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA	CTCCGGGAAA	CCGGGGCTAA	TACCGGATAA
EU231628.1	TGCCCATAAG	ACTGGGATAA	CTCCGGGAAA	CCGGGGCTAA	TACCGGATAA
	160	170	180	190	200
RBD					
	CTATTTTGAA	CCGCATGGTT	CGAAATTGAA	AGGCGGCTTC	GGCTGTCACT
EU231628.1	C-ATTTTGAA	CCGCATGGTT	CGAAATTGAA	AGGCGGCTTC	GGCTGTCACT
	210	220	230	240	250
RBD					
	TATGGATGGA	CCCGCGTCGC	ATTAGCTAGT	TGGTGAGGTA	ACGGCTCACC
EU231628.1	TATGGATGGA	CCCGCGTCGC	ATTAGCTAGT	TGGTGAGGTA	ACGGCTCACC
	260	270	280	290	300
RBD					
	AAGGCAACGA	TGCGTAGCCG	ACCTGAGAGG	GTGATCGGCC	ACACTGGGAC
EU231628.1	AAGGCAACGA	TGCGTAGCCG	ACCTGAGAGG	GTGATCGGCC	ACACTGGGAC
	310	320	330	340	350
RBD					
	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTAGGG	AATCTTCCGC
EU231628.1	TGAGACACGG	CCCAGACTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTAGGG	AATCTTCCGC
	360	370	380	390	400
RBD					
	AATGGACGAA	AGTCTGACGG	AGCAACGCCG	CGTGAGTGAT	GAAGGCCTTC
EU231628.1	AATGGACGAA	AGTCTGACGG	AGCAACGCCG	CGTGAGTGAT	GAAGGCCTTC
	410	420	430	440	450
RBD					
	GGGTCGTAAA	ACTCTGTTGT	TAGGGAAGAA	CAAGTGCTAG	TTGAATAAGC
EU231628.1	GGGTCGTAAA	ACTCTGTTGT	TAGGGAAGAA	CAAGTGCTAG	TTGAATAAGC
	460	470	480	490	500
RBD					
	TGGCACCTTG	ACGGTACCTA	ACCAGAAAGC	CACGGCTAAC	TACGTGCCAG
EU231628.1	TGGCACCTTG	ACGGTACCTA	ACCAGAAAGC	CACGGCTAAC	TACGTGCCAG
	510	520	530	540	550
RBD					
	CAGCCGCGGT	AATACGTAGG	TGGCAAGCGT	TATCCGGAAT	TATTGGGCGT
EU231628.1	CAGCCGCGGT	AATACGTAGG	TGGCAAGCGT	TATCCGGAAT	TATTGGGCGT

	560	570	580	590	600
RBD					
EU231628.1	AAAGCGCGCG	CAGGTGGTTT	CTTAAGTCTG	ATGTGAAAGC	CCACGGCTCA
	610	620	630	640	650
RBD					
EU231628.1	ACCGTGGAGG	GTCATTGGAA	ACTGGGAGAC	TTGAGTGCAG	AAGAGGAAAG
	660	670	680	690	700
RBD					
EU231628.1	TGGAATTCCA	TGTGTAGCGG	TGAAATGCGT	AGAGATATTG	GAGGAACACC
	710	720	730	740	750
RBD					
EU231628.1	AGTGGCGAAA	GGCGACTTTC	TGGTCTGTAA	CTGACACTGA	GGCGCGAAAG
	760	770	780	790	800
RBD					
EU231628.1	CGTGGGGAGC	AAACAGGATT	AGATACCCTG	GTAGTCCACG	CCGTAAACGA
	810	820	830	840	850
RBD					
EU231628.1	TGAGTGCTAA	GTGTTAGAGG	GTTTCCGCCC	TTTAGTGCTG	AAGTTAACGC
	860	870	880	890	900
RBD					
EU231628.1	ATTAAGCACT	CCGCCTGGGG	AGTACGGCCG	CAAGGCTGAA	ACTCAAAGGA
	910	920	930	940	950
RBD					
EU231628.1	ATTGACGGGG	GCCCGCACAA	GCGGTGGAGC	ATGTGGTTTA	ATTCGAAGCA
	960	970	980	990	1000
RBD					
EU231628.1	ACGCGAAGAA	CCTTACCAGG	TCTTGACATC	CTCTGACAAC	CCTAGAGATA
	1010	1020	1030	1040	1050
RBD					
EU231628.1	GGGCTTCTCC	TTCGGGAGCA	GAGTGACAGG	TGGTGATGG	TTGTCGTCAG
	1060	1070	1080	1090	1100
RBD					
EU231628.1	CTCGTGTCGT	GAGATGTTGG	GTTAAGTCCC	GCAACGAGCG	CAACCCTTGA
	1110	1120	1130	1140	1150
RBD					
EU231628.1	TCTTAGTTGC	CATCATTAAG	TTGGGCACTC	TAAGGTGACT	GCCGGTGACA

		1160	1170	1180	1190	1200
						
RBD		AACCGGAGGA	AGGTGGGGAT	GACGTCAAAT	CATCATGCCC	CTTATGACCT
EU231628.1		AACCGGAGGA	AGGTGGGGAT	GACGTCAAAT	CATCATGCCC	CTTATGACCT
		1210	1220	1230	1240	1250
						
RBD		GGGCTACACA	CGTGCTACAA	TGGACGGTAC	AAAGAGCTGC	AAGACCGCGA
EU231628.1		GGGCTACACA	CGTGCTACAA	TGGACGGTAC	AAAGAGC~GC	AAGACCGCGA
		1260	1270	1280	1290	1300
						
RBD		GGTGGAGCTA	ATCTCATAAA	ACCGTTCTCA	GTTTCGGATTG	TAGGCTGCAA
EU231628.1		GGTGGAGCTA	ATCTCATAAA	ACCGTTCTCA	GTTTCGGATTG	TAGGCTGCAA
		1310	1320	1330		
						
RBD		CTCGCCTACA	TGAAGCTG-A	ATCGCTA-TA	ATCGCG	
EU231628.1		CTCGCCTACA	TGAAGCTGGA	ATCGCTAGTA	ATCGCG	

ANEXO A.4 – Sequências alinhadas das cepas RBE e AJ306833.1, identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia*.

	10	20	30	40	50
RBE					
AJ306833.1	ACGCTGGCGG	TAGGC-TAAC	ACATGCA-GT	CGAACGGCAG	CACAGAGGAG
	60	70	80	90	100
RBE					
AJ306833.1	CTTGCTCCTT	GGGTGGCGAG	TGGCGGACGG	GTGAGGAATA	CATCGGAATC
	110	120	130	140	150
RBE					
AJ306833.1	TACTCTGTCG	TGGGGGATAA	CGTAGGGA	CTTACGCTAA	TACCGCATAC
	160	170	180	190	200
RBE					
AJ306833.1	GACCTACGGG	TGAAAGCAGG	GGATCTTCGG	ACCTTGCGCG	ATTGAATGAG
	210	220	230	240	250
RBE					
AJ306833.1	CCGATGTCGG	ATTAGCTAGT	TGGCGGGGTA	AAGGCCAC	AAGGCGACGA
	260	270	280	290	300
RBE					
AJ306833.1	TCCGTAGCTG	GTCTGAGAGG	ATGATCAGCC	ACACTGGAAC	TGAGACACGG
	310	320	330	340	350
RBE					
AJ306833.1	TCCGAGACTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG	AATATTGGAC	AATGGGCGCA
	360	370	380	390	400
RBE					
AJ306833.1	AGCCTGATCC	AGCCATACCG	CGTGGGTGAA	GAAGGCCTTC	GGGTTGTAAA
	410	420	430	440	450
RBE					
AJ306833.1	GCCCTTTTGT	TGGGAAAGAA	ATCCAGCTGG	CTAATACCCG	GTTGGGATGA
	460	470	480	490	500
RBE					
AJ306833.1	CGGTACCCAA	AGAATAAGCA	CCGGCTAACT	TCGTGCCAGC	AGCCGCGGTA
	510	520	530	540	550
RBE					
AJ306833.1	ATACGAAGGG	TGCAAGCGTT	ACTCGGAATT	ACTGGGCGTA	AAGCGTGCGT

	560	570	580	590	600
RBE					
AJ306833.1	AGGTGGTCGT	TTAAGTCCGT	TGTGAAAGCC	CTGGGCTCAA	CCTGGGAAC
	610	620	630	640	650
RBE					
AJ306833.1	GCAGTGGATA	CTGGACGACT	AGAGTGTGGT	AGAGGGTAGC	GGAATTCCTG
	660	670	680	690	700
RBE					
AJ306833.1	GTGTAGCAGT	GAAATGCGTA	GAGATCAGGA	GGAACATCCA	TGGCGAAGGC
	710	720	730	740	750
RBE					
AJ306833.1	AGCTACCTGG	ACCAACACTG	ACACTGAGGC	ACGAAAGCGT	GGGGAGCAAA
	760	770	780	790	800
RBE					
AJ306833.1	CAGGATTAGA	TACCTGGTA	GTCCACGCCC	TAAACGATGC	GAAC
	810	820	830	840	850
RBE					
AJ306833.1	TTGGGTGCAA	TTTGGCACGC	AGTATCGAAG	CTAACGCGTT	AAGTTCGCCG
	860	870	880	890	900
RBE					
AJ306833.1	CCTGGGGAGT	ACGGTCGCAA	GACTGAAACT	CAAAGGAATT	GACGGGGGCC
	910	920	930	940	950
RBE					
AJ306833.1	CGCACAAGCG	GTGGAGTATG	TGGTTTAATT	CGATGCAACG	CGAAGAACCT
	960	970	980	990	1000
RBE					
AJ306833.1	TACCTGGCCT	TGACATGTCG	AGAACTTTCC	AGAGATGGAT	TGGTGCCTTC
	1010	1020	1030	1040	1050
RBE					
AJ306833.1	GGGAACTCGA	ACACAGGTGC	TGCATGGCTG	TCGTCAGCTC	GTGTCGTGAG
	1060	1070	1080	1090	1100
RBE					
AJ306833.1	ATGTTGGGTT	AAGTCCCGCA	ACGAGCGCAA	CCCTTGTCTC	TAGTTGCCAG
	1110	1120	1130	1140	1150
RBE					
AJ306833.1	CACGTAATGG	TGGGAACTCT	AAGGAGACCG	CCGGTGACAA	ACCGGAGGAA

