

PATRÍCIA FERREIRA LOPES

**Diversidade taxonômica e potencial de biodegradação
de bactérias isoladas de reservatórios de petróleo da
Bacia de Campos (RJ)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2010

PATRÍCIA FERREIRA LOPES

**Diversidade taxonômica e potencial de biodegradação
de bactérias isoladas de reservatórios de petróleo da
Bacia de Campos (RJ)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do
Título de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Valéria Maia de Oliveira

São Paulo
2010

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

© reprodução total

Lopes, Patricia Ferreira.

Diversidade taxonômica e potencial de biodegradação de bactérias isoladas de reservatórios de petróleo da Bacia de Campos (RJ) / Patricia Ferreira Lopes. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Valéria Maia de Oliveira.

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: sistemática e ecologia Microbiana.

Versão do título para o inglês: Taxonomic diversity and biodegradation potential of bacteria isolated from oil reservoirs of the Campos Basin (RJ).

Descritores: 1. Taxonomia de bactérias 2. Biodegradação 3. Reservatórios de petróleo 4. Fingerprint genético 5. Genes RNAr 16S 6. Biomarcadores do petróleo I. Oliveira, Valéria Maia de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0150/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Patricia Ferreira Lopes.

Título da Dissertação: Diversidade taxonômica e potencial de biodegradação de bactérias isoladas de reservatórios de petróleo da Bacia de Campos (RJ).

Orientador(a): Valéria Maia de Oliveira.

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:

Às pessoas importantes e incentivadoras desse trabalho

Marcos, Raul, Sarah, D. Mercedes e D. Annita.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À professora Dra Valéria Maia de Oliveira pela orientação e contribuição para minha formação profissional. Tive sorte de ter uma orientadora e amiga ao mesmo tempo!

Às professoras Dra. Lara Durães Sette, Dra. Fabiana Garboggini Fantinatti e Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos pela ajuda e amizade de todos esses anos de convivência.

À professora Anita J. Marsaioli e equipe pela orientação nos ensaios realizados no Instituto de Química.

À equipe DRM: Geize, Natália, Leandro, Paula, Bruna, Cynthia, Samantha, Tiago, Michel, Fernando, Mariana, Maria Raphaella, Alysson, Rafaella, Cláudia, Bárbara, Cristina e Gisele.

À Milena por toda ajuda em microbiologia e Karen pela ajuda nas técnicas moleculares.

Aos funcionários do CPQBA em especial ao laboratório de Microbiologia coordenado pela Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte, alunos e técnicos.

Aos familiares que mesmo longe incentivaram minha profissão.

À Petrobras pelo apoio financeiro.

RESUMO

LOPES, P. F. **Diversidade taxonômica e potencial de biodegradação de bactérias isoladas de reservatórios de petróleo da Bacia de Campos (RJ)**. 2010. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Apesar de sua importância para a indústria petrolífera brasileira, a diversidade de bactérias associadas a processos biológicos em reservatórios de petróleo é pouco conhecida no país. Estudos recentes vêm demonstrando grande diversidade taxonômica e funcional de microorganismos nestes ambientes, dos quais muitos representam espécies e gêneros novos. O presente trabalho teve como objetivos caracterizar uma coleção de 98 bactérias isoladas de amostras de petróleo e água de formação de reservatórios da Bacia de Campos (RJ), utilizando técnicas de taxonomia molecular, e avaliar o potencial de degradação de biomarcadores do petróleo de alguns destes organismos. O DNA genômico extraído de todos os isolados foi utilizado em reação de PCR para amplificação do gene que codifica para o RNAr 16S. A metodologia de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) foi empregada utilizando-se três enzimas de restrição, visando detectar grupos taxonômicos potencialmente diferentes. Os perfis de bandas obtidos foram analisados com o auxílio do programa *Gelcompar*, sendo que 39 isolados foram escolhidos como representantes de grupos distintos. O sequenciamento e análise filogenética do gene RNAr 16S revelaram que estes isolados pertenciam a 16 grupos taxonômicos distintos, a saber: *Marinobacter lutaoensis* (12), *Halomonas shengliensis/H. alimentaria/ H.campisalis* (10), *Bacillus firmus* (1), *Bacillus megaterium* (2), *Bacillus pumilus* (49), *Bacillus sphaericus* (2), *Bacillus simplex* (1), *Citricella thiooxidans* (1), *Stenotrophomonas maltophilia* (2), *Achromobacter xylosoxidans* (1), *Bacillus cereus/B. thuringiensis* (5), *Micrococcus luteus* (5), *Kocuria rosea* (1), *Streptomyces alboniger/ S. chartreusis /S. moderatus*, (2), *Staphylococcus hominis* (1) e *Staphylococcus pasteurii/S. warneri* (3). O método de tipagem molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), utilizado para diferenciar os isolados em nível infra-específico, permitiu identificar 23 padrões de bandas distintos entre os isolados pertencentes à espécie *Bacillus pumilus*. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram uma alta diversidade taxonômica da fração cultivada da comunidade de bactérias aeróbias presente em amostras de óleo e águas de formação provenientes de reservatórios da Bacia de Campos. A habilidade dos isolados, representando as diferentes espécies isoladas das amostras ambientais, para biodegradar biomarcadores do petróleo foi avaliada por CG-EM. Os resultados evidenciaram a preferência das bactérias pela biotransformação do ácido nonadecanóico e esqualano. A caracterização da microbiota presente nos reservatórios e avaliação de seu potencial de biodegradação pode contribuir para fornecer subsídios para estudos futuros sobre os mecanismos biológicos responsáveis pela biodegradação do petróleo.

Palavras-chave: Diversidade de bactérias. Petróleo. Taxonomia molecular. RNAr 16S. biodegradação. Hidrocarbonetos.

ABSTRACT

LOPES, P. F. **Taxonomic diversity and biodegradation potential of bacteria isolated from oil reservoirs of the Campos Basin (RJ)**. 2010. 68 p. Master Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Despite their importance for the Brazilian oil industry, the diversity of bacteria associated with biological processes in oil reservoirs is poorly understood in Brazil. Recent research has demonstrated great taxonomic and functional diversity of microorganisms in such environments, many of which represent new species and genera. This study is aimed to characterize a collection of 98 bacteria isolated from oil and formation water samples derived from reservoirs of the Campos Basin (RJ), using molecular biology-based techniques, and to evaluate the degradation potential of petroleum biomarkers of some of these organisms. The genomic DNA extracted from all isolates was employed in PCR reactions for amplification of the 16S rRNA gene. The methodology of ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) was employed using three restriction enzymes, in order to detect potentially different taxonomic groups. The analysis of the band profiles, through the use of the Gelcompar software, allowed the selection of 39 isolates representing different taxonomic groups. Further sequencing and phylogenetic analysis of 16S rRNA genes revealed that these isolates belonged to 16 different taxonomic groups, namely *Marinobacter lutaoensis* (12), *Halomonas shengliensis*/*H. alimentaria*/*H. campisalis* (10), *Bacillus firmus* (1), *Bacillus megaterium* (2), *Bacillus pumilus* (49), *Bacillus sphaericus* (2), *Bacillus simplex* (1), *Citricella thiooxidans* (1), *Stenotrophomonas maltophilia* (2), *Achromobacter xylosoxidans* (1), *Bacillus cereus*/*B. thuringiensis* (5), *Micrococcus luteus* (5), *Kocuria rosea* (1), *Streptomyces alboniger*/*S. chartreusis*/*S. moderatus* (2), *Staphylococcus hominis* (1) and *Staphylococcus pasteurii*/*S. warneri* (3). The molecular typing method RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) was used to differentiate the isolates at the infra-specific level, and allowed the identification of 23 different band patterns among the isolates of the species *Bacillus pumilus*. The results of the present study demonstrated a high taxonomic diversity of cultivated fraction of the aerobic bacterial community present in oil and formation water samples from Campos Basin reservoirs. The ability of the isolates, representing the different species isolated from the environmental samples, to biodegrade petroleum biomarkers was evaluated by GC-MS. The results showed the preference of such bacteria for the biotransformation of nonadecanoic acid and squalane. The characterization of the microbiota associated to reservoirs and the evaluation of their biodegradation potential may provide subsidies for future studies about the biological mechanisms responsible for petroleum biodegradation.

Keywords: Bacterial diversity. Petroleum. Molecular taxonomy. 16S rRNA. Biodegradation, Hydrocarbons.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ilustração de reservatório de petróleo.....	13
Figura 2. Mapa ilustrando a região da Bacia de Campos, local onde foi realizada a coleta.....	26
Figura 3. Substratos fluorogênicos avaliados nos ensaios de triagens enzimáticas dos isolados do petróleo.....	34
Figura 4. Dendrograma de similaridade dos isolados analisados na primeira etapa do trabalho.....	40
Figura 5. Dendrograma de similaridade dos isolados restantes com base nos perfis de restrição.....	41
Figura 6. Análise filogenética das sequências parciais do gene RNAr 16S.....	42
Figura 7. Dendrograma de similaridade baseado nos <i>fingerprints</i> genéticos obtidos com a técnica de RAPD.....	44
Figura 8. Cromatograma de íons totais.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características do poço de origem na Bacia de Campos (RJ).....	26
Tabela 2 - Os meios de cultivo usados e sua composição.....	28
Tabela 3 - Origem das linhagens, meios de cultivo utilizados e temperatura de incubação	29
Tabela 4 - Resultado da tipagem por RAPD dos isolados pertencentes à mesma espécie.	45
Tabela 5 - Intensidade de fluorescência das bactérias que apresentaram atividade enzimática de epóxido hidrolases EP1 e EP2 esterases ES1 e ES2 e lipase LIP1.....	46
Tabela 6 - Intensidade de fluorescência das bactérias que apresentaram atividade enzimática de monoxigenases, onde os valores representam uma média das reações em duplicata.....	47
Tabela 7 - Porcentagem de biodegradação dos biomarcadores pelas bactérias.....	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Depósitos petrolíferos e a diversidade microbiana associada.....	13
2.2 Biodegradação microbiana do petróleo.....	16
2.3 Degradação de hidrocarbonetos e sua aplicação biotecnológica.....	20
2.4 Técnicas moleculares e a caracterização da diversidade microbiana.....	21
3 OBJETIVOS	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Linhagens de bactérias.....	25
<i>4.1.1 Características geológicas e geoquímicas da área de coleta dos óleos.....</i>	<i>25</i>
<i>4.1.2 Isolamento e repique das bactérias</i>	<i>27</i>
4.2 Extração de DNA.....	30
4.3 Amplificação do gene RNAr 16S.....	30
4.4 ARDRA.....	30
4.5 Sequenciamento	31
4.6 Análise filogenética	31
4.7 RAPD.....	32
4.8 Análise dos <i>fingerprints</i>	32
4.9 Triagem enzimática de alto desempenho	33
4.10 Ensaio de biodegradação	35
5 RESULTADOS	37
5.1 Amplificação do gene RNAr 16S.....	37
5.2 ARDRA, sequenciamento e análise filogenética	37
5.3 RAPD.....	43
5.4 Ensaio de triagem enzimática (HTS).....	45
5.5 Biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo.....	47
6 DISCUSSÃO	51
7 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Apesar de sua importância para a indústria petrolífera brasileira, a diversidade de bactérias associadas a processos biológicos em reservatórios de petróleo é pouco conhecida e estudada no país.

Alguns estudos recentes de grupos europeus e norte-americanos demonstraram uma grande diversidade taxonômica e funcional de micro-organismos em amostras de reservatórios localizados em regiões geograficamente distintas do planeta, incluindo desde micro-organismos anaeróbicos estritos termofílicos e hipertermofílicos até anaeróbicos facultativos e termotolerantes (ORPHAN et al., 2000). Destes, muitos representam espécies e gêneros novos. Nazina et al. (2001), em um estudo taxonômico de *Bacillus* em reservatórios de petróleo da Rússia, Cazaquistão e China, descreveram o gênero aeróbico *Geobacillus*, a partir de águas de formação de petróleo. Recentemente, Magot e colaboradores (2004) descreveram duas espécies novas de bactérias redutoras de sulfato, *Desulfovibrio bastinii* e *D. gracilis*, isolados de amostras de água coletadas em um reservatório de petróleo no Congo. Outros trabalhos incluem a descrição das espécies *Thermotoga subterranea* (JEANTHON et al., 1995), *Deferribacter thermophilus* (GREENE et al., 1997), *Halanaerobium congolense* (RAVOT et al., 1997), *Petrotoga mobilis* (LIEN et al., 1998), e, mais recentemente, das espécies *Thermosipho geolei* (L'HARIDON et al., 2001), *Petrotoga olearia* e *P. siberica* (L'HARIDON et al., 2002), bactérias anaeróbicas, termofílicas e fermentativas isoladas de reservatório de petróleo continental da Sibéria Ocidental.

Estudos relacionados à investigação da biodiversidade de comunidades microbianas associadas a depósitos petrolíferos são de grande relevância na medida em que permitem uma maior compreensão da estrutura e dinâmica das populações nestas comunidades, além da caracterização putativa de funções que possam desempenhar. O melhor conhecimento da biodiversidade nestes ambientes fornecerá subsídios para a adoção de medidas futuras de prevenção ou remediação de processos de biodeterioração dos óleos e/ou biocorrosão de tubulações e equipamentos associados, tais como: (a) avaliação do potencial de biodeterioração em poços ainda em estágio de perfuração; (b) monitoramento de processos de biodegradação/biodeterioração do óleo em poços de exploração ou sob condições de armazenamento de longo-prazo; (c) monitoramento de processos de biorremediação em derramamentos acidentais de petróleo.

O petróleo brasileiro tem características muito próprias, com uma predominância de óleos pesados, o que exige etapas adicionais de refino para a obtenção de gás, gasolina e óleo diesel. O perfil destes óleos é moldado pela ação de bactérias que atuam na degradação das frações leves do petróleo, consumindo, preferencialmente, hidrocarbonetos lineares e, na sequência, os hidrocarbonetos ramificados, isoprenoides e ciclanos (PETERS e MOLDOWAN, 1993).

Neste contexto, o presente projeto teve como objetivos analisar a diversidade genética e taxonômica de bactérias aeróbias isoladas de reservatórios de petróleo da Bacia de Campos e avaliar o seu potencial de degradação de biomarcadores do petróleo. Os resultados do presente estudo permitirão contribuir para a consolidação da linha de pesquisa de Microbiologia do Petróleo, ainda pouco desenvolvida em âmbito nacional, oferecendo grande potencial para pesquisa básica e de exploração tecnológica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Depósitos petrolíferos e a diversidade microbiana associada

Para haver a acumulação de petróleo e/ou gás, é necessária a existência de uma rocha capaz de gerar óleo, a presença de uma rocha reservatório e de uma barreira capeadora com uma retenção tridimensional, que irão constituir uma armadilha (ou trapa) para a acumulação do petróleo (Figura 1). A rocha geradora de petróleo é aquela que se formou com características de granulação muito fina, rica em matéria orgânica, gerando o petróleo para a formação armazenadora ou rocha reservatório. A rocha reservatório é aquela com condições geológicas de armazenar o fluido e, normalmente, ela armazena os fluidos na seguinte distribuição: uma capa de gás superior; uma capa de óleo intermediária e uma capa de água salgada inferior. A rocha capeadora é formada por rochas impermeáveis ou falhas provocadas pela movimentação das camadas terrestres, que não permitirão que os fluidos armazenados migrem para outras camadas de rochas. A água contida no reservatório que se encontra nos poros das formações, e normalmente salgada, é chamada de água de formação. Este é o volume de água livre que irá suprir a energia para o deslocamento das águas (*water drive*) nestes reservatórios. Com este mecanismo de empuxo d'água é que os hidrocarbonetos serão liberados, via poços perfurados, pela água que vai preenchendo os poros vazios, aumentando e empurrando o óleo para a superfície (CORRÊA, 2003).

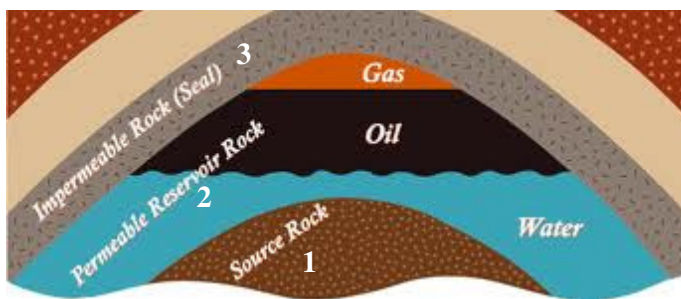


Figura 1. Ilustração de reservatório de petróleo. 1 = Rocha geradora; 2 = Rocha reservatório, contendo água, óleo e gás; 3 = Rocha capeadora impermeável.
FONTE: San Joaquin Geological Society – SJGS, 2010.

Várias bactérias que habitam o ambiente marinho são degradadoras de petróleo, sendo geralmente isoladas as degradadoras de alcanos ou compostos aromáticos, tais como tolueno, naftaleno e fenantreno (HARAYAMA et al., 2004). As bactérias sulfato-redutoras, por exemplo, utilizam compostos sulfurosos presentes na água do mar e produzem ácido sulfídrico, que é tóxico aos seres humanos e corrói tubulações e tanques de petróleo. Há

também os micro-organismos que proliferam em poços de petróleo, bloqueando os poros das rochas reservatório e reduzindo sua permeabilidade; e ainda há aqueles que inativam produtos químicos que são adicionados para facilitar operações de produção e aumentar a durabilidade dos reservatórios (BASS e LAPPING-SCOTT, 1997).

No entanto, existem micro-organismos que produzem, durante seu crescimento, substâncias úteis que aumentam a recuperação do óleo, tais como solventes, ácidos, gases, surfactantes e biopolímeros. Além disso, alguns produzem metabólitos que inibem o crescimento das bactérias sulfato-redutoras, enquanto estimulam o crescimento das metanogênicas (BASS e LAPPING-SCOTT, 1997).

Um dos primeiros estudos microbiológicos em reservatórios de petróleo de águas profundas resultou no isolamento de uma bactéria sulfato-redutora, a partir de amostras de águas de injeção (BASTIN, 1926). Por muito tempo permaneceu a dúvida sobre a origem destas bactérias: se eram naturais destes ambientes, ou haviam sido introduzidas nos reservatórios por operações de extração do óleo. Águas de injeção podem carrear micro-organismos não indígenas aos reservatórios, tanto aeróbicos quanto anaeróbicos.

A possibilidade de organismos vivos sobreviverem ou prosperarem em ambientes que contêm óleo depende das características físicas e composição química do ecossistema. A temperatura é o principal fator limitante para o crescimento microbiano em reservatórios de óleo, sendo sugerido que a presença de bactérias está limitada a temperaturas máximas de 80 e 90 °C (FISHER, 1987; BARTH, 1991).

