Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciências de Alimentos

# Caracterização da Comunidade Microbiana Em Ambientes Salinos e Suas Possíveis Aplicações Biotecnológicas

Francine Amaral Piubeli

**Orientadora:** Profa. Dra. Lucia Regina Durrant
**Co-orientadora:** Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini

Tese apresentada à Faculdade
de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas
para a Obtenção de Título de
Doutor em Ciencia de Alimentos

Campinas, Junho de 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Piubeli, Francine Amaral
P688c Caracterização da comunidade microbiana em ambientes salinos e suas possíveis aplicações biotecnológicas / Francine Amaral Piubeli. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Lucia Regina Durrant
Co-orientador: Fabiana Fantinatti Garboggini
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Biorremediação. 2. Arquéias. 3. Halomonas. 4. Degradação. 5. Bactérias Halofílicas. I. Durrant, Lucia Regina. II. Garboggini, Fabiana Fantinatti. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Caracterization of the microbiol community in saline environments and their possible biotechnological applications
Palavras-chave em inglês (Keywords): Biorremedition, Archea, Halomonas, Degradation, Halophilic bacterias
Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos
Banca examinadora: Lucia Regina Durrant
Gabriela Alves Macedo
Rose Marry Araújo Gondim Tomaz
Sara Cuadros Orellana
Suzete Aparecida Lanza Destefano
Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Lucia Regina Durrant
(Orientadora)

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
(Membro)

Profa. Dra.Rose Marry Araújo Gondim Tomaz
(Membro)

Profa. Dra. Sara Cuadros Orellana
(Membro)

Profa. Dra. Suzete Aparecida Lanza Destefano
(Membro)

Profa. Dra. Isis Serrano Silva
(Suplente)

Dra. Maricy Raquel Lindenbah Bonfá
(Suplente)

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(Suplente)

A minha mãe por todo apoio,
incentivo, exemplo e amor,

**DEDICO**

# AGRADECIMENTOS

Quero expressar os meus mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas que me acompanharam e me ajudaram neste (largo) caminho.

Agradeço primeiramente a Deus que me deu a vida e me acompanha em cada momento dessa larga jornada.

A minha mãe que é meu exemplo de mulher e profissional, sempre me apoiando e acreditando que um dia chegaria lá.... To chegando hein!

Ao meu pai pelo exemplo de profissional e os bons conselhos que me tornaram a mulher que sou.

Ao meu irmão pela presença e amizade.

Ao Javi pelo carinho, amizade, companheirismo e amor dedicado, além de toda ajuda nos difíceis momentos que passei na Espanha.

Aos meus queridos tios, tias e primos de um modo especial a Tia Rosa que sempre confiou em mim e esteve presente em cada momento da minha vida, mesmo nos difíceis sempre esteve me ajudando e apoiando, ao João Lucas pelas nossas conversas sem fim ao Tio Marcio pela presença de pai na minha vida e a Ivan, por todos os conselhos e ajudas.

A Tia Debora, Alemão e Djalma, pela disposição, alegria e toda a confiança que sempre depositaram em mim.... sem falar dos bons momentos de descontração.

A Profa. Dra Lucia Regina Durrant por ter confiado em mim mesmo antes de me conhecer, por toda ajuda e amizade, pelos conselhos não somente na vida profissional como na pessoal, obrigada por tudo!

Agradeço a Profa. Dra. Fabiana Fantinatti Gaborggini que me auxilio em muitos experimentos, pelo carinho e dedicação e principalmente pelo amor que tem pela ciência demonstrando isso com o excelente trabalho que faz.

Ao Prof. Dr. Mateus pelas idéias para a tese e ainda pelas perguntas que sempre me fizeram pensar.

À todos os membros da banca examinadora Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo, Profa. Dra.Rose Marry Araújo Gondim Tomaz, Profa. Dra. Sara Cuadros Orellana, Profa. Dra. Suzete Aparecida

Lanza Destefano, Profa. Dra. Isis Serrano Silva, Dra. Maricy Raquel Lindenbah Bonfá, Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre, que me auxiliaram nas correções enriquecendo e muito este trabalho.

Ao CNPq e Capes pelo auxilio financeiro e à UNICAMP pela excelente educação publica e de qualidade.

À Profa. Dra. Encarnación Mellado que me orientou na Universidade de Sevilla, pelas inúmeras técnicas ensinadas e pela preocupação com a minha formação.

Especialmente quero agradecer aos meus amigos do Laboratório de Sistemática e Fisiologia Microbiana, Isis, Emerson, Mineira, Ligia, Ivan, Eli, Cris, por todos os momentos juntos vividos, pelas ajudas e trocas de conhecimento. A Fer, por cada momento compartilhado dentro e fora do laboratório e por sua sincera amizade e apoio. A Maricy, por ser mais que uma companheira de trabalho, ser minha grande amiga e um exemplo de mulher e profissional, aos agregados Verônica e Oswaldo, que sempre encheram o laboratório de alegria.

Aos meus queridíssimos amigos do Laboratório de Halófilos da Universidade de Sevilla, Lourdes, Rafa, Paulina, Anita, Loli, Mer, Mon, Cristina, Aida, Manoel, Maria, Macarena e Javi por toda a ajuda, troca de conhecimento e principalmente por terem tornado a minha jornada na Espanha mais bonita e colorida.

Aos novos e já queridos amigos do Laboratório de Genética Molecular da Federal de São Carlos, Danilo, Fernando, Darlan, Adelita, Dani, Pri, Wesley, Natalia e Gabriel pela paciência nos meus dias de estresse pela tese e pela ajuda na nova área que estou iniciando. Ao Prof. Dr. Flávio por ter aberto as portas do seu laboratório e confiado em mim.

A toda Família Rossani que me recebeu em Campinas, me dando apoio e carinho e de modo especial a Gustavo que sempre me apoio e compartiu comigo desde o principio o sonho de ser doutora.

Finalmente aos meus amigos sem filtro de Bauru que fazerem dos meus finais de semana uma alegria, Camilinha, Bruna, Pedrim, Deverso, Vitao, Litio, Sorriso, Thiago, minha dentista predileta Déia e Biri que me alegra com a sua amizade a anos

**A todos o meu muito obrigada!**

***La paciencia es la madre de la ciencia!***

# Índice

## PARTE I

RESUMO..... 31

ABSTRACT.....35

**I INTRODUÇÃO ..... 39**

**II REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....43**

II.1. MICRO-ORGANISMOS EXTREMÓFILOS: MICRORGANISMOS HALOFÍLICOS ..... 43

II.2. MICRO-ORGANISMOS HALOFÍLICOS EXTREMOS.....44

II.2.1. Domínio *Archaea* ..... 44

II.2.2. Domínio *Bacteria* ..... 45

II.2.3. Domínio *Eukarya*.....45

II.3. ADAPTAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS HALOFÍLICOS AOS AMBINTES SALINOS ... 46

II.3.1. Adaptação de membrana ..... 46

II.3.2. Acumulo de solutos compatíveis..... 47

II.4. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS MICRO-ORGANISMOS HALOFÍLICOS ..... 50

II.4.1. Produção de enzimas ..... 50

II.4.2. Produção de polissacarídeos ..... 50

II.4.3. Solutos compatíveis..... 52

II.4.4. Alimentos fermentados ..... 53

II.4.5. Bio-plástico.....54

II.4.6. Lipossomas.....54

II.4.7. Biodegradação de Resíduos..... 54

II.5. AMBIENTES EXTREMOS: AMBIENTES SALINOS..... 56

II.5.1. Ambientes hipersalinos..... 58

II.5.1.1. Solos salinos..... 58

II.5.1.2. Ambientes aquáticos..... 59

II.6. OCORRÊNCIA DE COMPOSTOS AROMÁTICOS EM AMBIENTES SALINOS..... 60

II.6.1. Água de produção de petróleo..... 60

II.7. UTILIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS NA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS EM AMBIENTES SALINOS..... 61

II.8. BIORREMEDIAÇÃO..... 65

II.8.1. Bioaumentação..... 67

II.7.3. Bioestimulação..... 67

II.9. ESTUDO MOLECULAR DA DIVERSIDADE EM AMBIENTES SALINOS..... 68

**III OBJETIVOS**..... 71

## PARTE II

**I INTRODUÇÃO.....77**

**II OBJETIVOS.....81**

**III MATERIAL E MÉTODO**..... 85

III.1. COLETA DA AMOSTRA..... 85

III.2. MATERIAL BIOLÓGICO..... 85

III.2.1. Micro-organismos utilizados..... 85

III.3. MEIOS DE CULTURA ..... 85

III.3.1. Meios de cultivo para micro-organismos halofílicos..... 85

III.3.1.1. Meios complexos..... 85

III.3.1.2 Meios mínimos ..... 87

III.3.2. Meios de cultivo sólidos para a detecção da atividade hidrolítica. ..... 87

III.3.3. Meios de cultivo para *Escherichia coli* ..... 88

III.3.3.1. Meio complexo..... 88

III.4. CONDIÇÕES DE CULTIVO E PREPARO DO INÓCULO..... 89

III.5. PRESERVAÇÃO DAS CEPAS ..... 89

III.6. ISOLAMENTO DAS LINHAGENS ..... 90

III.6. 1. Isolamento utilizando meio complexo..... 90

III.6. 2. Isolamento utilizando meio mínimo..... 90

III.7. CARACTERIZAÇÃO FISIOLOGICA DAS LINHAGENS ..... 90

III.7.1. Requerimento salino..... 91

III.7. 2. Atividade hidrolítica extracelular..... 91

III.8. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS..... 93

III.8.1. Extração do DNA genômico..... 93

III.8.2. Determinação da concentração de DNA..... 94

II.8.3. Eletroforese do DNA em géis de agarose..... 95

III.8.4. Amplificação de fragmentos de DNA mediante PCR..... 96

III.8.5. Sequenciamento e análise filogenética de gene RNA ribossomal 16S..... 99

III.8.5.1. Sequenciamento do DNA ..... 99

III.8.5.2. Análise das seqüências de DNA..... 99

III.9. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS EM DISTINTOS COMPOSTOS..... .100

III.10. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE DISTINTOS COMPOSTOS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO.....100

III.11. ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....101

III.11.1. Catecol 2,3-dioxigenase.....101

III.11.2. Protocatecol 3,4-dioxigenase..... 102

III.11.3. Catecol 1,2-dioxigenase.....103

III.12. BIORREMEDIAÇÃO DA ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO.....104

III.12.1. Utilização dos isolados na bioaumentação da água de produção.....104

III.12.2. Avaliação da bioestimulação da microbiota presente na água de produção de petróleo através da adição de compostos.....105

III.15. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS E ARQUEAS PRESENTES NA ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO.....107

III.15.1. Sequenciamento dos clones e análises filogenética.....109

III.15.2. Análises estatísticas.....110

**IV.RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....113

IV.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS PRESENTES NA ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO.....113

IV.1.1. Caracterização fisiológica.....113

IV.1.1. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR..... 117

IV.1.1.2. Extração do DNA..... 117

IV.1.1.3 Amplificação do fragmento de DNA mediante PCR.....117

IV.1.1.4. Análise das sequências……..118

IV.2. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS EM DIFERENTES COMPOSTOS.....119

IV.2.1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO.....128

IV.4. ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA……..134

IV.5. BIORREMEDIAÇÃO DA ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO.....138

IV.5.1. Utilização dos isolados na bioaumentação da água de produção.....138

IV.2.1. Teste de inúmeros compostos para bioestimular a população natural a degradar os compostos presentes na água de produção.....139

IV.6.1 CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS E ARQUEAS PRESENTES NA ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO.....145

**V.CONCLUSÕES**……..161

**VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA**……..165

## PARTE III

**VII. INTRODUÇÃO.....** 201

**VIII. OBJETIVOS.....**205

**IX. MATERIAL E MÉTODO.....**209

**X. RESULTADOS.....**215

**XI. DISCUSSÃO.....223**

**XII. CONCLUSÃO.....**227

**XIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....** 231

## PARTE IV

**XIV. CONCLUSÕES.....239**

# Índice de Tabelas

**Tabela 1.** Principais dioxigenases de clivagem de anéis aromaticos utilizadas por micro-organismos .....62

**Tabela 2.** Meio SW e sua composição ..... 86

**Tabela 3.** Meio NA e sua composição ..... 86

**Tabela 4.** Meio HGM e sua composição..... 87

**Tabela 5.** Composição do meio LB ..... 88

**Tabela 6.** Compostos de interesse e seus respectivos fabricantes ..... 89

**Tabela 7.** Esquema geral das reações de PCR ..... 97

**Tabela 8.** Primes e condições utilizadas nas reações de amplificação do DNA por PCR..98

**Tabela 9.** Lista dos compostos utilizados na bioestimulação da biota presente na água de produção de petróleo.....105

**Tabela 10.** Linhagens isoladas.....113

**Tabela 11.** Porcentagem de tolerância de sal pelas linhagens estuda.....114

**Tabela 12.** Produção de enzimas hidrolíticas pelas bactérias isoladas de água de produção de petróleo.....116

**Tabela 13.** Crescimento das bactérias halofílicas em fenol suplementada com diferentes compostos.....125

**Tabela 14.** Crescimento das bactérias halofílicas em ácido benzóico suplementada com diferentes .....126

**Tabela 15.** Crescimento das bactérias halofílicas em ácido p-hidroxibenzoico suplementada com diferentes compostos. .....127

**Tabela 16.** Atividade enzimática obtida quando em presença de fenol.....135

**Tabela 17.** Atividade enzimática obtida quando em presença de ácido benzóico.....136

**Tabela 18.** Atividade enzimática obtida quando em presença de Paba.....136

**Tabela 19.** Taxa de redução de DQO das linhagens estudadas.....140

**Tabela 20.** Tratamentos realizados na água de produção de petróleo com o objetivo de biestimular a flora indígena.....141

**Tabela 21.** Tratamentos submetido à água de produção de petróleo e suas respectivas reduções de DQO..... .....144

**Tabela 22.** Índice de diversidade e dos estimadores de riqueza das bibliotecas de bactéria e arqueias da amostra de água de produção de petróleo. A classificação das sequências foi baseada no valor de *cutoff* de 0,03 determinado pelo programa DOTUR.....147

# Índice de Figuras


**Figura 1.** Esquema do mecanismo de osmoadaptação em procariotos.. ..... 49

**Figura 2.** Exemplo de derramamento de petróleo em regiões litorâneas. ..... 55

**Figura 3.** Exemplo de ambientes salinos em diversos lugares do mundo..... 57

**Figura 4.** Exemplos de solos salinos..... 58

**Figura 5.** Exemplos de ambientes aquáticos hipersalinos..... 60

**Figura 6.** Amostra de água de produção de petróleo. Evidenciando a coloração da mesma..... 61

**Figura 7.** Via de degradaçao do catecol – clivagem *orto* e *meta*..... 63

**Figura 8.** Relação de alguns compostos que possivelmente estimulam a produção de catecol como enzima de degradação..... 65

**Figura 9.** Prova da hidrólise da caseína ..... 91

**Figura 10.** Prova da hidrolise do amido..... 91

**Figura 11.** Prova da atividade DNAase..... 92

**Figura 12.** Prova da hidrolise de Tween 80 ..... 92

**Figura 13.** Resposta obtida quando positiva para a atividade pululase..... 92

**Figura 14.** Vetor pGem-T para clonagem de fragmentos de PCR.....107

**Figura 15.** Eletroforese em gel de agarose a 1%(p/v) mostrando a presença do DNA das sete linhagens isoladas.....117

**Figura 16.** Eletroforese em gel de agarose a 1%(p/v) mostrando a amplificação do DNA das sete linhagens isoladas.....117

**Figura 17.** Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das oito linhagens de bactérias halofílicas isoladas da água de produção e de microrganismos relacionado.....118

**Figura 18.** Crescimento das linhagnes Paba1 e df2 em meio suplementado com ácido benzóico e Paba como única fonte de carbono.....121

**Figura 19.** Crescimento das linhagens isoladas em meio com fenol e ácido benzóico suplementadas com extarto de levedura respectivamente.....122

**Figura 20.** Curva de crescimento das bactérias halofílicas moderadas em ácido p-hidroxibenzoico suplementado com 0,5% de extrato de levedura.....123

**Figura 21.** Comparação do crescimento da linhagem Paba 1 em meios contendo ácido benzóico suplementado ou não com extrato de levedura..... ...123

**Figura 22.** Degradação total de fenol, após 12 dias de experimento pelas linhagens isoladas da água de produção de petróleo.....128

**Figura 23.** Culturas demostrando a mudança na coloraçao do meio.....129

**Figura 24.** Curva padrão do ácido benzóico demonstrando que o tempo de retenção do composto é aproximadamente com 5.10 minutos de corrida com a fase móvel utilizada.....130

**Figura 25.** Taxa de degradação do ácido benzóico pela linhagem Paba 1 sem a suplementação de extrato de levedura.....131

**Figura 26.** Porcentagens de degradação do ácido benzóico obtidas pelas linhagens isoladas da água de produção de petróleo quando em presença de extrato de levedura.....131

**Figura 27.** Cromatogramas ilustrando a degradaçao do ácido benzóico pela linhagem Paba 1 em meio não suplementado com extrato de levedura.....132

**Figura 28.** Cromatogramas ilustrando a degradação do acido benzóico pela linhagem Paba 1 suplementada com extrato de levedura.....132

**Figura 29.** Degradação de Paba pela linhagem df2 sem a suplementação de extrato de levedura.....133

**Figura 30.** Variação da taxa de degradaçao da linhagem df2 quando em presença do extrato de levedura.....133

**Figura 31.** Taxas de degradaçao das diferentes linhagens estudadas.....133

**Figura 32.** Verificação do crescimento das linhagens isoladas e selecionadas da água de produção de petróleo após terem sido submetidas a um re-inoculo……139

**Figura 33.** Curvas de rarefação calculadas pelo programa DOTUR usando 97%, 95% e 90% de similaridade para o agrupamento das sequências 16S rDNA da biblioteca de bactéria.....147

**Figura 34.** Curvas de rarefação calculadas pelo programa DOTUR usando 97%, 95% e 90% de similaridade para o agrupamento das sequências 16S rDNA da biblioteca de arquéia.....148

**Figura 35.** Análise filogenética baseada nas sequências do gene RNA ribossomal 16S dos clones distintos da biblioteca de arqueia e micro-organismos relacionados recuperados das bases de dados.....149

**Figura 36.** Distribuição filogenética das seqüências de 16S rRNA obtidas de uma biblioteca de clones de arqueias.....150

**Figura 37.** Distribuição de clones de bactérias em grupos filogenéticos.....151

**Figura 38.** Análise filogenética baseada nas sequências do gene RNA ribossomal 16S dos clones distintos da biblioteca de bactéria e micro-organismos relacionados recuperados das bases de dados.....152

**Figura 39.** Distribuição filogenética das seqüências de 16S rRNA obtidas de uma biblioteca de clones de bactérias.....153

**Figura 40.** Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das linhagens de bactérias halofílicas isoladas da água de produção.....155

**Figura 41.** Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das linhagens de bactérias halofílicas isoladas da água de produção.....156

**Figura 42.** Alinhamento das sequências do catecol 1,2-dioxigenase da *Halomonas organivorans* com genes relacionados de outras bactérias halofilicas.....216