		1160	1170	1180	1190	1200
						
RBE		GGTGGGGATG	ACGTCAAGTC	ATCATGGCCC	TTACGGCCAG	GGCTACACAC
AJ306833.1		GGTGGGGATG	ACGTCAAGTC	ATCATGGCCC	TTACGGCCAG	GGCTACACAC
		1210	1220	1230	1240	1250
						
RBE		GTACTACAAT	GGTAGGGACA	GAGGGCTGCA	AGCCGGCGAC	GGTAAGCCAA
AJ306833.1		GTACTACAAT	GGTAGGGACA	GAGGGCTGCA	AGCCGGCGAC	GGTAAGCCAA
		1260	1270	1280	1290	1300
						
RBE		TCCCAGAAAC	CCTATCTCAG	TCCGGATTGG	AGTCTGCAAC	TCGACTCCAT
AJ306833.1		TCCCAGAAAC	CCTATCTCAG	TCCGGATTGG	AGTCTGCAAC	TCGACTCCAT
		1310	1320	1330	1340	
						.
RBE		GAAGTCG-AA	TCGCTAGTAA	TCGCAGATCA	GCAT-GCTGC	G
AJ306833.1		GAAGTCGGAA	TCGCTAGTAA	TCGCAGATCA	GCATTGCTGC	G

ANEXO A.5 – Sequências alinhadas das cepas RTC e EU162036.1, identificadas como *Enterobacter* sp.

	10	20	30	40	50
RTC					
EU162036.1	GTGAGTAATG	TCTGGGAGAC	TGCCTGATGG	AGGGGGATAA	CTACTGGAAA
	60	70	80	90	100
RTC					
EU162036.1	CGGTTGCTAA	TACCGCATAA	CGTCGCACGA	CCAAAGAGGG	GGACCTTCGG
	110	120	130	140	150
RTC					
EU162036.1	GCCTCTTGCC	ATCGGATGTG	CCCAGATGGG	ATTAGCTAGT	AGGTGGGGTA
	160	170	180	190	200
RTC					
EU162036.1	ACGGCTCACC	TAGGCGACGA	TCCCTAGCTG	GTCTGAGAGG	ATGACCAGCC
	210	220	230	240	250
RTC					
EU162036.1	ACACTGGAAC	TGAGACACGG	TCCAGACTCC	TACGGGAGGC	AGCAGTGGGG
	260	270	280	290	300
RTC					
EU162036.1	AATATTGCAC	AATGGGCGCA	AGCCTGATGC	AGCCATGCCG	CGTGTATGAA
	310	320	330	340	350
RTC					
EU162036.1	GAAGGCCTTC	GGGTTGTAAA	GTACTTTCAG	CGGGGAGGAA	GGCGACAGGG
	360	370	380	390	400
RTC					
EU162036.1	TTAATAACCC	TGTCGATTGA	CGTTACCCGC	AGAAGAAGCA	CCGGCTAACT
	410	420	430	440	450
RTC					
EU162036.1	CCGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	ATACGGAGGG	TGCAAGCGTT	AATCGGAATT
	460	470	480	490	500
RTC					
EU162036.1	ACTGGGCGTA	AAGCGCACGC	AGGCGGTCTG	TCAAGTCGGA	TGTGAAATCC
	510	520	530	540	550
RTC					
EU162036.1	CCGGGCTCAA	CCTGGGAACT	GCATTTCGAA	CTGGCAGGCT	AGAGTCTTGT

	560	570	580	590	600
RTC					
EU162036.1	AGAGGGGGGT	AGAATTCAG	GTGTAC-GGT	GAAATGCCGT	AGAGATCTGG
	610	620	630	640	650
RTC					
EU162036.1	GAGGAATACC	GGGTGGGCGA	AGGCGGCCCC	CTGGACAAAG	ACTGACGCTC
	-AGGAATACC	GG--TGGCGA	AGGCGGCCCC	CTGGACAAAG	ACTGACGCTC
	660	670	680	690	700
RTC					
EU162036.1	AGGTGCCGAAA	GCGTGGGGAG	CAAACAGGAT	TAGATACCCT	GGTAGTCCAC
	AGGTGCCGAAA	GCGTGGGGAG	CAAACAGGAT	TAGATACCCT	GGTAGTCCAC
	710	720	730	740	750
RTC					
EU162036.1	GCCGTAAACG	ATGTCGACTT	GGAGGTTGTG	CCCTTGAGGC	GTGGCTTCCG
	GCCGTAAACG	ATGTCGACTT	GGAGGTTGTG	CCCTTGAGGC	GTGGCTTCCG
	760	770	780	790	800
RTC					
EU162036.1	GAGCTAACGC	GTTAAGTCGA	CCGCCTGGGG	AGTACGGCCG	CAAGGTTAAA
	GAGCTAACGC	GTTAAGTCGA	CCGCCTGGGG	AGTACGGCCG	CAAGGTTAAA
	810	820	830	840	850
RTC					
EU162036.1	ACTCAAATGA	ATTGACGGGG	GCCCGCACAA	GCGGTGGAGC	ATGTGGTTTA
	ACTCAAATGA	ATTGACGGGG	GCCCGCACAA	GCGGTGGAGC	ATGTGGTTTA
	860	870	880	890	900
RTC					
EU162036.1	ATTCGATGCA	ACGCGAAGAA	CCTTACCTAC	TCTTGACATC	CAGAGAACTT
	ATTCGATGCA	ACGCGAAGAA	CCTTACCTAC	TCTTGACATC	CAGAGAACTT
	910	920	930	940	950
RTC					
EU162036.1	AGCAGAGATG	CTTTGGTGCC	TTCGGGAAC	CTGAGACAGG	TGCTGCATGG
	AGCAGAGATG	CTTTGGTGCC	TTCGGGAAC	CTGAGACAGG	TGCTGCATGG
	960	970	980	990	1000
RTC					
EU162036.1	CTGTCGTCAG	CTCGTGTTGT	GAAATGTTGG	GTTAAGTCCC	GCAACGAGCG
	CTGTCGTCAG	CTCGTGTTGT	GAAATGTTGG	GTTAAGTCCC	GCAACGAGCG
	1010	1020	1030	1040	1050
RTC					
EU162036.1	CAACCCCTTAT	CCTTTGTTGC	CAGCGGTTTCG	GCCGGGAAC	CAAAGGAGAC
	CAACCCCTTAT	CCTTTGTTGC	CAGCGGTTTCG	GCCGGGAAC	CAAAGGAGAC
	1060	1070	1080	1090	1100
RTC					
EU162036.1	TGCCAGTGAT	AAACTGGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAAG	TCATCATGGC
	TGCCAGTGAT	AAACTGGAGG	AAGGTGGGGA	TGACGTCAAG	TCATCATGGC
	1110	1120	1130	1140	1150
RTC					
EU162036.1	CCTTACGATT	AGGGCTACAC	ACGTGCTACA	ATGGCGCATA	CAAAGAGAGA
	CCTTACGAGT	AGGGCTACAC	ACGTGCTACA	ATGGCGCATA	CAAAGAGA-A

		1160	1170	1180	1190
					
RTC	GCGACCTCTC	GAGATGCAAG	CGGACCTCAT	AAAGTACGTC	GTA
EU162036.1	GCGACCTCGC	GAGA-GCAAG	CGGACCTCAT	AAAGTGCCTC	GTA

ANEXO A.6 – Sequências alinhadas das cepas RXB e AY561845.1, identificadas como *Burkholderia tropicalis*.