Estudos realizados por vários autores vêm demonstrando uma grande diversidade taxonômica e funcional de micro-organismos recuperados de reservatórios localizados em regiões geograficamente distintas do planeta, incluindo desde micro-organismos anaeróbicos estritos termofílicos e hipertermofílicos até anaeróbicos facultativos e termotolerantes (ORPHAN et al., 2000). Destes, muitos representam espécies e gêneros novos. Magot et al. (2004) descreveram duas espécies novas de bactérias redutoras de sulfato, *Desulfovibrio bastinii* e *D. gracilis*, isolados de amostras de água coletadas em um reservatório de petróleo no Congo. Outros trabalhos incluem a descrição das espécies *Thermotoga subterranea* (JEANTHON et al., 1995), *Deferribacter thermophilus* (GREENE et al., 1997), *Halanaerobium congolense* (RAVOT et al., 1997), *Petrotoga mobilis* (LIEN et al., 1998), e, mais recentemente, das espécies *Thermosipho geolei* (L'HARIDON et al., 2001), *Petrotoga*

olearia e *P. siberica* (L'HARIDON et al., 2002), bactérias anaeróbicas, termofílicas e fermentativas isoladas de reservatório de petróleo continental da Sibéria Ocidental.

Outros trabalhos relatam a recuperação de bactérias aeróbicas de reservatórios de petróleo. Nazina et al. (2001), em um estudo taxonômico de *Bacillus* em reservatórios de petróleo da Rússia, Cazaquistão e China, descreveram o gênero aeróbico *Geobacillus*, com duas novas espécies, *G. subterraneus* e *G. uzenensis*, isolados de águas de formação. Um estudo de caracterização da comunidade de bactérias associadas a reservatório de petróleo através de métodos dependentes e independentes de cultivo detectou espécies pertencentes aos gêneros aeróbicos *Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Acinetobacter* e *Methylobacterium* (ORPHAN et al., 2000). Mais recentemente, outro estudo similar de caracterização de comunidades usando uma abordagem polifásica identificou muitos gêneros aeróbicos em reservatórios de petróleo de alta temperatura no Mar do Norte, incluindo *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Microbacterium*, *Marinobacter*, dentre outros (KASTER et al., 2009). A análise da diversidade microbiana em sistemas de injeção de água em plataformas brasileiras permitiu a detecção de diversos grupos de bactérias aeróbicas através de bibliotecas de genes de RNAr 16S, sendo os gêneros mais abundantes *Marinobacter*, *Colwellia* e *Achromobacter* (KORENBUM et al., 2010).

Dentre os micro-organismos anaeróbicos estritos presentes nos reservatórios de óleo reportados na literatura, o principal grupo inclui arqueias (termofílicas e hipertermofílicas) e bactérias redutoras de sulfato (BRS), as quais estão envolvidas com os processos de corrosão de equipamentos (mesofílicas) e produção *in situ* de H₂S (termofílicas). Outras importantes comunidades microbianas destes ambientes são representadas pelas arqueias metanogênicas (principalmente as mesofílicas); bactérias (mesofílicas e termofílicas) e arqueias fermentativas; e bactérias redutoras de ferro e manganês (principalmente as mesofílicas) (MAGOT et al., 2000).

No Brasil, estudos de caracterização de comunidades microbianas associadas a reservatórios de petróleo, utilizando técnicas convencionais de cultivo ou métodos moleculares independentes de cultivo, têm revelado a recuperação e/ou detecção de uma ampla diversidade de bactérias em reservatórios profundos. Um trabalho recente desenvolvido pela nossa equipe na Divisão de Recursos Microbianos, CPQBA/UNICAMP, permitiu a identificação de nove diferentes grupos taxonômicos em amostras de óleo provenientes de

poços profundos com diferentes graus de biodegradação (não biodegradado e altamente biodegradado) da Bacia de Campos (SETTE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2008). Estes micro-organismos mostraram-se relacionados a *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Arcobacter*, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Halanaerobium*, *Leuconostoc*, *Marinobacter*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Propionibacterium* e *Streptococcus*, pertencendo a quatro classes dentro do Domínio Bactéria: Firmicutes (Gram positivas de baixo conteúdo de GC); Actinobacteria (Gram positivas de alto conteúdo de GC); γ -Proteobacteria e ϵ -Proteobacteria. Foi verificado que alguns destes grupos de micro-organismos eram exclusivos da amostra de óleo degradada, como os gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Streptococcus*. Destes, membros dos gêneros *Acinetobacter* e *Bacillus* têm sido associados com petróleo e degradação de hidrocarbonetos em muitos outros estudos (NAZINA et al., 2002; SAADOUN, 2002; BACH et al., 2003; LU et al., 2003). Os resultados obtidos com a estratégia independente de cultivo permitiram obter uma ampla perspectiva da diversidade, assim como da abundância, dos grupos microbianos presentes nas amostras de água e óleo originadas dos reservatórios de petróleo. Além disso, estudos de degradação realizados com bactérias isoladas das mesmas amostras de água de formação e óleo, revelaram a recuperação de bactérias com capacidade de degradar diferentes biomarcadores do petróleo (VASCONCELLOS et al., 2009).

A determinação da presença ou ausência de bactérias em reservatórios de petróleo poderia ajudar na elaboração de medidas de prevenção de problemas associados com a biocorrosão de equipamentos, biotransformação e biodeterioração dos óleos, e o conhecimento sobre sua ecologia poderia auxiliar a elucidar os mecanismos que governam a degradação do óleo nos reservatórios.

2.2 Biodegradação microbiana do petróleo

O petróleo é uma mistura complexa de vários compostos orgânicos e de alto conteúdo de energia (VAN HAMME et al., 2003). Os hidrocarbonetos de petróleo podem ser classificados em quatro classes principais: (i) saturados, (ii) aromáticos, (iii) asfaltenos e (iv) resinas (LEAHY e COLWELL, 1990). Os hidrocarbonetos saturados, menos polares, são mais abundantes, seguidos pelos compostos aromáticos. Os menos abundantes são as resinas, mais polares, e facilmente adsorvidas à matriz da rocha do reservatório (MELO et al., 2001).

Desde o início da produção de óleo comercial, cerca de 140 anos atrás, os engenheiros do petróleo têm enfrentado problemas causados por micro-organismos presentes nos sistemas de produção do petróleo (MAGOT et al., 2000).

Grande parte dos recursos petrolíferos do planeta é constituída por óleo pesados, ou seja, que sofreram biodegradação (RÖLING et al., 2003). Vários são os fatores que influenciam a biodegradação dos hidrocarbonetos de petróleo, incluindo tanto fatores físico-químicos, como pH do meio, teor de matéria orgânica, composição química do hidrocarboneto e temperatura, quanto fatores biológicos, como distribuição de micro-organismos no meio, adaptação fisiológica e metabólica e composição das comunidades de micro-organismos degradadores (MELO et al., 2001).

Dependendo de sua densidade (*gravity*), os óleos são classificados pelo *American Petroleum Institute* – API – em vários graus (*specific gravity*), sendo que os com maior graduação são os melhores, ou seja, como exemplo, um óleo de 17° API é muito pesado e um de 30° API é mais leve. Alguns fatores afetam o grau de API dos óleos, como: idade geológica, profundidade do reservatório, tectonismo, salinidade e teor de enxofre (CORRÊA, 2003).

Os óleos podem também ser caracterizados como biodegradados e não biodegradados e classificados de acordo com seu grau de biodegradação pela análise da distribuição dos hidrocarbonetos usando os critérios propostos por Peters e Moldowan (1993). Brevemente, estes critérios são baseados no desaparecimento de certas classes de hidrocarbonetos dos óleos, dependendo de sua susceptibilidade à biodegradação. Os n-alcanos são os mais susceptíveis, seguidos dos alcanos com ramificações simples, enquanto que os alcanos policíclicos são geralmente os mais resistentes. Na escala de 0 a 10, o nível 0 corresponde ao óleo não degradado, o nível 1 representa alguma remoção de n-alcanos, níveis 2 e 3 correspondem a uma maior remoção de n-alcanos, isoalcanos e alcanos isoprenóides, níveis 4 e 5 correspondem à completa remoção de n-alcanos, depleção de isoprenóides acíclicos e alguma remoção de hidrocarbonetos cíclicos e policíclicos, incluindo os aromáticos, os níveis 6 a 10 representam a degradação severa do óleo, com a destruição dos esteranos regulares e alteração da distribuição dos hidrocarbonetos policíclicos hopanos.

Os efeitos da biodegradação na composição e propriedades físico-químicas de óleos brutos e gases naturais são bem conhecidos e levam à diminuição do teor de hidrocarbonetos saturados, ao aumento da densidade dos óleos, conteúdo de enxofre, acidez, viscosidade, conteúdo de metais e ainda a diminuição do grau API (HEAD et al., 2003).

Do ponto de vista econômico, estas alterações nas propriedades dos óleos acarretam uma diminuição significativa do seu potencial de refino, biocorrosão de equipamentos e tubulações e produção de compostos indesejados (polímeros, gomas, ácidos orgânicos e H₂S), que podem causar a biodeterioração dos óleos (CORD-RUWICH et al., 1987; HEAD et al., 2003).

Devido à complexidade química do petróleo, uma só espécie de micro-organismo não é capaz de promover a degradação completa da mistura, sendo necessária a atuação de consórcios microbianos munidos de uma ampla variedade enzimática capaz de agir sobre moléculas de hidrocarbonetos alifáticos de cadeias longas, curtas, lineares e/ou ramificadas (WATKINSON e MOEGAN, 1990) e compostos aromáticos (e.g., benzeno, tolueno, naftaleno) (OKERENTUNGBA e EZERONYE, 2003; KANALY e HARAYAMA, 2000). Alguns são co-metabolizados, situação em que enzimas de outras vias metabólicas atuam sobre compostos não-alvo, gerando modificações químicas nas moléculas (PRITCHARD et al., 1995). Os produtos de uma biotransformação podem servir como fonte de carbono e energia para outras espécies da comunidade (SCHWARTZ e LITSKY, 1976; RÖLING et al., 2003).

As bactérias perfazem grande parte da microbiota com potencial degradativo em reservatórios de petróleo. Adaptações fisiológicas e genéticas desses organismos que permitem a biodegradação de hidrocarbonetos podem ser repassadas à descendência ou disseminadas via transferência lateral, como por exemplo, genes catabólicos com localização plasmidial (OKERENTUNGBA e EZERONYE, 2003).

Estudos recentes catalogaram mais de 47 gêneros de bactérias capazes de biotransformar petróleo e derivados, incluindo isolados de ambientes terrestres e marinhos contaminados com petróleo, tal como *Achromobacter*, *Acinetobacter*, actinomicetos, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* e *Pseudomonas* (MELO et al., 2001).

Estudos de genes associados a vias de degradação de componentes do petróleo têm se intensificado (ZYLSTRA e GIBSON, 1991; HAMANN et al., 1999). A degradação de compostos aromáticos é bem representada pelo tolueno que, certamente, possui a via mais estudada (ZYLSTRA e GIBSON, 1991). Essa via se inicia pela adição de oxigênio na posição 2,3 do anel aromático por uma dioxigenase. Em seguida, ocorre uma desidrogenação, originando catecol e a clivagem do anel, resultando, como produto final, o ácido clorobenzóico (KANALY e HARAYAMA, 2000).

Em *Pseudomonas putida* DOT-T1, Mosqueda et al. (1999) descreveram a via metabólica do tolueno com 13 genes divididos em dois operons: *todXFC1C2BADEGIH* e *todST*, com uma sequência de nucleotídeos de aproximadamente 15 Kb.

Outras vias relacionadas à degradação de compostos aromáticos foram relatadas em *Pseudomonas putida* BE81, (genes *bnz*, degradação de benzeno) e *Pseudomonas* sp. mt-2 (operon *xyl*, degradação de xileno), e em outros gêneros bacterianos (PRITCHARD, et al., 1995; OTHA et al, 2001; VAN HAMME et al., 2003).

Além de hidrocarbonetos aromáticos, vias degradativas de alcanos são bastante estudadas (VAN BEILEN et al., 2002). Os alcanos são hidrocarbonetos saturados que perfazem grande parte da composição do petróleo (MELO et al., 2001), de onde é retirada a fração correspondente à gasolina. Nesta classe encontram-se, ainda o metano (CH₄), etano (C₂H₆), propano (C₃H₈) e butano (C₄H₁₀) (CHAPMAN, 1983).

A via de degradação dos alcanos consiste em um sistema de hidroxilases formado basicamente por três componentes enzimáticos: hidroxilase de alcano (AlkB), rubredoxina (AlkG) e rubredoxina redutase (AlkT). A AlkB é uma proteína de membrana que potencializa a reação de hidroxilação. Essa proteína é codificada pelo gene *alkB*, com aproximadamente 1,2 kb, o qual tem sido detectado em uma larga fração de micro-organismos de ambientes contaminados por óleo, sendo marcante no gênero *Pseudomonas* (SMITS et al., 2002). Por esse motivo, podemos inferir que o gene *alkB* é um potencial marcador molecular de contaminação ou de processos biodegradativos de petróleo, podendo ser utilizado em estudos de prospecção em amostras de petróleo bruto.

A biodegradação aeróbia de *n*-alcanos se inicia pela atividade de uma monoxigenase, a qual introduz um grupo hidroxila na cadeia alifática. Os principais intermediários da degradação de alcanos são ácidos graxos, os quais são produzidos a partir de alcanóis, via aldeídos. Estes ácidos podem ser decompostos por rotas biossintéticas típicas de degradação de ácidos carboxílicos, em que a molécula é quebrada em ácidos menores. Ácidos graxos podem servir como fontes de carbono para bactérias de uma comunidade, podendo aumentar o índice de degradação de hidrocarbonetos (BERTHE-CORTI e HÖPNER, 2005).

A capacidade metabólica de uma comunidade é meramente um efeito aditivo da habilidade de cada membro deste consórcio a degradar diferentes compostos de uma mistura, como por exemplo, o petróleo.

A degradação anaeróbia de tolueno por culturas puras de bactérias redutoras de sulfato e bactérias desnitrificantes levam ao acúmulo de seus produtos finais reacionais, ou seja,

benzilsuccinato e benzilfumarato (EVANS et al., 1992). Da mesma forma, a degradação de *m*- ou *o*-cresol, por bactérias desnitrificantes leva ao acúmulo de 4-hidroxi-3-metil-benzoato e 4-hidroxi-2-metil-benzoato, respectivamente (RUDOLPHI et al., 1991). No entanto, estes metabólitos microbianos não são encontrados sob condições naturais, ou seja, nos reservatórios de petróleo, podendo-se afirmar que quando em comunidades microbianas, estes produtos podem servir como substratos ao crescimento de outras espécies, tanto aeróbias, quanto anaeróbias, as quais, por sua vez, levariam à completa mineralização do substrato original.

2.3 Degradação de hidrocarbonetos e sua aplicação biotecnológica

Os hidrocarbonetos de petróleo são os contaminantes mais amplamente distribuídos em quase todos os ecossistemas. Atmosfera, solos, águas superficiais e subterrâneas e ambientes marinhos têm sido continuamente afetados pela poluição produzida durante a extração, refino, transporte e uso do petróleo (MARGESIN et al., 2003; LE BORGNE et al., 2008).

O petróleo contém uma mistura de centenas de compostos individuais, os quais são geralmente agrupados em quatro frações de acordo com sua solubilidade em solventes orgânicos: hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, resinas e asfaltenos (SUGIURA et al., 1997). Marshall e Rogers (2003) contribuíram para a determinação da complexidade da composição do petróleo com a identificação de mais de 17.000 compostos químicos distintos através de espectrofotometria de massas de alta resolução.

A poluição ambiental com hidrocarbonetos de petróleo, estimada em vários milhões de toneladas por ano (XU et al., 2008), tornou-se um problema grave em todo o mundo. A limpeza destes locais poluídos pode ser realizada por micro-organismos degradadores de petróleo, processo conhecido como biorremediação, o que constitui uma alternativa biológica para a descontaminação de locais impactados com petróleo (VAN HAMME et al., 2003). A biorremediação é baseada na habilidade metabólica de micro-organismos para transformar ou mineralizar contaminantes orgânicos em substâncias menos nocivas, as quais são logo integradas aos ciclos naturais biogeoquímicos. A intensidade da biodegradação é influenciada por vários fatores, tais como nutrientes, oxigênio, pH, composição, concentração e biodisponibilidade dos contaminantes, assim como pelas características físicas e químicas do ambiente contaminado (MARGESIN e SCHINNER, 2001). Vários autores também têm

apontado que as frações constituintes do petróleo apresentam suscetibilidade diferenciada à biodegradação. A degradação ocorre primeiramente em direção aos n- e iso-alcanos, em seguida aos ciclo-alcanos de 1 a 3 anéis aromáticos e, finalmente, em direção aos poli-aromáticos, asfaltenos e resinas (SUGIURA et al., 1997; CAPELLI et al., 2001).

Muitos ambientes são caracterizados por baixas ou elevadas temperaturas, pH ácidos ou alcalinos, anaerobiose, altas concentrações de sais ou pressão. Os micro-organismos denominados extremófilos estão adaptados a crescer e proliferar sob estas condições diferentes e constituem, portanto, importantes fontes de arsenais enzimáticos únicos, resistentes a condições extremas. Os reservatórios de petróleo constituem, em geral, um habitat natural de micro-organismos extremófilos, os quais suportam elevada pressão, temperatura, anóxia, salinidade, escassez de nutrientes, entre outras condições adversas.

Os micro-organismos extremófilos degradadores de hidrocarbonetos são candidatos ideais para o tratamento biológico de locais poluídos (MARGESIN e SCHINNER, 2001). Além disso, as vias de degradação também são importantes como fontes de novas atividades catalíticas úteis em química verde e biotecnologia branca (GALVÃO et al., 2005). Portanto, o potencial biocatalítico de linhagens microbianas derivadas de ambientes extremos vem ganhando crescente interesse, sendo que a identificação de novos compostos e rotas metabólicas, incluindo a caracterização molecular e bioquímica de componentes celulares, vêm estimulando estudos microbiológicos destes nichos e representam uma fonte inovadora para a investigação dos processos biocatalíticos, os quais constituem uma ferramenta biotecnológica de elevado valor industrial e ambiental.

2.4 Técnicas moleculares e a caracterização da diversidade microbiana

Nos últimos anos, as técnicas moleculares têm movimentado os laboratórios especializados em sistemática microbiana. Os dados moleculares, particularmente referentes às sequências de RNAr 16S, têm sido utilizados na descrição de novas espécies, complementando a análise de % mol G+C do DNA (COENYE et al., 2005).