**Figura 43.** Organização gênica dos genes cat e bem em *Halomonas organivorans*.....218

**Figura 44.** Árvores filogenética dos genes 16S rRNA e *cat*A.....219

**Figura 45.** Resultado do RT-PCR……220

# Abreviações

| | |
|---|---|
| 1,2 CTD | catecol 1,2 dioxigensase |
| 3,4PCD | protocatecol 3,4 dioxigenase |
| aa: | aminoácido |
| CTAB: | bromuro de cetil trimetilamonio |
| ºC: | graus centígrados |
| DNTPs: | desoxinucleotídeos trifosfato |
| $D.O._{600\ nm}$: | densidade óptica a 600 nm |
| EDTA: | ácido etilén-diamín-tetracético |
| g: | grama |
| h: | horas |
| HPLC: | cromatografía líquida de alta eficiência |
| IPTG: | isopropil-β-D-tiogalactósido |
| kb: | kilobase |
| l: | litro |
| M: | molar |
| mg: | miligrama |
| mg: | miligrama |
| min: | minuto |
| ml: | mililitro |
| mm: | milímetro |
| mM: | milimolar |
| ng: | nanograma |
| nm: | nanómetro |
| orf: | fase aberta de leitura |
| pb: | pares de bases |
| PCR: | reação em cadeia da polimerase |
| p/v: | peso/volume |
| q.s.p.: | quantidade suficiente para |
| RNA | ácido ribonucléico |
| RNAr | RNA ribossômico |
| RNAase: | ribonuclease |
| r.p.m.: | revoluções por minuto |
| TAE: | tris- acetato-EDTA |
| TE: | tris-HCl-EDTA |
| µg: | microgramo |
| µl: | microlitro |

| | |
|---|---|
| µM: | micromolar |
| U: | unidades de enzima |
| v/v: | volume/volume |
| Xgal: | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranósido |

# Tabela de equivalência entre molaridade (M) e % de NaCl

| NaCl (M) | NaCl (%) |
|---|---|
| 0,1 | 0,6 |
| 0,2 | 1,2 |
| 0,5 | 2,9 |
| 0,75 | 4,3 |
| 1,0 | 5,8 |
| 1,5 | 8,7 |
| 2,0 | 11,6 |
| 2,5 | 14,5 |
| 3,0 | 17,4 |
| 4,0 | 23,2 |
| 5,0 | 29,0 |

# PARTE I

# *RESUMO*

A água residuária da extração de petróleo é altamente salina e contém uma mistura complexa de hidrocarbonetos, muitos dos quais são altamente tóxicos. Com o aumento da preocupação em preservar o meio ambiente, as tecnologias voltadas para a recuperação e despoluição de áreas degradadas tem ganhado a atenção. A biorremediação tem sido utilizada como método de biodegradação natural através da otimização de processos biológicos por ser econômica, versátil e a que mais se aproxima de uma despoluição ecologicamente aceitável. No entanto, a biorremediaçao depende de alguns fatores tais como: pH, temperatura, salinidade e pressão. Condições extremas desses fatores podem matar ou inibir espécies que não estejam adaptadas a ambientes extremos, por isso o desenvolvimento e otimização de processos de biorremediação de ambientes extremos contaminados por é de grande relevância. Desta forma, este trabalho teve como objetivos o isolamento e caracterização de bactérias halofílicas presentes na água residuária da extração de petróleo, além do estudo molecular dos genes envolvidos na degradação de compostos aromáticos para que posteriormente utilizássemos essas linhagens na biorremediação desse efluente, outra vertente desse trabalho foi o estudo da diversidade microbiana presente nesta água para auxiliar o direcionamento de esforços na minimização dos impactos causados com a exploração de petróleo. Foram isoladas sete linhagens de bactérias halofílicas da água de produção de petróleo, sendo todas pertencentes a família *Halomoneaceae* e com potencial para degradação de compostos aromáticos. A linhagem que apresentou maior taxa de crescimento nos compostos testados (ácido benzóico, fenol, ácido p-hidroxibénzoico) foi a denominada df2. Com relação à taxa de degradação dos compostos aromáticos testados, a dp3 degradou cerca 90% do fenol disponível, seguida pela df2 que degradou 80% desse mesmo composto. Quando a fonte de carbono foi o ácido benzóico, a df1 e DP3 degradaram 99% do composto e 70% do ácido p-hidroxibenzóico foi degradado em 12 dias de experimento pela linhagem df2. Para a degradação desses compostos a linhagem *Halomonas organivorans* seguiu a via de degradação do catecol na rota do β- cetoadipato compreendendo a codificaçao de diferentes enzimas por catRBCA. A comparação das seqüências da biblioteca de bactérias com as sequências do gene RNA ribossomal 16S presente nos bancos de dados GenBank e RDP revelou a presença de micro-organismos pertencentes aos gêneros *Marinobacter* e *Halomonas* e na comparação da técnica clássica de isolamento com a técnica independente de cultivo (biblioteca do gene RNA ribossomal 16S), foi encontrada uma maior diversidade na última. Finalmente de todos os testes realizados na tentativa de biorremediar a água de produção de petróleo, a bioestimulação foi a mais efetiva, sendo conseguida uma diminuição de 77% da carga orgânica

com a adição de solução de fosfato e alanina. Estes resultados demonstraram o grande potencial destas linhagens para a degradação de compostos aromáticos, bem como para a biorremediação da água de produção de petróleo, além de descrever a via metabólica utilizada por membros da família *Halomoneaceas* na degradação de compostos aromáticos, auxiliando assim nos esforços para biorremediação de ambientes salinos contaminados.

# *ABSTRACT*

The wastewater from oil extraction (produced water) is highly saline and contains a complex mixture of hydrocarbons, many of which are highly toxic. With increasing concern about preserving the environment, the technologies for recovery and remediation of degraded areas has been gaining attention. Bioremediation has been used as a method of natural biodegradation by optimizing biological processes because it is economical, versatile and it is the closest to a ecologically acceptable decontamination. However, bioremediation depends on factors such as pH, temperature, salinity and pressure. Extremes of these factors can inhibit or kill species that are adapted to extreme environments, so the development and optimization of bioremediation processes for contaminated extreme environments is of great importance. Thus, this work aimed at the isolation and characterization of halophilic bacteria present in the wastewater from oil extraction, and molecular studies of the genes involved with the degradation of aromatic compounds so that later we could use these strains in the bioremediation of this wastewater. Another aspect of this work was to study the microbial diversity present in this wastewater to assist in directing the efforts to minimize the impact of oil drilling. Seven strains of halophilic bacteria were isolated from of the produced water of oil production, all belonging to the family Halomoneaceae having potential for degradation of aromatic compounds. The strain that showed the highest growth rate in the tested compounds (benzoic acid, phenol, p-hydroxybenzoic acid) was strain DF2. Regarding the rate of degradation of the aromatic compounds tested, dp3 degraded about 90% of available phenol, followed by DF2 that degraded 80% of this compound. When the carbon source was benzoic acid, DP3 and df1 and degraded 99% and strain DF2 degraded 70% when the compound was p-hydroxybenzoic acid. For the degradation of these compounds the strain *Halomonas organivorans* followed the catechol degradation pathway ending in the formation of β-Ketoadipate and was shown to produce various enzyme activities encoded by catRBCA. Comparison of the 16S rRNA gene sequences of the isolates with the sequences present in the GenBank and RDP databases revealed the isolates belonged to the genera *Marinobacter* and *Halomonas*. Comparing these results with those obtained by classical taxonomic techniques demonstrated that the 16S ribosomal RNA gene analysis (culture independent method), found greater diversity. Finally, of all tests performed to bioremediate the produced water, biostimulation by addition of nutrients was the most effective, and achieved a reduction of 77% of the organic load with the addition of phosphate combined with alanine. These results demonstrate the great potential of these strains for the degradation of aromatic compounds, as well as for the bioremediation of produced water from crude oil production, and describe the metabolic pathway used by members of the family Halomoneaceas for the degradation of aromatic compounds, thus assisting in efforts to develop methods for the bioremediation of contaminated saline environments.

# *INTRODUÇÃO*

Numerosos processos industriais geram águas residuárias salinas. Isto sucede, por exemplo, na produção de diversos compostos químicos de interesse comercial como os pesticidas, herbicidas, determinados produtos farmacêuticos, além dos processos de extração de petróleo e gás.

A água de produção de petróleo é um efluente salino gerado durante a extração de petróleo tanto *onshore* quanto *offshore*. Volumes substanciais de águas salinas são produzidos juntamente com o petróleo. A quantidade de água gerada aumenta consideravelmente com a idade do poço e pode variar de 0,6 L água de produção/ L petróleo produzido podendo exceder em 10 vezes o volume de óleo produzido. O alto teor de sal, a mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos a presença de metais pesados, e o óleo presente na água de produção representam desafios ao emprego de tratamentos biológicos, sendo, nos últimos anos estudadas tecnologias alternativas para a degradação de seus contaminantes orgânicos.

A biorremediação é uma das ferramentas que pode ser utilizada na tentativa de recuperar e despoluir áreas degradadas, tendo como vantagem, o fato de ser um método econômico, versátil e o que mais se aproxima de uma despoluição ecologicamente aceitável.

No entanto, a eficiência da biorremediação depende de alguns fatores, tais como: pH, temperatura, salinidade e pressão. Condições ambientais extremas podem ser limitantes para espécies que não consigam se adaptar, por isso a adequação de processos de biorremediação em ambientes extremos, contaminados por compostos aromáticos é de grande relevância. Para isso é necessário utilizar micro-organimos capazes de realizar a biodegradação de forma eficiente sob estas condições.

Tentativas de utilizar micro-organismo mesófilos na biorremediação de ambientes com alta concentração de sais não foram bem sucedidas, mas quando determinadas bactérias halofílicas foram utilizadas, observou-se a degradação de uma grande quantidade de compostos recalcitrantes.

Para que o processo de biorremediação seja eficaz, o entendimento do mecanismo metabólico envolvido na degradação de poluentes por bactérias halofílicas é fundamental para a elaboração de sistemas eficientes de remedição. Além disso, o uso de técnicas moleculares que possibilitem o conhecimento da microbiota autóctone pode contribuir para o desenvolvimento de novas tecnologias que auxiliem na remediação de ambientes salinos impactados.

Deste modo, foi proposto o isolamento e caracterização de linhagens halofílicas isoladas da água de produção de petróleo para posterior utilização das mesmas na tentativa de biorremediar efluentes salinos produzidos pela indústria petrolífera.

# *REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*

## II.1.MICRO-ORGANISMOS EXTREMÓFILOS: MICRO-ORGANISMOS HALOFÍLICOS

Os micro-organismos que habitam ambientes extremos são chamados extremófilos e possuem características bioquímicas e especiais que os tornam extremamente úteis para o desenvolvimento de novos processos biotecnológicos.

Os micro-organismos especializados em viverem em ambientes salinos são denominados micro-organimos halofílicos, enquanto que, aqueles capazes de crescerem melhor em ausência de sal, mas que, toleram concentrações elevadas, são conhecidos como halotolerantes (Kushner, 1978). Cabe destacar que, ao longo dos anos, os conceitos ´´halofílico`` e ´´halotolerante`` estiveram sujeitos a inúmeras interpretações. Por este motivo, Kushner & Kamekura (1988) classificaram aos micro-organimos em diversos grupos em função da capacidade ótima de crescimento em diferentes concentrações salinas:

- ✓ **Não halofílicos.** crescem otimamente em meios com 0,2 M (aproximadamente 1% de NaCl).

- ✓ **Halotolerantes.** alguns destes micro-organimos podem tolerar elevadas concentrações de sal e são denominados halotolerantes. No caso de tolerarem uma concentração salina superior a 2,5 M de NaCl, são denominados halotolerantes extremos;

- ✓ **Halofílicos débeis.** possuem um crescimento ótimo em meios contendo 0,2-0,5 M (aproximadamente 1-3%) de NaCl;

- ✓ **Halofílicos moderados.** apresentam crescimento ótimo em meios com 0,5 -2,5 M (3-15%) de NaCl;

- ✓ **Halofílicos extremos.** o crescimento ótimo é obtido em meios que contenham de 2,5 -5,2 M (próximo à saturação) (15 - 30%) de NaCl.

Os micro-organismos halofílicos moderados e halofílicos extremos constituem os dois grupos predominantes nos ambientes salinos. Em concentrações salinas intermediárias (1,5 – 3 M de NaCl) os mais abundantes são as bactérias halofílicas moderadas, enquanto que os micro-organismos halofílicos extremos, representados fundamentalmente pelas bactérias halofílicas extremas ou arquéia, predominam em ambientes com salinidade superior à3 M de NaCl. Não obstante, existe uma faixa de salinidade na qual coexistem ambos os grupos de micro-organismos.

Além de procariotos (Bacteria e Archaea), nos ambientes salinos existe uma grande variedade de eucariotos o crustáceo *Artemia salina,* larvas da mosca do gênero *Ephydra*, alguns flagelados fotossintéticos pertencentes ao gênero *Dunaliella* e *Asteromonas*, assim como

diatomáceas (Rodríguez – Valera *et al*., 1985; Rodríguez – Valera 1988; Grant *et al.,* 1998; Ventosa *et al*., 1998b; Oren, 2002b; Ventosa, 2006). A diversidade presente nos ambientes salinos varia em função de vários parâmetros como a salinidade, a composição iônica, o pH, a temperatura, assim como a solubilidade do oxigênio (Rodríguez – Valera 1988; Javor, 1989; Oren, 1993).

Os primeiros estudos sobre micro-organismos halofílicos ficaram centrados na sua fisiologia, ecologia e metabolismo, principalmente de halofílicos extremos (Larsen, 1962; Lanyi, 1974; Dundas, 1978; Kushner, 1978; 1985). Além disso, os estudos destes micro-organismos despertaram um maior interesse ao descobrirem que as arquéia formavam parte de um novo domínio denominado *Archaea* (Woese & Fox, 1977; Woese, 1987). Dentro desta abordagem, a introdução de novas técnicas aplicadas ao campo da taxonomia, como o uso de sondas específicas e técnicas de PCR, acrescentaram dados importantes sobre a diversidade microbiana nos ambientes salinos (Rodríguez – Valera *et al*., 1999; Antón *et al*., 1999; Eder *et al*., 1999; Benlloch *et al*., 2001; 2002; Antón *et al*., 2002; Casamayor *et al*., 2002; Oren, 2002a; Sánchez – Porro *et al*., 2003).

## II.2. MICRO-ORGANISMOS HALOFÍLICOS EXTREMOS

Os micro-organimos extremos podem ser encontrados em qualquer dos três domínios descritos para seres vivos: *Archaea*, *Bacteria* e *Eukarya.* Até o momento no qual o gênero *Salinibacter*, as arquéia eram consideradas exclusivamente como micro-organimos halofílicos, de maior relevância ecológica (Antón *et al*., 2000). A descrição de *Salinibacter ruber* como uma nova espécie dentro do filo *Bacteroidetes* ampliou uma pequena lista de micro-organimos halofílicos extremos pertencentes ao domínio *Bacteria*.

### II.2.1. Domínio *Archaea*

Um dos grupos mais frequentes encontrados em ambientes salinos são os micro-organismo do domínio *Archaea*. Dentro deste domínio, os halofílicos encontram-se distribuídos em 3 famílias: *Methanospirillaceae*; *Methanosarcinaceae* e *Halobacteriaceae*. As duas primeiras famílias contém representantes marinhos, halofílicos e não-halofílicos, enquanto que a última família é formada apenas por micro-organimos halofílicos.

Entre as arquéias halofílicas extremas podemos mencionar *Methanohalobium evestigatum*, *Methanohalophilus mahii*; *Methanohalophilus portucalensis* (Boone, *et al*., 1993) e *Halomethanococcus doii* (Yu & Kawamura, 1988) da família *Methanosarcinaceae*. Além destes halofílicos metanogênicos, o grupo mais abundante e amplamente distribuído das archaea halofílicas são os representantes da família *Halobacteriaceae*, dentro da ordem *Halobacteriales*,

formada por um grande número de gêneros formalmente descritos. O gênero tipo da família é *Halobacterium* (Grant, 2001).

As arquéias membros da família *Halobacteriaceae*, são arquéias aeróbias, e apresentam uma morfologia celular bastante variada, incluindo formas bacilares, cocóides, quadrangulares, triangulares e pleomórficas. Os primeiros estudos sobre esses micro-organismos foram realizados em *Halobacterium salinarum* (antes conhecido como *Halobacterium halobium*, *Halobacterium salinarum* ou *Halobacterium cutirubrum*) (Ventosa & Oren, 1996; Gruber *et al*., 2004) isolado pela primeira vez de alimentos salgados.

Além destas, foram isoladas diferentes arquéias de diversos ambientes em todo o mundo. *Haloarcula marismortui* (Elazari – Volcani, 1957; Oren *et al*., 1990), *Haloarcula vallismortis* (González *et al.,* 1978; Torreblanca *et al*., 1986), *Haloferax volcanii* (Mullakhanbhai & Larsen, 1975; Torreblanca *et al*., 1986), de salinas solares, *Haloferax mediterranei* (Rodríguez – Valera *et al*., 1983) e *Halorubrum saccharovorum* (Tomlinson & Hochstein 1976; McGenity & Grant 1995) e inclusive de um lago antártico hipersalino, *Halorubrum lacusprofundi* (Franzmann, *et al*., 1988).

A classificação das arquéias está baseada nas características morfológicas, fenotípicas e análises das sequências do gene ARNr 16S, assim como, em características quimiotaxonômicas, como a composição dos lipídios polares, que mostrou ser um marcador molecular taxionômico e diferenciar micro-organismos em nível de gênero (Grant *et al*., 2001).

### II.2.2. Domínio *Bacteria*

Com relação ao domínio *Bacteria*, não foram caracterizados muitos membros deste domínio capazes de crescerem em condições extremas de salinidade. Entre eles, pode-se citar espécies dos gêneros *Halorhodospira* e *Salicola* ou as espécies *Halovibrio denitrificans*, *Halospina denitrificans*, *Thiohalospira halophila* e *Thiohalorhabdus denitrificans* (*Gammaproteobacterias*); a espécie *Actinopolyspora halophila* (actinobacteria) e o gênero *Salinibacter* (bacteróide)(Hischler-Réa *et al*., 2003; Imhoff *et al*., 1998; Maturrano *et al*., 2006b; Kharroub *et al.,* 2006a; Sorokin *et al.,* 2006; Sorokin *et al*., 2008a, 2008b; Antón *et al*., 2002; Oren, 2002a), assim como a espécie *Lentibacillus halophilus* (*Firmicutes*) (Tanasupawat *et al*., 2006) e alguns micro-organimos anaeróbicos halofílicos extremos (Mesbah & Wiegel, 2009; Heidi, *et al*., 2009; Bowers, *et al*., 2008; Mesbah, *et al*., 2007; Oren, 2000; Zhilina, *et al*., 1996; Cayol, *et al*., 1995; Zhilina & Zavarnin, 1990).

A família *Halomoneacea* possui membros capazes de crescerem em altas concentrações salinas como é o caso do gênero *Halomonas*. Esse gênero compreende mais de 20 espécies, incluindo bactérias isoladas de diferentes ambientes aquáticos e terrestres, sendo que na grande maioria com alta concentração de sal (García *et al*., 2004). Este gênero é considerado um modelo

de bactéria halofílica moderada por possuir mecanismos osmorregulatórios e adaptações fisiológicas para viverem em ambientes extremos, além disso, são metabolicamente versáteis, tendo espécies descritas como redutoras de nitratos durante processo de tratamento de água.

### II.2.3. Dominio *Eukarya*

Ainda que exista uma predominância de procariotos (bactérias e arquéias) nos ambientes salinos, também foram isoladas espécies de organismos eucariotos de ambientes com salinidade mais baixa. Em geral a presença e a abundancia de eucariotos diminuem com o aumento da salinidade (Ventosa, 2006). Foram encontradas, na sua maioria, espécies do gênero *Dunaliella* (Gunde & Cimerman, *et al*., 2004; Borowitzka & Silva, 2007), um organismo fotossintético unicelular que acumula glicerol em seu citoplasma como soluto compatível.