	10	20	30	40	50
RXB					
AY561845.1	GGCGGC-TGC	CTTACACATG	CAAGTCGAAC	GGCAGCACGG	GTGCTTGCCAC
	60	70	80	90	100
RXB					
AY561845.1	CTGGTGGCGA	GTGGCGAACG	GGTGAGTAAT	ACATCGGAAC	GTGTCCTGTA
	110	120	130	140	150
RXB					
AY561845.1	GTGGGGGATA	GCCCGGCGAA	AGCCGGATTA	ATACCGCATA	CGATCTACGG
	160	170	180	190	200
RXB					
AY561845.1	ATGAAAAGCGG	GGGATCTTCG	GACCTCGCGC	TATAGGGGCG	GCCGATGGCG
	210	220	230	240	250
RXB					
AY561845.1	GATTAGCTAG	TTGGTGAGGT	AAAGGCTCAC	CAAGGCGACG	ATCCGTAGCT
	260	270	280	290	300
RXB					
AY561845.1	GGTCTGAGAG	GACGACCAGC	CACACTGGGA	CTGAGACACG	GCCCAGACTC
	310	320	330	340	350
RXB					
AY561845.1	CTACGGGAGG	CAGCAGTGG-	GGAATTTTGG	ACAATGGGCG	AAAGCCTGAT
	360	370	380	390	400
RXB					
AY561845.1	CCAGCAATGC	CGCGTGTTGT	AAGAAGGCCT	TCGGGTTGTA	AAGCACTTTT
	410	420	430	440	450
RXB					
AY561845.1	GTCCGGAAAAG	AAATCCCTGG	TCCTAATATG	GCCGGGGGAT	GACGGTACCG
	460	470	480	490	500
RXB					
AY561845.1	GAAGAATAAG	CACCGGCTAA	CTACGTGCCA	GCAGCCGCGG	TAATACGTAG

	510	520	530	540	550
RXB					
AY561845.1	GGTGCAAGCG	TTAATCGGAA	TTACTGGGCG	TAAAGCGTGC	GCAGGCGGTTG
	560	570	580	590	600
RXB					
AY561845.1	ATGTAAGACC	GATGTGAAAT	CCCCGGGCTC	AACCTGGGAA	CTGCATTGGT
	610	620	630	640	650
RXB					
AY561845.1	GACTGCATCG	CTTGAGTATG	GCAGAGGGGG	GTAGAATTCC	ACGTGTAGCA
	660	670	680	690	700
RXB					
AY561845.1	GTGAAATGCG	TAGAGATGTG	GAGGAATACC	GATGGCGAAG	GCAGCCCCCT
	710	720	730	740	750
RXB					
AY561845.1	GGGTCAATAC	TGACGCTCAT	GCACGAAAGC	GTGGGGAGCA	AACAGGATTA
	760	770	780	790	800
RXB					
AY561845.1	GATACCCTGG	TAGTCCACGC	CCTAAACGAT	GTCAACTGGT	TGTCGGGTCT
	810	820	830	840	850
RXB					
AY561845.1	TCATTGACTT	GGTAACGTAG	CTAACGCGTG	AAGTTGACCG	CCTGGGGAGT
	860	870	880	890	900
RXB					
AY561845.1	ACGGTCGCAA	GATTAAACT	CAAAGGAATT	GACGGGGACC	CGCACAAGCG
	910	920	930	940	950
RXB					
AY561845.1	GTGGATGATG	TGGATTAATT	CGATGCAACG	CGAAAAACCT	TACCTACCCT
	960	970	980	990	1000
RXB					
AY561845.1	TGACATGTAC	GGAATCCTGC	TGAGAGGCGG	GAGTGCCCGA	AAGGGAGCCG
	1010	1020	1030	1040	1050
RXB					
AY561845.1	TAACACAGGT	GCTGCATGGC	TGTCGTCAGC	TCGTGTCGTG	AGATGTTGGG
	1060	1070	1080	1090	1100
RXB					
AY561845.1	TTAAGTCCCG	CAACGAGCGC	AACCCTTGTC	CCTAGTTGCT	ACGCAAGAGC

		1110	1120	1130	1140	1150
						
RXB	ACTCCAGGGA	GACTGCCGGT	GACAAACCGG	AGGAAGGTGG	GGATGACGTC	
AY561845.1	ACTCCAGGGA	GACTGCCGGT	GACAAACCGG	AGGAAGGTGG	GGATGACGTC	
		1160	1170	1180	1190	1200
						
RXB	AAGTCCTCAT	GGCCCTTATG	GGTAGGGCTT	CACACGTCAT	ACAATGGTCG	
AY561845.1	AAGTCCTCAT	GGCCCTTATG	GGTAGGGCTT	CACACGTCAT	ACAATGGTCG	
		1210	1220	1230	1240	1250
						
RXB	GAACAGAGGG	TTGCCAAGCC	GCGAGGTGGA	GCCAATCCCA	GAAAACCGAT	
AY561845.1	GAACAGAGGG	TTGCCAAGCC	GCGAGGTGGA	GCCAATCCCA	GAAAACCGAT	
		1260	1270	1280	1290	1300
						
RXB	CGTAGTCCGG	ATCGCAGTCT	GCAACTCGAC	TGCGTGAAGC	TGGAATCGCT	
AY561845.1	CGTAGTCCGG	ATCGCAGTCT	GCAACTCGAC	TGCGTGAAGC	TGGAATCGCT	
		1310	1320			
						
RXB	AGTAATCGCG	GATCAGCATG	CCGCG			
AY561845.1	AGTAATCGCG	GATCAGCATG	CCGCG			

ANEXO A.7 – Sequências alinhadas das cepas RXC e AY561845.1, identificadas como *Beta Proteobactéria* não cultivável.

		10	20	30	40	50
RXC		GGGGGATCGC	AAGACCTCAT	GCTCGTGGAG	CGGCCGATAT	CTGATTAGCT
DQ248255.1		GGGGGACCGC	AAGGCCTCAC	GCTCGTGGAG	CGGCCGATAT	CTGATTAGCT
		60	70	80	90	100
RXC		AGTTGGTGGG	GTAAAAGCCT	ACCAAGGCAT	CGATCAGTAG	CTGGTCTGAG
DQ248255.1		AGTTGGTGGG	GTAAAAGCCT	ACCAAGCCTT	CGATCAGTAG	CTGGTCTGAG
		110	120	130	140	150
RXC		AGGACGACCA	GCCACACTGG	GACTGAGACA	CGGCCCCAGAC	TCCTACGGGA
DQ248255.1		AGGACGACCA	GCCACACTGG	GACTGAGACA	CGGCCCCAGAC	TCCTACGGGA
		160	170	180	190	200
RXC		GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA	TCCAGCAATG
DQ248255.1		GGCAGCAGTG	GGGAATTTTG	GACAATGGGG	GCAACCCTGA	TCCAGCAATG
		210	220	230	240	250
RXC		CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT	TGTCAGGGAA
DQ248255.1		CCGCGTGAGT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	AAAGCTCTTT	TGTCAGGGAA
		260	270	280	290	300
RXC		GAAACGGTCC	GGGCTAATAT	CCTGGGCTAA	TGACGGTACC	TGAAGAATAA
DQ248255.1		GAAACGGTGC	GGGCCAATAC	CCTGTGCTAA	TGACGGTACC	TGAAGAATAA
		310	320	330	340	350
RXC		GCACCGGCTA	ACTACGTGCC	AGCAGCCGCG	GTAATACGTA	GGGTGCAAGC
DQ248255.1		GCACCGGCTA	ACTACGTGCC	AGCAGCCGCG	GTAATACGTA	GGGTGCAAGC
		360	370	380	390	400
RXC		GTTAATCGGA	ATTACTGGGC	GTAAAGCGTG	CGCAGGCGGT	TGTGCAAGAC
DQ248255.1		GTTAATCGGA	ATTACTGGGC	GTAAAGCGTG	CGCAGGCGGT	TGTGCAAGAC
		410	420	430	440	450
RXC		AGATGTGAAA	TCCCCGGGCT	TAACCTGGGA	ATTGCATTTG	TGACTGCACG
DQ248255.1		AGATGTGAAA	TCCCCGGGCT	TAACCTGGGA	ATTGCATTTG	TGACTGCACG
		460	470	480	490	500
RXC		GCTAGAGTGT	GTCAGAGGGG	GGTAGAATTC	CACGTGTAGC	AGTGAAATGC
DQ248255.1		GCTAGAGTGT	GTCAGAGGGG	GGTAGAATTC	CACGTGTAGC	AGTGAAATGC
		510	520	530	540	550
RXC		GTAGAGATGT	GG-AGGAATA	CCGATGGCGA	AGGCAGCCCC	CTGGGATAAC
DQ248255.1		GTAGAGATGT	GG-AGGAATA	CCGATGGCGA	AGGCAGCCCC	CTGGGATAAC

	560	570	580	590	600
RXC					
DQ248255.1	ACTGACGCTC	ATGCACGAAA	GCGTGGGGAG	CAAACAGGAT	TAGATACCCT
	610	620	630	640	650
RXC					
DQ248255.1	GGTAGTCCAC	GCCCTAAACG	ATGTCAACTA	GTTGTCGGGT	CTTAATTGAC
	660	670	680	690	700
RXC					
DQ248255.1	TTGGTAACGC	AGCTAACGCG	TGAAGTTGAC	CGCCTGGGGA	GTACGGTCGC
	710	720	730	740	750
RXC					
DQ248255.1	AAGATTAAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGA	CCCGCACAAAG	CGGTGGATGA
	760	770	780	790	800
RXC					
DQ248255.1	TGTGGATTAA	TTCGATGCAA	CGCGAAAAAC	CTTACCTACC	CTTGACATGG
	810	820	830	840	850
RXC					
DQ248255.1	CAGGAATCCC	TGAGAGATCA	GGGAGTGCTC	GAAAGAGAAC	CTGCACACAG
	860	870	880	890	900
RXC					
DQ248255.1	GTGCTGCATG	GCTGTCGTCA	GCTCGTGTCTG	TGAGATGTTG	GGTTAAGTCC
	910	920	930	940	950
RXC					
DQ248255.1	CGCAACGAGC	GCAACCCTTG	TCATTAGTTG	CTACGAAAGG	GCACTCTAAT
	960	970	980	990	1000
RXC					
DQ248255.1	GAGACTGCCG	GTGACAAACC	GGAGGAAGGT	GGGGATGACG	TCAAGTCCTC
	1010				
RXC		...			
DQ248255.1	ATGGCCCTTA	TGG			

ANEXO B – Identificação bacteriana através da análise de ácidos graxos.