A correta identificação e classificação de micro-organismos é de extrema importância prática, não só no aspecto clínico mas também na fitopatologia, biotecnologia e estudos ambientais. Os métodos usados na discriminação de gêneros, espécies e estirpes de micro-organismos podem ser divididos em métodos fenotípicos e genotípicos. Os métodos fenotípicos baseiam-se em fenômenos bioquímicos, fisiológicos e biológicos, enquanto os

métodos genotípicos detectam polimorfismos ao nível dos ácidos nucleicos, ou variação alélica ao nível de enzimas.

A tipagem de micro-organismos, isto é, a capacidade de identificação em nível da espécie e de discriminação entre indivíduos da mesma espécie apresentou grandes avanços nos últimos anos, tendo sido apoiada por uma série de novos métodos que fazem uso da variação encontrada no DNA destes micro-organismos. O desenvolvimento de técnicas moleculares de tipagem de micro-organismos abriu novas possibilidades nos campos da classificação, identificação e diagnóstico (TOWNER e COCKAYNE, 1993).

A taxonomia molecular baseada no estudo das moléculas de DNA e RNA pode levar à inferência de relações evolutivas sobre grupos de bactérias, complementando as características fenotípicas e resolvendo muitos problemas polêmicos de identificação e classificação de diversos grupos taxonômicos complexos (WOESE, 1987).

Nas últimas duas décadas, têm sido descritas variações no método básico de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (MULLIS e FALOONA, 1987), utilizadas com acuidade no diagnóstico, quantificação, caracterização e identificação de micro-organismos e da atividade dos mesmos. Em estudos de diversidade de micro-organismos a técnica de PCR é utilizada em várias metodologias como a análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA – *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), polimorfismo dos espaçadores (IGS – *intergene sequences*) do DNA ribossômico, DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*), PCR-SSCP (*Single-Strand-Conformation Polymorphism*), PCR de sequências repetitivas de DNA (rep-PCR usando *primers* REP, ERIC ou BOX), PCR com primers randômicos (RAPD, AP-PCR) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (TOWNER e COCKAYNE, 1993).

Ainda, o aumento na velocidade e acuidade da técnica de sequenciamento de ácidos nucleicos, associado ao método de PCR é o mais importante avanço nos estudos de sistemática microbiana.

A escolha do método a ser aplicado deve ser feita de acordo com a finalidade pretendida (*e.g.* identificação, diferenciação), entre outros aspectos, como reprodutibilidade, poder discriminatório, custos envolvidos, etc.

Em genética de populações e ecologia microbiana, as técnicas moleculares geram dados para estudos da distribuição natural das bactérias no ambiente. Pesquisas realizadas na última década demonstraram que menos de 10% dos micro-organismos presentes na natureza foram caracterizados e descritos utilizando métodos de plaqueamento seletivo, indicando que

apenas uma pequena fração da diversidade microbiana no ambiente é cultivável (STALEY e KONOPKA, 1985).

O desenvolvimento de metodologias moleculares independentes de cultivo, baseadas na extração direta de ácidos nucléicos de amostras ambientais, associadas às técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), clonagem e sequenciamento, vem permitindo a descoberta de novos grupos de organismos nunca antes cultivados (PACE, 1996; HUGENHOLTZ et al., 1998). Estas técnicas moleculares têm sido cada vez mais utilizadas como ferramenta para a avaliação da diversidade de micro-organismos em amostras ambientais, contornando os problemas associados aos métodos de isolamento e cultivo tradicionais (COUTINHO et al., 2001).

Entretanto, vários autores têm demonstrado que a abordagem polifásica para estudo de comunidades microbianas, ou seja, que combina o uso de técnicas tradicionais de isolamento e cultivo com metodologias independentes de cultivo, é a mais adequada para uma avaliação mais abrangente da diversidade microbiana em amostras ambientais, incluindo petróleo, solos, sedimentos, dentre outras, uma vez que permite a recuperação de diferentes grupos microbianos a partir do ambiente (SETTE et al., 2007; KASTER et al., 2009; CHANDLER et al., 1997; STEPHEN et al., 1996).

3 OBJETIVOS

- Caracterização taxonômica da fração cultivada da comunidade de bactérias de amostras de água-de-formação e óleos brutos originadas de poços de campos petrolíferos biodegradados e não-biodegradados da Bacia de Campos (RJ);
- Avaliação funcional dos isolados quanto à capacidade de degradação de hidrocarbonetos do petróleo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no âmbito da segunda fase do projeto CTPETRO “**Caracterização de processos biogeoquímicos em acumulações de petróleo**”, financiado pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Petrobras e desenvolvido na Divisão de Recursos Microbianos (CPQBA), em parceria com o Instituto de Química da Universidade de Campinas (UNICAMP).

4.1 Linhagens de bactérias

As bactérias investigadas no presente estudo foram isoladas pelo nosso grupo de pesquisa em trabalhos anteriores a partir de amostras de petróleo e água de formação coletadas de cinco poços em produção na Plataforma Pampo, Bacia de Campos (Macaé, Rio de Janeiro) (Figura 2). A coleta foi realizada em parceria com a equipe técnica da Petrobras (CENPES).

4.1.1 Características geológicas e geoquímicas da área de coleta dos óleos

A Bacia de Campos cobre uma área aproximada de 100.000 km², principalmente na parte costa afora até a isóbata de 3.400m, e é a bacia mais prolífica do Brasil. Possui aproximadamente 85% das reservas brasileiras confirmadas de petróleo e 40% das de gás (JAHNERT et al., 1998). A formação da Bacia de Campos está relacionada com a separação do supercontinente de *Gondwana*, que ocorreu no período Eocretáceo. Sua evolução tectonosedimentar pode ser dividida em três fases principais: fase *rift*, durante a qual ocorreu a deposição de rochas geradoras lacustres salinas (MOHIAK et al. 1989), *transicional* que engloba as litologias mais complexas da pilha sedimentar e na qual estão incluídas rochas siliciclásticas, margas, carbonatos e evaporitos, e *drifte*, que começou com a sedimentação de carbonatos de água rasa seguidos por sedimentos de águas profundas e culminando com uma sequência deposicional de raseamento ascendente (ASMUS e PONTE, 1973; PONTE e ASMUS 1978; GUARDADO et al., 1989; RANGEL et al., 1994).



Figura 2. Mapa ilustrando a região da Bacia de Campos, a seta vermelha indica a plataforma Pampo onde foi realizada a coleta.
 FONTE: Guardado et al., 1989.

Estes poços diferem em características como temperatura, profundidade e nível de degradação dos óleos (Tabela 1). Também foi coletada uma amostra de água de formação. Cada amostra foi coletada em triplicata utilizando-se garrafas *Schott* esterilizadas de 500 mL. Estas foram transportadas ao laboratório e mantidas à temperatura ambiente.

Tabela 1 - Características do poço de origem na Bacia de Campos (RJ).

Reservatórios de petróleo	P1	P2	P3	P4	P5
Nível de biodegradação	Não biodegradado	Altamente biodegradado	Moderadamente biodegradado	Altamente biodegradado	Não biodegradado
Temperatura	82 °C	71 °C	62 °C	62 °C	85 °C
Profundidade	2405-2588 m	1988-2222 m	3023 m	2066 m	3070-3286 m

FONTE: Petrobras

4.1.2 Isolamento e repique das bactérias

As bactérias analisadas no presente trabalho foram isoladas em estudos prévios a partir das amostras descritas acima e depositadas no acervo de pesquisa da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI/UNICAMP). Estes isolamentos foram realizados por outros alunos, no âmbito do Projeto CTPETRO “**Caracterização de processos biogeoquímicos em acumulações de petróleo**” – Fase II (CRUZ et al., 2010). Os repiques foram feitos a partir dos isolados de bactérias conservados em ultrafreezer a -80 °C em meios apropriados acrescidos de glicerol (Tabela 2). Após o período de crescimento de 48 horas, foi checada a pureza das culturas através de análise microscópica (coloração de Gram) e macroscópica (morfologia das colônias). As denominações dos isolados, os meios utilizados, a temperatura de incubação e o poço de origem estão listados na Tabela 3.

Tabela 2 - Meios de cultivo usados e sua composição.

Meio	Composição	Formulação g/L
Nutriente Agar - NA CM 0003 Oxoid LTD Basingstoke, Hampshire, England. pH 7,4 ± 0,2	Extrato de carne	1,0
	Extrato de levedura	2,0
	Peptona	5,0
	Cloreto de sódio	5,0
	Agar	15,0
	*NaCl	15,0
Tryptone Soya Agar –TSA CM 0129 Oxoid LTD Basingstoke, Hampshire, England. pH 7,3 ± 0,2	Caseína pancreática	17,0
	Papaína de soja	3,0
	Cloreto de sódio	5,0
	Fosfato de potássio dibásico	2,5
	Glicose	2,5
	Agar	15,0
Brain Heart Infusion – BHI CM 225 Oxoid LTD Basingstoke, Hampshire, England. pH 7,4 ± 0,2	Infusão de cérebro de bezerro	12,5
	Infusão de coração de boi	5,0
	Proteose peptona	10,0
	Glicose	2,0
	Cloreto de sódio	5,0
	Fosfato de sódio dibásico	2,5
GYM Referência: DSMZ – Deutsche Sammung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany pH 7,2 ± 1,0	Glicose	4,0
	Extrato de levedura	4,0
	Extrato de malte	10,0
	Carbonato de cálcio	2,0
	Agar	12,0
	*NaCl	15,0
Marine Agar – MA pH 7, ± 0,2	Peptona	5,0
	Extrato de levedura	1,0
	Citrato férrico	0,1
	Cloreto de sódio	19,5
	Cloreto de magnésio	8,8
	Sulfato de sódio	3,2
	Cloreto de cálcio	1,8
	Cloreto de potássio	0,6
	Bicarbonato de sódio	0,2
	Brometo de potássio	0,1
	Cloreto de estrôncio	0,03
	Acido bórico	0,02
	Silicato de sódio	0,004
	Fluoreto de sódio	0,002
	Nitrato de amônio	0,002
	Fosfato disódico	0,008
Agar	15,0	

*NaCl acrescido.

Tabela 3 - Origem das linhagens, meios de cultivo e temperatura de incubação.

Linhagem	Origem	Meio de cultivo	Linhagem	Origem	Meio de cultivo
SG 24	P1	NA, 28 °C	SG 33	AF	NA, 28 °C
SG 25	P1	NA, 28 °C	SG 34	AF	NA, 28 °C
SG 26	P1	NA, 28 °C	SG 35	AF	NA, 28 °C
SG 27	P1	NA, 28 °C	SG 36	AF	NA, 28 °C
SG 40	P1	NA, 28 °C	SG 41_1	AF	NA, 28 °C
SG 47_1	P1	NA, 28 °C	SG 41_2	AF	TSA, 28 °C
SG 47_2	P1	NA, 28 °C	SG 42_1	AF	NA, 28 °C
P1_1	P1	TSA, 35 °C	SG 43_1	AF	NA, 28 °C
P1_4	P1	TSA, 28 °C	SG 43_2	AF	TSA, 28 °C
SG 4	P2	NA, 28 °C	SG 46	AF	NA, 28 °C
SG 5	P2	NA, 28 °C	SG 54_1	AF	NA, 28 °C
SG 6	P2	NA, 28 °C	SG 54_2	AF	NA, 28 °C
SG 20	P2	NA, 28 °C	SG 55	AF	NA, 28 °C
SG 21	P2	NA, 28 °C	SG 56	AF	NA, 28 °C
SG C	P2	NA, 28 °C	SG 57	AF	NA, 28 °C
P2_1	P2	MA, 35 °C	SG 58_1	AF	NA, 28 °C
P2_2	P2	TSA, 50 °C	SG 58_2	AF	NA, 28 °C
SG 3	P3	NA, 28 °C	SG 61	AF	NA, 28 °C
SG 15	P3	NA, 28 °C	SG 62	AF	NA, 28 °C
SG 23_2	P3	TSA, 28 °C	AF 5	AF	TSA, 35 °C
SG 49	P3	NA, 28 °C	AF 6	AF	TSA, 35 °C
SG 1	P4	NA, 28 °C	AF 8	AF	TSA, 35 °C
P4_1	P4	MA, 35 °C	AF 9	AF	MA, 35 °C
P4_3	P4	TSA, 35 °C	AF 10	AF	MA, 35 °C
P4_4	P4	MA, 35 °C	AF 12	AF	TSA, 35 °C
P4_5	P4	GYM, 35 °C	AF 13	AF	TSA, 35 °C
SG 2	P5	NA, 28 °C	AF 14	AF	TSA, 35 °C
SG 50	P5	NA, 28 °C	AF 16	AF	TSA, 28 °C
SG 51_1	P5	NA, 28 °C	AF 17	AF	TSA, 28 °C
SG 51_2a	P5	NA, 28 °C	AF 18	AF	MA, 28 °C
SG 52	P5	TSA, 28 °C	AF 19	AF	MA, 35 °C
SG 59	P5	NA, 28 °C	AF20	AF	MA, 35 °C
P5_3	P5	TSA, 28 °C	AF 21	AF	MA, 35 °C
SG 7	AF	NA, 28 °C	AF 26	AF	MA, 35 °C
SG 8	AF	NA, 28 °C	AF 27	AF	MA, 35 °C
SG 9	AF	NA, 28 °C	AF 28	AF	MA, 50 °C
SG 10	AF	NA, 28 °C	AF 29	AF	MA, 50 °C
SG 11	AF	NA, 28 °C	AF 30	AF	MA, 28 °C
SG 12_1	AF	NA, 28 °C	AF 32	AF	MA, 35 °C
SG 12_2	AF	NA, 28 °C	AF 33	AF	MA, 35 °C
SG 13	AF	NA, 28 °C	AF 34	AF	MA, 35 °C
SG 14	AF	NA, 28 °C	AF 35	AF	MA, 35 °C
SG 16	AF	NA, 28 °C	AF 39	AF	MA, 35 °C
SG 18	AF	NA, 28 °C	AF 40	AF	MA, 50 °C
SG 28	AF	NA, 28 °C	AF 43	AF	TSA, 35 °C
SG 29	AF	NA, 28 °C	AF 44	AF	GYM, 28 °C
SG 30	AF	BHI, 28 °C	AF 45	AF	GYM, 28 °C
SG 31	AF	NA, 28 °C	AF 46	AF	GYM, 28 °C
SG 32	AF	NA, 28 °C	AF 47	AF	MA, 35 °C

4.2 Extração do DNA

O DNA genômico das 98 bactérias isoladas de amostras de óleo e água de formação provenientes dos reservatórios de petróleo foi extraído de acordo com os protocolos descritos por Pitcher et al. (1989), Young e Blakesley (1991) e Pospiech e Neumann (1995). Os resultados da extração foram visualizados em gel de agarose 0,8% corados com brometo de etídio (0,1 µg/mL) em transiluminador UV. A estimativa da concentração do DNA total dos isolados foi realizada utilizando-se o DNA intacto do fago lambda como padrão de concentração.

4.3 Amplificação do gene RNAr 16S

O DNA obtido foi utilizado em reações de PCR para amplificação do DNAr 16S. O par de *primers* utilizado, homólogos a regiões conservadas do DNAr 16S para o Domínio Bacteria, foi o 27f [5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG - 3'] (LANE, 1991) e o 1401r [5'- CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG- 3'] (HEUER et al., 1997), e o programa de amplificação utilizado consistiu de 1 ciclo a 95 °C por 2 minutos; 30 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 55 °C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos; e 1 ciclo de extensão final a 72 °C por 3 minutos. Foram utilizadas alíquotas de 50 a 100 ng de DNA genômico, em reações de 50 µL contendo 2,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen); 1 × Tampão da Taq (Invitrogen); 1,5 mM de cloreto de magnésio, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs e 0,4 µL de cada *primer*. Os resultados de amplificação dos fragmentos do gene RNAr 16S foram confirmados em géis de agarose 1%, corados com brometo de etídio (0,1 µg/mL)

4.4 ARDRA

A metodologia de ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) foi empregada a fim de se detectar perfis de bandas representativos de grupos taxonômicos potencialmente distintos para posterior sequenciamento do gene DNAr 16S e inferência filogenética. Os produtos de amplificação do gene RNAr 16S foram utilizados em reações independentes de restrição enzimática, empregando-se 3 enzimas *MSPI*, *HaeIII* e *AluI* (GE Healthcare), as quais reconhecem sítios distintos de quatro pares de bases na sequência de DNA. Cerca de 5 µL (~ 0,5 a 1,0 µg) do produto de PCR foram adicionados a um volume final de reação de 10 µL contendo 3 U de enzima e 1,0 µL de tampão da enzima (10 ×). O tempo de incubação da reação foi de 2 horas a 37 °C. Os produtos da restrição enzimática de

cada isolado foram submetidos à eletroforese cujas condições foram 120 V por 2h 40min, onde todo o volume da reação (10 µL) foi aplicado em um gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio. Os perfis de bandas polimórficos foram visualizados em transiluminador UV e documentados utilizando-se o equipamento UVP BioImaging Systems (UVP, Upland, CA, USA).

4.5 Sequenciamento

Os produtos de PCR do DNAr 16S dos isolados que apresentaram perfis de restrição (ARDRA) distintos, levando-se em consideração as três enzimas utilizadas, foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático (MegaBace 500, GE Healthcare). As reações de sequenciamento foram realizadas com o Kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems (GE Healthcare), segundo especificações do fabricante. Os *primers* utilizados para o sequenciamento foram 10f (5' - GAG TTT GAT CCT GGC TCA G - 3') (LANE, 1991); 782r (5' - ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT - 3') e 1100r (5' - AGG GTT GGG GTG GTT G - 3') (LANE, 1991).

4.6 Análise Filogenética

As seqüências parciais do gene RNAr 16S obtidas com cada *primer* foram montadas em um contig (seqüência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do programa *phredPhrap* (EWING et al., 1998) e comparadas com as seqüências de RNAr 16S de organismos representados nas bases de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA, <http://www.rdp.cme.msu.edu/>), usando as rotinas BLASTn e *Sequence Match*, respectivamente. Foram então selecionadas diversas seqüências de organismos relacionados ao organismo desconhecido para realização das análises filogenéticas. As seqüências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997) e analisadas com o software MEGA v. 4 (TAMURA et al., 2007). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura 2 p (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU e NEI, 1987), com valores de bootstrap calculados a partir de 1000 replicatas, utilizando as rotinas incluídas no software MEGA.