## II.3. ADAPTAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS HALOFÍLICOS AOS AMBIENTES SALINOS

Pode-se definir a osmo-adaptação como a resposta adaptativa que é produzida como consequência de uma situação de estresse hídrico pelo aumento na salinidade externa embora alguns procariotos e muitos micro-organismos eucariotos também possuam mecanismos eficazes de osmo-adaptação ao estresse hídrico resultante de concentrações elevadas de açúcar no meio externo (Brown, 1990). Como forma de adaptação às condições de elevada salinidade, os micro-organismos halofílicos desenvolveram uma série de mecanismos específicos que fundamentalmente compreendem, por um lado, as modificações de suas membranas celulares com relação a composição de fosfolipídios e ácidos graxos e, por outro lado, o acúmulo intracelular de grandes quantidades de íons ou outros osmólitos para compensar o estresse osmótico (Oren, 1999; Galinski, 1995).

### II.3.1. Adaptação de membrana

A membrana citoplasmática constitui uma barreira que separa o citoplasma (geralmente com concentração baixa e constante de sais) e o meio externo, no qual podem ocorrer flutuações consideráveis de salinidade. Por consequência, certas funções da membrana como, a permeabilidade a íons e a atividade das proteínas integradas à membrana estão condicionadas pela concentração salina externa (Russell, 1993; Ventosa, *et al*., 1998). Foi demonstrado que a adaptação da composição lipídica das membranas celulares frente uma nova situação de estresse osmótico inclui modificações tanto no tipo de fosfolipídios existentes na membrana, como no tipo de ácidos graxos que formam parte dos lipídios. Provavelmente, a finalidade desta modificação é

aportar consistência à membrana e preservar a estrutura de bicamada lipídica (Russell, 1989; 1993; Sutton, *et al*., 1991). A capacidade de adaptar eficazmente à membrana citoplasmática à salinidade externa é uma das características que diferenciam os micro-organismos halofílicos dos micro-organismos não-halofílicos.

Assim, as arquéias conseguiram adaptar suas membranas para que em elevadas concentrações salinas sejam muito estáveis: elas possuem ligações do tipo éter e cadeia de isoprenóide diferenciando-se de outros lipídios que possuem ligações do tipo éster e cadeia reta (Russell, 1989). Com respeito à composição das membranas das arquéias, há que se destacar a ausência de fosfolipídios com etanolamina, inositol e serina, além da presença predominante de fosfolipídios com fosfatidilglicerol e em algumas ocasiões de glicolipídios fosfatados (Tenchov *et al*., 2006).

Nas bactérias halofílicas moderadas foi demonstrado que, quanto maior a salinidade externa, maior é o conteúdo de fosfolipídios carregados negativamente, com a diminuição da presença de fosfolipídios de carga neutra (Russell, 1993; Ventosa *et al*., 1998).

De forma similar, em bactérias halofílicas Gram positivas, Ventosa *et al.,* (1998) encontraram a cardiolipina, que é um fosfolipídio aniônico, em uma proporção aumentada quando esses micro-organismos estavam em ambientes com alta salinidade.

### II.3.2. Acúmulo de solutos compatíveis

Os procariotos não possuem mecanismo para o transporte ativo de água, e por isso, tiveram que desenvolver outras estratégias, tanto para prevenir os efeitos prejudiciais da perda de água, como para poder estabelecer a necessária pressão de turgência. Ao longo da evolução foram desenvolvidos dois tipos de mecanismos que permitem controlar a concentração de compostos e moléculas osmoticamente ativas no citoplasma.

A primeira estratégia é denomina **"salt–in"** e consiste no acúmulo de elevadas concentrações de íons orgânicos no citoplasma, principalmente $K^+$ e $Cl^-$, até alcançarem níveis que se assemelhem à concentração salina do meio externo (Brown, 1990). Esta estratégia é a que adotam tipicamente as arquéias aeróbias halofílicas extremas da família *Halobacteriaceae* (Oren, 1999), ainda que também haja relatos de que a bactéria halofílica extrema como a *Salinibacter ruber* (Antón *et al*., 2002), assim como uma série de bactérias halofílicas moderadas Gram positivas, acetogênicas e redutoras de sulfato, da ordem *Haloanaerobiales* (Galinski, 1995; Oren 1999) utilizarem esse mecanismo. Os mecanismos utilizados por estes micro-organismos para manter seus citoplasmas livres de $Na^+$ consistem em acumular concentrações elevadas de $K^+$ mediante um sistema de importe de $K^+$ e outro de expulsão de $Na^+$. Assim, conseguem manter um

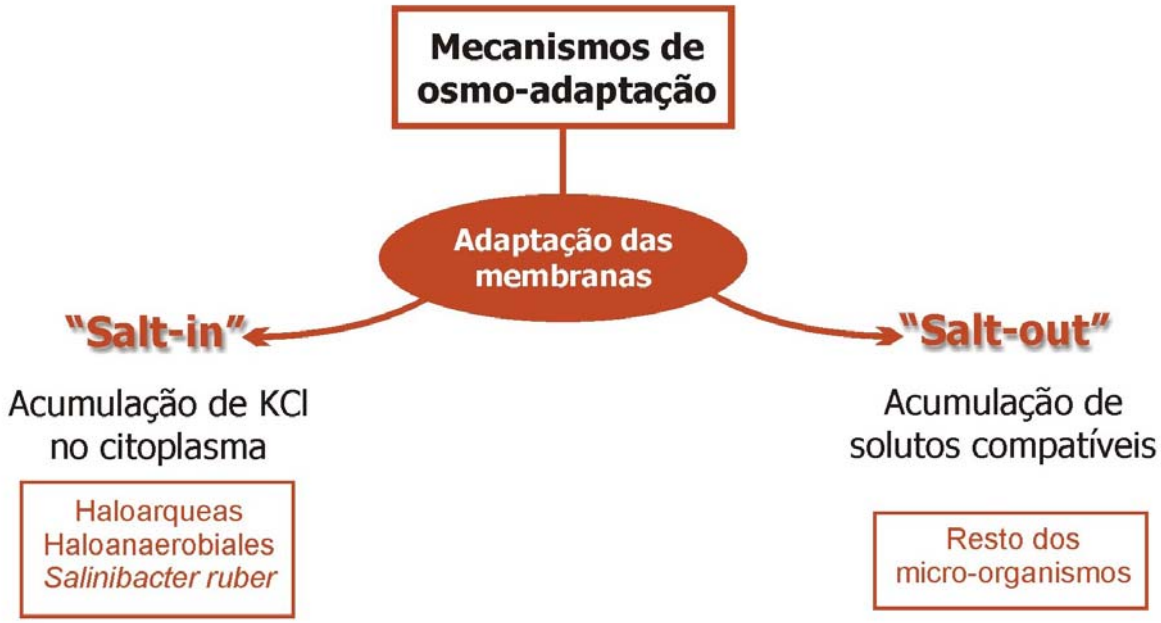
gradiente de $K^+$ de 100:1 (Galinski, 1995; Roeβler & Müller, 2001a). É importante ressaltar que nas células que utilizam este mecanismo de adaptação, tanto as enzimas como todos os componentes celulares sofreram um processo de evolução até que se adaptaram perfeitamente às elevadas concentrações salinas, assegurando assim o correto funcionamento da maquinaria celular. Para isto, as proteínas possuem uma porcentagem elevada de aminoácidos ácidos e baixa de aminoácidos básicos, junto com uma proporção relativamente escassa de aminoácidos hidrofóbicos, isso faz com estas proteínas não somente estejam, adaptadas às altas concentrações salinas, mas também que dependam de uma alta salinidade no meio para manter a sua conformação, já que se encontram uma diminuição na salinidade, o excesso de ânions desestabiliza a estrutura das moléculas devido às forças de repulsão que são produzidas quando não existem cátions ao redor (Oren, 1999). Estas modificações nas proteínas, que inicialmente foram descritas em arquéias, foram confirmadas também em bactérias halofílicas extremas *S. ruber* (Oren & Mana, 2002). O inconveniente que apresenta essa adaptação é que apesar de sua eficiência, é muito pouco flexível, sendo que os micro-organismos que utilizam desse método, possuem uma margem muito pequena de adaptação a diferentes osmolaridades do meio externo (Galinski & Trüper, 1994).

A segunda estratégia é denominada **"salt-out"**, já que, neste caso, as características do interior celular praticamente não são modificados, produzindo somente ajustes mínimos nas suas proteínas internas (por exemplo, as que formam os ribossomos), que são ligeiramente mais ácidas que da *E. coli*. Este mecanismo de adaptação consiste em manter o citoplasma livre de NaCl em uma grande proporção, e acumular uma grande quantidade de compostos orgânicos específicos, solúveis, que atuam como osmólitos para equilibrar a pressão osmótica externa. Trata-se de moléculas orgânicas de baixo peso molecular, muito solúveis e geralmente de carga neutra. Estes foram denominados "solutos compatíveis" porque não interferem no metabolismo celular (Brown, 1976), e podem acumular-se até alcançarem concentrações, da ordem de 1 mol/kg de água. O acúmulo destes compostos ajuda a manter a pressão de turgência, o volume celular e a concentração de eletrólitos, o que é fundamental para uma adequada proliferação celular. No caso desta estratégia não é necessário que as proteínas e as organelas estejam especialmente adaptados e permitirem que as enzimas funcionem de forma eficaz. Por esta razão, é a estratégia utilizada pela maioria dos procariotos, destacando as bactérias halofílicas moderadas e marinhas, as halotolerantes, algumas archaea halofílicas moderadas metanogênicas, além de algas, leveduras, fungos, plantas e células humanas (Welsh, 2000; Bremer & Krämer, 2000; Roberts, 2005; Burg *et al.*, 1997). De fato, a natureza destes solutos compatíveis está evolutivamente bem conservada nos três gêneros (Yancey, 1994).

Uma vantagem desse tipo de adaptação é que o nível dos solutos compatíveis que são acumulados é dependente da osmolaridade do meio (Galinski, 1995; Kempf & Bremer, 1998), o

que permite que as células não somente possam viver em elevadas concentrações (meio hiperosmótico), mas também em concentrações muito inferiores, já que este mecanismo permite adaptar a flutuações da pressão osmótica externa simplesmente ajustando a concentração interna dos solutos compatíveis a cada osmolaridade externa em particular (Kempf & Bremer, 1998). Para isto, as células possuem transportadores de solutos compatíveis do tipo canais mêcano-sensíveis como MscL, MscS e MscK, que liberam ao meio a quantidade suficiente dos mesmos para ajustar as novas condições osmóticas (Vargas & Nieto, 2004; Pflüger & Müller, 2004). Portanto, esta estratégia é a que permite aos micro-organismos colonizarem nichos ecológicos que, em princípio, possam parecer inóspitos para sua proliferação. Na figura 1, encontram-se esquematizadas as diferentes estratégias de osmoadaptaçao dos procariotos.

**Figura 1.** Esquema do mecanismo de osmo-adaptação em procariotos.



## II.4. POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS MICRO-ORGANISMOS HALOFÍLICOS

Nos últimos anos os micro-organismos halofílicos despertaram um grande interesse por sua enorme capacidade biotecnológica. Suas principais aplicações incluem a produção de enzimas hidrolíticas que podem ser utilizadas como biocatalizadores em condições extremas, não somente em altas salinidades, mas também em condições elevadas de temperatura e pH. Outra importante aplicação é a produção de polissacarídeos ou diversos compostos orgânicos que estes micro-organismos acumulam intracelularmente como os solutos compatíveis. Além disso, esses micro-organismos possuem um papel de grande importância nos processos de biodegradação de compostos recalcitrantes presentes em ambientes salinos, advindos não somente de atividades industriais como de acidentes causados pelas indústrias petroquímicas (Oren, 2010).

### II.4.1. Produção de enzimas

Muitos processos industriais, como a produção de corantes, são desenvolvidos em condições extremas, portanto, oferecem um amplo campo de aplicação para as enzimas produzidas por micro-organismos extremófilos, capazes de atuarem em condições extremas de temperatura, pH ou salinidade proporcionando desta maneira novas possibilidades nos processos biocatalíticos (Adams & Kelly, 1995; Eisenberg, 1995). As propriedades e funções destas enzimas foram extensamente estudadas já que oferecem importantes aplicações biotecnológicas: biorremediação ambiental, processos biosintéticos ou produção de alimentos (Kamekura, 1986; Mellado *et al*., 2004; Ventosa *et al*., 2005). A maioria das enzimas halofílicas isoladas e caracterizadas são provenientes de bactérias halofílicas e archaea, como é o caso da lípase e protease produzida pela bactéria halofílica extrema *Salicola* sp. IC10 caracterizadas por Moreno *et al*., (2009).

### II.4.2. Produção de polissacarídeos

Os polissacarídeos possuem grande interesse industrial devido às suas propriedades viscozizantes, estabilizantes, emulsionantes e formadores de géis. São formados principalmente por carboidratos cuja composição e estrutura podem apresentar variações (Sutherland, 1990).

Encontram-se amplamente distribuídos na natureza formando parte das carapaças de crustáceos marinhos, plantas, algas e micro-organismos (Páez, 2004). Numerosos micro-organismos produzem os chamados exopolissacarídeos ou EPS, esses polímeros extracelulares proporcionam a esses micro-organismos uma série de vantagens como a adesão microbiana na superfície ou o aumento da captação de nutrientes.

O estudo das bactérias halofílicas moderadas produtoras de EPS está adquirindo grande interesse nos últimos anos já que seus EPS possuem múltiplas aplicações industriais: indústria alimentícia, farmacêutica, médica, cosmética, petroquímica, entre outras (Sutherland, 1998; Quesada *et al*., 2004).

- ✓ Indústrias farmacêuticas. são empregados como princípio ativo e como parte de algumas fórmulas farmacêuticas. São utilizados os seguintes polímeros microbianos: dextrana, xantana, galana, ácido hialurônico, celulose e alginatos que, entre outras aplicações, são empregados para a preparação de vacinas frente ao *Haemophilus influenzae, Strectococcus pneumoniae* e *Neisseria meningitidis*.

- ✓ Indústrias petrolíferas. Graças às propriedades surfactantes e emulsionantes dos EPS, esses podem aumentar a eficácia nos processos de extração de petróleo, incrementando a viscosidade da água que é injetada no interior dos poços diminuindo a sua tensão superficial, essa água normalmente é advinda do mar e por isso os poços de petróleo apresentam uma elevada salinidade, o que tornam especialmente interessantes a utilização direta de bactérias halofílicas e *archaea* produtoras destes biopolímeros na remediação dos resíduos produzidos nesse processo.

Os primeiros estudos de EPS em bactérias halofílicas moderadas foram realizados com *Halomonas eurihalina* (Quesada *et al*., 1993). Foram descritos dois exopolissacarídios: o primeiro, EPS V2-7, que tem caráter ácido e cuja produção e composição química variam em função das características dos nutrientes presentes no meio de cultivo (Béjar, *et al*., 1996; Martínez – Checa, *et al*., 1996). As soluções aquosas apresentam uma viscosidade intermediária bastante termoestável. Esta propriedade junto com a capacidade de formar géis em pH ácido, e seu poder emulgente, confere uma qualidade ótima para diversos usos indústriais (Calvo *et al*., 1995; 2002). Além disso, pelo seu alto conteúdo de grupos fosfato, ficou comprovada a sua capacidade de estimular a proliferação de linfócitos T em células humanas, extraídas de sangue periférico, quando utilizado como estimulador antigênico do anticorpo monoclonal AntiCD3 (Pérez – Fernández *et al*., 2000). O segundo exopolissacarídio descrito, o EPS H-96 origina soluções de viscosidade intermediária a pH 7, no entanto, a pH ácido (pH 3) apresenta um comportamento similar ao polímero V2-7, proporcionando um aumento na viscosidade, o que ocasiona a formação de géis (Quesada *et al*., 1993; Béjar *et al*., 1998). Outra propriedade deste polímero é o seu poder emulgente sobre hidrocarbonetos e outras substâncias lipídicas (Calvo, *et al*., 1998).

Também foi descrito o EPS H-28, produzido pela bactéria *Halomonas eurihalina* H-28, que é capaz de emulsificar petróleo bruto mais eficientemente que outros surfactantes estudados

(Tween 20, Tween 80 ou Triton X-100), fazendo com que seja potencialmente útil na indústria petroquímica (Martínez-Checa *et al*., 2002).

Os exopolissacarídeos produzidos por *Halomonas maura* possuem propriedades viscosante e emulsificantes, particularmente o produzido pela cepa S-30 (EPS S-30), que é resistente ao estresse osmótico, mudanças de pH e processos de congelamento e descongelamento, atuando como quelante de metais pesados e fazendo com que esse composto tenha uma alta utilidade no campo da biorremediação. Este polímero chamado maurano, foi estudado detalhadamente por Arias *et al*. (2003).

Martínez-Checa *et al*., (2005a, 2005b, 2005c), isolaram varias bactérias halofílicas moderadas capazes de produzir exopolissacarídeos, entre as quais podemos citar: *Halomonas almeriensis* isolada do Cabo de Gata (Almería); *Alteromonas hispanica*, isolada da Fonte de Pedra (Málaga); e *Pelleronia marsiminoris*, isolada de uma salina costeira em Murcia. Recentemente, González – Domenech *et al*., (2008a, 2008b), isolaram bactérias halofílicas moderadas produtoras de exopolissacarídeos de solos salinos do sul da Espanha e em salinas no Chile sendo essas denominadas *Halomonas cerina* e *Halomonas nitroreducens* respectivamente.

### II.4.3. Solutos compatíveis

A natureza dos solutos compatíveis é variável, compreendendo poliálcoois, aminoácidos, aminas quartenárias, tetrahidropiridina entre outros (da Costa *et al*., 1998; Roberts, 2005). Cada micro-organismo possui o potencial de acumular preferencialmente determinados solutos compatíveis. Assim, por exemplo, as arquéias metanogênicas hipertermófilas acumulam principalmente o di-mioinositol fosfato, o manosilglicerol ou o glicerol fosfato (Muller, *et al*., 2005). No caso de bactérias halofílicas moderadas, os principais solutos compatíveis acumulados são os polialcoóis (glicosilglicerol), aminoácidos (prolina), diaminoácidos N-acetilados, aminas quaternárias (betaína e ectoína). Esses dois últimos são os solutos compatíveis mais acumulados, dentre os mencionados (Galinski *et al*., 1995; da Costa *et al*., 1998; Roberts, 2005; Yancey, 2005).

Como regra geral, as bactérias e os eucariotos acumulam solutos compatíveis de carga neutra enquanto que as arquéias acumulam solutos compatíveis semelhantes em estrutura aos acumulados por bactérias, mas com carga negativa (Martins *et al.,* 1997; Roberts, 2005). A carga negativa é conseguida mediante a adição de um grupo carboxi, fosfato ou sulfato, possivelmente para equilibrar a elevada concentração citoplasmática de cátions inorgânicos, principalmente o íon $K^+$.

Os solutos compatíveis despertaram enormes interesses industriais em virtude de possuírem um alto poder estabilizador e protetor de enzimas, células, ácidos nucléicos,

membranas e anticorpos frente a congelamento, dessecação, desnaturação por calor ou salinidade (Galinski *et al*., 1993; 1995; Louis *et al.,* 1994; Pastor,*et al*., 2010). Esses benefícios são baseados no modelo de ´´exclusão preferencial``. Segundo este modelo, os solutos compatíveis ficariam excluídos de uma primeira capa de hidratação das proteínas, o que daria lugar a uma hidratação preferencial da superfície das mesmas, diminuindo assim o volume que ocupam e estabilizando sua estrutura.