ANEXO B.1 - Identificação de ácidos graxos da cepa RBB.

RT	Respons	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percen	Comment1	Comment2
1,723	3,468E+	0,02	----	7,024	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1,993	602	0,02	----	7,568		----	< min rt	
3,829	807	0,02	1,084	10,916	Sum In Feature 2	0,35	ECL deviates 0,002	12:0 ALDE ?
4,793	3696	0,03	1,034	12,000	12:0	1,51	ECL deviates 0,000	Reference -0,005
6,175	1123	0,03	0,995	13,179	12:0 2OH	0,44	ECL deviates 0,002	
7,291	17984	0,04	0,977	14,000	14:0	6,94	ECL deviates 0,000	Reference -0,006
8,064	2316	0,04	0,968	14,504	unknown 14.502	0,89	ECL deviates 0,002	
8,829	775	0,03	0,961	15,003	15:0	----	ECL deviates 0,003	
9,164	4427	0,04	0,959	15,205	14:0 2OH	1,68	ECL deviates 0,002	
9,637	22010	0,04	0,956	15,489	Sum In Feature 2	8,31	ECL deviates 0,001	14:0 3OH/16:1 ISO I
10,185	51605	0,04	0,953	15,818	Sum In Feature 3	19,43	ECL deviates -0,004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,335	368	0,03	0,952	15,908	16:1 w5c	0,14	ECL deviates -0,001	
10,488	89477	0,04	0,951	16,000	16:0	33,63	ECL deviates 0,000	Reference -0,004
10,642	1033	0,05	----	16,089		----		
12,026	22367	0,04	0,946	16,889	17:0 CYCLO	8,36	ECL deviates 0,001	Reference -0,003
12,222	533	0,03	0,945	17,002	17:0	0,20	ECL deviates 0,002	Reference -0,002
13,543	832	0,04	----	17,750		----		
13,668	44317	0,04	0,941	17,820	18:1 w7c	16,48	ECL deviates -0,003	
13,974	1469	0,04	0,940	17,993	18:0	0,55	ECL deviates -0,007	Reference -0,009
14,758	1159	0,05	----	18,439		----		
15,119	589	0,04	0,937	18,645	19:0 ISO	0,22	ECL deviates 0,011	Reference 0,010
15,562	2397	0,05	0,936	18,896	19:0 CYCLO w8c	0,89	ECL deviates -0,006	Reference -0,006
----	22817	---	----	----	Summed Feature	8,66	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	-----	---	----	----		----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	51605	---	----	----	Summed Feature	19,43	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO

ECL Deviation: 0,004

Reference ECL Shift: 0,006

Number Reference

Peaks: 8

Total Response: 268508

Total Named: 265484

Percent Named: 98,87%

Total Amount: 253825

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,774	Serratia-marcescens-GC subgroup B
	0,770	Enterobacter-pyrrinus
	0,752	Cedecea-davisae
	0,679	Proteus-vulgaris
	0,677	Kluyvera-cryocrescens-GC subgroup B
	0,667	Serratia-rubidaea
	0,646	Morganella-morganii
	0,626	Klebsiella-pneumoniae-pneumoniae-GC subgroup A
	0,623	Salmonella-typhi-GC subgroup B (confirm with other tests)
	0,506	Enterobacter-aerogenes-GC subgroup A
	0,494	Cedecea-lapagei
	0,488	Kluyvera-ascorbata-GC subgroup A
	0,479	Salmonella-bongori
	0,469	Photobacterium-luminescens-luminescens (Xenorhabdus)

ANEXO B.2 - Identificação de ácidos graxos da cepa RBD.

RT	Respons	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percen	Comment1	Comment2
1,722	3,465E+	0,02	----	7,019	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1,826	2173	0,01	----	7,228		----	< min rt	
1,909	1643	0,03	----	7,395		----	< min rt	
1,991	760	0,03	----	7,561		----	< min rt	
4,437	791	0,02	1,062	11,610	12:0 ISO	1,30	ECL deviates 0,001	Reference -0,002
4,791	347	0,03	1,042	12,000	12:0	0,56	ECL deviates 0,000	Reference -0,003
5,491	7205	0,03	1,015	12,614	13:0 ISO	11,34	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
5,592	1280	0,03	1,012	12,702	13:0 ANTEISO	2,01	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
6,771	3581	0,03	0,982	13,618	14:0 ISO	5,45	ECL deviates -0,001	Reference -0,002
7,290	2546	0,03	0,972	14,000	14:0	3,84	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
8,245	13934	0,03	0,959	14,623	15:0 ISO	20,72	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
8,384	3983	0,04	0,957	14,713	15:0 ANTEISO	5,91	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
8,823	365	0,03	0,953	15,000	15:0	----	ECL deviates 0,000	
9,470	583	0,04	0,947	15,389	16:1 w7c alcohol	0,86	ECL deviates 0,002	
9,625	1031	0,03	0,946	15,483	Sum In Feature 2	1,51	ECL deviates 0,003	16:1 ISO I/14:0 3OH
9,862	4534	0,04	0,944	15,626	16:0 ISO	6,64	ECL deviates -0,001	Reference -0,004
10,085	462	0,03	0,943	15,760	16:1 w11c	0,68	ECL deviates 0,003	
10,250	7806	0,04	0,942	15,859	Sum In Feature 3	11,40	ECL deviates 0,007	15:0 ISO
10,485	7092	0,04	0,941	16,001	16:0	10,35	ECL deviates 0,001	Reference -0,002
11,158	1870	0,04	0,937	16,390	ISO 17:1 w10c	2,72	ECL deviates 0,002	
11,289	1741	0,04	0,937	16,466	ISO 17:1 w5c	2,53	ECL deviates 0,005	
11,427	502	0,04	0,936	16,546	17:1 ANTEISO A	0,73	ECL deviates 0,006	
11,576	6172	0,04	0,936	16,632	17:0 ISO	8,96	ECL deviates 0,002	Reference -0,001
11,735	1164	0,04	0,935	16,724	17:0 ANTEISO	1,69	ECL deviates 0,001	Reference -0,002
13,973	558	0,03	0,928	17,999	18:0	0,80	ECL deviates -0,001	Reference -0,006
----	1031	---	----	----	Summed Feature	1,51	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	-----	---	----	----	----	----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	7806	---	----	----	Summed Feature	11,40	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO

ECL Deviation: 0,003

Reference ECL Shift: 0,003

Number Reference

Peaks: 13

Total Response: 67181

Total Named: 67181

Percent Named: 100,00%

Total Amount: 64822

Library
TSBA50 5.00

Sim Index
0,568
0,428

Entry Name
Bacillus-cereus-GC subgroup B
Bacillus-cereus-GC subgroup A

ANEXO B.3 - Identificação de ácidos graxos da cepa RBE.

RT	Respons	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percen	Comment1	Comment2
1,718	3,365E+	0,02	----	7,019	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1,987	325	0,02	----	7,562		----	< min rt	
2,247	185	0,02	----	8,085		----	< min rt	
2,671	607	0,02	----	8,940		----	< min rt	
2,964	869	0,02	1,180	9,529	unknown 9.531	0,37	ECL deviates -0,002	
3,198	912	0,02	1,146	10,000	10:0	0,38	ECL deviates 0,000	Reference -0,001
3,613	8429	0,02	1,107	10,606	11:0 ISO	3,41	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
3,674	179	0,02	1,101	10,695	11:0 ANTEISO	0,07	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
4,265	409	0,03	1,063	11,422	10:0 3OH	0,16	ECL deviates 0,000	
4,608	2256	0,02	1,045	11,799	unknown 11.799	0,86	ECL deviates 0,000	
4,766	496	0,03	----	11,973		----		
4,892	4330	0,03	1,033	12,090	11:0 ISO 3OH	1,63	ECL deviates 0,001	
5,489	2126	0,03	1,014	12,613	13:0 ISO	0,79	ECL deviates -0,001	Reference -0,004
5,591	508	0,03	1,011	12,702	13:0 ANTEISO	0,19	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
6,065	310	0,03	0,998	13,100	12:0 ISO 3OH	0,11	ECL deviates 0,002	
6,550	8550	0,03	0,988	13,455	12:0 3OH	3,09	ECL deviates 0,001	
6,771	2258	0,03	0,984	13,618	14:0 ISO	0,81	ECL deviates -0,001	Reference -0,004
7,290	10501	0,03	0,976	13,999	14:0	3,74	ECL deviates -0,001	Reference -0,004
7,460	9442	0,03	0,974	14,110	13:0 ISO 3OH	3,36	ECL deviates 0,001	
7,587	891	0,04	0,972	14,193	13:0 2OH	0,32	ECL deviates -0,001	
7,929	1315	0,04	0,968	14,415	15:1 ISO F	0,46	ECL deviates 0,000	
8,250	123001	0,03	0,964	14,624	15:0 ISO	43,34	ECL deviates 0,001	Reference -0,002
8,385	28670	0,04	0,963	14,713	15:0 ANTEISO	10,09	ECL deviates 0,000	Reference -0,004
8,827	1718	0,04	0,959	15,000	15:0	----	ECL deviates 0,000	
9,867	3168	0,04	0,951	15,627	16:0 ISO	1,10	ECL deviates 0,000	Reference -0,004
10,112	4478	0,04	0,950	15,775	16:1 w9c	1,55	ECL deviates 0,001	
10,184	27466	0,04	0,949	15,818	Sum In Feature 3	9,53	ECL deviates -0,004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,486	17724	0,04	0,948	16,000	16:0	6,14	ECL deviates 0,000	Reference -0,004
11,212	5320	0,04	0,944	16,420	ISO 17:1 w9c	1,84	ECL deviates 0,004	
11,576	10374	0,04	0,943	16,630	17:0 ISO	3,57	ECL deviates 0,000	Reference -0,004
11,737	642	0,04	0,942	16,723	17:0 ANTEISO	0,22	ECL deviates 0,000	Reference -0,004
12,026	4661	0,04	0,941	16,891	17:0 CYCLO	1,60	ECL deviates 0,003	Reference -0,001
13,576	1806	0,04	0,937	17,771	18:1 w9c	0,62	ECL deviates 0,002	
13,671	1240	0,04	0,937	17,825	18:1 w7c	0,42	ECL deviates 0,002	
----	27466	----	----	----	Summed Feature	9,53	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,001