4.7 RAPD

A técnica molecular RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) foi utilizada com o intuito de diferenciar geneticamente os isolados pertencentes à mesma espécie. Três dos seis primers listados a seguir foram utilizados para a tipagem dos isolados bacterianos, em reações independentes: UBC# 12 (5' - CCT GGG TCC A - 3'), UBC# 25 (5' - ACA GGG CTC A - 3'), UBC# 31 (5' - CCG GCC TTC C - 3'), UBC# 2 (5' - CCT GGG CTT G - 3'), UBC # 4 (5' - CCT GGG CTG G - 3') e UBC # 15 (5' - CCTGGGTTTG - 3') (Set 100/1; University of British Columbia, Vancouver, Canadá). Na reação utilizou-se 1 X do tampão da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen); 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 1 μ M do primer, 2 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 5 ng de DNA genômico. O programa de amplificação consistiu de 1 ciclo de 2min. a 95 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30s a 36 °C e 1min. a 72 °C e um ciclo final de extensão a 72 °C por 3min. Os *primers* utilizados foram selecionados dentre aqueles que geraram maior diversidade de perfis para os isolados, em teste preliminar realizado. Os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo, em condições de corrida a 100 V por 2h 30min. Os perfis de bandas polimórficos foram visualizados em transiluminador UV e documentados utilizando-se o equipamento UVP BioImaging Systems (UVP, Upland, CA, USA).

4.8 Análise dos *fingerprints*

As imagens digitalizadas dos géis obtidos com os métodos ARDRA e RAPD foram analisadas com o auxílio do programa *Gelcompar* v. 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). A similaridade entre os isolados foi calculada a partir dos géis através da comparação dos perfis de bandas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson (1926). Os dendrogramas de similaridade foram construídos através do uso do algoritmo de agrupamento UPGMA. O valor de $\geq 70\%$ de similaridade foi utilizado como valor de corte para o estabelecimento de clusters de ARDRA. Este valor foi escolhido com base na análise visual dos géis e a coerência dos clusters como representantes de grupos taxonômicos distintos foi determinada através do sequenciamento e análise filogenética de alguns dos isolados. No caso das análises dos *fingerprints* genéticos obtidos por RAPD, o valor de ≥ 75 a 80% de similaridade foi utilizado como valor de corte para se considerar os isolados como geneticamente idênticos (BRAAK et al., 2000).

4.9 Triagem enzimática de alto desempenho (HTS – *High Throughput Screening*)

Os isolados obtidos foram avaliados nos ensaios de triagem enzimática para as atividades de hidrolases (lipases, esterases e epóxido-hidrolases) e monoxigenases (Figura 3). Aqueles que apresentaram os melhores resultados de atividade biocatalítica nestes ensaios foram selecionados para os experimentos convencionais de biodegradação. Estes experimentos foram realizados no Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química, UNICAMP, sob supervisão da Profa. Dra. Anita J. Marsaioli.

Para os ensaios de triagem enzimática, as bactérias foram cultivadas em meio sólido e incubadas de acordo com a Tabela 3. Após o crescimento, as culturas foram transferidas para microtubos para serem pesadas. As sondas para lipases (L1P1), esterases (ES1, ES2), epóxido-hidrolases (EP1, EP2) e monoxigenases (S1, S2, S3 e S4) (Figura 2) foram inicialmente solubilizadas em acetonitrila ($H_2O:CH_3CN$), fornecendo soluções estoque na concentração de 20 mM. Uma segunda diluição, a partir da solução estoque, foi realizada em (1:1, v/v), obtendo-se uma solução 2 mM de cada sonda, a qual constituiu a solução trabalho. A solução tampão borato 20 mM, pH 8,8, foi preparada segundo procedimento descrito no manual “*Preparation of buffers for use in enzyme studies*” (GOMORI, 2000). A solução de periodato de sódio ($NaIO_4$) foi utilizada na concentração de 20 mM, preparada a partir da dissolução de 4,3 mg do reagente em 1 mL de água Milli-Q. É importante ressaltar que esta solução era preparada no momento da realização dos experimentos de HTS, não sendo permitido seu armazenamento. A solução de BSA (albumina de soro bovino) para a determinação da atividade de hidrolases foi preparada pela dissolução de 5 mg da proteína em 1 mL de solução tampão borato, agitando-se suavemente de modo a não gerar emulsão. Previamente à realização dos ensaios, quantidade suficiente de solução tampão borato 20 mM pH 8,8 foi adicionado às células para o preparo das suspensões, de modo a obter-se a concentração final de 0,2 mg de células/mL.

Para a detecção da atividade enzimática, alíquotas de 10 μ L da solução dos substratos, na concentração de 2 mM, foram adicionadas a 80 μ L de solução de BSA (5 mg/mL). Finalmente, 100 μ L das suspensões de células microbianas e 10 μ L de solução aquosa de $NaIO_4$ 2 mM foram adicionados às micro-reações. Controles negativos foram realizados substituindo a suspensão celular por solução tampão. Controles para a determinação da autofluorescência do micro-organismo também foram realizados, substituindo-se 10 μ L das soluções de sondas por solução tampão borato. Os controles positivos foram determinados

pela substituição de 10 µL das soluções de sondas por soluções dos produtos esperados a partir da liberação de umbeliferona, mantendo-se as mesmas condições reacionais de forma a verificar se as suspensões celulares não poderiam mascarar resultados positivos de atividade enzimática.

As reações foram realizadas em microplacas de polipropileno com 96 cavidades (Costar 3363, fundo plano), as quais foram recobertas por tampa acrílica durante a aquisição da leitura de fluorescência, realizada à temperatura ambiente.

As medidas de fluorescência, emitidas pelas reações enzimáticas microbianas, foram realizadas em espectrofotômetro *Flashscan 530 Analytic Jena*, com comprimento de onda de excitação de 365 ± 20 nm e leitura da fluorescência emitida em 460 ± 20 nm. O aumento dos valores de fluorescência emitida foi relacionado à liberação de umbeliferona no meio reacional e consequente atividade enzimática.

Foram feitas três leituras de fluorescência, com intervalos de 3 minutos, realizadas em espectrofotômetro (*Flashscan 530 Analytic Jena*).

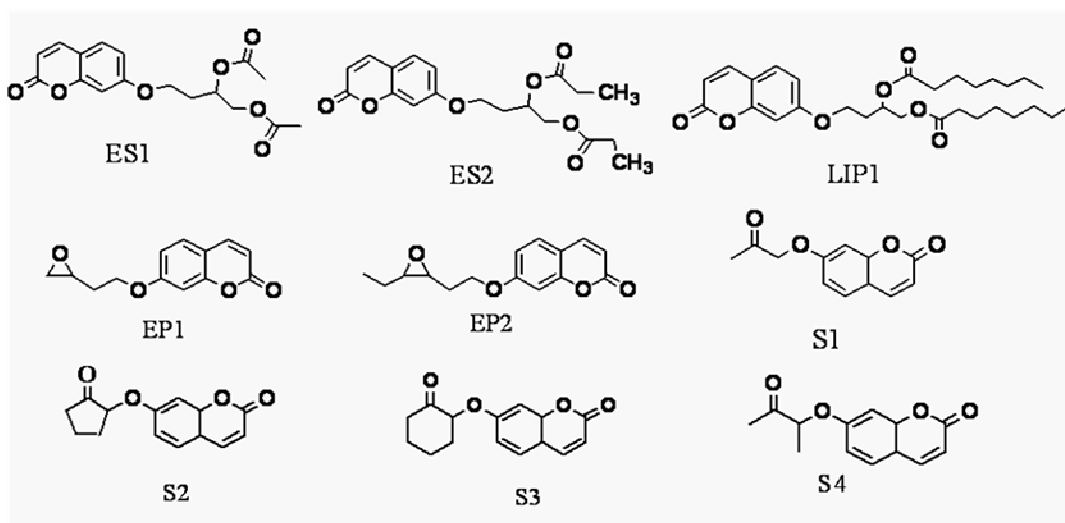


Figura 3. Substratos fluorogênicos avaliados nos ensaios de triagens enzimáticas dos isolados do petróleo.

4.10 Ensaios de biodegradação

Para os ensaios de biodegradação de biomarcadores do petróleo, as bactérias foram inoculadas em erlenmeyers contendo 400 mL de meio de cultivo (Tabela 3), em triplicata, e incubadas em agitador rotacional a 150 rpm por 48h. Após o crescimento, as culturas microbianas foram centrifugadas (18 °C / 5000 rpm / 20min) e o precipitado celular utilizado como inóculo para os ensaios de biodegradação.

Os biomarcadores do petróleo avaliados foram fenantreno, 4-colesten-3-ona, ácido nonadecanóico, nonadecano e esqualano. Estes biomarcadores foram pesados (0,010 g) e, em seguida, homogeneizados em 300 µL de Tween 80, 300 µL de etanol absoluto e 400 µL de acetato de etila, totalizando 1 mL de solução.

Solução de bicarbonato de sódio (10%) foi adicionada ao meio reacional como agente estabilizador do pH. Uma solução de vitaminas (VASCONCELLOS et al., 2009) também foi adicionada ao meio no intuito de ativar o crescimento microbiano e dar início à degradação ou biotransformação dos substratos avaliados.

Os micro-organismos foram inoculados na concentração de 1,5 g de biomassa celular em 40 mL de meio mineral Zinder (ZINDER et al., 1984), o qual foi adicionado de 1% de solução de bicarbonato de sódio, solução de vitaminas e 0,02% do biomarcador (mg/mL). Os frascos foram inoculados em duplicata para cada tempo amostrado (0, 7, 14, 21 e 28 dias) e incubados em agitador rotacional 150 rpm.

Os ensaios tiveram dois controles, um com o meio de cultivo, para detectar possível contaminação e outro chamado de controle de células mortas. Nesse controle as bactérias foram inoculadas no meio de cultivo Zinder e então foram submetidas à autoclavagem por 30 minutos a 121 °C. Após a autoclavagem foi conferida a integridade das bactérias através da coloração de Gram. Seguiu-se à adição ao meio mineral dos biomarcadores, bicarbonato de sódio e solução de vitaminas. Os ensaios foram incubados em agitador rotacional (100 rpm, 28 °C) por 28 dias.

Após o período de incubação prosseguiu-se com a extração da fase orgânica. Na extração utilizou-se o volume total do erlenmeyer (40 mL) acrescido de NaCl, 20 mL de acetato de etila, agitação e separação das fases orgânica e aquosa (2x). A fase orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio (MgSO₄) e evaporada sob o fluxo de N₂. O extrato obtido foi diluído em éter etílico e metilado por diazometano. O extrato metilado foi seco sob fluxo de N₂, pesado e solubilizado em 1 mL de acetato de etila. A partir desta solução, foi feito o

cálculo (através da fórmula $C_1.V_1 = C_2.V_2$) determinando a massa necessária para obter-se 1 mg/mL do extrato para injeção no CG-EM. Em seguida evaporou-se o solvente e adicionou-se 1 mL de hexano. Utilizou-se heptadecano na concentração de 0,03 mg/mL, como padrão interno para a quantificação da atividade biodegradadora dos micro-organismos, através de análises cromatográficas.

Os índices de biodegradação foram obtidos por CG-EM, utilizando-se cromatógrafo gasoso HP6890, acoplado a detector de massas HP 5970-MSD, injetor tipo split (20:1), tendo He como gás de arraste, fluxo de 1 mL/min, coluna capilar de sílica fundida do tipo HP-5MS, cuja fase estacionária consiste de 5% de fenil metil silicone. Os dados foram adquiridos utilizando-se o modo SCAN e os valores de massa variaram entre 50 e 700 u.m.a. Tal metodologia de monitoramento dos ensaios de biodegradação CG-EM já é consolidada pelos componentes deste grupo de pesquisa, apresentando-se eficiente na quantificação e qualificação dos produtos gerados a partir do metabolismo microbiano de biomarcadores do petróleo.

5 RESULTADOS

5.1 Amplificação do gene RNAr 16S

O DNA genômico obtido das linhagens bacterianas foi amplificado com sucesso utilizando-se o par de *primers* p27f e 1401r. Estes produtos de PCR foram a seguir submetidos à técnica de ARDRA a fim de selecionar as linhagens representativas de grupos taxonômicos potencialmente distintos para posterior sequenciamento do gene DNAr 16S e inferência filogenética.

5.2 ARDRA, sequenciamento e análise filogenética

A análise de ribotipagem do total de 98 bactérias isoladas das amostras de petróleo e água de formação foi conduzida em duas etapas. Na primeira etapa, 63 linhagens foram avaliadas, sendo que 17 grupos de ARDRA representativos de grupos taxonômicos potencialmente diferentes foram estabelecidos utilizando-se um valor de corte de 70% de similaridade (Figura 4).

Os isolados AF 29, SG 47_1, SG 40 e SG 59 foram representantes únicos dos perfis 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Os isolados SG 10, SG 12_2, SG 6, SG 56, SG 62, SG 18, SG 13, SG 41_1, SG 41_2 foram os representantes do perfil 5. O perfil 6 foi representada pelos isolados SG 30, SG 43_2. O grupo de isolados com o perfil 7 incluiu as 3 linhagens: SG 5, SG 61, SG 51_2. Os isolados SG 14, SG 27, SG 12_1, SG 28, SG 7, SG 33, SG 9, SG 11, SG 8, SG 16, SG 1, SG 3, SG 4, SG 2 representaram o perfil 8. O grupo com maior número de representantes foi o 9, sendo elas: SG 54_1, SG 42_1, SG 54_2, SG 51_1, SG 46, SG 31, SG 58_2, SG 32, SG 58_1, SG 49, SG 29, SG 43_1, SG 55, SG 26, SG 34, SG 35 e SG 36. Os isolados SG 47_2, e SG 57 formam os únicos representantes dos perfis 10 e 11 respectivamente. O grupo com o perfil 12 foi formado por 4 linhagens: SG 20, SG 21, SG 15 e SG C. A linhagem SG 52 foi a única representante do grupo 13, e as linhagens SG 24 e SG 25 formaram o grupo 14. O isolado SG 23_2 foi o único representante do grupo 15 e os isolados AF 20, AF 40 apresentaram o perfil 16 e o isolado AF 46 representou o perfil 17 (Figura 4). Os isolados identificados por sequenciamento do DNAr 16S foram: AF 29 do grupo 1, SG 47_1 do grupo 2, SG 40 do grupo 3, SG 59 do grupo 4, SG 10 e SG 12_2 do grupo 5, SG 30 do grupo 6, SG 5 do grupo 7, SG 1 do grupo 8, SG 54_1 do grupo 9, SG 47_2 e SG 57 dos grupos 10 e 11 respectivamente, SG 21 e SG C do grupo 12, SG 52 do grupo 13, SG 25 do grupo 14, SG 23_2 do grupo 15, AF 20 do grupo 16 e AF 46 do grupo 17 (Figura 4).

A análise filogenética das sequências de DNAr 16S dos isolados revelou que os ribotipos representavam, na verdade, 9 grupos taxonômicos diferentes. O isolado AF 29 (perfil ARDRA 1) agrupou-se com as espécies de *Halomonas shengliensis*, *Halomonas campisalis* e *Halomonas alimentaria* (bootstrap 100%). O isolado SG 47_1 (perfil ARDRA 2) foi recuperado em um agrupamento suportado por alto valor de bootstrap (100%) juntamente com 2 linhagens de *Achromobacter xylosoxidans*, incluindo a linhagem tipo da espécie. Os isolados SG 40 e SG 59 (perfis ARDRA 3 e 4, respectivamente) agruparam-se com a espécie *Stenotrophomonas maltophilia* (bootstrap 100%). As bactérias SG 10 e SG 12_2, representantes do perfil ARDRA 5, juntamente com os isolados SG 30, SG 5, SG 1, SG 54_1, SG 47_2 e SG 57, representantes dos respectivos perfis ARDRA 6, 7, 8, 9, 10 e 11, mostraram-se proximamente relacionadas a diferentes linhagens de *Bacillus pumilus* (bootstrap de 99%). Os isolados SG C e SG 21 (perfil ARDRA 12) agruparam-se com *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus cereus* (bootstrap 100%). A bactéria SG 52 (perfil ARDRA 13) foi agrupada com *Staphylococcus warneri* e *S. pasteurii* (bootstrap 87%). O isolado SG 25 (perfil ARDRA 14) agrupou com linhagens de *Bacillus sphaericus* (bootstrap 99%). A bactéria SG 23_2 foi recuperada em um agrupamento coeso com linhagens da espécie *Bacillus simplex* (bootstrap 100%). Por fim, os isolados AF 20 (perfil ARDRA 16) e AF 46 (perfil ARDRA 17) foram recuperados juntamente com a linhagem tipo de *Marinobacter lutaoensis* (bootstrap 100%) (Figura 6).

Na segunda etapa do trabalho, as 35 linhagens restantes foram analisadas pela metodologia de ARDRA, sendo que 14 grupos de ARDRA representativos de grupos taxonômicos potencialmente diferentes foram estabelecidos utilizando-se um valor de corte de 70% de similaridade (Figura 5). Os isolados AF16, P4_3, P4_4, P4_5 e P4_1 foram os representantes do perfil 1. AF44 e AF45 foram os únicos representantes dos perfis 2 e 3, respectivamente. O perfil 4 teve como representantes: AF21, AF27, AF39, AF12, AF8, AF13, AF33 e AF26. Os isolados AF9, AF43 e P1_1 foram representantes únicos dos perfis 5, 6 e 7, respectivamente. O perfil 8 foi representado pelos isolados P5_3, AF10 e AF32. O isolado P2_1 foi o único representante do perfil 9. Os isolados P1_4 e P2_2 representaram o perfil 10. AF 35 foi o único representante do perfil 11. O grupo com o maior número de representantes foi o perfil ARDRA 12, o qual incluiu os isolados AF17, AF30, AF34, AF19, AF29, AF6, AF18, AF5 e AF14. Por fim os isolados AF28 e AF47 representaram respectivamente os perfis 13 e 14 (Figura 5).

Nesta etapa, foram selecionadas 20 bactérias para o sequenciamento, escolhidas como representantes dos perfis de agrupamento ARDRA, as quais incluíram: AF16, P4_3 e P4_1 do grupo 1, AF44 do grupo 2, AF45 do grupo 3, AF13 e AF21 do grupo 4, AF9 do grupo 5, AF43 do grupo 6, P1_1 do grupo 7, P5_3 e AF32 do grupo 8, P2_1 do grupo 9, P1_4 do grupo 10, AF35 do grupo 11, AF5, AF14 e AF17 do grupo 12, AF28 do grupo 13 e AF47 do grupo 14.