### II.4.4. Alimentos fermentados

No campo da alimentação, os micro-organismos halofílicos também possuem diversas aplicações. Com respeito às bactérias halofílicas moderadas, foi descrita a sua utilização no processo de elaboração de molho de soja, no qual os grãos de trigo e soja são ressuspendidos em água salina contendo 19% (p/v) de NaCl e incubados por 9 meses na ausência de luz (Kushner *et al.,* 1989). A espécie halofílica *Tetragenococcus halophila* é empregada como indicador da fermentação, podendo alcançar uma densidade de $10^8$ UFC/ml no molho de soja que contem uma concentração de 3M de NaCl (Uchida & Kanbe, 1993; Roling & Verseveld, 1996). Outra espécie do mesmo gênero, *Tetragenococcus muriatiacus* foi empregada na fabricação de molhos de fermentado de lula (Satomi *et al*., 1997). Além das bactérias halofílicas moderadas, também foi descrito micro-organismos halotolerantes que participaram da produção de molho de peixe Thai, condimento alimentício amplamente utilizado no sudeste asiático (Thongthai & Suntinanalert, 1991).

Nos últimos anos, foram isoladas inúmeras bactérias halofílicas moderadas de alimentos fermentados: a espécie *Halomonas alimentaria* parece que contribui para o aroma e sabor do ´´Jeotgal``, uma comida tradicionalmente coreana baseada em mariscos fermentados ( Yoon *et al*.,2002). Também a partir destes alimentos foram isolados outras bactérias halofílicas moderadas como *Psychrobcter alimentarius* (Yoon *et al.,* 2005c), *Salinicoccus jeotgali* (Islam *et al*., 2007) e *Paenibacillus tyraminigenes* (Mah *et al*., 2008).

A bactéria halofílica moderada *Marinospirillum insulare* foi isolada do molho´´kusaya`` que é uma salmoura fermentada utilizada para a produção do tradicional pescado seco na ilha Izu no Japão (Satomi *et al.,*2004).

Sabe-se que as arquéia produzem proteases extracelulares estáveis em sal, o que lhes confere grande importância nos processos de fermentação e na produção de aroma e sabor. Além disso, as arquéia são fundamentais na elaboração de produtos fermentado na Tailândia, o denominado *pla-ra* sendo obtido pela mistura de peixe fresco, sal e arroz e deixando fermentar a temperatura ambiente durante um período de 6-12 semanas (Phithakpol *et al*.,1995). É um

alimento rico em nutrientes, particularmente em aminoácidos e peptídeos e possui elevada concentrações salinas (7-18%, p/v de NaCl) (Saisithi et al.,1966; Phithakpol *et al.,*1995; Tanasupawat & Komagata, 2001; Tanasupawat *et al*., 2007; Chamroensaksri *et al*., 2009). Novas espécies de arquéia também foram isoladas a partir de alimentos semelhantes (Roh *et al*., 2007a; 2007b; Namwong *et al*., 2007; Yachai *et al*., 2008; Tapingkae *et al*., 2008).

### II.4.5. Bioplástico

Os polihidroxialcanoatos (PHA) constituem uma família heterogênea de poliésteres que constituem uma forma de armazenamento de carbono intracelular, e são considerados termoplásticos (Ventosa & Nieto, 1995). Os PHAs bacterianos oferecem algumas vantagens sobre os outros plásticos: são biodegradáveis, resistentes a água e biocompatíveis. Esta última propriedade lhes confere uma grande importância farmacêutica e clínica, incluindo seu uso em drogas de liberação retardada, substituição de peças ósseas e suturas cirúrgicas (Laffert *et al*., 1988).

Algumas arquéia, especialmente *Haloferax mediteranei*, são capazes de produzirem grandes quantidades de PHA quando cultivadas em meio contendo glicose ou amido (Lilo & Rodríguez – Valera, 1990).

### II.4.6. Lipossomas

Os lipossomos são lipídios com cadeias do tipo éster, que nas arqueia recebem o nome de arqueosomos. Os arqueosomos são considerados indutores das células Th1, Th2 e $CD8^{+}T$, que são células do sistema imunológico e por isso existem inúmeros estudos para o uso desse composto em vacinas (Krishnan & Sprott, 2008). Além disso, podem apresentar uma aplicação importante na indústria cosmética como novo tipo de lipossoma. Estes lipossomas são caracterizados por serem mais resistentes à biodegradação comparados aos que são utilizados atualmente, com uma maior vida útil e relativa resistência à ação de outras bactérias (Galinski & Tindall, 1992).

### II.4.7. Biodegradação de Resíduos

Existem numerosos processos indústriais que geram águas residuárias salinas. Isto ocorre, por exemplo, na produção de diversos compostos químicos de interesse comercial como os pesticidas, herbicidas, determinados produtos farmacêuticos, além dos processos de extração de petróleo e gás.

Nas ultimas décadas foram descritos diversos micro-organismos halofílicos quandto ao seu potencial para biodegradar compostos tóxicos, de modo que se tornaram uma importante alternativa aos tratamentos convencionais em situações nas quais a salinidade seja um fator limitante (Oren *et al*., 1992; 1993).

Com relação à capacidade de degradar compostos contaminantes em altas concentrações de sais, foram realizados estudos em uma marisma do sul da França (Bertrand *et al*.,1990) na qual foi isolada a arquéia EH4 a qual degradou alcanos (tetradecano, hexadecano e pristano) e hidrocarbonetos aromáticos (fenantreno e antraceno). Foi determinado que outras haloarquéia descritas pertencentes ao gênero *Haloferax* possuem maior potencial metabólico que a cepa EH4. Vários estudos foram realizados para determinar a capacidade metabólica destes micro-organismos para degradar compostos orgânicos (Mellado & Ventosa, 2003).

O estudo das bactérias halofílicas moderadas capazes de degradarem compostos aromáticos está adquirindo grande relevância. Oren *et al*., 1991, demonstraram a degradação de vários compostos aromáticos pelas bactérias *Haloanaerobium praevalens* e *Orenia marismortui* em concentrações salinas de 13-14% (p/v) NaCl. DeFrank & Cheng (1991) purificaram e caracterizaram uma bactéria halofílica moderada que foi isolada a partir de um manancial hipersalino em Utah (EUA), pertencente ao gênero *Alteromonas* e capaz de degradar vários compostos tóxicos organofosforados.

Maltsev *et al.,* 1996, isolaram várias cepas pertencentes a família *Halomonadaceae*, capazes de utilizar como fonte de carbono e energia o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), potente herbicida relatado como poluente em inúmeros habitats. Os genes responsáveis pela degradação deste composto foram clonados e transferidos à outras bactérias halofílicas moderadas, conferindo a estas a capacidade de hidrolisar o contaminante (Kleinsteuber *et al*.,2001).

**Figura 2.** Exemplo de derramamento de petróleo em regiões litorâneas.

Um dos principais contaminantes ambientais é o fenol, e algumas espécies pertencentes ao gênero Halomonas, que possuem a capacidade de utilizarem este composto como fonte de carbono e energia, foram isoladas. Assim, *H. venusta* foi isolada da água do mar e é capaz de crescer em meios contendo fenol (Muñoz *et al*., 2001). Por outro lado, foi estudado o efeito da salinidade e do pH na degradação de fenol na bactéria *Halomonas campisalis*, determinando que o fenol é usado como fonte carbono e energia a valores de pH compreendidos entre 8-11 e uma

concentração de NaCl de 0-15% (p/v)(Alva & Peyton, 2003). Garcia *et al*., 2005b, realizaram estudos em habitats hipersalinos do sul da Espanha centrados na caracterização de bactérias halofílicas moderadas capazes de degradar em diferentes compostos aromáticos. A caracterização das cepas isoladas determinou que as espécies do gênero *Halomonas* são as principais responsáveis por esta degradação, descrevendo a espécie *Halomonas organivorans* (Garcia *et al*.,2004) capaz de degradar um grande número de compostos aromáticos: ácido benzóico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido salicílico, fenol, ácido p-cumárico e ácido ferúrico. Garcia *et al.,* 2005a, descreveram a espécie halofílica moderada, *Thalassobacillus devorans*, isolada de uma salina no sul da Espanha, caracterizada também pela sua capacidade em degradar fenol.

Além disso, a partir de distintos ambientes hipersalinos foram isolados micro-organismos capazes de degradar hidrocarbonetos, inclusindo hexanos e fenantrenos (McMeekin *et al*., 1993; Margesin & Schinner, 2001; Peyton *et al*., 2004). Nos últimos anos, foram realizados estudos em vários campos petrolíferos salinos da China baseados na caracterização de bactérias halofílicas moderadas capazes de degradar hidrocarbonetos e alguns derivados de petróleo. Assim, foram descritas várias linhagens bacterianas com a capacidade de utilizar o petróleo bruto como única fonte de carbono: *Halomonas shengliensis* (Wang *et al.,* 2007a), *Halomonas gudaoniensis* (Wang *et al*., 2007b) e *Marinobacter gudaoniensis* (Gu *et al*., 2007). Por outro lado, uma equipe de pesquisadores europeus sequenciaram o genoma de uma bactéria chave para a degradação de petróleo, *Alcanivorax borkumensis* (Golyshin *et al*., 2003). Isso contribuiu para a compreensão do estudo destes micro-organismos, permitindo o desenvolvimento de novos métodos eficazes e ecológicos para limpar águas contaminadas com petróleo.

Frequentemente, como resultado da atividade industrial, os ambientes salinos são contaminados com metais pesados que constituem um grande problema para o ecossistema. Diversos estudos permitiram o isolamento e caracterização de um grupo de bactérias halofílicas moderadas resistentes a cinco dos mais importantes contaminantes industriais: cádmo, zinco, cobre, cromo e mercúrio (Nieto *et al*., 1989; Rios *et al*., 1998).

## II.5. AMBIENTES EXTREMOS: AMBIENTES SALINOS

Sempre houve dificuldades para definir este tipo de ambiente, fundamentalmente devido à complexidade e relatividade do termo ´´ambiente extremo``. Em geral, pode-se considerar como ambiente extremos, aqueles locais não-favoráveis, inclusive letais, para a maioria dos seres vivos.

Existem ambientes no planeta cujas características encontram-se próximo dos limites físicos para o desenvolvimento dos processos vitais, apresentando valores extremos de determinados parâmetros como temperatura, pH, radiações, concentrações de nutrientes ou

metais tóxicos, pressão hidrostática, potencial redox ou salinidade (figura 3). Apesar destas características, podemos encontrar organismos extremófilos, que não somente toleram como muitas vezes requerem tais condições para sobreviverem.

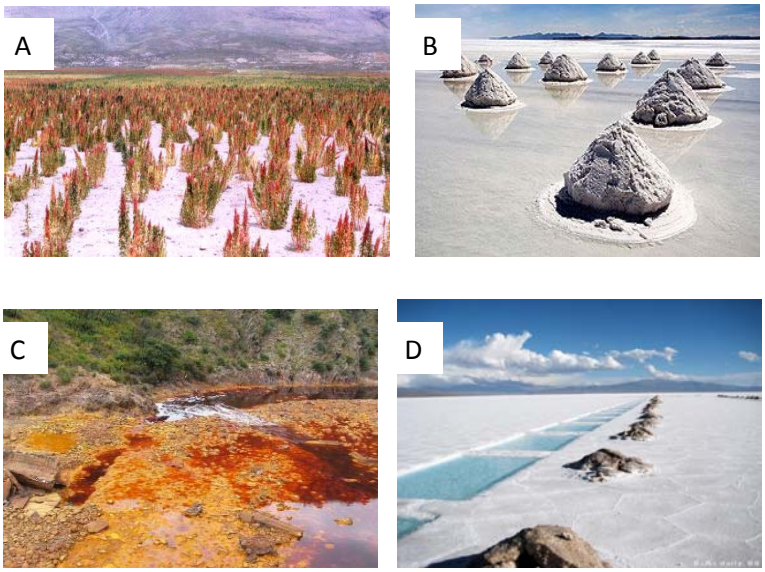



**Figura 3.** Exemplo de ambientes salinos em diversos lugares do mundo. A. Australia; B. Espanha; C. Espanha; D. Brasil.

Brock (1979) definiu estes ambientes do ponto de vista taxonômico como ´´ambientes nos quais existem uma escassa diversidade de espécies, estando ausentes alguns grupos taxonômicos``. No entanto, os estudos realizados nos últimos anos revelaram que os micro-organimos extremófilos não estão representados de maneira tão reduzida como se pensava no início. Como demostram os trabalhos realizados por Oren (1993 e 2002a), Horikoshi & Grant (1998), Ventosa *et al*., (1998b), Jones, *et al*.,(1998), Litchfield *et al*., (1999), Litchfield & Gillevet (2002), Benlloch *et al*., (2002), González-Toril *et al*., (2003), Cifuentes *et al*., (2003), Perdersen *et al*., (2004) e Ventosa (2006).

Não é fácil encontrar uma definição na qual se possam incluir todos os ambientes considerados extremos, porém é possível observar que, em alguns habitats, as condições ambientais são tão extremas que somente um número limitado de espécies capazes de crescer em uma alta densidade celular, encontra-se adaptados à essas condições (Ventosa, 2006).

## II.5.1. Ambientes hipersalinos

Os ambientes salinos estão entre os exemplos mais característicos dos ambientes extremos nos quais, além das elevadas concentrações salinas há outras peculiaridades ambientais que podem limitar a biodiversidade, tais como: oscilações de temperatura (dependendo da área geográfica, elevadas ou baixas), baixa concentração de oxigênio, baixa disponibilidade de nutrientes, oscilações de pH, presença de metais pesados e outros compostos tóxicos, assim como a radiação solar ou a pressão (Rodríguez-Valera, 1988).

### II.5.1.1. Solos salinos

Dos diferentes ambientes salinos, os solos são aqueles que contém uma concentração de cloretos de sódio entre 0,1% a 0,2% (Javor, 1989). Estão estendidos por todo o mundo (figura 4), especialmente, ainda que de maneira não exclusiva, em zonas áridas ou semi-áridas. Estudos realizados em solos hipersalinos (concentração de cloreto de sódio superior a 0,2%) revelaram a existência de uma micro-biota complexa e adaptada e estes ambientes (Quesada *et al*.,1982; Rodríguez - Valera; 1988 e 1993; Valenzuela - Encinas *et al*., 2008). Ainda assim, estudos realizados em minas de sais (Norton & Grant, 1988) mostraram uma diversidade variada de micro-organismos.

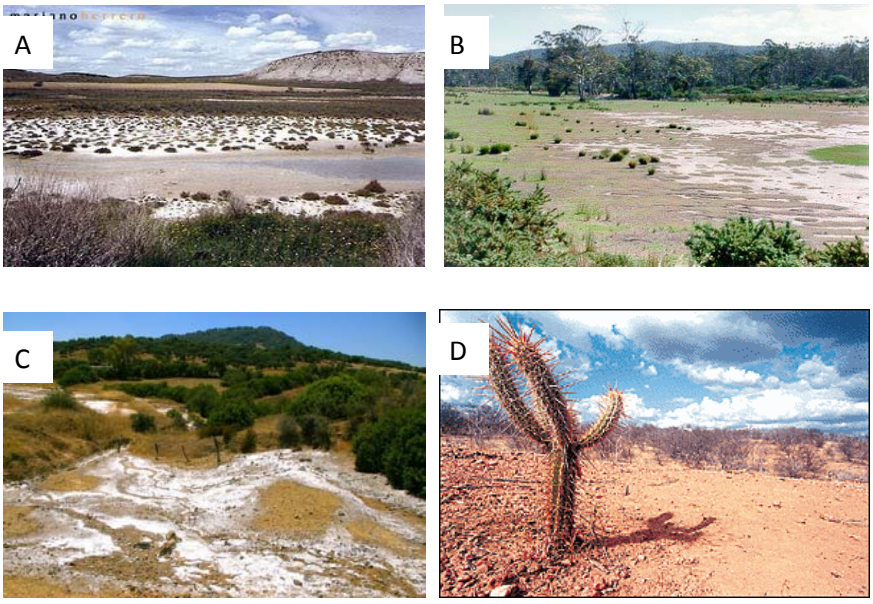



**Figura 4.** Exemplos de solos salinos. A. Solo salino da Espanha; B. Solo salino da Tasmânia; C. Solo Salino da Austrália; D.Solo salino do nordeste do Brasil.

### II.5.1.2. Salinas

As salinas são consideradas excelentes modelos para o estudo dos micro-organismos halofílicos, principalmente por possuirem uma elevada concentração de sais e estarem submetidas a uma forte radiação solar além de sofrerem uma grande variação de temperaturas entre o dia e a noite, apresentando ainda uma baixa concentração de oxigênio já que a sua solubilidade nestes meios é mínina (Rodríguez-Valera & Ruiz- Berraquero, 1983).

Inúmeros micro-oganismos vêm sendo isolados de salinas de todo o mundo, dentre eles pode-se mencionar a *Halomonas organivorans*, isolada da Salina de Isla Cristina no sul da Espanha.

- ✓ Salinas de Isla Cristina. As salinas de Isla Cristina estão situadas nos pântanos do rio Carreras e remontam a Época Romana onde era utilizada para a conservação de peixes. As salinas são oriundas de porções de pântanos que foram transformados artificialmente para a extração de sal. A atividade de extração salina na região teve seu auge na segunda metade do século XIX até meados do século XX, chegando a ocupar 30% do território do pântano. Atualmente apenas 1% de sal é exportado dessas salinas.

### II.5.1.3. Ambientes aquáticos

Dentre os ambientes salinos, os aquáticos são os mais estudados. Caracterizam-se por possuírem uma concentração salina maior que a apresentada pela água do mar, que corresponde aproximadamente a 3,5% de sais totais (Edgerton & Brimbecome, 1981) (figura 5). Com base na origem e natureza dos sais presentes nestes ambientes eles são classificados em dois grupos: atalasosalinos e talasosalinos:

- ✓ Os ambientes aquáticos atalosalinos são aqueles formados por dissoluções de depósitos minerais de sais de origem continental, cujas proporções podem não assemelha-se às encontradas em um ambiente marinho. Estes ambientes correspondem a lagos salgados naturais e em sua composição de sais predominam os cátions divalentes, como o $Ca^{2+}$ e o $Mg^{2+}$ (Brock, 1979; Rodríguez – Valera & Ruiz – Berraquero, 1983; Rodríguez – Valera, 1993). A composição iônica destas águas pode variar amplamente em função das características geográficas, topográficas ou climatológicas (Grant & Ross, 1986). No caso de lagos salinos alcalinos na composição de sais predominam íons monovalentes. Existem alguns lagos naturais cuja microbiota foi amplamente estudada, como é o caso do Mar Morto (Israel), dos Great Salt Lake (Estados Unidos), alguns lagos da Antártica e lagos alcalinos, em particular do oeste Africano, como o Lago Magadi e os Lagos de Wadi Natrum (Rodríguez – Valera, 1988; Javor, 1989; Grant *et al* ., 1990).

- ✓ Os ambientes aquáticos talasosalinos, possuem origem marinha e, portanto, uma composição salina similar à da água do mar. A lenta evaporação da água, permite a concentração dos sais, mantendo proporções relativamente parecidas com as apresentadas pelo mar. Apresentam um pH neutro ou ligeiramente alcalino e predomínio de íons $Cl^-$ e $Na^+$ (Brock, 1979; Williams, 1981; Oren, 1994). O processo de evaporação é produzido, por exemplo, em salinas construídas pelo homem para a obtenção de sal comum. O Great Salt Lake de Utah (Estados Unidos) constitui uma exceção dentre os tipos de água, pois não é de origem marinha, mas apresenta uma composição química semelhante a da água do mar (Post, 1977; Rodríguez – Valera, 1993).