Reference ECL Shift: 0,003

Number Reference

Peaks: 15

Total Response: 282916

Total Named: 282420

Percent Named: 99,82%

Total Amount: 275276

Library

Sim Index

Entry Name

TSBA50 5.00

0,809

Stenotrophomonas-maltophilia (Xanthomonas, Pseudomonas)

ANEXO B.4 - Identificação de ácidos graxos da cepa RBF.

RT	Resp	Ar/Ht	RFa	ECL	Peak Name	Percen	Comment1	Comment2
1,718	3,35	0,02	----	7,01	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1,987	318	0,02	----	7,56		----	< min rt	
3,825	924	0,02	1,08	10,9	Sum In Feature 2	0,55	ECL deviates 0,004	12:0 ALDE ?
4,790	4364	0,03	1,03	12,0	12:0	2,46	ECL deviates 0,001	Reference -0,002
5,852	1698	0,03	1,00	12,9	13:1 AT 12-13	0,93	ECL deviates -0,005	
7,289	1499	0,03	0,97	13,9	14:0	0,79	ECL deviates -0,002	Reference -0,005
9,637	8643	0,04	0,95	15,4	Sum In Feature 2	4,47	ECL deviates 0,000	14:0 3OH/16:1 ISO I
10,184	4401	0,04	0,94	15,8	Sum In Feature 3	22,69	ECL deviates -0,004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,336	1036	0,05	0,94	15,9	16:1 w5c	0,53	ECL deviates 0,000	
10,486	4472	0,04	0,94	16,0	16:0	23,02	ECL deviates 0,000	Reference -0,004
12,027	7266	0,04	0,94	16,8	17:0 CYCLO	3,72	ECL deviates 0,003	Reference -0,001
12,304	1936	0,04	0,94	17,0	16:1 2OH	0,99	ECL deviates 0,003	
12,632	1114	0,04	0,94	17,2	16:0 2OH	0,57	ECL deviates 0,003	
13,133	7923	0,04	0,93	17,5	16:0 3OH	4,04	ECL deviates 0,001	
13,671	6195	0,04	0,93	17,8	18:1 w7c	31,53	ECL deviates 0,002	
13,838	678	0,04	0,93	17,9	18:1 w5c	0,35	ECL deviates 0,001	
13,978	2076	0,04	0,93	17,9	18:0	1,06	ECL deviates -0,001	Reference -0,006
15,564	2227	0,04	0,93	18,9	19:0 CYCLO w8c	1,13	ECL deviates -0,001	Reference -0,006
15,891	2323	0,04	0,93	19,0	18:1 2OH	1,18	ECL deviates -0,001	
----	9567	----	----	----	Summed Feature	5,02	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	----	----	----	----		----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	4401	----	----	----	Summed Feature	22,69	16:1 w7c/15 iso	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,002

Reference ECL Shift: 0,005

Number Reference

Peaks: 6

Total Response: 194401

Total Named: 194401

Percent Named: 100,00%

Total Amount: 184079

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,819	Pandoraeea-pulmonicola
	0,801	Pandoraeea-pnomenusa
	0,691	Burkholderia-cepacia-GC subgroup B (Pseudomonas cepacia)
	0,688	Burkholderia-cepacia-GC subgroup A (Pseudomonas cepacia)
	0,598	Burkholderia-pyrrocinia (Pseudomonas pyrrocinia)

ANEXO B.5 - Identificação de ácidos graxos da cepa TBB.

RT	Respo	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Perc	Comment1	Comment2
1,722	3,337	0,02	----	7,016	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1,992	576	0,02	----	7,560		----	< min rt	
3,830	369	0,02	1,103	10,917	Sum In Feature 2	0,22	ECL deviates	12:0 ALDE ?
4,794	4731	0,03	1,042	12,000	12:0	2,67	ECL deviates	Reference 0,000
5,856	537	0,03	1,003	12,933	13:1 AT 12-13	0,29	ECL deviates -	
7,290	1460	0,03	0,972	13,999	14:0	0,77	ECL deviates -	Reference -0,002
9,638	9646	0,04	0,946	15,490	Sum In Feature 2	4,93	ECL deviates	14:0 3OH/16:1 ISO I
10,186	45501	0,04	0,942	15,820	Sum In Feature 3	23,1	ECL deviates -	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,485	43741	0,04	0,941	16,000	16:0	22,2	ECL deviates	Reference -0,002
12,023	6572	0,04	0,934	16,890	17:0 CYCLO	3,32	ECL deviates	Reference 0,000
12,301	2462	0,04	0,933	17,049	16:1 2OH	1,24	ECL deviates	
12,629	1722	0,04	0,932	17,235	16:0 2OH	0,87	ECL deviates	
13,133	8987	0,04	0,931	17,521	16:0 3OH	4,52	ECL deviates	
13,669	63773	0,04	0,929	17,824	18:1 w7c	32,0	ECL deviates	
13,975	2327	0,04	0,928	17,998	18:0	1,17	ECL deviates -	Reference -0,005
15,227	547	0,04	----	18,711		----		
15,563	1942	0,04	0,924	18,903	19:0 CYCLO w8c	0,97	ECL deviates	Reference -0,002
15,892	3121	0,04	0,923	19,092	18:1 2OH	1,56	ECL deviates	
16,954	1321	0,04	----	19,704		----		
----	10015	---	----	----	Summed Feature	5,15	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	----	---	----	----		----	16:1 ISO I/14:0	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	45501	---	----	----	Summed Feature	23,1	16:1 w7c/15 iso	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,002

Reference ECL Shift: 0,002

Number Reference

Peaks: 6

Total Response: 198760

Total Named: 196892

Percent Named: 99,06%

Total Amount: 184933

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,834	Pandora-aea-pnomenusa
	0,809	Pandora-aea-pulmonicola
	0,683	Burkholderia-pyrrocinia (Pseudomonas pyrrocinia)
	0,681	Burkholderia-cepacia-GC subgroup B (Pseudomonas cepacia)
	0,663	Burkholderia-cepacia-GC subgroup A (Pseudomonas cepacia)

ANEXO B.6 - Identificação de ácidos graxos da cepa RTC.

RT	Respon	Ar/Ht	RFa	ECL	Peak Name	Percen	Comment1	Comment2
1,71	3,31E+	0,02	----	7,02	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1,82	3131	0,02	----	7,23		----	< min rt	
1,98	314	0,02	----	7,56		----	< min rt	
3,15	343	0,02	----	9,90		----		
3,82	2615	0,02	1,08	10,9	Sum In Feature 2	0,72	ECL deviates 0,001	12:0 ALDE ?
3,88	323	0,02	1,08	10,9	11:0	0,09	ECL deviates -0,001	Reference -0,001
4,79	11467	0,03	1,03	12,0	12:0	2,99	ECL deviates 0,001	Reference -0,001
5,93	6056	0,03	1,00	13,0	13:0	1,52	ECL deviates 0,002	Reference -0,001
6,60	625	0,03	----	13,4		----		
7,03	451	0,03	----	13,8		----		
7,29	27919	0,03	0,97	13,9	14:0	6,85	ECL deviates -0,001	Reference -0,004
8,01	8054	0,05	0,96	14,4	Sum In Feature 1	1,96	ECL deviates 0,003	13:0 3OH/15:1 i l/H
8,50	1138	0,03	0,96	14,7	15:1 w8c	0,28	ECL deviates 0,001	
8,82	38707	0,04	0,95	15,0	15:0	----	ECL deviates 0,000	
9,12	1248	0,04	----	15,1		----		
9,63	30451	0,04	0,95	15,4	Sum In Feature 2	7,29	ECL deviates 0,001	14:0 3OH/16:1 ISO I
10,1	46392	0,04	0,94	15,8	Sum In Feature 3	11,07	ECL deviates -0,003	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,3	1409	0,04	0,94	15,9	16:1 w5c	0,34	ECL deviates 0,004	
10,4	99615	0,04	0,94	16,0	16:0	23,73	ECL deviates 0,000	Reference -0,003
10,6	1358	0,05	----	16,0		----		
11,3	1514	0,04	0,94	16,5	15:0 3OH	0,36	ECL deviates 0,002	
11,8	1192	0,04	0,94	16,7	17:1 w8c	0,28	ECL deviates 0,002	
12,0	70843	0,04	0,94	16,8	17:0 CYCLO	16,77	ECL deviates 0,001	Reference 0,000
12,2	15084	0,04	0,94	17,0	17:0	3,57	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
13,5	1008	0,04	----	17,7		----		
13,6	84975	0,04	0,93	17,8	18:1 w7c	20,02	ECL deviates -0,003	
13,7	2907	0,04	----	17,8		----		
13,9	1278	0,04	0,93	17,9	18:0	0,30	ECL deviates -0,007	Reference -0,007
14,7	1635	0,05	----	18,4		----		
15,1	675	0,04	0,93	18,6	19:0 ISO	0,16	ECL deviates 0,012	Reference 0,013
15,5	7342	0,05	0,93	18,8	19:0 CYCLO w8c	1,72	ECL deviates -0,006	Reference -0,004
15,6	604	0,04	----	18,9		----		
----	8054	---	----	----	Summed Feature	1,96	15:1 ISO H/13:0	13:0 3OH/15:1 i l/H
----	----	---	----	----	Summed Feature	8,01	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	----	---	----	----	Summed Feature	11,07	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	46392	---	----	----	Summed Feature	11,07	16:1 w7c/15 iso	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,004