A análise filogenética das sequências de DNAr 16S dos isolados desta etapa do trabalho revelou que os ribotipos representavam, na verdade, 12 grupos taxonômicos diferentes. O isolado P2_1 (perfil ARDRA 9) se agrupou com as linhagens de *Bacillus cereus/Bacillus thuringiensis* (bootstrap 100%). O isolado AF35 (perfil ARDRA 11) se mostrou proximamente relacionado às linhagens de *Bacillus pumilus* (bootstrap 99%), o isolado P1_1 (perfil ARDRA 7) com *Bacillus firmus* (bootstrap 98%); o P1_4 (perfil ARDRA 10) com *Bacillus megaterium* (bootstrap 100%); o isolado AF32 (perfil ARDRA 8) agrupou-se com *Staphylococcus hominis* (92%) e P5_3 (perfil ARDRA 8) com *Staphylococcus warneri/pasteuri* (bootstrap 87%); os isolados AF43 (perfil ARDRA 6) e AF45 (perfil ARDRA 3) com as espécies *Streptomyces alboniger*, *S. chartreusis* e *S. moderatus* (bootstrap 90%); o isolado AF44 (perfil ARDRA 2) com *Kocuria rosea* (bootstrap 99%); os isolados P4_3, P4_1 e AF16 (perfil ARDRA 1) com *Micrococcus luteus* (bootstrap 99%); os isolados AF13 e AF21 (perfil ARDRA 4) e AF9 (perfil ARDRA 5), agruparam-se todos com *Marinobacter lutaoensis* (bootstrap 100%); os isolados AF5, AF14 e AF17 (perfil ARDRA 12) e AF28 (perfil ARDRA 13) com 3 espécies de *Halomonas* (*H. shengliensis*, *H. campisalis* e *H. alimentaria*) (bootstrap 100%) e, finalmente, AF47 (perfil ARDRA 14) agrupou-se com *Citreicella thiooxidans* (bootstrap 94%) (Figura 6).

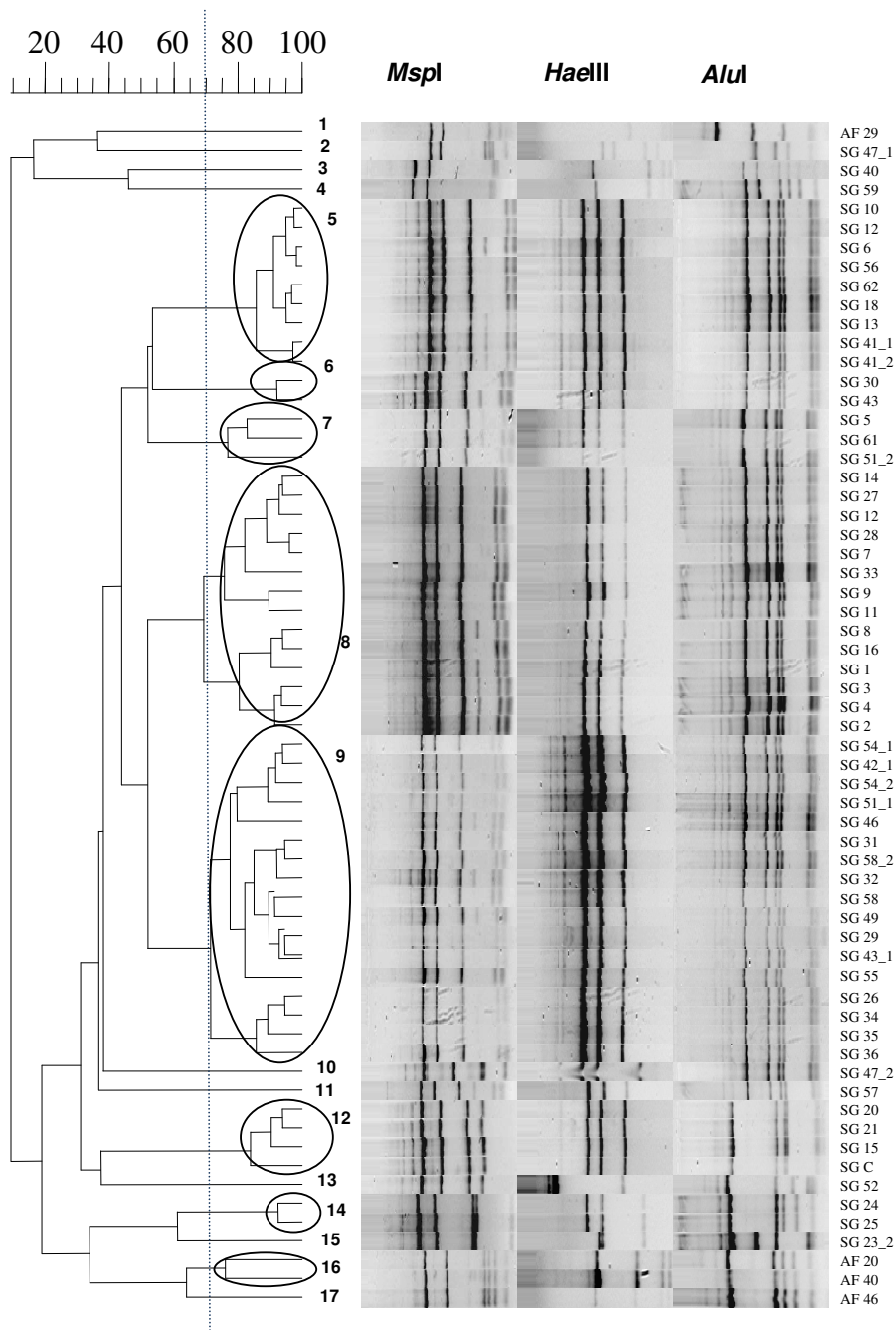


Figura 4. Dendrograma de similaridade dos 63 isolados analisados na primeira etapa do trabalho com base nos perfis de restrição, obtidos após digestão do gene RNAr 16S com as enzimas *MspI*, *HaeIII* e *AluI* e analisados utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o algoritmo UPGMA (programa *GelCompar* v. 4.1). Os perfis de ARDRA distintos são indicados no dendrograma por números de 1 a 17.

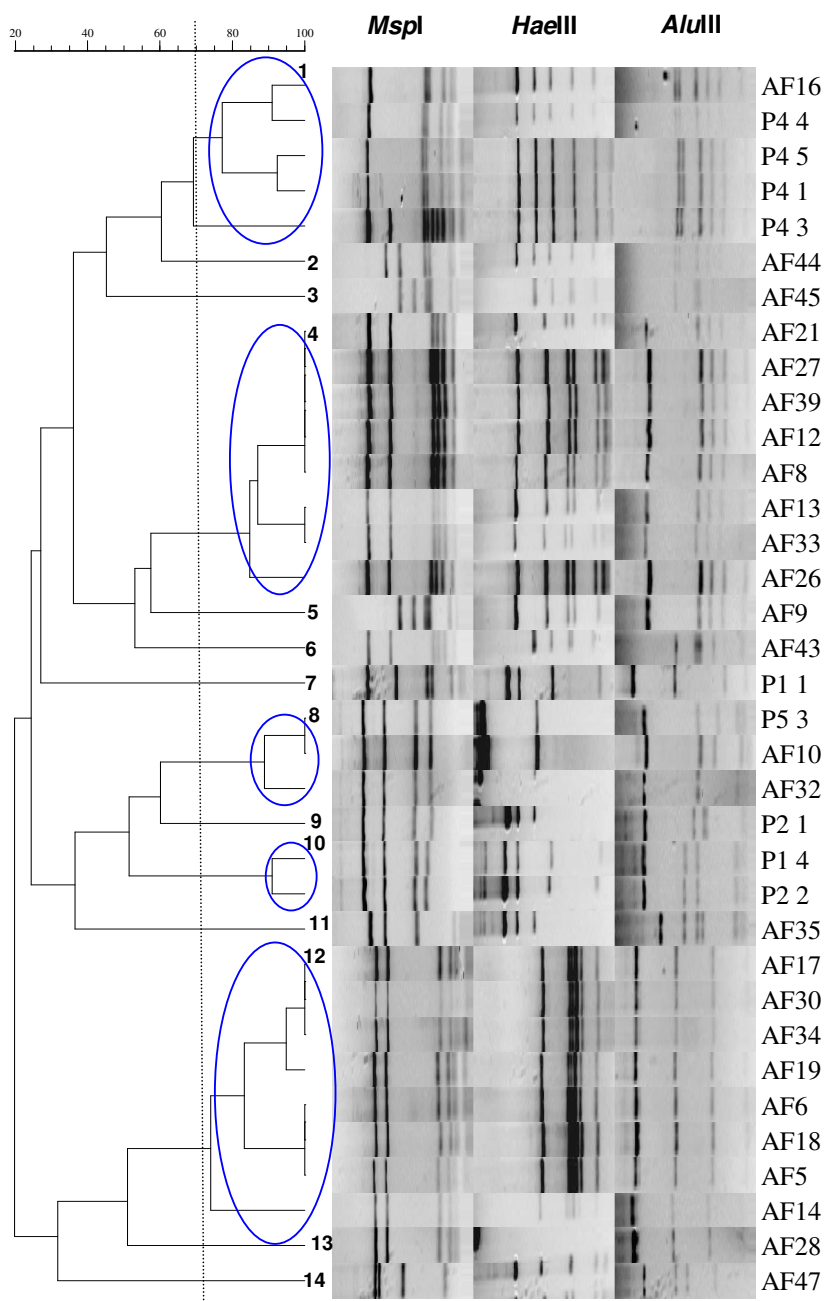


Figura 5. Dendrograma de similaridade dos 35 isolados restantes com base nos perfis de restrição, obtidos após digestão do gene RNAr 16S com as enzimas *MspI*, *HaeIII* e *AluI* e analisados utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o algoritmo UPGMA (programa *GelCompar* v. 4.1). Os perfis de ARDRA distintos são indicados no dendrograma por números de 1 a 14.

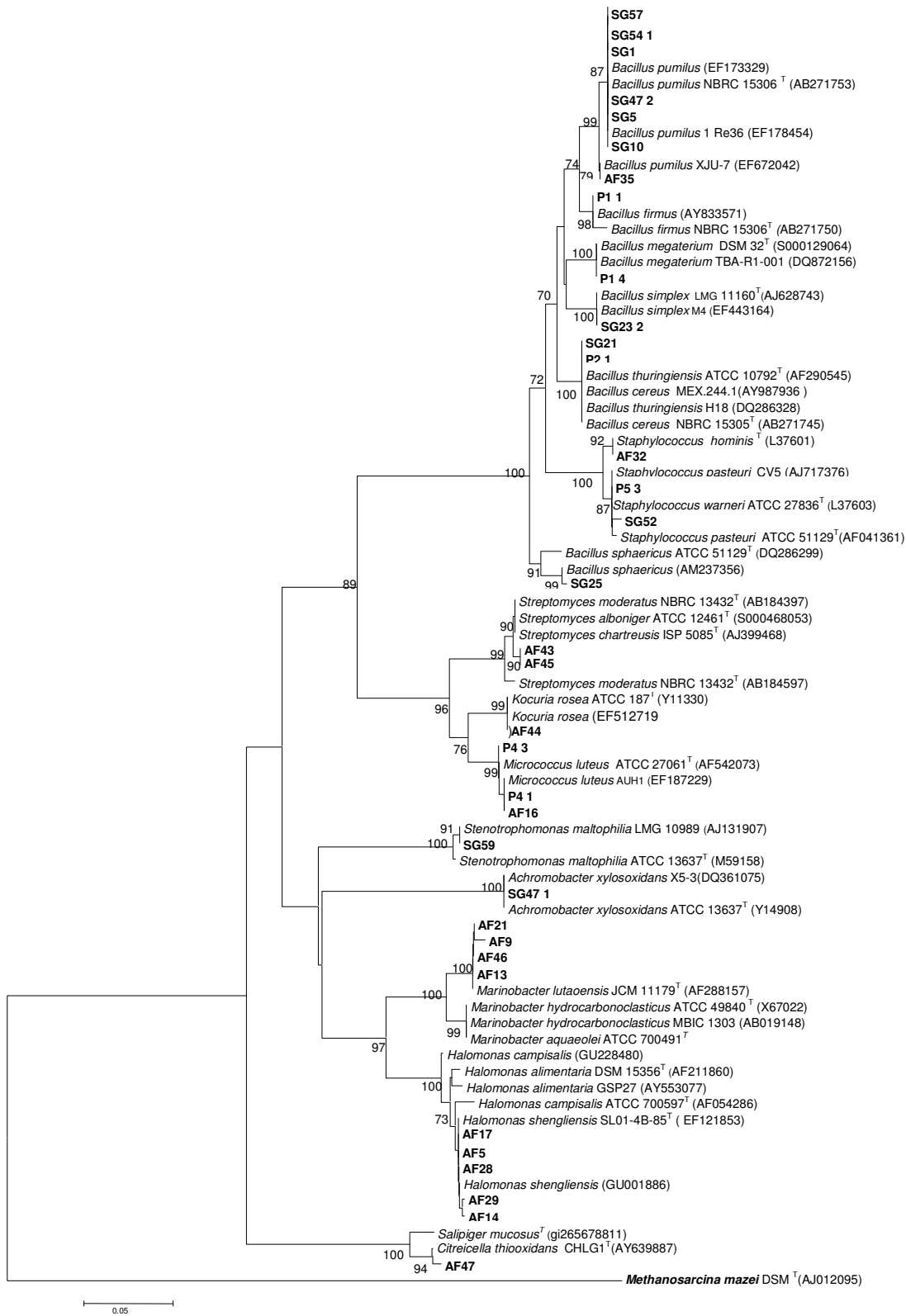


Figura 6. Análise filogenética das sequências parciais do gene RNAr 16S (~1000 pb) obtidas a partir de bactérias representantes de grupos taxonômicos distintos isoladas das amostras de óleo e água de formação e micro-organismos relacionados recuperados da base de dados Genbank.

5.3 RAPD

Os isolados pertencentes ao mesmo grupo ARDRA da primeira etapa do trabalho, foram submetidos à tipagem por RAPD, para diferenciação em nível infra-específico. Os resultados combinados, usando os 3 *primers* em reações independentes, permitiram discriminar com sucesso os isolados geneticamente distintos. Os *fingerprints* genéticos das 48 linhagens identificadas como *Bacillus pumilus* foram analisados com o auxílio do programa *Gelcompar* e agrupados em 23 padrões diferentes com nível de similaridade $\geq 80\%$, a saber: α , A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U e V (Figura 7). Estes padrões foram confirmados por análise visual dos géis. As duas bactérias identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia* apresentaram o mesmo padrão de RAPD (padrão X), demonstrando ser geneticamente idênticas. Os isolados SG C, SG 15, SG 20, SG 21 e P2_1, identificados como pertencentes ao grupo *Bacillus cereus/B. thuringiensis*, apresentaram três padrões de RAPD distintos, Y (isolado SG_15) e Z (isolados SG_C, SG_20 e SG_21). As bactérias SG 24 e SG_25, identificadas como *B. sphaericus*, mostraram-se idênticas geneticamente (padrão RAPD W), assim como as bactérias AF 20, AF 40 e AF 46 (padrão RAPD β), que foram identificadas como *Marinobacter lutaoensis* pela análise filogenética.

Na segunda etapa do trabalho, à exceção do isolado AF 35 identificado como *Bacillus pumilus*, os isolados restantes foram também submetidos ao RAPD para diferenciação infra-específica. Os isolados P1_4 e P2_2, identificados como *Bacillus megaterium*, mostraram-se geneticamente distintos. Os isolados SG 52, AF 10 e P5_3, identificados como *Staphylococcus warneri/pasteuri*, foram comparados e 3 padrões de RAPD distintos foram observados. Os isolados AF43 e AF45, pertencentes ao grupo *Streptomyces alboniger/ S. chartreusis /S. moderatus*, mostraram-se geneticamente distintas. As bactérias P4_3, P4_1, P4_5, P4_4 e AF16, identificadas como *Micrococcus luteus*, demonstraram ser todas distintas, exibindo cinco padrões de RAPD distintos. As bactérias AF 21, AF 27, AF 39, AF 12, AF 8, AF 13, AF 33, AF 26 e AF 9, identificadas como *Marinobacter lutaoensis*, apresentaram 7 padrões distintos, considerando um valor $\geq 75\%$ de nível de similaridade no dendrograma. Por fim, os isolados identificados como *Halomonas shengliensis/ H. campisalis*, apresentaram 5 padrões distintos com base no dendrograma de similaridade. Todos os perfis estão desmonstrados na Tabela 4.

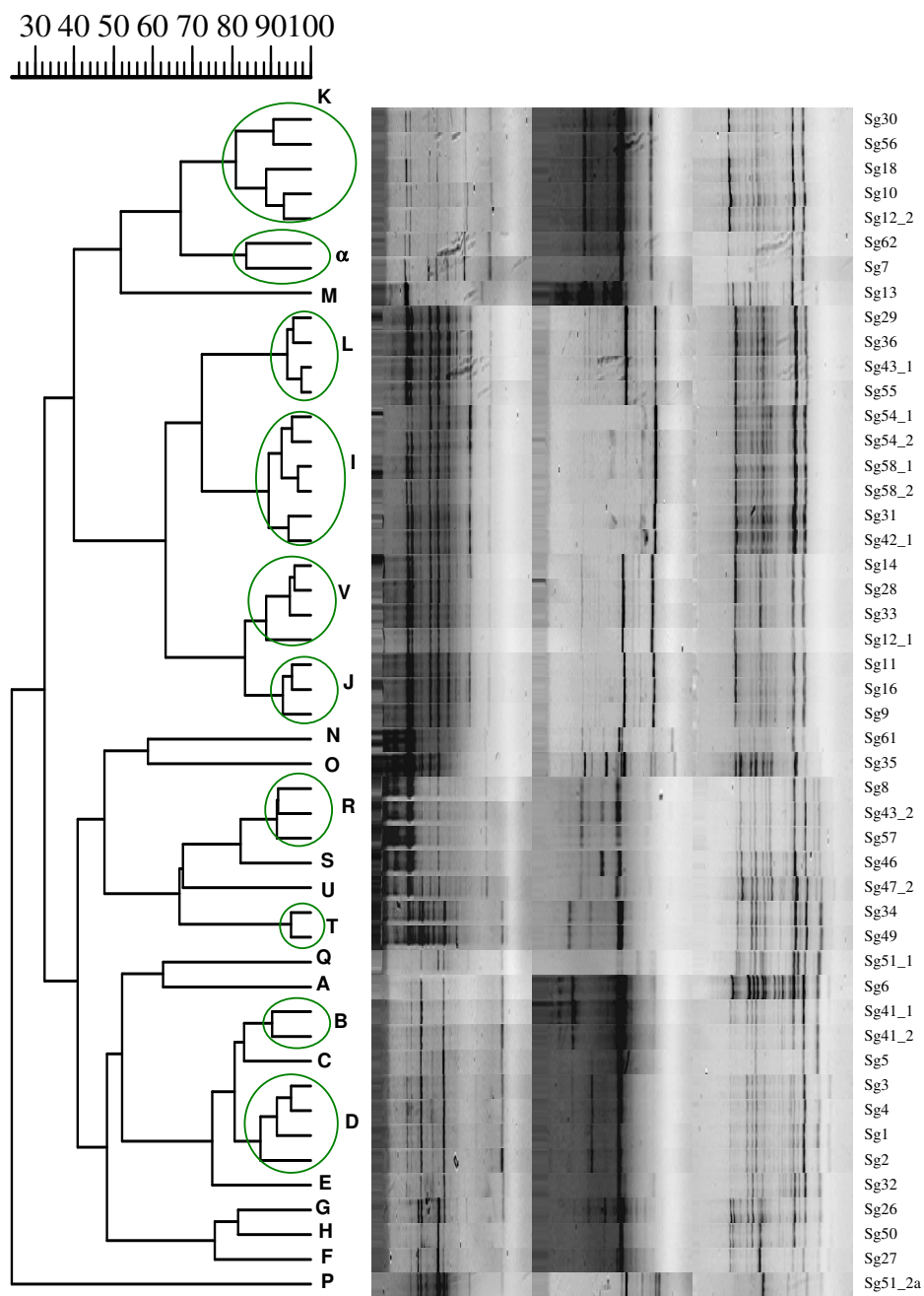


Figura 7. Dendrograma de similaridade baseado nos *fingerprints* genéticos obtidos com a técnica de RAPD, utilizando os primers UBC#12, UBC#25 e UBC#31, mostrando as 48 linhagens de *Bacillus pumilus* agrupadas em 23 *clusters*. A análise foi realizada utilizando o coeficiente de correlação de Pearson e o algoritmo UPGMA (programa *GelCompar* v. 4.1). Os *clusters* correspondentes aos padrões de RAPD considerados distintos ($\geq 80\%$ de similaridade) são indicados no dendrograma por letras.