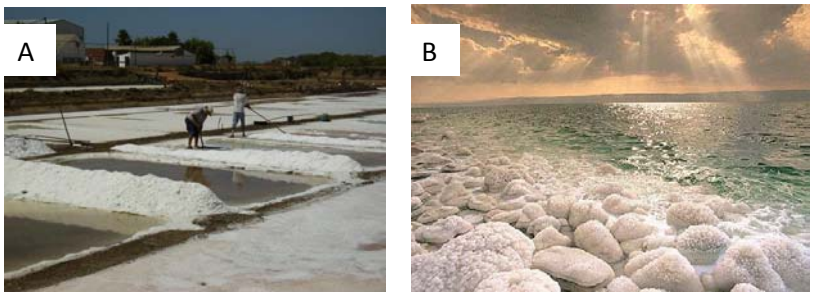



**Figura 5.** Exemplos de ambientes aquáticos hipersalinos. **A**. Salina de Isla Cristina (Espanha); **B**. Mar Morto

## II.6. OCORRÊNCIA DE COMPOSTOS AROMÁTICOS EM AMBIENTES SALINOS

Ambientes marinhos e regiões costeiras estão expostas a compostos fenólicos antropogênicos e biogênicos, os quais se acumulam em sedimentos superficiais. Além disso, compostos aromáticos são produzidos naturalmente através de degradação da lignina, a qual está presente abundantemente nos sedimentos de estuários (Lovell et al., 2002). Dentre as muitas formas de contaminação que podem ocorrer nos ambientes salinos, a produção de efluentes pelas indústrias petroquímicas possui um lugar de destaque: a cada ano bilhões de galões de água de produção de petróleo, contendo altas concentrações de sais (≥ 3,5% p/v) e compostos orgânicos, são gerados por estas indústrias, durante a produção, transporte e refino do óleo bruto. A água de produção, como já é sabido, contém uma alta quantidade de sais, o que a difere de outros efluentes produzidos por processos industriais (Flynn *et al*.,1996; Roe *et al*.,1996).

### II.6.1 Água de produção de petróleo

A água de produção de petróleo é um efluente salino gerado durante a extração de petróleo. Neste efluente geralmente encontramos minerais dissolvidos, constituintes oleosos dissolvidos e dispersos, produtos químicos empregados durante o processo de produção, sólidos e gases dissolvidos (Oliveira & Oliveira, 2002) (Figura 6).

A indústria petroquímica tem aumentado gradativamente a capacidade de explorar águas profundas. A consequência deste avanço na produção é a geração de resíduos advindos desse processo, tais como compostos orgânicos e tendo como agravante uma alta concentração salina (Freire, *et al.,* 1998).

**Figura 6.** Amostra de água de produção de petróleo. Evidenciando a coloração da mesma.

O solo ao redor dos poços de extração pode também ser contaminado por esta água residuária. Durante a produção de petróleo *onshore* em sistemas que operam com recuperação secundária, ou seja, quando a capacidade de extração do poço de petróleo é esgotada água do mar é injetada na tentativa de uma maior recuperação. A conseqüência desse fato é a geração de grandes volumes de água a serem descartado no mar ou em tanques e lagoas para tratamento posterior. Nos locais de descarte desses resíduos podem ser encontrados micro-organismos halofílicos (Oliveira & Oliveira, 2000; Cuadros-Orellana, 2003).

Devido à presença de altas concentrações de sais nestes efluentes, é esperada a presença de micro-organismos halofílicos, os quais podem estar envolvidos na degradação dos compostos aromáticos presentes no petróleo contaminante (Fu & Oriel, 1999). Desta forma, arquéias e bactérias halofílicas podem ser empregadas na biorremediação da água produzida na extração de petróleo (Dassarma & Aroma, 2001; Dyall-Smith & Danson, 2001).

## II.7. UTILIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS NA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS EM AMBIENTES SALINOS

Como mencionado anteriormente, os ambientes salinos são frequentemente contaminados por compostos orgânicos como resultados de atividades industriais (Oren *et al*., 1992; Margesin *&* Schinner, 2001). Contaminações desses ambientes constituem um sério problema ambiental devido à alta toxicidade dos compostos orgânicos presentes. Em muitos casos, a biodegradação constitui o mecanismo primário para a remoção destes compostos. No entanto, o desempenho esperado muitas vezes não é alcançado em virtude das condições salinas. Nestes casos, os compostos não são degradados ou são degradados com baixa eficiência. Uma alternativa para esse problema é a utilização de bactérias halofílicas adaptadas a viveram em ambientes extremos (Piedad Diaz *et al*., 2000; Margesin & Schinner, 2001; Mellado & Ventosa, 2003; Peyton *et al*., 2004).

Para a degradação dos compostos aromáticos as bactérias possuem uma maquinária enzimática especializada, na qual as dioxigenases são as constituintes centrais. Elas catalisam a abertura de anéis aromáticos hidroxilados por incorporação de dois átomos de oxigênio ($O_2$) nos substratos, e podem ser classificados em dois grupos, de acordo com a clivagem do anel (Harayama & Rekik, 1989). Enzimas intradioisclivam o anel entre dois grupos hidroxilas (rota *orto*), enquanto a enzima do tipo extradiol cliva o anel entre um grupo hidroxila e outro carbono adjacente não hidroxilado (rota *meta*) (Figura 5). As subfamílias de enzimas intra e extradiol dioxigenases diferem primariamente em sequência e estrutura, elas utilizam diferentes mecanismos para ativar o oxigênio por ataque nucleofílico/eletrofílico no substrato aromático: o primeiro usa $Fe^{3+}$, enquanto o segundo emprega $Fe^{2+}$. Por esta razão, eles exibem absoluta fidelidade para a posição de clivagem do anel. As principais dioxigenases estão sumarizadas na Tabela 1.

Catecol e protocatecoato são oxidados por dioxigenases de clivagem de anel, para formar beta-cetoadipato, que depois é convertido em intermediários do ciclo de Krebs (Harwood & Parales, 1996). De fato, o protocatecol divide a rota beta-cetoadipato incluindo seis enzimas no catabolismo de diversos compostos fenólicos para intermediário do ciclo do ácido cítrico.

**Tabela 1.** Principais dioxigenases de clivagem de anéis aromáticos utilizadas por micro-organismos

| Dioxigenases (DO) | E.C. | Reação |
|---|---|---|
| **Intradiol (Orto- clivagem)** | | |
| Catecol 1,2-DO | 1.13.11.1 | Catecol + $O_2$ = cis , cis -muconato |
| Protocatecoato 3,4-DO | 1.13.11.3 | 3,4-dihidroxibenzoato + $O_2$ = 3-carboxi-cic,cis-muconato |
| **Extradiol (Meta-clivagem)** | | |
| Catecol 2,3 -DO | 1.13.11.2 | Catecol + $O_2$ = Hidroximuconato semialdeido |
| Protocatecoato 4,5-DO | 1.13.11.8 | Protocatecol + $O_2$ = 4-carboxi-2-semialdeido hidroximuconico |
| Homoprotocatecoato 2,3- DO | 1.13.11.15 | 3,4-dihidroxitenilacetato + $O_2$ = 2-hidroxi-5-carboximetilmuconato semialdeido |

| Dioxigenases (DO) | E.C. | Reação |
|---|---|---|
| Homogentisato 1,2-DO | 1.13.11.5 | Homogentisato + $O_2$ = 4-maleilacetoacetato |
| **Outros tipos** | | |
| Gentisato 1,2-DO | 1.13.11.4 | 2,5-dihidroxibenzoato + $O_2$ = maleilpiruvato |

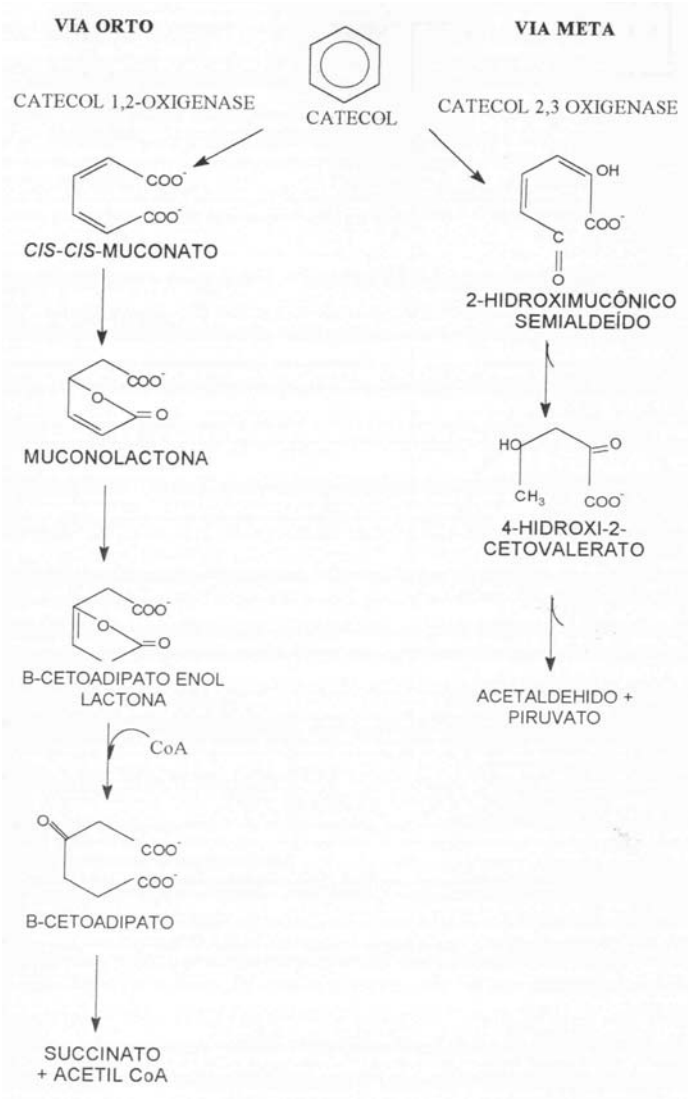



**Figura 7.** Via de degradação do catecol – vias *orto* e *meta*.

Dentre as enzimas dioxigenases já citadas, as que possuem um papel fundamental na degradação de compostos aromáticos são as descritas abaixo:

✓ Catecol 2,3-dioxigenase (E.C.1.13.11.2): faz parte das enzimas de clivagem extradiol. Consiste de quatro subunidades idênticas de 32KDa e contém um íon ferro $Fe^{2+}$ catalítico por subunidade. O produto de reação é um semi-aldeído 2-hidroximuconico, o qual possui coloração amarela (Hahn *et al*., 1991).

A reação enzimática procede por um mecanismo bi-uni ordenado: primeiro ocorre a ligação do catecol à enzima, seguido pelo dioxigênio para formar um complexo ternário, então, o anel aromático é clivado para produzir o semi-aldeído hidroximucônico.

✓ Protocatecol 3,4-dioxigenase (E.C.1.13.11.3): pertencem às enzimas que realizam clivagem intradiol. Contem $Fe^{3+}$ como grupo prostético e números iguais de subunidades α e β que formam diferentes estruturas quarternárias de (αβ)n, onde n varia de 3 a 12 (Harayama *et al*.,1992).

✓ Catecol 1,2-dioxigenase (E.C.1.13.11.1): contém $Fe^{3+}$ como grupo prostético e fazem a clivagem intradiol. Muitas espécies bacterianas apresentam subunidades α e β não-idênticas (αβ- $Fe^{3+}$)n, já outras, possuem polipeptídio simples (αα- $Fe^{3+}$)n. Possui pouca ou nenhuma atividade frente aos clorocatecóis.

Para os micro-organismos não existe um consenso no que diz respeito aos compostos que induzem a produção de determinadas enzimas de degradação. García*et al*.,(2005) afirmaram que apenas os ácidos p-hidroxibenzóico, ácido p-cumárico e ácido felúrico induziram a atividade da enzima protocatecol 3,4-dioxygenase na bactéria halofílica *Halomonas organivorans*, enquanto, os ácidos salicílico, fenilpropiônico, fenilacetico, aminosalicílico e o fenol induziram a atividade da catecol 1,2-dioxigenase (Figura 6). Por outro lado, Buchan *et al*., (2003) afirmam que o gênero *Roseobacter* utiliza a via do protocatecol para a degradação do mesmo composto. Nesse contexto, estudos devem ser realizados para identificar as possíveis rotas de degradação dos compostos aromáticos frente os diferentes micro-organismos degradadores.

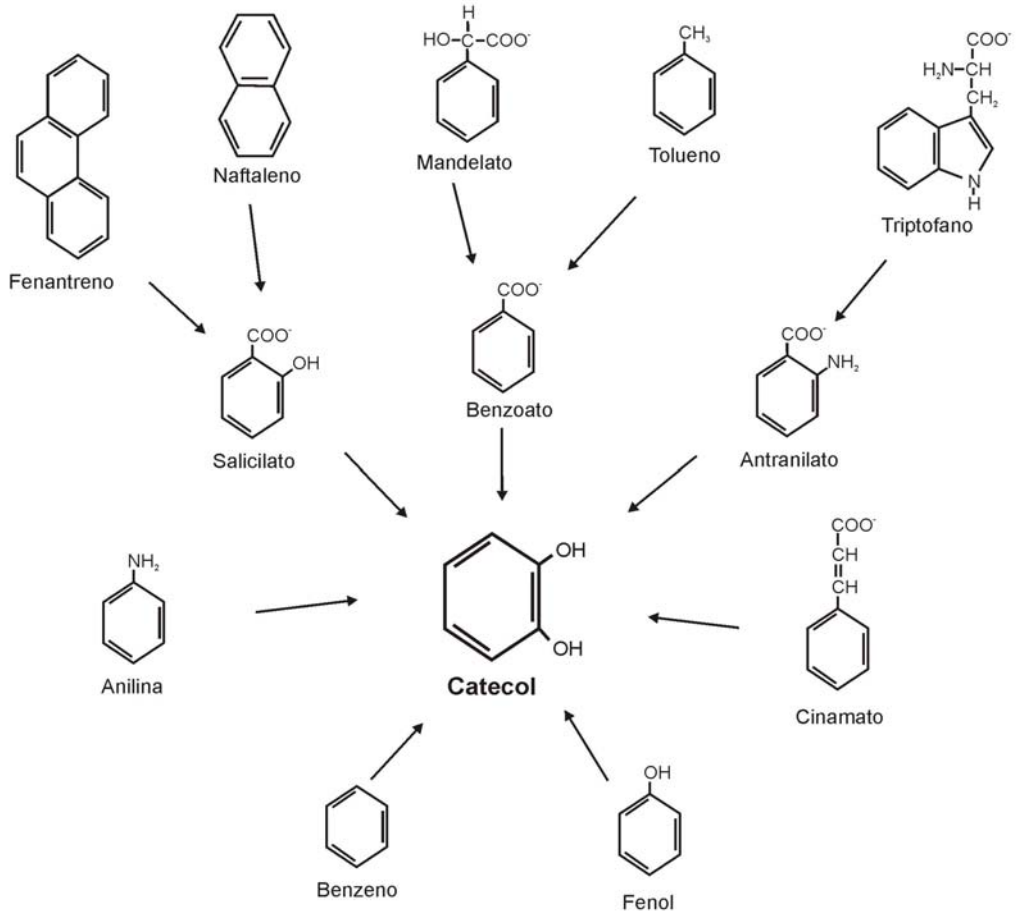



**Figura 8**. Relação de alguns compostos que possivelmente estimulam a produção de catecol como enzima de degradação.

## II.7. BIORREMEDIAÇÃO

A biodegradação de compostos aromáticos tem sido um dos aspectos do catabolismo microbiano mais explorado nos últimos anos. O isolamento de novas linhagens capazes de metabolizar compostos aromáticos e a identificação de vias metabólicas alternativas, bem como a clonagem molecular dos genes envolvidos neste processo são algumas das tendências na biodegradação de compostos aromáticos em ambientes hipersalinos (Fairley *et al*., 2002). Além disso, o conhecimento da microbiota presente pode auxiliar quando necessário o uso da bioestimulção. A utilização de consórcios microbianos (culturas mistas) é uma estratégia eficiente para a recuperação de áreas contaminadas. Ao reunir sistemas enzimáticos diferentes, amplia-se a capacidade metabólica da cultura, evita-se a formação de substratos tóxicos ou intermediários inibitórios e aumenta-se a possibilidade de mineralização completa do substrato (Timmis & Pieper, 1999).

Através do conhecimento do mecanismo catabólico, da ampla gama de enzimas responsáveis pela clivagem de compostos e ainda pela grande variedade de micro-organismos encontrados no meio ambiente que apresentam potencial para a degradação de compostos tóxicos, a biorremediação se tornou uma ferramenta para a despoluição ambiental.

No caso de ambientes contaminados por petróleo a utilização da biorremediação já é conhecido há muito tempo (Morgan & Watinkson, 1989; Lee & Levy 1989; Bartha 1986). O reconhecimento do petróleo como uma mistura complexa, no entanto largamente biodegradável e de que os degradadores de hidrocarbonetos podem ser estimulados em muitos tipos de ambientes (Lee & Levy, 1987; Atlas 1981), contribuiu largamente para o desenvolvimento de tecnologias de biorremediação. Em adição, a biorremediação, por ser uma tecnologia que além de viável, quando usada prudentemente é extremamente eficiente, barata e ambientalmente correta o que acarretou a sua rápida aceitabilidade.

A viabilidade da biorremediação como uma ferramenta para a limpeza ambiental no derramamento causado no petroleiro *Exxon Valdez* na enseada Príncipe William, Alasca foi oportuna e cientificamente razoável (Pritchard & Costa, 1991). Análises dos dados coletados para subsequentes estudos determinaram que a degradação do óleo pela microbiota endógena da praia de Príncipe William teve um significante aumento pela aplicação de fertilizantes, sugerindo um novo e viável método de remediação (Pritcahrd & Costa, 1991).

No entanto, qualquer esforço para a utilização da biorremediação envolve a demonstração científica da eficiência do processo e a segurança ao meio ambiente. A eficácia na biorremediação significa estabelecer que:

- ✓ A remoção ou desaparecimento do óleo seja primariamente atribuível à biodegradação e não a outro processo;
- ✓ Haja uma alta taxa de degradação e que essa seja mais rápida que a degradação natural, para que assim justifique a aplicação da técnica.

No processo de descontaminação ocorrido no derramamento envolvendo *Exxon Valdez*, ambos os aspectos foram cruciais para que a biorremediação fosse aceita pela população e pelas agências estaduais e federais. Além disso, dados de mais de 20 anos de estudos sobre a biodegradação de óleos foram aplicados e foram substanciais para o sucesso da técnica. O que evidencia que inúmeros estudos devem ser realizados para a obtenção de bons resultados na prática da biorremediação.

A biorremediação consiste em duas técnicas distintas que são discutidas a seguir: bioaumentação e bioestimulação.

### II.7.1. Bioaumentação

A bioaumentação é considerada uma ferramenta para a remediação de locais contaminados com petróleo desde 1970. Essa técnica consiste na adição de micro-organismos com potencial de degradação no ambiente a ser descontaminado. A justificativa para a adição de micro-organismos que degradam compostos aromáticos é que muitas vezes a população microbiana indígena não é capaz de degradar a alta quantidade de carga orgânica presente no meio, sendo assim, aumentando a massa celular de degradadores é possível que a taxa de degradação seja aumentada e o ambiente descontaminado mais rapidamente.

Inúmeras estratégias são adotadas e devem ser amplamente analisadas antes da utilização da bioaumentação, a biota deve ser amplamente estudada e suaviabilidade conhecida.

### II.7.2. Bioestimulação

Bioestimular envolve a adição de nutrientes cuja ausência esteja limitando o metabolismo da biota presente no local contaminado. Em ecossistemas mais litorâneos que foram contaminados, a baixa concentração de nutrientes é muitas vezes o fator limitante para que ocorra biodegradação. O objetivo principal dos estudos de tratabilidade em escala de bancada é o de determinar o tipo, a concentração e freqüência da adição dos nutrientes necessários para a estimulação máxima da biota (Venosa, 1998).

A maioria dos experimentos em laboratórios demonstrou que a adição de nutrientes auxilia no crescimento, ou seja, nitrogênio e fósforo aumentaram a taxa de biodegradação do petróleo (Venosa, 1998). No entanto, os tipos ideais de nutrientes e as concentrações variam muito, dependendo das propriedades do ambiente contaminado e das condições ambientais.