Reference ECL Shift: 0,005

Number Reference

Peaks: 10

Total Response: 428523

Total Named: 418343

Percent Named: 97,62%

Total Amount: 434873

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,695	Enterobacter-cancerogenus (Erwinia cancerogena)
	0,649	Enterobacter-hormaechei
	0,589	Salmonella-choleraesuis-choleraesuis-GC subgroup B

ANEXO B.7 - Identificação de ácidos graxos da cepa TTA.

RT	Respo	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Perce	Comment1	Comment2
1,722	3,5E+	0,02	----	7,027	SOLVENT	----	< min rt	
1,992	622	0,02	----	7,571		----	< min rt	
3,829	823	0,02	1,095	10,915	Sum In Feature	0,31	ECL deviates	12:0 ALDE ?
4,792	4676	0,02	1,038	12,000	12:0	1,67	ECL deviates	Reference -0,005
6,172	1179	0,03	0,994	13,179	12:0 2OH	0,40	ECL deviates	
7,289	21230	0,04	0,972	14,001	14:0	7,09	ECL deviates	Reference -0,005
8,061	2240	0,04	0,961	14,505	unknown 14.502	0,74	ECL deviates	
8,822	780	0,04	0,953	15,001	15:0	----	ECL deviates	
9,163	4962	0,05	0,950	15,206	14:0 2OH	1,62	ECL deviates	
9,637	25505	0,03	0,947	15,491	Sum In Feature	8,30	ECL deviates	14:0 3OH/16:1 ISO I
10,183	40176	0,04	0,943	15,819	Sum In Feature	13,03	ECL deviates -	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,332	484	0,04	0,942	15,908	16:1 w5c	0,16	ECL deviates -	
10,485	10606	0,04	0,942	16,000	16:0	34,33	ECL deviates	Reference -0,004
10,642	1530	0,06	----	16,091		----		
12,024	41820	0,04	0,936	16,889	17:0 CYCLO	13,45	ECL deviates	Reference -0,002
12,214	626	0,03	0,935	16,999	17:0	0,20	ECL deviates -	Reference -0,004
13,540	1066	0,04	----	17,748		----		
13,666	49585	0,04	0,933	17,819	18:1 w7c	15,90	ECL deviates -	
13,975	2144	0,04	0,932	17,994	18:0	0,69	ECL deviates -	Reference -0,006
14,755	1466	0,05	----	18,438		----		
15,117	805	0,05	0,931	18,644	19:0 ISO	0,26	ECL deviates	Reference 0,012
15,560	5774	0,05	0,931	18,897	19:0 CYCLO	1,85	ECL deviates -	Reference -0,004
15,675	508	0,04	----	18,962		----		
----	26329	----	----	----	Summed	8,61	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	-----	----	----	----		----	16:1 ISO I/14:0	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	40176	----	----	----	Summed	13,03	16:1 w7c/15 iso	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,004

Peaks: 8

Total Response: 312663

Percent Named: 98,54%

Reference ECL Shift: 0,006

Total Named: 308092

Total Amount: 291618

Number Reference

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,838	Escherichia-coli-GC subgroup D (DNA homology with Shigella)
	0,808	Serratia-rubidaea
	0,733	Cedecea-davisae
	0,699	Salmonella-typhi-GC subgroup A (confirm with other tests)
	0,692	Salmonella-bongori
	0,686	Enterobacter-aerogenes-GC subgroup B
	0,680	Salmonella-typhi-GC subgroup B (confirm with other tests)
	0,676	Serratia-marcescens-GC subgroup B
	0,656	Klebsiella-pneumoniae-ozaenae-GC subgroup B
	0,629	Kluyvera-ascorbata-GC subgroup B
	0,625	Morganella-morganii
	0,610	Proteus-vulgaris
	0,603	Enterobacter-gergoviae
	0,600	Klebsiella-pneumoniae-pneumoniae-GC subgroup A
	0,571	Cedecea-lapagei
	0,565	Moraxella-nonliquefaciens
	0,553	Klebsiella-oxytoca
	0,535	Escherichia-coli-GC subgroup E (DNA homology with Shigella)
	0,530	Escherichia-coli-GC subgroup B (DNA homology with Shigella)

ANEXO B.8 - Identificação de ácidos graxos da cepa TTB.

RT	Respons	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percen	Comment1	Comment2
1,722	3,483E+	0,02	----	7,016	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1,992	586	0,02	----	7,560		----	< min rt	
3,831	349	0,02	1,103	10,920	Sum In Feature 2	0,24	ECL deviates 0,006	12:0 ALDE ?
4,794	4029	0,03	1,042	12,000	12:0	2,59	ECL deviates 0,000	Reference 0,000
5,855	576	0,03	1,003	12,932	13:1 AT 12-13	0,36	ECL deviates -0,004	
7,292	1271	0,03	0,972	14,000	14:0	0,76	ECL deviates 0,000	Reference 0,000
9,638	8845	0,04	0,946	15,489	Sum In Feature 2	5,17	ECL deviates 0,001	14:0 3OH/16:1 ISO I
10,185	38652	0,04	0,942	15,818	Sum In Feature 3	22,49	ECL deviates -0,004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,487	40405	0,04	0,941	15,999	16:0	23,47	ECL deviates -0,001	Reference -0,001
12,026	6584	0,04	0,934	16,889	17:0 CYCLO	3,80	ECL deviates 0,001	Reference 0,001
12,307	1366	0,05	0,933	17,051	16:1 2OH	0,79	ECL deviates 0,003	
12,628	1050	0,04	0,932	17,233	16:0 2OH	0,60	ECL deviates 0,000	
13,133	7831	0,04	0,931	17,519	16:0 3OH	4,50	ECL deviates 0,000	
13,670	55574	0,04	0,929	17,824	18:1 w7c	31,89	ECL deviates 0,001	
13,981	1931	0,04	0,928	18,000	18:0	1,11	ECL deviates 0,000	Reference -0,001
15,563	2143	0,05	0,924	18,902	19:0 CYCLO w8c	1,22	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
15,894	1792	0,04	0,923	19,092	18:1 2OH	1,02	ECL deviates 0,003	
----	9194	---	----	----	Summed Feature	5,40	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	-----	---	----	----		----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	38652	---	----	----	Summed Feature	22,49	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,003

Reference ECL Shift: 0,001

Number Reference

Peaks: 6

Total Response: 172398

Total Named: 172398

Percent Named: 100,00%

Total Amount: 161944

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,880	Pandoraea-pulmonicola
	0,831	Pandoraea-pnomenusa
	0,704	Burkholderia-cepacia-GC subgroup A (Pseudomonas cepacia)
	0,695	Burkholderia-cepacia-GC subgroup B (Pseudomonas cepacia)
	0,597	Burkholderia-pyrrocinia (Pseudomonas pyrrocinia)

ANEXO B.9 - Identificação de ácidos graxos da cepa REB.