Tabela 4 - Resultado da tipagem por RAPD dos isolados pertencentes à mesma espécie.

Espécies	Número de isolados	Número perfis RAPD
<i>Bacillus pumilus</i>	48	23
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	1
<i>Bacillus cereus/ B. thuringiensis</i>	5	3
<i>Bacillus sphaericus</i>	2	1
<i>Marinobacter luatoensis</i>	12	8
<i>Bacillus megaterium</i>	2	2
<i>Staphylococcus warneri/ S. pasteurii</i>	3	3
<i>Streptomyces chartreusis/ S. moderatus</i>	2	2
<i>Micrococcus luteus</i>	5	5
<i>Halomonas shengliensis/ H. campisalis</i>	10	5

5.4 Ensaios de triagem enzimática (HTS)

Métodos baseados na utilização de substratos fluorogênicos ou cromogênicos para o monitoramento da catálise enzimática são os mais interessantes para implementar a triagem de alto desempenho. Recentemente, foi demonstrado que usando conjuntos de substratos fluorogênicos é possível caracterizar um padrão de reatividade de certas enzimas (BACKES et al., 2000; HARRIS et al., 2000). Estes métodos são de alta sensibilidade, permitindo a utilização de substratos altamente diluídos e quantidades extremamente pequenas de catalisadores. Reymond e colaboradores relataram um ensaio fluorogênico para enzimas hidrolíticas que associa a formação de produtos (resultado de uma catálise enzimática) com a liberação de sinal fluorescente, via oxidação com periodato e reação de beta eliminação catalisada por albumina (BADALASSI et al., 2000). Controles experimentais asseguram que a velocidade de liberação de umbeliferona seja diretamente proporcional à velocidade da hidrólise dos substratos. Fazendo o teste nas microplacas de 96 poços, é possível uma avaliação rápida dos substratos. Este esquema de ensaio pode ser adaptado facilmente a várias enzimas hidrolíticas, como acilases, lipases, esterases, epóxido-hidrolases e fosfatases, com os respectivos substratos de interesse.

Neste estudo, as sondas utilizadas para detecção das atividades enzimáticas dos 98 isolados foram: duas sondas fluorogênicas de epóxido hidrolase EP1 e EP2, duas sondas fluorogênicas de esterases ES1 e ES2, uma de lipases LIP1 e quatro de monoxigenases S1, S2, S3 e S4 (Figura 3).

Os valores de intensidade de fluorescência emitida após a liberação da umbeliferona foram estabelecidos com base numa curva de calibração, onde valores de ~1200 do sinal de fluorescência foram traduzidos em conversões de 100% e de ~zero foram traduzidos em conversões de 10%. Assim valores de fluorescência entre 100 e 200 corresponderam a uma conversão entre ~10 - 20 %, indicando atividade enzimática baixa, nível 1. Valores de fluorescência entre 200 e 500 foram considerados de atividade enzimática média e de nível 2, e valores acima de 500 foram considerados de nível 3.

No caso das sondas de epóxido hidrolases, as bactérias *Bacillus pumilus* SG16 e SG 30 apresentaram melhores desempenhos para a sonda EP2. No caso das sondas de esterases, as bactérias *Bacillus pumilus* SG 30, *Marinobacter lutaoensis* AF 33 e *Stenotrophomonas maltophilia* SG 59, apresentaram melhores resultados para ES2. Para a lipase, as bactérias *Bacillus pumilus* SG16 e SG 30 exibiram novamente os melhores desempenhos (Tabela 5).

Os maiores valores de intensidade de fluorescência foram observados para as atividades enzimáticas de monoxigenases, sendo que as bactérias *Bacillus pumilus* SG01, SG 32, SG 49 e SG 50 apresentaram atividades enzimáticas de nível 3 (Tabela 6).

Tabela 5 - Intensidade de fluorescência das bactérias que apresentaram atividade enzimática de epóxido hidrolases EP1 e EP2, esterases ES1 e ES2, e lipase LIP1, onde os valores representam a diferença entre a média das reações em duplicata e o controle, dados em unidades arbitrárias.

Micro-organismos	Sondas				
	EP1	EP2	ES1	ES2	LIP1
<i>Bacillus pumilus</i> SG16	13	145	6	31	251
<i>Bacillus pumilus</i> SG30	38	166	29	147	135
<i>M. lutaoensis</i> AF 33	10	6	11	132	20
<i>S. maltophilia</i> SG 59	8	8	21	113	28

FONTE: CRUZ et al., 2010.

Tabela 6 - Intensidade de fluorescência das bactérias que apresentaram atividade enzimática de monoxigenases, onde os valores representam a diferença entre a média das reações em duplicata e o controle, dados em unidades arbitrárias.

Micro-organismos	Sondas			
	S1	S2	S3	S4
<i>Bacillus pumilus</i> SG01	743	17	3	24
<i>Bacillus pumilus</i> SG32	111	135	31	47
<i>Bacillus pumilus</i> SG49	808	13	3	29
<i>Bacillus pumilus</i> SG50	435	15	4	27

FONTE: CRUZ et al., 2010.

5.5 Biodegradação dos hidrocarbonetos do petróleo

As pesquisas sobre origem, acúmulo, migração e biodegradação de óleos são de grande importância para a exploração eficaz de petróleo, sendo que tais estudos são auxiliados, na maioria das vezes, pela análise dos fósseis geoquímicos, os denominados **Biomarcadores**. Estes marcadores biológicos são complexos fósseis moleculares derivados de organismos vivos e formados por carbono, hidrogênio e outros elementos. Eles podem ser usados para interpretar as características das rochas geradoras de petróleo, fornecer informações sobre a matéria orgânica das rochas geradoras, as condições ambientais durante a sua deposição e o soterramento, a maturidade térmica da rocha ou o óleo, o grau de biodegradação, alguns aspectos da mineralogia da rocha e idade. Estes compostos orgânicos são encontrados não somente no petróleo, mas também em sedimentos e rochas, sendo estruturalmente relacionados a produtos naturais conhecidos, presentes em plânctons, bactérias e vegetais superiores, os quais após alterações biológicas e termoquímicas, preservam seus esqueletos carbônicos básicos (MELLO, 1988; PETERS e MOLDOWAN, 1993).

Nesta etapa do trabalho buscou-se avaliar a biotransformação dos hidrocarbonetos utilizados como biomarcadores pelas bactérias isoladas de amostras de óleo e água de formação da Bacia de Campos (RJ). Os biomarcadores avaliados, fenantreno, 4-colesten-3-ona, ácido nonadecanóico, nonadecano e esqualano, foram escolhidos por representarem classes distintas de compostos presentes no petróleo, ou seja, aromáticos, esteranos, ácidos lineares, hidrocarbonetos lineares e isoprenos, respectivamente.

As bactérias escolhidas para os ensaios de biodegradação foram as que apresentaram os melhores resultados nos testes de HTS (Tabelas 5 e 6). Além destas, uma bactéria representante de cada espécie isolada das amostras de petróleo e água de formação também

foram avaliadas nos ensaios de biodegradação, sendo elas: *Bacillus firmus* P 1_1, *Micrococcus luteus* P 4_1, *Staphylococcus pasteurii/warneri* P 5_3, *Staphylococcus hominis* AF 32, *Halomonas shengliensis* AF 19, *Citricella thiooxidans* AF 47, *Bacillus megaterium* P 2_2, *Bacillus simplex* SG 23_2, *Bacillus sphaericus* SG 25, *Bacillus pumilus* AF 35, *Bacillus thurigiensis/cereus* SG 21, *Achromobacter xylosoxidans* SG 47-1, *Kocuria rosea* AF 44, *Streptomyces moderatus/chartreusis/alboniger* AF 45 e *Micrococcus luteus* SG 16.

A Tabela 7 mostra a porcentagem de biodegradação dos hidrocarbonetos após 28 dias de monitoramento pelo CG-EM. A análise dos cromatogramas indicou que mesmo com os valores dos índices de degradação obtidos, foi possível observar somente produto de degradação do ácido nonadecanóico. Para os cálculos dos valores de biodegradação utilizou-se a abundância de cada biomarcador em relação ao padrão interno (heptadecano).

A Figura 8 mostra um dos cromatogramas obtidos, ilustrando os biomarcadores no tempo 0 h (painel a) e após 28 dias de ensaio (painel b), evidenciando o ácido octadecanóico como produto da biotransformação do ácido nonadecanóico pela linhagem de *Bacillus pumilus* AF 35. Outras linhagens também apresentaram o ácido octadecanóico como produto da biodegradação do ácido nonadecanóico, sendo elas: *Micrococcus luteus* (P4_1), *Bacillus megaterium* (P2_2), *Bacillus pumilus* (SG 49), *Stenotrophomonas maltophilia* (SG 59), *Streptomyces moderatus/chartreusis/alboniger* (AF 45) e *Bacillus pumilus* (AF 35).

O esqualano apresentou altas porcentagens de degradação (acima de 70%), porém não foi identificado nenhum produto de sua biotransformação, como mostra a Tabela 7. Os biomarcadores fenantreno, nonadecano e 4-colesten-3-ona apresentaram porcentagens de degradação menores, embora também não tenham sido detectados seus produtos.

Os resultados mostraram a degradação dos biomarcadores, mesmo subtraindo-se o valor obtido pelo controle de células inativadas (autoclavadas). A análise microscópica confirmou que as células deste controle ainda mantinham a integridade de suas paredes celulares mesmo após o processo de autoclavagem (dados não mostrados). Desta forma, os resultados apresentados sugerem que a variação na concentração do biomarcador neste controle pode ter ocorrido em função da adsorção do biomarcador às próprias células. Entretanto, isto não descarta a possibilidade de perda do biomarcador por fatores abióticos, como volatilização ou adsorção às paredes dos frascos de ensaio.

Tabela 7 - Biodegradação dos biomarcadores pelas bactérias.

Biodegradação dos Biomarcadores do Petróleo (%)					
Linhagens	1*	2*	3*	4*	5*
<i>Bacillus firmus</i> P 1 1	-*	3,5	63,8	68,7	16,7
<i>Micrococcus luteus</i> P 4 1	19,1	13,1	63,8	89,1	18,9
<i>Staphylococcus pasteurii/warneri</i> P 53	8,6	3,0	63,8	75,0	17,1
<i>Staphylococcus hominis</i> AF 32	20,0	13,1	-	89,1	18,1
<i>Marinobacter lutaoensis</i> AF 33	14,3	2,9	63,8	89,1	18,9
<i>Halomonas shengliensis</i> AF 19	9,5	13,6	63,8	89,1	18,9
<i>Citricella thiooxidans</i> AF 47	14,8	2,3	63,8	78,2	18,9
<i>Bacillus megaterium</i> P 2 2	4,6	-	62,4	-	7,6
<i>Bacillus simplex</i> SG 23_2	2,3	10,7	62,8	79,3	18,9
<i>Bacillus sphaericus</i> SG 25	7,3	9,8	60,4	82,8	18,9
<i>Bacillus pumilus</i> AF 35	15,4	9,2	63,8	79,9	16,5
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> SG 59	10,2	0,2	63,8	73,8	18,9
<i>Bacillus thurigiensis/cereus</i> SG 21	40,3	-	-	-	-
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> SG 47-1	15,4	12,0	50,2	83,3	18,2
<i>Kocuria rosea</i> AF 44	17,5	11,8	63,8	79,7	18,9
<i>Streptomyces moderatus/chartreusis/alboniger</i> AF 45	-	-	50,6	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> SG 16	-	13,6	63,8	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> SG 32	-	13,6	63,8	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> SG 49	-	-	63,8	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> SG 50	-	-	63,8	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> SG 01	-	13,6	63,8	-	-
<i>Bacillus pumilus</i> SG 30	-	13,6	63,8	-	-

Os valores de biodegradação foram obtidos através da equação: $B = ((IB_i - IB_f) / IB_i) \cdot 100$

onde: B: Porcentagem de Biodegradação

IB_i : índice de biodegradação em tempo 0

IB_f : índice de biodegradação final (28 dias)

Os índices de biodegradação foram obtidos a partir da equação 2: $IB = I_1 / I_x^{-1}$

onde: IB: índice de biodegradação

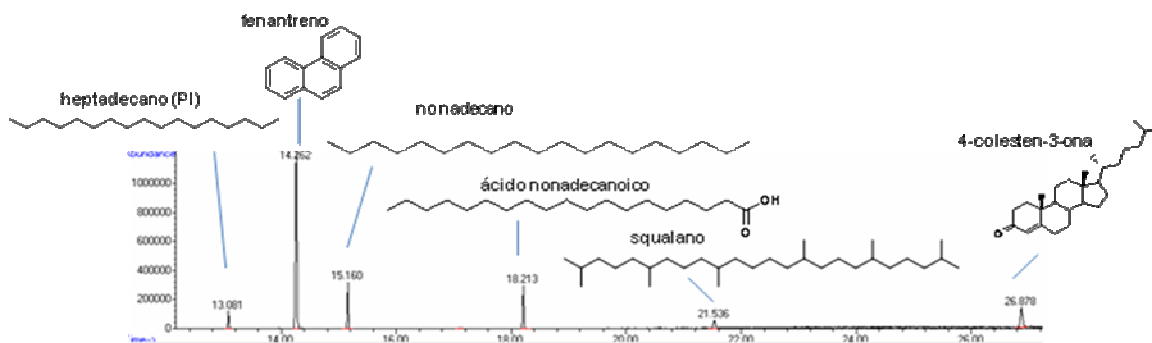
I_1 : áreas do padrão interno de quantificação (heptadecano)

I_x^{-1} : áreas dos biomarcadores durante os diferentes períodos de tempo avaliados (0 horas e 28 dias)

* biodegradação não detectada

*1- Fenantreno, *2- nonadecano, *3- ácido nonadecanoico, *4- Esqualano, *5- 4-colesten-3-ona

(a)



(b)

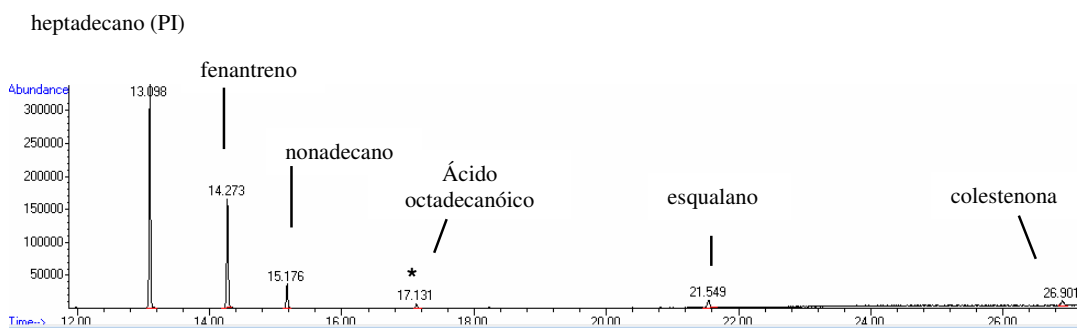


Figura 8. (a) Cromatograma de íons totais da no tempo 0 h. (b) Cromatograma representativo de íons totais da biotransformação após 28 dias sob ação da linhagem *Bacillus pumilus* (AF 35). PI = padrão interno de quantificação; * produto de degradação ácido octadecanoico.

6 DISCUSSÃO

Vários gêneros de bactérias encontrados no presente estudo já foram detectados em reservatórios de petróleo, ambientes marinhos ou associados com óleo bruto, tais como *Marinobacter*, *Halomonas* (ORPHAN et al., 2000; KORENBLUM et al., 2010), *Achromobacter*, *Streptomyces* (SETTE et al., 2007; KORENBLUM et al., 2010), *Micrococcus luteus* (TOLEDO et al., 2006), *Kocuria* (NAZINA et al., 2001), *Stenotrophomonas* e *Staphylococcus* (YOSHIDA et al., 2005), ou estão comumente associados com a degradação de hidrocarbonetos, como *Bacillus* (STAPLETON et al., 2000). Os gêneros *Marinobacter*, *Halomonas*, *Kocuria*, *Streptomyces* e *Staphylococcus* também já foram reportados como degradadores de hidrocarbonetos do petróleo de ocorrência em ambientes marinhos (GAUTHIER et al., 1992; MELCHER et al., 2002; NAZINA et al., 2001; RADWAN et al., 1995; ZHUANG et al., 2003).

A espécie *Bacillus pumilus* constituiu o grupo cultivável mais abundante recuperado das amostras de óleo e água de formação em estudo. Das 98 linhagens analisadas, 49 mostraram-se proximamente relacionadas a esta espécie. Estas bactérias foram isoladas de todos os poços de petróleo amostrados, com diferentes graus de biodegradação, profundidade e temperatura, assim como da água de formação. Estes dados podem sugerir a adaptação de *B. pumilus* a reservatórios de petróleo, ou seja, alta salinidade, temperatura e pressão elevadas, e deficiência dos teores de oxigênio, indicando sua capacidade de sobreviver em ambientes extremos.