## II.8. ESTUDO MOLECULAR DA DIVERSIDADE EM AMBIENTES SALINOS

A compreensão do papel das comunidades microbianas frente ao meio ambiente, os dados moleculares, particularmente ás seqüências de RNAr 16S, tem sido utilizadas para a descrição de novas espécies, além disso, essas técnicas vêm sendo extensivamente utilizadas para determinar a diversidade genética de comunidades microbianas como demonstram estudos realizados por diversos autores (Furhrman*et al*., 1993; Lee & Furhrmanet, 1990; Muyzer *et al*., 1993).

O conhecimento da diversidade genética de um determinado ambiente em conjunto com o seu dinamismo nos possibilita levantar questões sobre a composição, estrutura e estabilidade dessas comunidades, assim como, sobre a função de seus habitantes. Através dessa compreensão podemos monitorar, modificar e quantificar os grupos de microrganismos existentes em determinados ecossistemas e desta forma buscar ferramentas tais como a bioaumentação e/ou a bioestimulação para acelerar a minimização dos impactos ambientais utilizando a flora normal do ambiente.

# *OBJETIVOS*

Nosso grupo de investigação estudou durante anos a capacidade de micro-organismos em degradar compostos tóxicos, tendo como foco principal a busca de novas cepas com potencial de remediar ambientes contaminados, nesse caso a água de produção de petróleo. Por isto, a presente tese de doutorado teve como objetivo isolar, caracterizar e verificar a capacidade de bactérias halofílicas em degradar compostos aromáticos, bem como conhecer molecularmente a via metabólica utiliza na metabolização desses compostos. Além disso, caracterizar a comunidade microbiana presente na água de produção de petróleo para que a partir desse conhecimento otimizar o processo de biorremediação.

# *PARTE II: CARACTERIZAÇÃO DA COMINIDADE MICROBIANA EM EFLUENTES SALINOS*

# *INTRODUÇÃO*

A elevada participação de derivados de petróleo na matriz energética mundial, resulta no acúmulo destes no meio ambiente. Os hidrocarbonetos de petróleo são a origem da poluição na maioria dos ecossistemas. Atmosfera, solo, águas superficiais e subterrâneas, e ambientes marinhos são continuamente afetados pela poluição produzida durante a extração, refino, transporte e uso do petróleo.

Durante a produção de petróleo em sistemas que operam com recuperação secundária, é comum a co-produção de parte da água empregada no processo de injeção. A consequência desse fato é a geração de grandes volumes de água a serem descartados no mar. Esta água, denominada água de produção, geralmente, contém altos teores de sais e uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos, cuja composição varia durante a vida do campo de petróleo, e cujo volume tende crescer a medida que o campo envelhece..

Devido a presença de altas concentrações de sais nestes efluentes, variando de 7% a 10%, há uma maior propenção para o desenvolvimento de microrganimos halofílicos. Tais microrganimos podem estar envolvidos no mecânismo de degradação primário dos compostos aromáticos presentes na água de produção de petróleo podendo assim serem empregados na sua biorremediação.

A biorremediação tem sido usada como método de biodegradação natural através da otimização dos limites ambientas e esse método tem mostrado ser econômico, versátil e o que mais se apróxima de uma despoluição ecologicamente aceitável.

No entanto, a biorremediação depende de alguns fatores, tais como: pH, temperatura, salinidade e pressão. Condições extremas desses fatores podem matar ou inibir espécies que não estejam adaptadas a ambientes extremos, por isso o interesse em desenvolver e otimizar processos de biorremediação em ambientes extremos contaminados por compostos aromáticos e para isso são necessários microrganismos capazes de sobreviverem em tais condições além, de possuírem um potencial de biodegradação.

Um grande número de bactérias halofílicas degradadoras de compostos aromáticos podem ser encontradas na água de produção em forma de consórcio. Algumas espécies que compõem esses consórcios apresentaram potencial quando utilizadas na bioumentação, portanto, é importante o conhecimento da composição dos consórcios microbiano para auxilar na biorremediação de sistemas monitorados.

O isolamento dos microrganismos presentes em consórcios no meio ambiente não é uma prática usual quando queremos entender os requerimentos nutricionais, além da dinâmica das

comunidades em estudo, no entanto essa estratégia é valida na tentativa de obter linhagens capazes de serem utilizadas em processos de biodegradação.

Metodologias moleculares têm sido otimizadas e adaptadas para superarem as limitações impostas pela abordagem clássica de estudo de populações microbianas e, conseqüentemente, reduzirem os erros associados a esta estratégia. A utilização de uma abordagem molecular permite uma visão representativa da extensão da diversidade bacteriana no ambiente, que supera em muito a diversidade conhecida de microrganismos cultivados em laboratório. Esses métodos se aplicam tanto para estudos de microrganismos responsáveis pela biorremediação de derivados de petróleo em solos e reatores biológicos quanto para estudos de diversidade microbiana em água.

A combinação de técnicas moleculares avançadas que nos revelam a diversidade genetica aliadas aos modelos clássicos de isolamento e taxonomia podem trazer uma nova compreensão das comunidades microbianas e desta forma auxiliar o direcionamento.

# *OBJETIVOS*

Os objetivos estabelecidos para este trabalho são:

- ✓ Selecionar e caracterizar (fisiológica e molecular) as bactérias halofílicas isoladas da água de produção de petróleo;

- ✓ Obter cepas da própria água de produção capazes de degradar compostos aromáticos;

- ✓ Utilizar bactérias halofilicas moderadas isoladas da água de produção de petróleo para aumentar a biomassa presente na água de produçao;

- ✓ A busca das melhores condições que possam estimular o metabolismo das bactérias isoladas para obter uma maior taxa de degradação de compostos aromáticos;

- ✓ Utilização das bactérias halofílicas isoladas da água de produção de petróleo para aumentar a biomassa presente na água de produção, objetivando uma incrementarão na biorremediação desse dejeto;

- ✓ Obtenção das melhores condições de biorremedição da água de produção de petróleo;

- ✓ Caracterizar a estrutura de comunidades microbianas envolvidas em processos de controle e remediação de poluição utilizando uma abordagem independente de cultivo através da construção de bibliotecas de RNA ribossomal 16S, alem da utilização de métodos tradicionais de isolamento para posterior utilização dos dados obtidos na bioremediação da água produzida na extração de petróleo;

- ✓ Caracterizar a comunidade de microrganismos para o Domínio Arqueia presente na água produzida na extração de petróleo;

- ✓ Comparação de métodos independe de cultivo e taxonômicos na obtenção da diversidade presente na água de produção de petróleo.

# *MATERIAL E MÉTODO*

## III.1 COLETA DA AMOSTRA

Um litro de água de produção de petróleo foi adquirido na Petrobras, situada na cidade de São Sebastião no estado de São Paulo/Brasil. A amostra foi mantida a 4°C durante uma semana e posteriormente utilizadas para o isolamento de micro-organismo e estudos de biorremediação, como descrito no item III.12.

## III. 2. MATERIAL BIOLÓGICO

### III. 2.1. Micro-organismos utilizados

No presente trabalho foram isoladas da água de produção de petróleo sete bactérias halofílicas, sendo que uma utilizando ácido benzóico como fonte de carbono, três com ácido p-hidroxibenzóico e três com fenol. As mesmas encontram-se sumarizadas na tabela 10 dos resultados e discussão, a nomenclatura foi estabelecida de acordo com o composto utilizado no isolamento.

Os meios utilizados para a obtenção das linhagens e a metodologia realizada estão descritos a seguir.

## III. 3. MEIOS DE CULTURA

A composição dos diferentes meios de cultivo utilizados estão descritos a seguir. Depois de preparados, os meios foram esterilizados em autoclave durante 20 min a uma temperatura de 121°C e uma pressão de 1 atmosfera. Para a preparação dos meios de cultivo sólidos foi utilizado ágar bacteriológico numa concentração de 2% (p/v), quando necessário. Compostos foram adicionados posteriormente aos meios terem sido autoclavados.

### III. 3. 1. Meios de cultivo para micro-organismos halofílicos

#### III.3.1.1. Meios complexos

**Meio SW:** As bactérias halofílicas moderadas foram cultivadas em meio complexo a partir de uma solução-estoque de sais (30%), denominada SW30 (SW é derivado das iniciais em inglês ´´Sea Water``) (Subow, 1931). Essa solução de sais mantém as proporções relativas da água do mar, com uma pequena diminuição na concentração de $CaCl_2$ e $NaHCO_3$, para evitar a precipitação dos mesmos. Este meio foi preparado em diferentes concentrações finais de sais (0,5% a 25%) e os meios resultantes foram denominados de acordo com a concentração de sais (SW 0,5%; SW1% até SW25%) (Nieto *et al*., 1989). A composição da solução-estoque de SW30 está detalhada na Tabela 2.

| Compostos | Quantidade |
|---|---|
| NaCl | 234,0 g |
| $MgCl_2.6H_2O$ | 39,3 g |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 61,0 g |
| KCl | 6,0 g |
| NaBr | 0,7 g |
| $NaHCO_3$ | 0,2g |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 1,0g |
| $H_2O_{dest.}$ (q.s.p) | 1000 mL |

Tabela 2: Meio SW e sua composição

O pH foi ajustado a 7,2 com uma solução de KOH 1N.

Em todos os casos que este meio foi utilizado, 0,5% de extrato de levedura foi adicionado com fonte de carbono.

**Meio NA:** Para o isolamento de bactérias halofílicas moderadas da água de produção de petróleo foi usado o meio ágar nutriente (NA). Sua composição base, na qual foi adicionado NaCl em uma concentração de 1,3M está detalhado na Tabela 3.

| Compostos | Quantidade |
|---|---|
| Extrato de carne | 3,0 g |
| Peptona | 5,0 g |
| Agar agar | 15,0 g |
| $H_2O_{dest.}$ (q.s.p) | 1000 mL |

Tabela 3: Meio NA e sua composição

O pH foi ajustado a 7,2 com uma solução de KOH 1N.

### III.3.1.2. Meio mínimo

**Meio HGM:** Como meio mínimo para o cultivo das cepas de bactérias halofílicas moderadas foi utilizado o meio HGM (*Halophile Growth Medium*) (Fairley *et al.,* 2002). Sua composição base, na qual foi necessário adicionar a fonte de carbono, está detalhada na Tabela 4.

| Compostos | Quantidade |
|---|---|
| $MgCl_2.6H_2O$ | 19,5 g |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 29,0 g |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 1,1 g |
| KCl | 6,0 g |
| NaBr | 0,5 g |
| $(NH4)_2\ SO_4$ | 10,0 g |
| NaCl | 174,0 g |
| $H_2O_{dest.\ (q.s.p)}$ | 1000 mL |

Tabela 4: Meio HGM e sua composição

O pH foi ajustado a 7,2 com uma solução de KOH 1N.

## III. 3. 2. Meios de cultivo sólidos para a detecção da atividade hidrolítica

A composição dos meios de cultivo sólidos e as condições utilizadas para a detecção das seguintes atividades hidrolíticas: da amilase, protease, DNAse, lípase, pululase, xilanase estão detalhadas a seguir. Em todos os casos o pH dos meios foram ajustados para 7,2.

- ✓ **Amilase:** Para a detecção da atividade amilase foi utilizado o meio SW 10% com adição de amido solúvel da marca Scharlau em uma concentração de 0,5% (p/v);

- ✓ **Protease:** Para avaliar se o micro-organismo é capaz de hidrolisar a caseína, foi utilizado o ágar caseína, modificado de Hastings (1903), que contém leite desnatado, e este, diluído em meio SW 10% nas proporções especificadas pelo fabricante. Além disso, foi adicionado uma solução de Skim Milk (Difco) 2%, para evitar a caramelização desta solução a mesma

foi esterilizada separadamente em autoclave e, após esfriar, adicionada aos outros componentes;

- ✓ **DNAase:** Para verificar a atividade DNAase, foi utilizado o meio desidratado ágar DNA da marca Scharlau adicionado ao meio SW10% (p/v);

- ✓ **Lipase:** Para o estudo da atividade lipolítica foi utilizado o método descrito por Sierra (1957), o qual consiste na adição de tween 80 em uma concentração de 1% em meio SW 10%;

- ✓ **Pululase:** Para a detecção desta atividade enzimática foi utilizado um substrato cromogênico AZCL-pululano (Megazyme). Por se tratar de um substrato insolúvel em água foi adicionado ao meio SW 10% em uma concentração de 0,1%;

- ✓ **Xilanase:** Para o estudo das xilanases, foi utilizado o substrato AZCL-Xilano (Megazyme). A preparação do meio foi realizada da mesma forma descrita para a detecção de pululase.

## III. 3. 3. Meios de cultivo para *Escherichia coli*

### III. 3. 3.1. Meio complexo

**LB.** O meio de Luria-Bertani (LB) (Miller, 1972; Sambrook y Russell, 2001) foi o meio complexo utilizado para cultivar *E. coli*. A composição se encontra na Tabela 5.

| Compostos | Quantidade |
|---|---|
| Triptona | 10 g |
| Extrato de levedura | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| $H_2O_{dest.\ (q.s.p)}$ | 1000 ml |

Tabela 5: Composição do meio LB

## III.4. CONDIÇÕES DE CULTIVO E PREPARO DO INÓCULO

A temperatura habitual de crescimento para todas as cepas foi de 37°C. Quando em meio líquido, os micro-organismos foram submetidos à agitação orbital de 200 rpm. Quando necessária a avaliação do crescimento e degradação, células foram crescidas em 50 mL de meio HGM 10% e mantidas sob agitação até atingirem a fase exponencial de crescimento. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas e o botão celular homogeneizado em 5 mL de HGM 10% fresco, sendo tomado 1 ml deste para aferição da densidade óptica. O inóculo foi preparado com uma $DO_{600nm}$ inicial de aproximadamente 0,01 e então transferido para 50 mL de meio líquido HGM suplementado com 0,5% de extrato de levedura e 2,0 mM dos diferentes compostos listados na tabela 6. Foi preparado um controle sem inóculo de células (controle abiótico) e mantido nas mesmas condições de cultivo.

| Composto | Marca |
|---|---|
| Fenol | USB |
| Ácido benzóico | STANDARD |
| Ácido p-hidroxibenzóico | SIGMA |

Tabela 6: Compostos de interesse e seus respectivos fabricantes

## III. 5. PRESERVAÇÃO DAS CEPAS

A preservação das cepas isoladas neste trabalho realizada conforme os métodos descritos abaixo:

✓ **Preservação em temperatura ambiente:** Para a preservação das cepas isoladas foi utilizado o meio HGM 10% acrescido de 0,5% de extrato de levedura (III.3.1.2. Material e Método) em tubo inclinado. Depois de inoculados e posterior incubação a 37°C durante 6 a 7 dias, os cultivos foram mantidos à temperatura ambiente. Assim, as cepas foram conservadas por aproximadamente um mês, com repiques periódicos a cada 30 dias.

✓ **Preservação por congelamento:** Temperaturas baixas permitem uma preservação a longo prazo, utilizando-se o glicerol que atua como crio-protetor. Para a utilização desse método, as cepas foram crescidas em meio HGM 10% (III.3.1.2. Material e Método), acrescido de 0,5% de extrato de levedura. Em seguida, foi preparada uma

suspensão com glicerol a 40% (p/v) (previamente esterilizado). A suspensão de célula foi colocada em crio-tubos esterilizados, mantidos a -20°C e a -80°C.

## III. 6. ISOLAMENTO DAS LINHAGENS

Após inúmeras tentativas de isolar micro-organismos da água de produção de petróleo, duas estratégias foram adotadas.

### III. 6. 1. Isolamento utilizando meio complexo

Visando conhecer os micro-organismos cultiváveis presentes na água de produção de petróleo, foram isoladas bactérias em meio NA (III.3.1.1 Material e Método) acrescido de 5% de NaCl. A água de produção contendo a biomassa microbiana foi diluída seriadamente e inoculada no meio NA. Em seguida, as placas foram mantidas em estufa a 37˚C por 24 h ou até o crescimento de colônias. Essas passaram por uma análise visual onde pode-se diferenciar através de coloração, estrutura da colônia, dentre outras características, as que eram visivelmente diferentes. Estas foram estriadas através da técnica de esgotamento, obtendo-se assim micro-organismos isolados.

### III. 6. 2. Isolamento utilizando meio mínimo

A estratégia adotada para o isolamento foi descrito por Silva (2007), com modificações para o isolamento de bactérias halofílicas, capazes de degradar compostos aromáticos foi descrita por Silva onde 25 µL de fenol, ácido benzóico e ácido p-hidroxibenzóico em uma concentração final de 2 mM foram borrifados, separadamente, sobre a superfície de placas que continham meio HGM 10% (III.3.1.2. Material e Método). Este meio foi utilizado para inocular 100 µL de água de produção de petróleo utilizando a técnica de espalhamento. Assim, os micro-organismos tiveram melhor acesso às fontes de carbono disponibilizadas. Após o crescimento das colônias, essas foram transferidas para novas placas contendo o mesmo meio de cultivo e a fonte de carbono específica utilizada no isolamento inicial. Transferências sucessivas, nas mesmas condições de cultivo, foram feitas até obtenção de massa celular suficiente para a preservação do isolado.

## III. 7. CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DAS LINHAGENS

Ensaios foram realizados para se conhecer as bactérias capazes de degradar compostos aromáticos isoladas da água de produção de petróleo. O primeiro visou avaliar a melhor concentração de sais necessária para o crescimento e assim classificou-se os mesmos

taxonomicamente e o segundo, avaliou a produção de enzimas hidrolíticas para o conhecimento de possíveis utilizações desses isolados em processos biotecnológicos.

## III. 7.1. Requerimento salino

As linhagens isoladas da água de produção de petróleo foram cultivadas em meio SW (descrito no item III.3.1.1. do Material e Método) em diferentes concentração de sais (0,5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 7,5%, 15%, 20% e 25%). Após 3 dias uma, avaliação visual foi realizadas e os resultados foram sumarizados como:

| | |
|---|---|
| Sem crescimento | - |
| Pouco crescimento | + |
| Muito crescimento | ++ |

## III. 7.2. Atividade hidrolítica extracelular

As bactérias isoladas da água de produção de petróleo capazes de degradar compostos aromáticos foram submetidas aos 6 ensaios descritos a seguir:

**Protease:** A atividade proteolítica das culturas foi testada no meio descrito no item III.3.2. As placas foram repartidas em três partes e a mesma linhagem estriada três vezes, como ilustrado na Figura 9. As placas foram incubadas a 37°C, a leitura realizada diretamente depois de três dias de incubação. O tese apresenta-se positivo quando observado um halo transparente ao redor do crescimento bacteriano, significando que a cepa em questão apresenta atividade proteolítica.

**Figura 9:** Prova da hidrólise da caseína

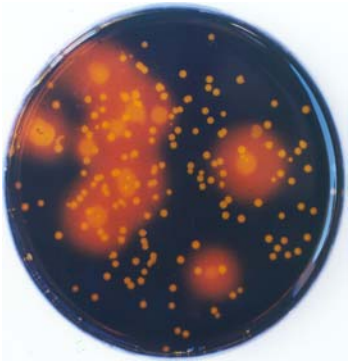


**Figura 10:** Prova da hidrolise do amido

**Amilase:** A presença de atividade amilolítica em placas é rotineiramente determinada seguindo o método descrito por Cowan (1991), utilizando o meio descrito em no item (III.3.2.). Após 3 dias de incubação a 37°C foi realizada a leitura mediante a adição de uma solução de lugol. Esta solução reage com o amido do meio originando um precipitado de cor azul escuro. A prova é considerada positiva quando aparece um halo transparente ao redor da zona de crescimento bacteriano,

indicando a ocorrência da hidrólise do amido (Cowan & Steel., 1982), conforme figura 10.