RT	Respons	Ar/Ht	RFac	ECL	Peak Name	Percen	Comment1	Comment2
1,71	3,372E+	0,02	----	7,01	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1,98	322	0,02	----	7,56		----	< min rt	
3,82	736	0,02	1,089	10,9	Sum In Feature 2	0,41	ECL deviates 0,004	12:0 ALDE ?
4,79	5276	0,03	1,037	12,0	12:0	2,77	ECL deviates 0,001	Reference -0,001
5,85	1343	0,03	1,003	12,9	13:1 AT 12-13	0,68	ECL deviates -0,005	
7,29	1626	0,03	0,976	13,9	14:0	0,80	ECL deviates -0,002	Reference -0,004
9,63	10471	0,04	0,953	15,4	Sum In Feature 2	5,05	ECL deviates 0,001	14:0 3OH/16:1 ISO I
10,1	48038	0,04	0,949	15,8	Sum In Feature 3	23,08	ECL deviates -0,003	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,3	815	0,04	0,948	15,9	16:1 w5c	0,39	ECL deviates 0,003	
10,4	54833	0,04	0,948	16,0	16:0	26,30	ECL deviates 0,000	Reference -0,003
12,0	6855	0,04	0,941	16,8	17:0 CYCLO	3,27	ECL deviates 0,002	Reference -0,001
12,3	1964	0,05	0,941	17,0	16:1 2OH	0,93	ECL deviates 0,001	
12,6	1350	0,04	0,940	17,2	16:0 2OH	0,64	ECL deviates 0,001	
13,1	8624	0,04	0,938	17,5	16:0 3OH	4,10	ECL deviates 0,002	
13,6	60042	0,04	0,937	17,8	18:1 w7c	28,47	ECL deviates 0,000	
13,8	693	0,04	0,937	17,9	18:1 w5c	0,33	ECL deviates 0,002	
13,9	2336	0,04	0,936	17,9	18:0	1,11	ECL deviates -0,001	Reference -0,005
15,5	1871	0,04	0,932	18,9	19:0 CYCLO w8c	0,88	ECL deviates 0,000	Reference -0,005
15,8	1677	0,05	0,931	19,0	18:1 2OH	0,79	ECL deviates 0,000	
----	11208	---	----	----	Summed Feature	5,45	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	-----	---	----	----		----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	48038	---	----	----	Summed Feature	23,08	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,002

Reference ECL Shift: 0,004

Number Reference

Peaks: 6

Total Response: 208551

Total Named: 208551

Percent Named: 100,00%

Total Amount: 197568

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,758	Burkholderia-cepacia-GC subgroup A (Pseudomonas cepacia)
	0,701	Pandoraea-apista
	0,590	Pandoraea-pulmonicola
	0,578	Burkholderia-cepacia-GC subgroup B (Pseudomonas cepacia)
	0,474	Burkholderia-gladioli-GC subgroup A (Pseudomonas gladioli)
	0,471	Pandoraea-pnomenusa

ANEXO B.10 - Identificação de ácidos graxos da cepa REC.

RT	Respons	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percen	Comment1	Comment2
1,723	3,459E+	0,02	----	7,023	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1,994	625	0,02	----	7,569		----	< min rt	
3,831	830	0,02	1,084	10,914	Sum In Feature 2	0,34	ECL deviates 0,000	12:0 ALDE ?
4,796	2933	0,03	1,034	12,000	12:0	1,13	ECL deviates 0,000	Reference -0,003
6,176	1480	0,03	0,995	13,178	12:0 2OH	0,55	ECL deviates 0,001	
7,294	17582	0,04	0,977	14,000	14:0	6,41	ECL deviates 0,000	Reference -0,004
8,066	2440	0,04	0,968	14,505	unknown 14.502	0,88	ECL deviates 0,003	
8,828	719	0,03	0,961	15,002	15:0	----	ECL deviates 0,002	
9,167	7315	0,04	0,959	15,206	14:0 2OH	2,62	ECL deviates 0,003	
9,641	23975	0,04	0,956	15,490	Sum In Feature 2	8,55	ECL deviates 0,002	14:0 3OH/16:1 ISO I
10,187	37443	0,04	0,953	15,818	Sum In Feature 3	13,32	ECL deviates -0,004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,341	422	0,03	0,952	15,910	16:1 w5c	0,15	ECL deviates 0,001	
10,491	94773	0,04	0,951	16,001	16:0	33,66	ECL deviates 0,001	Reference -0,003
10,641	1738	0,05	----	16,087		----		
12,029	38147	0,04	0,946	16,889	17:0 CYCLO	13,47	ECL deviates 0,001	Reference -0,001
12,221	542	0,04	0,945	17,000	17:0	0,19	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
13,543	1288	0,04	----	17,747		----		
13,673	42696	0,04	0,941	17,821	18:1 w7c	15,00	ECL deviates -0,002	
13,979	1626	0,04	0,940	17,994	18:0	0,57	ECL deviates -0,006	Reference -0,006
14,765	1791	0,05	----	18,440		----		
15,128	919	0,04	0,937	18,646	19:0 ISO	0,32	ECL deviates 0,012	Reference 0,015
15,567	8130	0,04	0,936	18,895	19:0 CYCLO w8c	2,84	ECL deviates -0,007	Reference -0,003
15,678	655	0,04	----	18,958		----		
----	24805	---	----	----	Summed Feature	8,89	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	-----	---	----	----		----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	37443	---	----	----	Summed Feature	13,32	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,004

Peaks: 8

Total Response: 286724

Percent Named: 98,09%

Reference ECL Shift: 0,006

Number Reference

Total Named: 281252

Total Amount: 268562

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,766	Cedecea-davisae
	0,720	Escherichia-coli-GC subgroup D (DNA homology with Shigella)
	0,694	Serratia-rubidaea
	0,647	Enterobacter-aerogenes-GC subgroup B
	0,640	Salmonella-bongori
	0,619	Salmonella-typhi-GC subgroup A (confirm with other tests)
	0,598	Morganella-morganii
	0,593	Salmonella-typhi-GC subgroup B (confirm with other tests)
	0,593	Cedecea-lapagei
	0,592	Serratia-marcescens-GC subgroup B
	0,591	Klebsiella-pneumoniae-pneumoniae-GC subgroup A
	0,543	Klebsiella-pneumoniae-ozaenae-GC subgroup B
	0,508	Enterobacter-gergoviae
	0,477	Kluyvera-ascorbata-GC subgroup B
	0,468	Proteus-vulgaris
	0,465	Cedecea-neteri

ANEXO B.11 - Identificação de ácidos graxos da cepa TEA.

RT	Respons	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percen	Comment1	Comment2
1,721	3,455E+	0,02	----	7,016	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1,992	520	0,02	----	7,562		----	< min rt	
3,828	1007	0,02	1,103	10,918	Sum In Feature 2	0,44	ECL deviates 0,004	12:0 ALDE ?
4,792	4904	0,03	1,042	12,000	12:0	2,04	ECL deviates 0,000	Reference -0,003
6,173	994	0,03	0,995	13,178	12:0 2OH	0,40	ECL deviates 0,001	
7,289	18238	0,03	0,972	13,999	14:0	7,08	ECL deviates -0,001	Reference -0,003
8,061	2197	0,03	0,961	14,503	unknown 14.502	0,84	ECL deviates 0,001	
8,820	402	0,03	0,953	14,998	15:0	----	ECL deviates -0,002	
9,161	3395	0,05	0,950	15,203	14:0 2OH	1,29	ECL deviates 0,000	
9,635	22382	0,04	0,946	15,489	Sum In Feature 2	8,46	ECL deviates 0,001	14:0 3OH/16:1 ISO I
10,182	38198	0,04	0,942	15,818	Sum In Feature 3	14,38	ECL deviates -0,004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,485	91889	0,04	0,941	16,001	16:0	34,54	ECL deviates 0,001	Reference -0,002
10,648	1377	0,05	----	16,095		----		
12,022	32329	0,04	0,934	16,890	17:0 CYCLO	12,07	ECL deviates 0,002	Reference -0,001
13,539	1067	0,04	----	17,752		----		
13,665	44197	0,04	0,929	17,823	18:1 w7c	16,41	ECL deviates 0,000	
13,972	1747	0,04	0,928	17,997	18:0	0,65	ECL deviates -0,003	Reference -0,006
14,758	1547	0,05	----	18,446		----		
15,124	822	0,04	----	18,655		----		
15,560	3790	0,05	0,924	18,903	19:0 CYCLO w8c	1,40	ECL deviates 0,001	Reference -0,003
15,677	608	0,04	----	18,970		----		
----	23389	---	----	----	Summed Feature	8,90	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	-----	---	----	----		----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	38198	---	----	----	Summed Feature	14,38	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,002

Reference ECL Shift: 0,003

Number Reference

Peaks: 6

Total Response: 270687

Total Named: 265266

Percent Named: 98,00%

Total Amount: 250630

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,850	Escherichia-coli-GC subgroup D (DNA homology with Shigella)
	0,839	Serratia-rubidaea
	0,806	Salmonella-typhi-GC subgroup B (confirm with other tests)
	0,732	Cedecea-davisae
	0,702	Salmonella-bongori
	0,696	Serratia-marcescens-GC subgroup B
	0,689	Enterobacter-aerogenes-GC subgroup B
	0,655	Morganella-morganii
	0,647	Proteus-vulgaris
	0,632	Klebsiella-pneumoniae-ozaenae-GC subgroup B
	0,608	Klebsiella-pneumoniae-pneumoniae-GC subgroup A
	0,575	Salmonella-typhi-GC subgroup A (confirm with other tests)
	0,564	Cedecea-lapagei
	0,563	Kluyvera-ascorbata-GC subgroup B
	0,560	Escherichia-coli-GC subgroup B (DNA homology with Shigella)
	0,542	Klebsiella-oxytoca
	0,515	Enterobacter-aerogenes-GC subgroup A
	0,510	Salmonella-choleraesuis-arizonae

ANEXO B.12 - Identificação de ácidos graxos da cepa TEC.