Resultados de ensaios cromatográficos de degradação de biomarcadores do petróleo revelaram que uma linhagem de *B. pumilus*, isolada de amostra de óleo da Plataforma Pampo foi capaz de biodegradar moderadamente (~40%) o fitano (VASCONCELLOS et al., 2009). Estes mesmos autores relataram que populações de *B. pumilus* foram detectadas nas amostras de petróleo obtidas de reservatórios com diferentes graus de biodegradação utilizando uma abordagem molecular direta baseada na detecção por PCR grupo-específico. Ainda, linhagens de *Bacillus pumilus* já foram isoladas de óleos de corte e de consórcios que degradam hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de alto peso molecular, sendo reportadas como degradadores ativos destes compostos (TOROPOVA et al., 1986; GAUTHIER et al., 2003). Toledo et al. (2006) demonstraram que várias linhagens de *B. pumilus*, isoladas de descarte de óleo bruto, foram capazes de utilizar hidrocarbonetos aromáticos como única fonte de carbono e energia, e removê-los em altas porcentagens do meio de cultivo. Já existem relatos prévios

de isolamento de *B. pumilus*, assim como de outras espécies de *Bacillus*, a partir de reservatórios de petróleo brasileiros (SEBÁSTIAN, 1999).

O método de tipagem molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), utilizado para diferenciar os isolados em nível infra-específico, permitiu identificar 23 padrões de bandas distintos entre os isolados de *Bacillus pumilus*. Os resultados obtidos evidenciaram uma alta diversidade genética desta espécie nos reservatórios brasileiros. Os dados de literatura demonstrando a excelente capacidade de degradação de hidrocarbonetos desta espécie (TOLEDO et al., 2006) podem sugerir o seu potencial para deteriorar o petróleo nos reservatórios amostrados neste estudo.

Outras espécies do gênero *Bacillus* identificadas neste trabalho, *Bacillus sphaericus* e *Bacillus cereus*, já foram encontradas em ambientes associados a petróleo, como depósitos de armazenamento de óleo cru (YOSHIDA et al., 2005) e solos e lagos de água doce contaminados com petróleo (CHAILLAN et al., 2004). Ainda, Cunha et al. (2006) isolaram linhagens de *Bacillus cereus* de amostras de rocha-reservatório de petróleo provenientes de poços virgens no Rio de Janeiro, sugerindo que estas bactérias são autóctones nestes ambientes. Entretanto, linhagens de *B. cereus* isoladas em estudos prévios não apresentaram capacidade de degradar hidrocarbonetos do petróleo (CHAILLAN et al., 2004; CUNHA et al., 2006), nem tampouco apresentaram amplificação de genes catabólicos avaliados, como n-alcano monoxigenase, catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase (CUNHA et al., 2006). Estes dados corroboram os resultados encontrados no presente trabalho, uma vez que a linhagem SG_21 de *Bacillus cereus/thuringiensis* avaliada nos ensaios de CG-EM mostrou capacidade moderada (~40%) para degradar apenas o fenantreno dentre todos os hidrocarbonetos usados. Isto pode sugerir que estas bactérias sejam degradadores secundários, ou seja, assimilam metabólitos produzidos pelos degradadores primários de hidrocarbonetos.

Quanto à espécie *B. simplex*, não foram encontrados registros prévios desta bactéria em ambientes marinhos ou relacionados ao petróleo. Neste estudo, a linhagem *Bacillus simplex* analisada apresentou 62% de degradação para o ácido nonadecanóico e 79% para o esqualano, representando dados inéditos na literatura.

A espécie *Bacillus firmus*, frequentemente reportada na literatura como eficiente degradadora de hidrocarbonetos do petróleo, tem sido isolada de diferentes ambientes associados a petróleo. Mancera-López et al. (2007) recuperaram isolados de *B. firmus* de solos contaminados com hidrocarbonetos do petróleo e demonstraram sua habilidade para

degradar HAPs (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos) e HAs (hidrocarbonetos alifáticos). Em outro estudo, esta espécie foi isolada de reservatórios brasileiros e testada quanto à sua capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, mostrando-se eficaz em inibir o crescimento de outras espécies de bactérias, como as redutoras de sulfato (KORENBLUN et al., 2005). Os resultados obtidos neste estudo revelaram a habilidade de algumas linhagens à biodegradação dos compostos avaliados, como mostram os índices obtidos pela linhagem de *B. firmus*: ácido nonadecanóico (63,8%) e esqualano (68,7%).

Bacillus megaterium, outra espécie identificada neste trabalho, foi encontrada em amostras de esgoto da Nigéria, sendo sua capacidade de biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo testada e comprovada (OJO, 2006). Os resultados de biodegradação do presente estudo revelaram que a linhagem de *Bacillus megaterium* P2_2 biodegradou preferencialmente o ácido nonadecanóico (62%).

O isolado SG 47_1, identificado como *Achromobacter xylosoxidans*, foi recuperado do poço 1, considerado não biodegradado. Populações de *A. xylosoxidans* foram previamente detectadas em amostras dos poços 3 e 5 utilizando uma abordagem molecular direta baseada na detecção por PCR grupo-específico (VASCONCELLOS et al., 2009). Os resultados encontrados por estes autores revelaram que *Achromobacter xylosoxidans* apresentou o melhor índice de biodegradação do colestano (89%), além da habilidade de degradar e biotransformar fitano e ácido nonadecanóico. Outro estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa reportou o isolamento de *Achromobacter xylosoxidans* a partir de óleo coletado de poço com alto grau de biodegradação e temperatura de 52 °C (SETTE et al., 2007). Estes dados podem refletir a capacidade desta espécie de bactéria de sobreviver em condições de pressão elevada e temperaturas variando entre 52 e 85 °C, verificadas nestes poços. Esta espécie tem sido isolada de diversos ambientes associados a petróleo, além de reservatórios de petróleo, como plantas de tratamento de água residual de refinaria (BIESZKIEWICZ et al., 1998) e tanques de armazenamento de óleo cru (YOSHIDA et al., 2005), usando métodos de plaqueamento e cultivo. Diversos dados de literatura vêm demonstrando a capacidade desta bactéria para degradar hidrocarbonetos do petróleo, incluindo os mono e poliaromáticos (ANDREONI et al., 2004; NIELSEN et al., 2006; VINÑAS et al., 2005). No presente trabalho a linhagem *Achromobacter xylosoxidans* apresentou valores de biodegradação mais expressivos para o ácido nonadecanóico (50%) e esqualano (83%).

Uma das linhagens identificadas no presente estudo revelou alta similaridade com *Stenotrophomonas maltophilia* e apresentou 63% de degradação para o ácido nonadecanóico e 73% para o esqualano. Esta bactéria já foi anteriormente isolada a partir de óleo bruto armazenado, apresentando excelente capacidade de crescer em meio contendo o hidrocarboneto linear *n*-eicosano (C₂₀) como única fonte de carbono, indicando o seu potencial para degradar alguns componentes do petróleo (YOSHIDA et al., 2005).

O gênero *Marinobacter* foi também identificado entre as linhagens estudadas. Nossos resultados corroboraram descobertas anteriores destas bactérias em amostras provenientes de reservatórios de petróleo. Estes estudos empregaram métodos independentes de cultivo para a caracterização da microbiota, revelando a presença das espécies *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (ORPHAN et al., 2000) e *Marinobacter lipolyticus* (SETTE et al., 2007) nestes ambientes. *M. hydrocarbonoclasticus* é uma bactéria marinha extremamente halotolerante e degradadora de hidrocarbonetos (GAUTHIER et al., 1992; DOUMENQ et al., 2001; BARBEAU et al., 2002), ao passo que *Marinobacter lipolyticus* é uma espécie halofílica com atividade lipolítica, originalmente isolada de ambientes hipersalinos (MARTÍN et al., 2003). A linhagem identificada neste estudo apresentou estreita relação com a espécie *Marinobacter lutaoensis*, uma bactéria termotolerante isolada de uma fonte termal da costa de Taiwan (SHIEH et al., 2003). No presente trabalho, os resultados mostraram que o ácido nonadecanóico (63%) e o esqualano (89%) foram preferencialmente biodegradados pela linhagem avaliada.

Ainda, 10 linhagens isoladas da água de formação apresentaram estreita relação filogenética com 3 espécies de *Halomonas*, incluindo *Halomonas shengliensis* (WANG et al., 2007), recentemente descrita como uma nova espécie moderadamente halofílica isolada de solo salino contaminado com óleo bruto de campo de petróleo da China. Os autores verificaram que esta espécie é capaz de utilizar óleo cru como única fonte de carbono. Em um estudo de comunidades bacterianas utilizando metodologias independentes de cultivo, os autores detectaram bactérias pertencentes ao gênero *Halomonas* em amostras de água de produção provenientes de reservatórios da Califórnia (ORPHAN et al., 2000). A linhagem de *Halomonas* avaliada apresentou os melhores valores de biodegradação para o ácido nonadecanóico (63%) e o esqualano (89 %).

As bactérias *Staphylococcus hominis* e *Kocuria rosea* foram reportadas por Mariano et al. (2007) na biorremediação de solo contaminado com óleo diesel, obtido de posto de

combustível em que ocorreu vazamento subterrâneo. Como resultados os autores obtiveram que estas bactérias foram as mais predominantes dentre aquelas isoladas a partir dos consórcios utilizados nas estratégias de biorremediação, as quais foram capazes de acelerar a remoção de hidrocarbonetos de petróleo. O gênero *Kocuria* foi também reportado em outro estudo de diversidade filogenética de bactérias aeróbias isoladas de água de formação de um reservatório chinês (NAZINA et al., 2001). Os autores foram capazes de comprovar sua capacidade de utilizar hidrocarbonetos do petróleo. Neste estudo, a linhagem *K. rosea* AF 44 seguiu o padrão da maioria das bactérias, apresentando os melhores índices de degradação para o ácido nonadecanóico (~63%) e o esqualano (79%). Ao contrário da maioria das bactérias, a linhagem de *Staphylococcus hominis* AF 32, não apresentou habilidade à biodegradação do ácido nonadecanóico, apresentando 89% de degradação preferencial do esqualano.

O gênero *Streptomyces* já foi detectado em estudos relacionados à caracterização de comunidades microbianas de amostras de óleo degradado e não-degradado da Bacia de Campos, RJ, empregando bibliotecas de DNAr 16S (SETTE et al., 2007). Os autores verificaram uma abundância maior destas populações na biblioteca da amostra de óleo não biodegradado, o que poderia ser explicado pelo fato destes organismos não serem os principais responsáveis pela degradação de hidrocarbonetos nestas reservas. *Streptomyces* spp. também foram detectados nas amostras de óleo provenientes dos poços 1, 2, 3, 4 e 5 utilizando a metodologia de PCR grupo-específico (VASCONCELLOS et al., 2009). Embora este gênero não seja frequente e/ou predominante em reservatórios de petróleo, alguns representantes podem ser encontrados em ambientes associados a óleo ou relacionados à degradação de hidrocarbonetos (RADWAN et al., 1995, 1998; BACHOON et al., 2001). A linhagem *Streptomyces moderatus/ chartreusis/ alboniger* AF 45 identificada no presente estudo, apresentou capacidade de biodegradar somente o ácido nonadecanóico (50%).

A espécie *Micrococcus luteus*, recuperada neste estudo a partir de amostras de água de formação e óleo do poço 4, considerado altamente biodegradado, tem sido reportada em vários trabalhos como degradadora eficiente de hidrocarbonetos, sendo capaz de degradar naftaleno e fenantreno (TOLEDO et al., 2006; JOSHI e SATISH, 1996; TORRES et al., 2005). Em estudo prévio, Vasconcellos e colaboradores (2009) detectaram populações de *Micrococcus* spp. nos reservatórios 1, 3, 4 e 5, assim como em águas de formação de petróleo provenientes da Plataforma Pampo, utilizando uma abordagem molecular direta baseada em PCR grupo-específico. Estes autores demonstraram também que esta bactéria apresenta ótima

capacidade de degradação de hidrocarbonetos isoprenóides (fitano) e aromáticos (diidrofenantreno), o que sugere seu potencial como agente deteriogênico do petróleo nos reservatórios. Neste estudo, a linhagem de *Micrococcus luteus* apresentou melhores resultados de biodegradação para o ácido nonadecanóico (63%) e para o esqualano (89%).

Citreicella thiooxidans também foi identificada como uma espécie recuperada neste estudo a partir de amostras de água de formação, constituindo um gênero novo e espécie nova descrita por Sorokin et al. (2005). Estas bactérias foram isoladas pela primeira vez do Mar Negro, dependentes de NaCl para seu crescimento e capazes de oxidar tiosulfato, sulfeto e enxofre a sulfato, além de usar a energia metabólica dessas reações para o seu crescimento (SOROKIN et al., 2005). Nos ensaios de degradação a linhagem *Citreicella thiooxidans* apresentou valores semelhantes às demais bactérias, exibindo preferência pela degradação do ácido nonadecanóico (~64%) e esqualano (~78%).

De maneira geral, os resultados obtidos nos ensaios de biodegradação revelaram a preferência dos isolados bacterianos pela degradação do ácido nonadecanóico. Isto foi verificado em estudos prévios de nosso grupo de pesquisa para algumas linhagens de *Bacillus* (VASCONCELLOS et al., 2009) e corroboram dados de literatura sobre a produção e utilização de ácidos carboxílicos durante o metabolismo microbiano aeróbico (HÄNER et al., 1994).

Os isolados avaliados mostraram índices reais de até 89% de biodegradação, como no caso do esqualano. Entretanto, produtos desta biodegradação não foram observados nos cromatogramas. O mesmo ocorreu com o fenantreno e a 4-colesten-3-ona, onde houve variação da concentração inicial sem observação de produtos. O nonadecano apresentou os menores índices de degradação e o ácido nonadecanóico apresentou valores em torno de 60% para a maioria dos isolados, com exceção do *Bacillus thuringiensis*/*B. cereus* e *Staphylococcus hominis*.

A observação geral da degradação preferencial do ácido nonadecanóico pelos microorganismos cultivados recuperados dos poços de petróleo da Bacia de Campos, e a baixa biodegradação dos outros biomarcadores, poderia ser explicada pela estratégia utilizada para o isolamento, a qual não empregou hidrocarbonetos do petróleo como única fonte de carbono e energia nos meios de cultivo usados para o plaqueamento (CRUZ et al., 2010). Desta maneira, as bactérias selecionadas não se mostraram degradadores obrigatórios e não exibiram atividade biodegradadora relevante sobre biomarcadores de diferentes classes, como o

fenantreno, a 4-colesten-3-ona e o nonadecano. Neste sentido, muitas bactérias isoladas no presente estudo não apresentaram índices de degradação expressivos, como esperado de acordo com dados de literatura (GAUTHIER et al., 1992; MELCHER et al., 2002; NAZINA et al., 2001; RADWAN et al., 1995; ZHUANG et al., 2003).

O potencial biocatalítico dos isolados bacterianos obtidos das amostras de petróleo e água de formação, avaliado através de ensaios enzimáticos, revelou que estes podem representar fontes interessantes de enzimas para a biorredução de cetonas e monoxigenases, mais especificamente monoxigenase P450 (CRUZ et al., 2010). Estas últimas são enzimas que atuam na etapa inicial da degradação aeróbia de alcanos em muitas bactérias (HEISS-BLANQUET et al., 2005) e podem ser úteis em processos de biorremediação de áreas impactadas por petróleo. Entretanto, não foi encontrada correlação entre os isolados com maiores valores de intensidade de fluorescência para monoxigenases nos ensaios HTS e aqueles com resultados mais expressivos de biodegradação de hidrocarbonetos.

Embora as técnicas de cultivo tenham sido aprimoradas e tenham permitido a recuperação *in vitro* de um número crescente de micro-organismos ainda não cultivados (LEADBETTER, 2003), nosso conhecimento sobre sua ecologia permanece insuficiente para cultivar a maioria deles. Isto é particularmente verdade no caso de comunidades microbianas que degradam compostos recalcitrantes ou poluentes, onde a complexidade dos processos metabólicos necessários a essa degradação leva à formação de consórcios, com bactérias de diferentes gêneros e espécies, cada uma especializada em degradar um ou vários compostos (ABRAHAM et al., 2002). Neste contexto, as espécies recuperadas em cultivo neste estudo representam, na verdade, apenas uma pequena fração da microbiota total presente no ambiente do reservatório de petróleo, como já observado para muitos outros ambientes naturais (AMANN et al., 1995). Deste modo, possivelmente, muitas outras espécies responsáveis pela degradação dos compostos do petróleo *in situ* não foram recuperadas no presente estudo, tornando evidentes as limitações impostas pelo uso de culturas puras nos estudos de biodegradação.

7 CONCLUSÕES

- ✓ A caracterização taxonômica das bactérias recuperadas das amostras de petróleo da Bacia de Campos revelou uma ampla diversidade de gêneros de bactérias cultivadas, todos já relacionados a reservatórios de petróleo ou ambientes contaminados com óleo.
- ✓ A grande maioria das bactérias cultivadas recuperadas neste estudo, tanto para os poços biodegradados como para os não-biodegradados, mostrou-se relacionada ao gênero *Bacillus*. Isto pode ter sido decorrência dos meios de cultivo e condições utilizadas para o isolamento.
- ✓ As amostras de água de formação foram as que apresentaram a maior diversidade e quantidade de bactérias recuperadas em cultivo. Destas, a grande maioria foi representada também por diferentes espécies de *Bacillus*.
- ✓ Apesar de todos os gêneros já terem sido reportados na literatura como degradadores de hidrocarbonetos, neste trabalho o ácido nonadecanóico foi o único biomarcador degradado cuja formação de produtos foi observada.
- ✓ Os ensaios realizados revelaram apenas o potencial destes micro-organismos para degradar os biomarcadores do petróleo em condições *in vitro*, o que não implica necessariamente em um papel significativo destes micro-organismos nos processos de degradação nos reservatórios, dado que as condições *in situ* são muito distintas daquelas empregadas nos experimentos. Estes dados são reforçados pelo fato de terem sido encontrados muitos isolados do gênero *Bacillus* (*B. pumilus*, *B. sphaericus*, *B. firmus*, *B. megaterium*), tidos como excelentes biodegradadores, nas amostras de petróleo proveniente dos poços não biodegradados.
- ✓ A diversidade de bactérias analisada neste estudo representa apenas uma fração da diversidade cultivável presente nas amostras de petróleo e águas de formação, a qual foi obtida em função das condições de cultivo impostas. Muitas outras espécies possivelmente seriam recuperadas se outros meios de cultivo, temperatura, condições de pH e teor de oxigênio fossem utilizadas.
- ✓ A caracterização da microbiota presente nos reservatórios pode contribuir para o melhor conhecimento da ecologia destes ambientes e da fisiologia de seus habitantes, fornecendo subsídios para estudos futuros sobre os mecanismos biológicos responsáveis pela biodegradação do petróleo.