**DNAase:** Neste caso, foi utilizado o meio descrito no item III.3.2. Após três dias de incubação a 37°C, as placas foram analisadas colocando-as sobre um fundo escuro e adicionando HCl 1N. Nestas condições, o DNA não-hidrolisado precipita dando lugar a uma coloração embranquecida. O resultado é considerado positivo quando observado um halo claro ao redor do crescimento bacteriano, sendo indicativo da hidrólise do DNA (Jeffries *et al*., 1957) (Figura 11).

**Figura 11:** Prova da atividade DNAase.

**Lipase:** A atividade lipolítica dos isolados foi detectada por observação visual das zonas hidrolisadas ao redor das colônias crescidas. O meio descrito na sessão III.3.2. foi utilizado no ensaio. Após a inoculação, as placas foram incubadas a 37°C durante três dias. Após transcorrido esse período a leitura dos resultados foi realizada diretamente, em caso de atividade lipolítica aparecem precipitados ao redor das colônias como consequência da reação do $CaCl_2$ com os ácidos graxos liberados pela hidrólise do Tween 80 (Cowan & Steel., 1982) (Figura 12).

**Figura 12:** Prova da hidrolise de Tween 80

**Pululase:** Para detecção da atividade pululase as linhagnes foram cultivadas em meio SW 7,5%, preparado como descrito no item III.3.2. A leitura foi realizada após 38 horas de incubação a 37°C. A visualização da produção de pululase em meio de cultivo é facilmente observada, já que após a adição de álcool 97% onde o pululano reage com o álcool levando a formação de um precipitado branco (Figura 13).

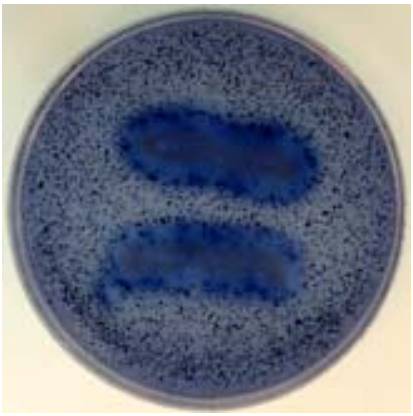


**Figura 13:** Resposta obtida quando positiva para a atividade pululase

**Xilanase.** Para a avaliação da atividade desta enzima, as linhagens foram crescidas em meio SW 7,5% como descrito na sessão III.3.2, e após 36 horas de incubação os resultados foram analisados.

A vantagem da técnica utilizada na avaliação das atividades de pululase e xilanase em bactérias halofílicas é a intensa coloração apresentada em virtude do uso do substrato cromogenico.

Todos os testes acima mencionados foram analisados e os resultados expressos da seguinte forma:

| | |
|---|---|
| Não houve atividade | - |
| Houve atividade | + |

## III. 8. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS LINHAGENS

A identificação de todas as linhagens de micro-organismos isoladas neste estudo foi realizada através de metodologia molecular, a qual envolveu o sequenciamento e análise filogenética do gene do RNA 16S.

### III. 8.1. Extração do DNA genômico

Foram utilizados diferentes métodos de extração do DNA genômico em função da sua posterior utilização.

**Extração de DNA.** Para a extração do DNA genômico bacteriano, foi utilizado o kit comercial AquaPure Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad). Para a extração do DNA total da água de produção de petróleo visando a montagem de bibliotecas do DNA 16S para posterior caracterização da comunidade microbiana encontrada nesta, o método utilizado foi o do CTAB (bromato de cetil trimetilamonio).

**Método CTAB.** A extração e purificação do DNA genômico foi realizada seguindo o método descrito por Ausubel *et al.*, (1989). Este método está baseado no uso do detergente CTAB, que em condições de elevada salinidade reage com os ácidos nucléicos formando um complexo estável e solúvel. Posteriormente o CTAB é eliminado com facilidade aproveitando a sua solubilidade em solventes orgânicos. O protocolo encontra se descrito a seguir:

- ✓ 1litro da água de produção de petróleo foi filtrada em coluna com uma membrana de 20 micras da Millipore;
- ✓ Os filtros foram lavados com 5mL tampão TE, o volume final foi centrifugado durante 15 min a 10.000g, e o precipitado suspenso em 4,75 mL de tampão TE. Em seguida, foram adicionados, ainda 25 µL de solução de SDS 10% (v/v), 25 µl de proteinase K (20 mg/mL) e 30 µL de RNAase (10 mg/mL);
- ✓ Esta mistura foi mantida a 37°C durante uma hora;
- ✓ Posteriormente, foi adicionado 0,9 mL de NaCl 5M e a suspensão foi misturada por inversão;
- ✓ Na sequência, foram misturados 0,75 mL de solução CTAB/NaCl (CTAB 10% em NaCl 0,7M) e a suspensão foi mantida a 65°C durante 20 min;
- ✓ Transcorrido este tempo, a suspensão foi tratada duas vezes com igual volume de uma solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamlico(25:24:1), em seguida com um volume de solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1);
- ✓ Por último, o DNA foi precipitado com 0,6 volume de isopropanol e mantido por pelo menos 20 min a - 70°C;
- ✓ O precipitado foi lavado com etanol 70% e o DNA foi suspenso em um volume de 30 µL – 50 µL de tampão TE ou água bidestilada esterilizada.

**Tampao TE:** Tris-HCl 10 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM (pH 8,0).

**SDS 10%:** SDS 10% (p/v) em água destilada.

**Proteinase K:** 20 mg/mL de proteinase K dissolvida em água.

**RNAase:** 10 mg/mL de RNAase em Tris-HCl 10 mM e NaCl 15 mM. Aquecido por 15 min a 100°C.

### III.8.2. Determinação da concentração de DNA

A quantificação do DNA foi realizada por comparação visual da intensidade luminosa das bandas de DNA após separação eletroforética, sendo comparadas com um padrão comercial de concentração conhecida. A visualização e documentação dos fragmentos foram feitas utilizando-se o sistema de fotodocumentação Canon. Quando houve a necessidade de determinar com maior

precisão a concentração de DNA, foi medida a absorbância das preparações a 260 nm (1 unidade de $A_{260}$ equivale a uma concentração de 50 µg/mL), utilizando um espectofotometro Lambda 20 UV/VIS ( Perkin Elmer). Em ambos os casos foram seguidas metodologias descritas por Sambrook & Russell (2001).

### III.8.3. Eletroforese do DNA em géis de agarose

A eletroforese é uma técnica utilizada para separação DNA genômico. A migração das moléculas através de uma matriz de gel é inversamente proporcional ao logaritmo do seu peso molecular, a mesmo tempo que inclui a conformação da molécula. Aquelas moléculas de DNA em forma circular covalentemente ligadas oferecem uma menor resistência à migração que as moléculas em conformação linear.

A separação tem lugar devido à diferentes mobilidades que apresentam as moléculas cargadas quando são submetidas à influência de um campo elétrico. O DNA é uma molécula que possui carga negativa e, portanto, quando aplicado em um gel de agarose, e submetida a um campo elétrico (eletroforese) migra até o ânodo (pólo positivo). Os fragmentos pequenos de DNA migram mais rapidamente, chegando mais próximos ao ânodo, e os fragmentos grandes se movem mais lentamente, permanecendo mais próximos ao cátodo.

Neste trabalho, a eletroforese de DNA foi feita em géis horizontais de agarose, cuja concentração variou entre 1 e 2% (p/v). Estes géis foram preparados em TAE 1X e submersos no mesmo tampão. A concentração de agarose do gel variou segundo o tamanho dos fragmentos a serem separados. Rotineiramente foram preparados géis com uma concentração de agarose de 1%, enquanto que para visualizar fragmentos muito pequenos de DNA utilizaram-se géis com uma concentração de agarose mais elevada, como 1,5 ou 2% A voltagem usual para corrida foi de 90V.

Para a visualização do DNA durante a preparação do gel foi adicionado brometo de etídio (Promega), que se intercala com a dupla hélice de DNA, permitindo a sua visualização ao expor o gel à luz ultravioleta de um comprimento de onda de 360 nm, usando um sistema de fotodocumentação Canon. Como padrão de peso molecular utilizou-se o ´´1Kb DNA ladder`` (Invitrogen)(figura 14).

A técnica de eletroforese foi utilizada na visualização de fragmentos de DNA de bactérias isoladas da água de produção e também dos fragmentos de DNA total da água de produção.

**Tampão TAE 50X:** ácido acético glacial: 57,1 mL; EDTA 0,050 M pH 8,0: 100 mL; Tris base: 242 g; $H_2O_{dest.}$ q.s.p. 1000 mL

**Brometo de Etídio:** 3 µL de brometo para 30 mL da solução de agarose a 1,5%

## III.8.4. Amplificação de fragmentos de DNA por reação em cadeia de polimerase (PCR)

A reação de polimerase em cadeia (PCR) é uma técnica que permite amplificar fragmentos de DNA (Saiki *et al*., 1985; Saiki *et al*., 1988; Mullis & Falcoona, 1987). Partindo de uma molécula de um DNA molde, se amplifica de maneira exponencial uma região específica mediante o emprego de iniciadores (*primers)*. Estes *primers* são dois oligonucleotidios de origem sintética desenhados sempre na direção 5` → 3`, tanto na cadeia molde (forward) como na reversa complementa (reverse). A distância que separa ambos os *primers* determina o tamanho do fragmento que será amplificado.

Esta técnica foi usada para a obtenção de fragmentos de DNA para a sua posterior clonagem e também para obtenção de fragmentos para a identificação das bactérias isoladas. As reações foram realizadas seguindo as indicações do manual de Sambrook & Russell (2001), utilizou-se um volume total de 50 µL quando foi usada a *Taq* DNA polimerase fabricada pela (Eppendorf).

O esquema geral das reações de PCR está apresentado na Tabela 7, com modificações acordo com as necessidades. A enzima empregada nas reações foi a *Taq* DNA polimerase (Eppendorf (5-Primer) ou Dominion – MBL), que é uma enzima modificada de *Thermus aquaticus* (Lawyer *et al.,* 1989). As reações foram feitas em um termociclador Mastercycle (Eppendorf).

As reações de PCR apresentam as seguintes etapas:

- ✓ **Desnaturação inicial** do DNA molde: 2-5 min a 94-98°C

1. **Desnaturação**
2. **Anelamento**
3. **Extensão**

> 18-35 ciclos

- ✓ **Extensão final:** 10 min a 72°C

**Tabela 7:** Esquema geral das reações de PCR

| Reativos | Amplificação do fragmento de DNA |
|---|---|
| DNA molde | 20-100 ng (1 µL) |
| Tampao 10X da Taq polimerase | 1x(5 µL) |
| MgCl2 | 2,5 mM (5 µL) |
| Mix de dNTPs | 0,2 mM (8 µL) |
| Primer ´´*forward*`` | 0,3 µM (1,5 µL) |
| Primer ´´*reverse*`` | 0,3 µM (1,5 µL) |
| Taq DNA polimerase | 3,5 U (1 µL) |
| $H_20$ dest. estéril | (q.s.p.) 50 µl ( 27 µL) |

Os *primers* utilizados neste estudo estão descritos na tabela 8.

O número de ciclos, a temperatura de anelamento dos *primers* e o tempo de extensão variaram segundo o tipo de experimento realizado. Ao serem concluídas as reações, o tamanho e a qualidade dos produtos foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose.

**Tabela 8.** Primes e condições utilizadas nas reações de amplificação do DNA por PCR.

| Experimento | *Primer* | sequência (5'-3') | Condições | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Desnaturação | Anelamento | Extensão |
| PCR do gene RNA ribossomal 16S de Bactéria | 16S bac 27f | 5`AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3´ | 30 seg -94 ºC | 1 min – 55 ºC | 3 min – 72ºC |
| | 16S bac 1100r | 5`AGGGTTGCGCTCGTTG3´ | | | |
| Sequenciamento dos clones | m13f | 5´- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC - 3´ | 3 min – 72ºC<br>1 min - 60 ºC<br>20 seg -94 ºC | | |
| | m13r | 5´-TTT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC - 3´ | | | |
| | P27f | 5´ GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3' | | | |
| | P765f | 5´ ATT AGA TAC CCT GGT AG 3´ | | | |
| | P782r | 5´ ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT 3´ | | | |
| | P1100r | 5´ AGG GTT GGG GTG GTT G 3´ | | | |
| PCR do gene RNA ribossomal 16S de Arqueias | 16S Arch 21f | 5´-TTCCGGTTGATCCTGCCGGA - 3´ | 1min -94 ºC | 1 min – 50 ºC | 2 min – 72ºC |
| | 16S Arch 1942r | 5´-GGTTACCTTGTTACGACTT - 3´ | | | |

### III.8.5. Sequenciamento e análise filogenética de gene do RNA ribossomal 16S

#### III.8.5. 1. Seqüenciamento de DNA

Os fragmentos amplificados em gel do gene do RNA ribossomal e os diferentes fragmentos de DNA amplificados foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit,* GE Health Care) e, posteriormente, os fragmentos sequenciados em um sequenciador automático (MegaBace, GE Health Care) nas seguintes condições de injeção, 3Kv de voltagem e 45 s. As condições de corrida foram 10Kv de voltagem por 75 min.). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems* (GE Health Care). Foram utilizados primers internos para a obtenção das sequências desejadas (Tabela 8).

#### III.8.5. 2. Análise das sequências de DNA

As sequências parciais de DNAr 16S obtidas com os primers, 10f e 1100r, foram utilizadas para a montagem de *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as sequências de organismos representados nas bases de dados do Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e do RDP (http://rdp.cme.msu.edu/). Sequências de organismos relacionados à sequência do organismo desconhecido foram selecionadas para alinhamento no programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1994) e análises filogenéticas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (Kumar *et al.*, 2001), sendo considerado a mesma espécie quando obtivemos uma similaridade igual a 97%. A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (1980) e a árvore filogenética obtida pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987), com valores de *bootstrap* a partir de 1000 re-amostragens.

## III.9. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS EM DIFERENTES COMPOSTOS

A determinação da capacidade de crescimento em distintos compostos pelas bactérias isoladas na água de produção de petróleo foi realizada visando verificar a capacidade de cada linhagem em separado de utilizar compostos tóxicos presentes na água de produção e ainda buscar elementos essenciais no metabolismo dessas cepas que pudessem auxiliá-las a metabolizar os compostos de interesse. Esses compostos encontram-se listados no item III.4.

Em primeiro lugar, as bactérias isoladas foram cultivadas em meio HGM 10% (III.3.1.2. presente no Material e Método), acrescido dos compostos listados no item III.4, como única fonte de carbono em uma concentração de 2 mM.

Em seguida, as cepas isoladas foram inoculadas em novos meios HGM 10%, no entanto acrescidos dos compostos já mencionados e suplementados com 0,5% de extrato de levedura.

Por último, foi utilizado meio HGM 10% suplementado com uma fonte de nitrogênio e um aminoácido, além dos compostos listados no item III.4., como fonte de carbono, ou seja, cada bactéria foi submetida a 12 combinações distintas.

- ✓ Solução de cloreto de amônio + Acido D-glucorônico;
- ✓ Solução de cloreto de amônio + D-lactose;
- ✓ Solução de cloreto de amônio + Alanina;
- ✓ Solução de cloreto de amônio + L-histidina.

O objetivo do crescimento nos compostos mencionados foi avaliar as diferentes condições metabólicas de degradação de diferentes compostos. O extrato de levedura e um composto que a auxilia no crescimento inicial das linhagens. Já o cloreto de amônio é uma fonte de nitrogênio, composto este que auxilia como co-fator enzimático em diferentes rotas metabólicas, sendo os aminoácidos responsáveis pela síntese enzimática.

As condições de crescimento e cultivo utilizadas nessa fase do estudo estão detalhadas no item III.4. e a análise dos resultados foi realizada através da leitura da absorbância de 1 mL da cultura a 600nm em espectofotometro UV-1201 (Shimadzu), após dose dias de incubação. As condições de análise foram às seguintes: sistema isocrático, fase móvel metanol: água: ácido acético (50 : 49 : 1, v/v), vazão de 0,5 mL/min, volume de injeção 20µL, temperatura da coluna 35°C, e detector de absorbância ajustado para 254nm.

## III.10. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO

As linhagens que apresentaram crescimento satisfatório, superior a 0,2 nm, nos compostos de interesse, foram submetidas a um novo estudo, visando o conhecimento da taxa de catabolização dos mesmos. Para o levantamento desses dados, foi feito um novo inóculo em meio HGM 10% suplementado com os compostos que suportaram crescimento, de acordo com o experimento detalhado no item III.9. Todas as condições de crescimento e cultivo utilizadas foram mantidas. No entanto, como nessa etapa do estudo foi necessário manter as culturas por aproximadamente 12 dias, foram preparados inóculos em quadriplicada e estes analisados no tempo 0, 3, 9 e 12 dias. As análises foram realizadas mediante a centrifugação por 10 min, a 9000

rpm do conteúdo dos Erlenmeyers, seguido por uma analise quantitativa dos compostos através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras foram injetadas em cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-6A, com detector UV-Vis e uma coluna de fase reversa Varian C18 (5 µm x 150 mm x 4,6 mm).

Quando necessário, amostras foram coletadas e congeladas a –20ºC para que posteriormente fossem realizadas as análises cromatográficas. Todas as análises acima mencionadas foram realizadas em triplicadas e os resultados apresentados representam à média dos valores anotados.

## III.11. Estudo da atividade enzimática

A degradação de compostos aromáticos por bactérias envolve a ação de uma dioxigenase que gera a formação de um diol, com consequente clivagem e formação de um diácido como cis-cis-ácido mucônico (Edward, 1993). Existem várias vias responsáveis pela quebra de compostos aromáticos, muitas delas apresentam o catecol como intermediário central. Uma vez formado, o próximo passo é a fissão do anel do catecol, e essa quebra pode ocorrer com o auxilio de várias enzimas diferentes, sendo elas: catecol 2,3-dioxigenase, protocatecol 3,4-dioxigenase, catecol 1,2 dioxigenase.

Visando o conhecimento das possíveis rotas catabólicas dos compostos de interesse pelas bactérias isoladas da água de produção de petróleo, foi realizado o estudo das suas produções enzimáticas.

### III.11.1. Catecol 2,3-dioxigenase

A atividade de catecol 2,3-dioxigenase foi determinada de acordo com o método de Baggi, *et al., (*1987), modificado. As amostras foram preparadas, seguindo o procedimento descrito a seguir:

- ✓ Partiu-se de cinco ml do cultivo, o qual foi centrifugado por 10 min a 1500 rpm;
- ✓ O sobrenadante foi descartado e o pellet celular lavado com tampão fosfato 0,025mM;
- ✓ Em seguida as células foram novamente lavadas e, posteriormente, homogeneizadas em tampão fosfato;
- ✓ As células foram submetidas à sonicação por 5 min;
- ✓ A suspensão foi novamente centrifugada por 20 min a 6000 rpm;

- ✓ Finalmente o sobrenadante foi utilizado na análise.

Transcorrido o preparo do sobrenadante, o método de determinação enzimático foi realizado:

- ✓ Foram adicionados em um tubo:

  - 1 mL do sobrenadante (extrato celular).

  - 1 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7).

- ✓ Apos 10 min foram adicionados o substrato catecol e o resultado foi obtido por meio de leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 375 nm. As leituras foram realizadas no tempo inicial (zero) e após 10 min.