RT	Respons	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percen	Comment1	Comment2
1,721	3,551E+	0,02	----	7,019	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1,993	644	0,02	----	7,565		----	< min rt	
3,829	707	0,02	1,095	10,918	Sum In Feature 2	0,32	ECL deviates 0,004	12:0 ALDE ?
4,611	457	0,03	1,048	11,799	unknown 11.799	0,20	ECL deviates 0,000	
4,794	3420	0,03	1,038	12,000	12:0	1,45	ECL deviates 0,000	Reference -0,004
6,174	1453	0,03	0,994	13,178	12:0 2OH	0,59	ECL deviates 0,001	
7,039	356	0,03	----	13,815		----		
7,290	14819	0,04	0,972	13,999	14:0	5,90	ECL deviates -0,001	Reference -0,004
8,063	2164	0,04	0,961	14,504	unknown 14.502	0,85	ECL deviates 0,002	
8,828	576	0,03	0,953	15,002	15:0	----	ECL deviates 0,002	
9,163	7400	0,04	0,950	15,204	14:0 2OH	2,88	ECL deviates 0,001	
9,637	22871	0,04	0,947	15,489	Sum In Feature 2	8,87	ECL deviates 0,001	14:0 3OH/16:1 ISO I
10,185	14529	0,04	0,943	15,818	Sum In Feature 3	5,61	ECL deviates -0,004	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,487	88766	0,04	0,942	16,000	16:0	34,22	ECL deviates 0,000	Reference -0,003
10,629	2232	0,05	----	16,082		----		
12,025	53494	0,04	0,936	16,890	17:0 CYCLO	20,50	ECL deviates 0,002	Reference -0,001
12,216	659	0,04	0,935	17,000	17:0	0,25	ECL deviates 0,000	Reference -0,003
13,542	1736	0,04	----	17,751		----		
13,666	28253	0,04	0,933	17,822	18:1 w7c	10,79	ECL deviates -0,001	
13,977	1671	0,04	0,932	17,998	18:0	0,64	ECL deviates -0,002	Reference -0,005
14,757	2379	0,05	----	18,443		----		
15,124	1232	0,05	----	18,652		----		
15,562	18188	0,04	0,931	18,903	19:0 CYCLO w8c	6,93	ECL deviates 0,001	Reference -0,002
15,677	990	0,04	----	18,968		----		
----	23578	---	----	----	Summed Feature	9,18	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	-----	---	----	----		----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	14529	---	----	----	Summed Feature	5,61	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,002

Reference ECL Shift: 0,003

Number Reference

Peaks: 7

Total Response: 267777

Total Named: 258852

Percent Named: 96,67%

Total Amount: 244757

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,685	Ewingella-americana
	0,622	Morganella-morganii
	0,549	Shigella-sonnei-GC subgroup B (high DNA homology with E. coli)
	0,487	Cedecea-davisae
	0,428	Salmonella-typhi-GC subgroup A (confirm with other tests)
	0,414	Escherichia-coli-GC subgroup E (DNA homology with Shigella)

ANEXO B.13 - Identificação de ácidos graxos da cepa RXA.

RT	Respons	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percen	Comment1	Comment2
1,723	3,469E+	0,02	----	7,022	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1,994	608	0,02	----	7,567		----	< min rt	
3,832	825	0,02	1,084	10,914	Sum In Feature 2	0,32	ECL deviates 0,000	12:0 ALDE ?
4,796	4200	0,03	1,034	12,000	12:0	1,54	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
6,177	1245	0,03	0,995	13,179	12:0 2OH	0,44	ECL deviates 0,002	
7,293	18979	0,04	0,977	14,000	14:0	6,56	ECL deviates 0,000	Reference -0,004
8,064	2504	0,04	0,968	14,504	unknown 14.502	0,86	ECL deviates 0,002	
8,827	714	0,04	0,961	15,001	15:0	----	ECL deviates 0,001	
9,165	5391	0,05	0,959	15,204	14:0 2OH	1,83	ECL deviates 0,001	
9,640	24901	0,04	0,956	15,490	Sum In Feature 2	8,43	ECL deviates 0,002	14:0 3OH/16:1 ISO I
10,188	37835	0,04	0,953	15,819	Sum In Feature 3	12,77	ECL deviates -0,003	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,491	101209	0,04	0,951	16,001	16:0	34,10	ECL deviates 0,001	Reference -0,002
10,651	1748	0,05	----	16,093		----		
12,029	40559	0,04	0,946	16,889	17:0 CYCLO	13,58	ECL deviates 0,001	Reference -0,001
12,221	758	0,04	0,945	17,000	17:0	0,25	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
13,545	1338	0,05	----	17,749		----		
13,671	48823	0,04	0,941	17,820	18:1 w7c	16,27	ECL deviates -0,003	
13,978	2016	0,04	0,940	17,993	18:0	0,67	ECL deviates -0,007	Reference -0,007
14,759	1753	0,04	----	18,437		----		
15,125	916	0,04	0,937	18,645	19:0 ISO	0,30	ECL deviates 0,011	Reference 0,013
15,568	6282	0,04	0,936	18,896	19:0 CYCLO w8c	2,08	ECL deviates -0,006	Reference -0,003
15,682	775	0,04	----	18,961		----		
----	25727	---	----	----	Summed Feature	8,74	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	----	---	----	----		----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	37835	---	----	----	Summed Feature	12,77	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,004

Peaks: 8

Total Response: 302057

Percent Named: 98,14%

Reference ECL Shift: 0,006

Number Reference

Total Named: 296444

Total Amount: 283077

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,832	Escherichia-coli-GC subgroup D (DNA homology with Shigella)
	0,773	Serratia-rubidaea
	0,739	Salmonella-typhi-GC subgroup A (confirm with other tests)
	0,727	Cedecea-davisae
	0,692	Enterobacter-aerogenes-GC subgroup B
	0,686	Salmonella-bongori
	0,671	Salmonella-typhi-GC subgroup B (confirm with other tests)
	0,669	Serratia-marcescens-GC subgroup B
	0,644	Klebsiella-pneumoniae-ozaenae-GC subgroup B
	0,641	Cedecea-lapagei
	0,606	Morganella-morganii
	0,598	Enterobacter-gergoviae
	0,591	Klebsiella-pneumoniae-pneumoniae-GC subgroup A
	0,591	Kluyvera-ascorbata-GC subgroup B
	0,562	Moraxella-nonliquefaciens
	0,559	Escherichia-coli-GC subgroup B (DNA homology with Shigella)
	0,540	Proteus-vulgaris
	0,540	Klebsiella-oxytoca
	0,539	Escherichia-coli-GC subgroup E (DNA homology with Shigella)
	0,538	Cedecea-neteri

ANEXO B.14 - Identificação de ácidos graxos da cepa RXB.

RT	Respons	Ar/Ht	RFact	ECL	Peak Name	Percen	Comment1	Comment2
1,722	3,418E+	0,02	----	7,018	SOLVENT PEAK	----	< min rt	
1,991	485	0,02	----	7,562		----	< min rt	
3,828	286	0,03	1,103	10,916	Sum In Feature 2	0,27	ECL deviates 0,002	12:0 ALDE ?
5,855	505	0,03	1,003	12,933	13:1 AT 12-13	0,44	ECL deviates -0,003	
7,289	4431	0,03	0,972	14,000	14:0	3,72	ECL deviates 0,000	Reference -0,002
9,160	656	0,03	0,950	15,203	14:0 2OH	0,54	ECL deviates 0,000	
9,635	6636	0,04	0,946	15,489	Sum In Feature 2	5,42	ECL deviates 0,001	14:0 3OH/16:1 ISO I
10,185	17750	0,04	0,942	15,820	Sum In Feature 3	14,44	ECL deviates -0,002	16:1 w7c/15 iso 2OH
10,332	775	0,04	0,941	15,908	16:1 w5c	0,63	ECL deviates -0,001	
10,484	27205	0,04	0,941	16,000	16:0	22,09	ECL deviates 0,000	Reference -0,003
12,023	7177	0,04	0,934	16,890	17:0 CYCLO	5,79	ECL deviates 0,002	Reference -0,001
12,302	3017	0,04	0,933	17,050	16:1 2OH	2,43	ECL deviates 0,002	
12,627	2894	0,04	0,932	17,234	16:0 2OH	2,33	ECL deviates 0,001	
13,132	5744	0,04	0,931	17,520	16:0 3OH	4,61	ECL deviates 0,001	
13,664	42276	0,04	0,929	17,822	18:1 w7c	33,92	ECL deviates -0,001	
15,560	3418	0,04	0,924	18,901	19:0 CYCLO w8c	2,73	ECL deviates -0,001	Reference -0,003
15,896	820	0,05	0,923	19,094	18:1 2OH	0,65	ECL deviates 0,005	
----	6922	---	----	----	Summed Feature	5,69	12:0 ALDE ?	unknown 10.928
----	-----	---	----	----		----	16:1 ISO I/14:0 3OH	14:0 3OH/16:1 ISO I
----	17750	---	----	----	Summed Feature	14,44	16:1 w7c/15 iso 2OH	15:0 ISO 2OH/16:1w7c

ECL Deviation: 0,002

Reference ECL Shift: 0,002

Number Reference

Peaks: 4

Total Response: 123591

Total Named: 123591

Percent Named: 100,00%

Total Amount: 115833

Library	Sim Index	Entry Name
TSBA50 5.00	0,796	Burkholderia-cepacia-GC subgroup B (Pseudomonas cepacia)
	0,485	Burkholderia-gladioli-GC subgroup A (Pseudomonas gladioli)