REFERÊNCIAS*

- ABRAHAM, W. R. et al. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 46-53, 2002.
- AMANN, R. I. et al. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 143-169, 1995.
- ANDREONI, V. et al. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. **Chemosphere**, v. 57, n. 5, p. 1-12, 2004.
- ASMUS, H. E. e PONTE, F. C. The Brazilian marginal basins. In: NAIRN, A. E., STHLI, F. G. (eds) **The ocean basins and margins**. New York: South Atlantic, Plenum Press, 1973. v. 1, p. 87-133.
- BACH, H. et al. An exocellular protein from the oil-degrading microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 enhances the emulsifying activity of the polymeric bioemulsifier emulsan. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2608-2615, 2003.
- BACHOON, D. S. Microbial community dynamics and evaluation of bioremediation strategies in oil-impacted salt marsh sediment microcosms. **Journal of the Microbiological and Biotechnology**, v. 27, p. 72-79, 2001.
- BACKES, B. J. et al. Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 149-150, 2000.
- BADALASSI, F. et al. Formation of a giant supramolecular porphyrin array by self-coordination. **Angewandte Chemie**, v. 39, p. 4070-4073, 2000.
- BARBEAU, K. Petrobactin, a photoreactive siderophore produced by the oil-degrading marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 3, p. 378-9, 2002.
- BARTH, T. Organic acids and inorganic ions in waters from petroleum reservoirs, Norwegian continental shelf: a multivariate statistical analysis and comparison with american reservoir formation water. **Applied Geochemistry**, v. 6, p. 1-15, 1991.
- BASS, C; LAPPING-SCOTT, H. The bad guys and the good guys in petroleum microbiology. **Spring**, v. 9, p. 17-25, 1997.
- BASTIN, E. S. The presence of sulphate reducing bacteria in oil field water. **Science**, v. 48, p. 21-24, 1926.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BERTHE-CORTI, L.; HÖPNER, T. Geo-biological aspects of coastal oil pollution. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 219, p. 171-189, 2005.

BIESZKIEWICZ, E. et al. An attempt to use selected strains of bacteria adapted to high concentrations of petroleum oil to increase the effective removal of petroleum products in excess activated sludge in laboratory conditions. **Acta microbiologica Polonica**, v. 47, p. 305–312, 1998.

BRAAK, N. V. Random amplification of polymorphic DNA versus pulsed field gel electrophoresis of *Sma*I DNA macrorestriction fragments for typing strains of vancomycin-resistant enterococci. **FEMS Microbiology Letters**, v. 192, p. 45-52, 2000.

CAPELLI, S. M. et al. Hydrocarbon bioremediation of a mineral-base contaminated waste from crude oil extraction by indigenous bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 47, p. 233–238, 2001.

CHANDLER, D. P. et al. A molecular comparison of culturable aerobic heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from a deep subsurface sediment. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 23, p. 131-144, 1997.

CHANDLER, D. P. et al. Effect of PCR template concentration on the composition and distribution of total community 16S rDNA clone libraries. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 475-482, 1997.

CHAILLAN, F. et al. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 587–595, 2004.

CHAPMAN, R. E. **Petroleum geology**: development in the petroleum science. Amsterdam: Elsevier, 1983.

COENYE T. et al. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 147–167, 2005.

CORD-RUWICH, R. et al. Sulfate-reducing bacteria and their activities in oil production. **Journal of Petroleum Technology**, v. 1, p. 97-106. 1987

CORRÊA, O. L. S. **Petróleo**: noções sobre exploração, perfuração, produção e microbiologia. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2003. 90 p.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P. Diversidade microbiana em amostras ambientais. In: GARAY, I.; DIAS, B. (Ed.) **Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais**. Petrópolis: Editora Vozes, 2001. p. 215-232.

CUNHA, C. D. et al. Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. **Applied Microbiological and Biotechnology**. v. 73, p. 949-959, 2006. doi: 10.1007/s00253-006-0531-2.

- CRUZ, G. F. et al. Searching for monooxygenases and hydrolases in bacteria from an extreme environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 319-329, 2010.
- DOUMENQ, P. et al. Influence of n-alkanes and petroleum on fatty acid composition of a hydrocarbonoclastic bacterium: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain 617. **Chemosphere**, v. 44, n. 4, p. 519-528, 2001.
- EVANS, P. J. et al. Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and o-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, p. 496-501, 1992.
- EWING, B. et al. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, v. 8, p. 175-185, 1998.
- FISHER, J. B. F. Distribution and occurrence of aliphatic acid anions in deep subsurface waters. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. v. 51, p. 2459-2468, 1987.
- GALVÃO, T. C. et al. Exploring the microbial biodegradation and biotransformation gene pool. **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 497-506, 2005.
- GAUTHIER, E. et al. Initial characterization of new bacteria degrading high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from a 2-year enrichment in a two-liquid-phase culture system. **Journal Applied Microbiological**, v. 94, n. 2, p. 301-311, 2003.
- GAUTHIER, M. J. et al. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 4, p. 568-576, 1992.
- GOMORI, G. Handbook of Biochemistry and Molecular Biology. In: FASMAN, G. D. (Ed.). **Physical and Chemical Data**. Florida: Boca Raton, 2000. p. 370-377.
- GREENE, A. C. et al. *Deferribacter thermophilus* gen. nov., sp. nov., a Novel Thermophilic Manganese- and Iron-Reducing Bacterium Isolated from a Petroleum Reservoir. **International Journal of Systematic Bacteriology**, p. 505-509, 1997.
- GUARDADO, L. R. et al. Petroleum Geology of the Campos Basin, Brazil, a model for a producing Atlantic type basin. In: EDWARDS J. D.; SANTOGROSSI, P. A. (Ed.). **Divergent/passive margin basins**. Tulsa: AAPG Memoir 48, 1989. p. 3-79.
- HAMANN, C. et al. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation genes in different soil bacteria by polymerase chain reaction and DNA hybridization. **FEMS Microbiology Letters**. v. 171, n. 1, p. 255-263, 1999.
- HÄNER, A. et al. Aerobic thermophilic waste sludge biotreatment: carboxylic acid production and utilization during biodegradation of bacterial cells under oxygen limitation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 904-909, 1994.
- HARAYAMA, S. et al. Microbial communities in oil-contaminated seawater. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 205-214, 2004.

HARRIS, J. L. et al. Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 7754-7759, 2000.

HEAD, I. M. et al. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. **Nature**, v. 426, p. 344-352, 2003. doi:10.1038/nature02134.

HEISS-BLANQUET, S. et al. Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 1392-1403, 2005.

HEUER, H. et al. 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, p. 3233-3241, 1997.

HUGENHOLTZ, P. et al. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 4765-4774, 1998.

JAHNERT, R. et al. The petroleum system of Campos Basin. BGP. In: AAPG INTERNATIONAL CONFERENCE AND EXHIBITION, 1998, Rio de Janeiro. **Abstracts...** Rio de Janeiro: Editora, 1998. p. 600-601.

JEANTHON, C. et al. Thermotoga subterranea. A new thermophilic bacterium isolated from a continental oil reservoir. **Archives of Microbiology**, v. 164, n. 2, p. 91-97, 1995.

JOSHI, B.; SATISH, W. PCR amplification of catechol 2,3-dioxygenase gene sequences from naturally occurring hydrocarbon degrading bacteria isolated from petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 19, n. 1, p. 5-15, 1996.

KANALY, R. A.; HARAYAMA, S. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 182, n. 8, p. 2059-2067, 2000.

KASTER, K. M. Characterisation of culture-independent and dependent microbial communities in a high-temperature offshore chalk petroleum reservoir. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 423-439, 2009.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111-120, 1980.

KORENBLUM, E. et al. Production of antimicrobial substances by *Bacillus subtilis* LFE-1, *B. firmus* H2O-1 and *B. licheniformis* T6-5 isolated from an oil reservoir in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 667-675, 2005.

KORENBLUM, E. et al. Bacterial diversity in water injection systems of Brazilian offshore oil platforms. **Environmental Biotechnology**, v. 85, p. 791-800, 2010.

LEADBETTER, J. R. Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 74-8, 2003.

L'HARIDON, S. et al. *Thermosiphon geolei* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a continental petroleum reservoir in Western Sibéria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p.1327–1334, 2001.

L'HARIDON, S. et al. *Petrotoga olearia* sp. nov. and *Petrotoga sibirica* sp. nov., two thermophilic bacteria isolated from a continental petroleum reservoir in Western Sibéria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 1715–1722, 2002.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: GOODFELLOW, M.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. p. 115-147.

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

LE BORGNE, S. et al. Biodegradation of Organic Pollutants by Halophilic Bacteria and Archaea. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 15, p. 74–92, 2008.

LIEN, T. et al. *Petrotoga mobilis* sp. nov., from a North Sea oil-production well. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 1007–1013, 1998.

LU, X. X. et al. Production of biosurfactant and its role in the biodegradation of oil hydrocarbon. **Journal of Environmental Science and Health, part A. Toxic/hazardous substances & environmental engineering**, v. 38, p. 482-492, 2003.

MAGOT, M. et al. Microbiology of petroleum reservoirs. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 77, p. 103-116, 2000.

MAGOT, M. et al. *Desulfovibrio bastinii* sp. nov. and *Desulfovibrio gracilis* sp. nov., moderately halophilic, sulfatereducing bacteria isolated from deep subsurface oilfield water. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1693–1697, 2004.

MANCERA-LÓPEZ, M. E. et al. Fungi and Bacteria Isolated from Two Highly Polluted Soils for Hydrocarbon Degradation. **Acta Chimica Slovenica**, v. 54, p. 201–209, 2007.

MARIANO, A. P. et al. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 346-353. 2007.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 56, p. 650-663, 2001.

MARGESIN, R. et al. Characterization of hydrocarbon degrading microbial populations in contaminated and pristine Alpine soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3085–3092, 2003.

MARSHALL, A. G.; ROGERS, R. P. Petroleomics: the next grand challenge for chemical analysis. **Accounts of chemical research**, v. 37, p. 53-59. 2003.

MARTÍN, S. et al. *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, 1383–1387, 2003.

MELCHER, R. J. et al. Impact of irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking on microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2858-2868, 2002.

MELO, I. S. et al. **Biodegradação**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2001. 440 p.

MELLO, R. et al. Geochemical and biological marker assessment of depositional environments using Brazilian offshore oils. **Marine and Petroleum Geology**, v. 5, p. 205-223, 1988.

MOHIAK, W. U. et al. Structural and stratigraphic evolution of the Campos Basin, offshore Brasil. In:_____. **Extentional Tectonics and Stratigraphy of North Atlantic Margins: Analogs**. AAPG Memoir 46, 1989. cap. 38, p. 577-598.

MOSQUEDA, G. et al. Toluene metabolism by the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* DOT-T1 strain, and its role in solvent impermeabilization, **Gene**, v. 232, p. 69-76, 1999.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

NAZINA, T. N. et al. Phylogenetic Diversity of Aerobic Saprotrophic Bacteria Isolated from the Daqing Oil Field. **Mikrobiologiya**, v. 71, n. 1, p. 103-110, 2002.

NAZINA, T. N. et al. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 433–446, 2001.

NIELSEN, D. R. et al. Direct estimation of the oxygen requirements of *Achromobacter xylosoxidans* for aerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in abioscrubber. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 16, p. 1293-1298, 2006.

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.

OKERENTUNGBA, P. O.; EZERONYE, O. U. Petroleum degrading potencils of single and mixed microbial cultures isolated from rivers and refinery effluent in Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 9, p. 288-292, 2003.

OLIVEIRA et al. Bacterial diversity characterization in petroleum samples from Brazilian reservoirs. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 445-452, 2008.

ORPHAN et al. Culture-dependent and culture-independent characterization of microbial assemblage associated with high temperature petroleum reservoirs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 700-711, 2000.

OTHA, Y. et al. Pseudomonas putida CE2010 can degrade biphenyl by a mosaic pathway encoded by the tod operon and cmtE, which are identical to those of P. putida F1 except for a single base difference in the operator-promoter region of the cmt operon. **Microbiology**, v. 147, p. 31-41, 2001.

PACE, N. R. New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology. **American Society for Microbiology News**, v 62, p. 463-470, 1996.

PETERS, K. E.; MOLDOWAN, J. M. **The Biomarkers Guide**: Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments. New York: Prentice-Hall, 1993. 363 p.

PITCHER, D. G. et al. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 8, p. 151-156, 1989.

PRITCHARD, P. H.; MUELLER, J. G.; LANTZ, S. E.; SANTAVY, D. L. The potential importance of biodiversity in environmental biotechnology applications: bioremediation of PAH-contaminated soils and sediments. In: ALLSOPP, D., Colwell, R. R, HAWKSWORTH, D. L. (Ed.). **Microbial diversity and ecosystem function**. Wallingford, UK: CABI, 1995. p. 161-182.

PONTE, F. C.; ASMUS, H. E. Geological framework of the Brazilian continental margin. **Geologische Rundschau**, v. 67, p.201-235, 1978.

POSPIECH, A.; NEUMAN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. **Technical Tips**, v. 11, p. 217-218, 1995.

RADWAN, S. S. et al. Soil management enhancing hydrocarbon biodegradation in the polluted Kuwaiti desert. **Applied Microbiological and Biotechnology**, v. 44, p. 265-270, 1995.

RANGEL, H. D. et al. Bacia de Campos . **Boletim de Geociências da Petrobras**, v. 8, n. 1, p. 203-217, 1994.

RAVOT, G. et al. Haloanaerobium congolense sp. nov., an anaerobic, moderately halophilic, thiosulfate- and sulfur-reducing bacterium from an African oil field. **FEMS Microbiology letters**, v. 147, n. 1, p. 81–88, 1997. doi:1097/97/s0378-1097

RUDOLPHI, A. et al. Anaerobic degradation of cresols by denitrifying bacteria. **Archives of microbiology**, v. 155, p. 238-248, 1991.

RÖLING, W. F. M. et al. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. **Research in Microbiology**, v. 154, p. 321-328, 2003. doi:10.1016/s0923-2508.

SAADOUN, I. Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. **Journal Basic Microbiology**, v. 42, p. 420-428, 2002.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SAN JOAQUIN GEOLOGICAL SOCIETY. Disponível em: <<http://www.sjgs.com/index.html>>. Acesso em 17 set. 2010.

SEBÁSTIAN, G. V. **Avaliação da população bacteriana presente em um reservatório de petróleo situado em águas profundas brasileiras, com ênfase no isolamento e caracterização de estirpes de Bacillus**. 1999. 192 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

SCHWARTZ, R. D.; LITSKY, W. Petroleum microbiology. In: MILLER, B. M.; LITSKY, W. (Ed.). **Industrial microbiology**. New York: McGraw-Hill Book co, 1976. p. 384-411.

SETTE, L. D. et al. Analysis of composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazilian basin. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 91, p. 253-266, 2007.

SHIEH, W. Y. et al. Marinobacter lutaoensis sp. nov., a thermotolerant marine bacterium isolated from a coastal hot spring in Lutao, Taiwan. **Canadian journal of microbiology**, v. 49, n. 4, p. 244-252, 2003.

SMITS, T. H. M. et al. Functional analysis of alkane hydroxylases from Gram- negative and Gram-positive bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 184, p. 1733-1742, 2002.

SOROKIN, D. Y. et al. Citreicella thiooxidans gen. nov., sp. nov., a novel lithoheterotrophic sulfur-oxidizing bacterium from the Black Sea. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 679–687, 2005.

STALEY, J. T.; KONOPKA, A. Measurement of *in situ* activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, p. 321–346, 1985.

STAPLETON, R. D. et al. Catabolic and genetic diversity of degradative bacteria from fuel-hydrocarbon contaminated aquifers. **Microbial ecology**, v. 39, n. 3, p. 211–221, 2000.

STEPHEN, J. R. et al. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to beta-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4147-4154, 1996.

SUGIURA, K. et al. Physicochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil. **Environmental science & technology**, v 31, p. 45-51, 1997.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 4: Molecular Evolutionary genetics analysis. (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

THOMPSON, J. D. et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleid Acids Research**, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

TOLEDO, F. L. et al. 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.

TOROPOVA, E. G. et al. Bacteria decomposing technical oils. **Mikrobiologiya**, v. 55, v. 3, p. 526-527, 1986.

TORRES, et al. Effect of temperature, and surfactant's HLB and dose over the TPH-diesel biodegradation process in aged soils. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3296-3302, 2005.

TOWNER, K. J.; COCKAYNE, A. **Molecular Methods for Microbial Identification and Typing**. Londres: Chapman & Hall. 1993. 202 p.

VAN BEILEN, J. et al. Alkane hydroxylases homologues in Gram positive strains. **Environmental Microbiology**. v. 4, n. 11, p. 676- 682, 2002.

VAN HAMME et al. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 503-549, 2003.

VASCONCELLOS, S. P. **Atividades Enzimáticas e de Biodegradação de Microorganismos do Petróleo da Bacia de Campos (Pampo Sul)**. 2006. 218 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Instituto de Química Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

VASCONCELLOS, S. P. et al. Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. **Organic Geochemistry**, v. 40, p. 574-588, 2009.

VINÃS, M. et al. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7008-7018, 2005.

WATKINSON, R. J. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Biodegradation**, v. 1, p. 79-92, 1990.

- WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological research**, v. 51, p. 221-271, 1987.
- WANG, Y. et al. Halomonas shengliensis sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, crude-oil-utilizing bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1222–1226, 2007.
- XU, M. et al. Isolation and characterization of alkane hydroxylases from a metagenomic library of Pacific deep-sea sediment. **Extremophiles**, v.12, p. 255–262, 2008.
- YOSHIDA, N. et al. Bacterial Communities in Petroleum Oil in Stockpiles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, p. 143-149, 2005.
- YOUNG, A. ; BLAKESLEY, R. Sequencing plasmids form single colonies with the dsDNA cycle sequencing system. **Focus**, v.13, p.137, 1991.
- ZHUANG, W. Q. et al. Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 251-257, 2003.
- ZINDER, S. H. et al. Methanogenesis in a Thermophilic (58°C) Anaerobic Digester: *Methanotherix* sp. as an Important Aceticlastic Methanogen. **Applied Environmental Microbiology**, v.47, p. 796-807, 1984.
- ZYLSTRA, G. J.; GIBSON, D.T. Aromatic hydrocarbon degradation: a molecular approach. **Genetic engineering news**, v. 13, p. 183-203, 1991