A atividade enzimática foi determinada considerando a quantidade de enzima necessária para converter 1 mmol do substrato por min de reação. Na presente tese resultados foram expressos da seguinte forma:

| | |
|---|---|
| Sem atividade | - |
| ≤ 0,05 | + |
| ≤ 0,1 | ++ |

**Tampão fosfato 0,025mM:** 0,0035 g de fosfato e completa para um litro de água destilada.

**Tampão fosfato 50 mM:** 7 g de fosfato e completa para um litro de água destilada.

**Catecol 0,3 mM**: 0.028 g de catecol e completa com um litro de água destilada.

## III.11.2. Protocatecol 3,4-dioxigenase

A atividade de protocatecol 3,4- dioxigenase foi determinada de acordo com o método de Fujisawa & Hayaishi (1968) modificado, assim como mencionado no item III.10.1. Antes da realização do ensaio enzimático as amostras foram preparadas, conforme descrito anteriormente. Em seguida, foi utilizado o protocolo abaixo para avaliação da atividade de enzima protocatecol 3,4- dioxigenase em adicionar em um tubo:

- 1 mL do extrato celular.

- 1 mL de tampão tris-acetato (pH 7,5).

✓ Após 10 min foi adicionado o ácido protocatecóico e a atividade foi obtida pela leitura aferida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 290 nm. As leituras foram realizadas no tempo 0 e após 10 min.

**Tampão tris-acetato 15 mM:** 1,8 g de Tris acrescido de um litro de água. O ph foi ajustado para 7,5 com acido acético.

**Protocatecol 0,12 mM:** 0,067 g de protocatecol e completa com um litro de água destilada.

A atividade enzimática foi definida considerando a quantidade de enzima necessária para converter 1mmol do substrato por minuto de reação. E os resultados expressos como já descrito no item anterior.

### III.11.3. Catecol 1,2-dioxigenase

A determinação da atividade de catecol 1,2-dioxigenase nas bactérias isoladas da água de produção de petróleo realizado após o preparo das amostras como descrito no item II.10.1 e usando o ensaio descrito por Hegman (1966) modificado, que consiste:

✓ Adição em um tubo:

- 1 mL do extrato celular.

- 0,8 mL de tampão fosfato 50 mM (pH 7,5).

- 0,2 mL de EDTA (0,4mM)

✓ Após 10 min foi adicionado o catecol e a atividade foi obtida pela leitura aferida em espectrofotômetro a 260nm de absorbância. A leitura foi realizada no tempo 0 e após 10 min.

Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade requerida para transformar 1mmol do substrato em produto, por minuto. A conversão de 1mmol do substrato corresponde a aumento de 5,63 unidades de absorbância, sob estas condições.

## III.12. BIORREMEDIAÇÃO DA ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO

A biorremediação pode ser realizada de duas formas: bioestimulando a população presente no ambiente a ser tratado; ou bioaumentando a massa celular, com adição de novos micro-organismos com o potencial de degradar compostos que sejam indesejáveis ao meio ambiente (EPA – Agencia de Proteção Ambiental Americana).

### III. 12.1. Utilização dos isolados na bioaumentação da água de produção

As linhagens isoladas da água de produção de petróleo foram inoculadas na própria água, da qual foram isoladas, com o objetivo de aumentar a população degradadora e, consequentemente diminuir a concentração de compostos tóxicos nesse efluente. Para a realização deste experimento, as bactérias isoladas foram cultivadas e usadas como um pré-inoculo e as condições de cultivo e crescimento seguiram a metodologia já descrita no item III.4. Posteriormente ao preparo das células, estas foram inoculadas em 50 mL de água de produção e os frascos mantidas sob uma agitação de 130 rpm a 37□C durante 15 dias. A determinação da taxa de crescimento destas bactérias foi feita através da leitura da absorbância a 600 nm.

Com o intuito de corroborar a taxa de crescimento dessas bactérias com a diminuição da carga orgânica, foi utilizada a metodologia de avaliação de demanda química de oxigênio (DQO) utilizada na caracterização de efluentes.

**Demanda química de oxigênio (DQO):** A água de produção de petróleo possui uma alta concentração de sais. Para evitar que estes influenciassem na resposta da técnica, foram seguidos alguns tratamentos para que esses sais fossem precipitados durante a reação e não interferissem nos resultados obtidos. Os tratamentos podem variar desde a simples diluição das amostras, até a adição de sulfato de prata ou sulfato de mercúrio.

No presente trabalho, foram testadas as seguintes condições:

| | |
|---|---|
| Amostra diluída 1:10 | Sulfato de Prata |
| Amostra diluída 1:20 | Sulfato de Prata |
| Amostra sem diluição | Sulfato de Prata |
| Amostra diluída 1:10 | Sulfato de Mercúrio |
| Amostra diluída 1:20 | Sulfato de Mercúrio |
| Amostra sem diluição | Sulfato de Mercúrio |
| Amostra Bruta | # |

A metodologia utilizada esta detalhada a seguir:

- ✓ Partiu-se de 2 mL da água de produção acondicionada em tubos de rosca de 50 mL;
- ✓ Em seguida, foram adicionados 0,04 a 0,05 g de sulfato de mercúrio, 0,5 mL de dicromato de potássio 1,0 N e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado com sulfato de prata;
- ✓ Uma vez misturados, foram mantidos sob aquecimento por 2 horas a 150°C;
- ✓ Após resfriamento, foi realizada a leitura dos tubos em espectrofotômetro Hach, modelo DR-2000 (código 440).

## III. 12. 2. Avaliação da bioestimulação da microbiota presente na água de produção de petróleo através da adição de compostos

Inúmeras soluções foram testadas com o objetivo de fornecer à microbiota da água de produção condições que favorecessem seu metabolismo, e assim, estimular a degradação de compostos presentes neste efluente. Os compostos utilizados estão resumidos na tabela 9.

Tabela 9. Lista dos compostos utilizados na bioestimulação da biota presente na água de produção de petróleo.

| Tratamentos | Tratamentos |
|---|---|
| Solução de vitaminas | Solução de cloreto de amônio |
| Solução mineral | Triptona |
| Solução de fosfato | Extrato de levedura |
| Solução de nitrato de potássio | Acido D-glucorônico |
| D-lactose | Solução de vitaminas + D- lactose |
| alanina | Solução de vitaminas + Alanina |
| L-histidina | Solução de vitaminas + L-histidina |
| Solução de vitaminas + Ácido D-glucurônico | Solução Mineral + Ácido D- glucurônico |
| Solução Mineral + D-lactose | Solução de nitrato de potássio + L-histidina |
| Solução mineral +alanina | Solução de cloreto de amônio + Ácido D- glucurônico |

| Tratamentos |
|---|
| Solução Mineral +L-hisidina |
| Solução de fosfato + Ácido D-glucurônico |
| Solução de fosfato + D- lactose |
| Solução de fosfato + alanina |
| Solução de fosfato + L-histidina |
| Solução de nitrato de potássio + Ácido D-glucorônico |
| Solução de nitrato de potássio + D-lactose |
| Solução de nitrato de potássio + alanina |

| Tratamentos |
|---|
| Solução de cloreto de amônio + D-lactose |
| Solução de cloreto de amônio + L-histidina |
| Triptona + Ácido D- glucurônico |
| Triptona + D-lactose |
| Triptona + alanina |
| Triptona + L- histidina |
| Extrato de levedura + D-lactose |
| Solução de cloreto de amônio + alanina |

**Solução fosfato 100X.** 10 g/L de $KH_2PO_4$ em água destilada

**Solução de nitrato de potássio 100X.** 100 g/L de $KNO_3$ em água destilada

**Solução de cloreto de amônio 100X.** 100 g/L de $NH_4NO_3$ em água destilada

**Extrato de levedura.** 1 g/L de extrato de levedura em água destilada

**Triptona.** 2,0 g/L de triptona em água destilada

**Solução mineral 100x:**

| | |
|---|---|
| $KH_2PO_4$ | 10 g |
| $NH_4NO_3$ | 50 g |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 20 g |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 4,0 g |
| NaCl | 80 g |
| KCL | 10 g |
| Água destilada | 1,0 L |

Os compostos foram preparados em uma solução-estoque 100X e todos adicionados a água de produção a 1% (v/v).

Para a realização desse experimento, a própria água de produção foi utilizada como meio de cultivo, sendo somente suplementada com os compostos já mencionados. As condições de cultivo e crescimento descritos no item III.4 foram mantidas.

Alíquotas foram amostradas para verificar o crescimento da microbiota, nos tempos 0, 3,9 e 12 e a leitura realizada em um espectrofotômetro UV-1201 (Shimadzu) em um comprimento de onda de 600 nm, no décimo segundo dia o conteúdo foi centrifugado por 10 min, a 9000 rpm e quando necessário congelado a –20 □C para posterior análises.

A análise empregada para a obtenção destes resultados foi descrita no item III.11.1.

**Solução de Vitaminas 100x:**

| | |
|---|---|
| Biotina | 2,0 mg |
| Ácido Fólico | 2,0 mg |
| Piridoxina HCl | 10 mg |
| Tiamina HCl | 5,0 mg |
| Riboflavina | 5,0 mg |
| Ácido nicotínico | 5,0 mg |
| Pantotenato de cálcio | 5,0 mg |
| Vitamina B12 | 0,1 mg |
| Ácido p-aminobenzóico | 5,0 mg |
| Ácido alfa lipolítico | 5,0 mg |
| Água destilada | 1,0 L |

## III. 13. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE DE BACTERIAS E ARQUEIAS PRESENTES NA ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO

Visando o conhecimento da diversidade microbiana presente na água de produção foram construídas bibliotecas do gene do RNA ribossomal 16S para os domínios Bacteria e Archaea. O DNA genômico foi extraído diretamente da água de produção, conforme metodologia Ausubel *et al.*, (1989) e que se encontra descrita no item III.8.1. A amplificação do gene do RNA ribossomal 16S através da técnica de PCR, está descrita no item III.8.4.

Os fragmentos de DNA correspondentes ao gene do RNA ribossomal 16S amplificado de Bacteria ou Arqueia foram purificados do gel utilizando o kit *GFX PCR DNA and gel band purification kit* (GE Health Care). Em seguida, os produtos purificados

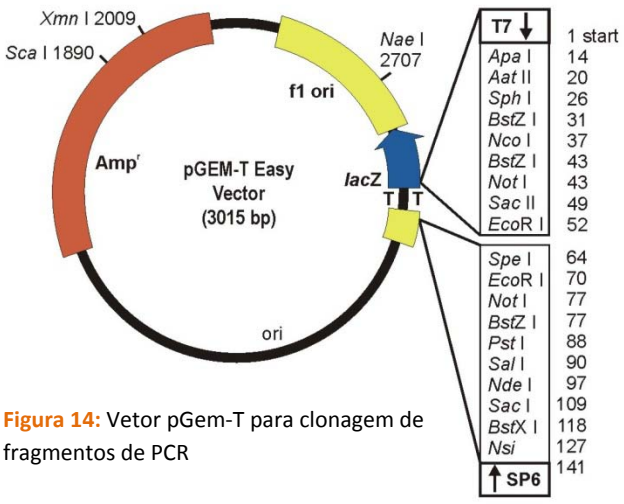



**Figura 14:** Vetor pGem-T para clonagem de fragmentos de PCR

foram clonados em vetor plasmidial utilizando o kit comercial *pGEM-T Easy Vector System* (Promega) específico para clonagem de fragmentos de PCR. A metodologia de clonagem seguiu o protocolo do fabricante.

O vetor pGEM-T (Figura 14) é linear e possui uma base nitrogenada timina em cada uma das extremidades. Dessa maneira é possível utilizar a capacidade intrínseca da enzima DNA polimerase de adicionar uma base nitrogenada adenina em cada nova fita de DNA no final de um ciclo de amplificação. A existência de pontas coesivas A – T aumenta a eficiência da ligação do inserto com o vetor.

**Ligação:** A ligação dos fragmentos de DNA foi feita utilizando a enzima T4 DNA ligase. Esta enzima cataliza a união de uma fita de DNA com um grupo hidroxi livre na posição 3` com outro que possua um grupo fosfato na posição 5`. A reação de ligação, está detalhada em seguida:

- ✓ Previamente uma mistura de vetor e inserto foram aquecidos durante 10 min para permitir que as moléculas abrissem suas estruturas;
- ✓ Em seguida, em um tubo de 500 µL de polipropileno foram adicionados 10 µL de vetor pGEM-T, 2 µL (100 ng) DNA produto de PCR (inserto), 2 µL de enzima T4 DNA ligase, tampão de reação diluído 10 vezes e água ultra pura esterilizada para completar um volume final de 20 µl;
- ✓ O sistema de ligação foi incubado durante a noite (aproximadamente 4°C) conforme recomendações do fabricante.

**Tampão de reação:** 60 mM Tris-HCl pH 7,8, 20 mM MgCl2, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% polietileno glicol

**Transformação:** A transformação é um processo pelo qual as células captam o DNA livre presente no meio. É um fenômeno que ocorre de forma natural em muitas bactérias, mas a eficácia do processo varia enormemente de uma espécie para outra. Para que a transformação ocorra, a bactéria deve estar no estado chamado estado de competência, que ocorre em determinadas condições fisiológicas. Assim, as bactérias apresentam alterações em suas paredes e membrana celular, que permitem a entrada de ácidos nucléicos na célula.

Em laboratório é possível realizar tratamentos químicos e físicos que produzam microporos na membrana citoplasmática que permitem a introdução do DNA exógeno (transformação) de modo bastante eficiente.

O método de transformação utilizado neste trabalho foi a transformação de células competentes *E. coli* DH5α (Prodimol) por choque térmico, descrito por Hanahan (1983). O protocolo utilizado encontra-se detalhado a seguir:

- ✓ Células competentes, congeladas a -80°C foram lentamente descongeladas em gelo;
- ✓ Uma vez descongeladas, foi adicionado a elas o DNA alvo da transformação, normalmente 10 µL, e a mistura mantida em gelo por 30 min;
- ✓ Depois da incubação a mistura foi submetida a um choque térmico de 45 segundos a 37° C, seguido de 2 min em gelo;
- ✓ Em seguida, foram adicionados 500 µL de meio LB (descrito no item III.3) para a recuperação das células e o tubo foi incubado por 1 hora a 37 °C em agitação;
- ✓ Posteriormente, alíquotas de 100 e 200 µL foram inoculados em placas Petri contendo de LB com 15% de Agar, acrescido de ampicilina, do indutor IPTG e do substrato cromogenico X-Gal;
- ✓ As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas;
- ✓ Os clones positivos foram selecionados em meio LB líquido com ampicilina e X-gal quando necessário, estocado em glicerol 15% a –80°C;

**Ampicilina.** 150 µg/mL de ampicilina dissolvida em água.

**X-gal.** 80 µg/mL de X-gal dissolvido em água

**IPTG.** 200 mM

## III.13.1.Sequenciamento dos clones e análises filogenéticas:

Os clones obtidos nas bibliotecas genômicas foram sequenciados utilizando os oligonucleotídeos universais M13f e M13r. Os clones bacterianos foram inoculados em meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e mantidos a 37°C com agitação (100 rpm) por 18-24hs. Uma alíquota (1-2 µL) de cada cultura foi transferida para microplaca de PCR (96 orifícios). A composição da reação de amplificação esta detalhada na Tabela 3 dos materiais e métodos. O programa de amplificação encontra-se na Tabela 4. As reações de PCR foram feitas em equipamento BioRad modelo iCycler.

Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o kit *GFX™ PCR-DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences), e utilizados para o sequenciamento no sequenciador automático MegaBace (Amersham Biosciences), empregando o kit DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace DNA Analysis Systems (Amersham Biosciences).

As sequências parciais de rDNA 16S obtidas com cada *primer* foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do software phredPhrap (http://www.phrap.org/) (Erwing *et al.*. 1998) e comparadas com os bancos de dados Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e RDP (http://www.rdp.cme.msu.edu/), visando recuperar sequências similares para realização das análises filogenéticas. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa CLUSTAL X (Thompson *et al*, 1994). Seqüências que apresentaram 97% de similaridade ou mais foram consideradas como pertencentes ao mesmo grupo taxonômico. As análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4.0 (Tamura *et al*, 2007), onde o modelo de Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980) foi utilizado para estimar a distância evolutiva e o algoritmo *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987) foi utilizado para as reconstruções filogenéticas, com valores de *bootstrap* a partir de 1000 re-amostragens.

## III. 13. 2. Análises estatísticas

Os índices de cobertura e riqueza das bibliotecas genômicas de rDNA 16S foram calculados pelo programa DOTUR (Schloss &Handelman, 2005). Com base no alinhamento obtido pelo programa ClustalX, foi construída uma matriz de distâncias, usando o programa DNAdist (Falsensten, 1989); Finalmente, esta matriz de distâncias foi utilizada como entrada de dados para o programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005), que fez a análise de agrupamento, a construção de curvas de extinção e o cálculo do índice de diversidade de Shannon-Weaver ($H$ = å ($P_i$ ln[$P_i$]), em que $P_i$ é o número de indivíduos de uma dada espécie dividido pelo número total de espécies observadas.

O índice de Shannon-Weaver é um índice geral de diversidade sensível à riqueza e à abundância relativa de espécies (Atlas & Bartha, 1998). A relação entre as espécies detectadas foi avaliada pelo índice de Equitabilidade, calculado pela seguinte equação: $E = H/$ [ln $S$], em que $S$ é o número de espécies detectadas e $H$ é o índice de Shannon-Weaver. A Equitabilidade indica se há o domínio de uma população na comunidade amostrada. Todos os programas utilizados foram aplicados usando as configurações-padrão.

A estimativa da cobertura foi calculada por meio da construção de curvas de extinção e pela equação proposta por Mullins *et al*. (1995), em que representatividade amostral (C) é igual a: C = 1-($n_1$/$N$), sendo $n_1$ o número de sequências que foram detectadas apenas uma vez (sequências únicas) e $N$ o número total de seqüências amostradas.

# *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

# IV.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS BACTÉRIAS PRESENTES NA ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO

## IV.1.1 Caracterização fisiológica

Com a finalidade de determinar a diversidade de micro-organismos cultiváveis, produtores de enzimas hidrolíticas e/ou com capacidade de degradar compostos tóxicos, foi realizada uma coleta em um ambiente salino como descrito no item III.1. do Material e Método.

Quando utilizado o meio de cultivo complexo NA, 13 linhagens foram isoladas, no entanto, estes resultados foram discutidos no item IV. 6 dos resultados e discussão, onde foi efetuada a comparação da microbiota cultivável e não cultivável presente na água de produção de petróleo.

Posteriormente quando utilizou-se meios mínimos suplementados, item III.4, sete linhagens foram isoladas e todas caracterizadas fisiológica e molecularmente (Tabela 10).

**Tabela 10**: Linhagens isoladas.

| Linhagens isoladas | Gêneros | Fonte de carbono utilizada para isolamento |
|---|---|---|
| **ác. benzóico** | *Halomonas* | Ácido benzóico |
| **dP3** | *Halomonas* | Ácido p-hidroxibenzóico |
| **Fenol 3** | *Halomonas* | Fenol |
| **Paba 2** | *Halomonas* | Ácido p-hidroxibenzóico |
| **Df 1** | *Halomonas* | Fenol |
| **Df 2** | *Bacterium* | Fenol |
| **Paba 1** | *Halomonas* | Ácido p-hidroxibenzóico |

As sete linhagens isoladas foram enquadradas taxonomicamente no grupo das bactérias halofílicas moderadas, pois toleram uma concentrações de 0,5-2,5 M (3 a 15%) de NaCl, (Kushner & Kamekura, 1988). Todas as cepas cresceram em meios que continham 15% (p/v) de NaCl, sendo inclusive capazes de crescer até 25%, ainda que o valor ótimo de crescimento da maioria das cepas esteja entre 0,5-7,5% (p/v). A única exceção foi a linhagem df1 que manteve um crescimento ótimo com 20% (p/v) de NaCl (Tabela 11).

As bactérias halofílicas moderadas são freqüentemente encontradas em ambientes salinos. Bodtker *et al*., (2008), observaram que o grupo taxonômico predominante em águas de produção no norte da Noruega era pertencente ao gênero *Marinobacter.* Más recentemente, Korenblum *et al*., (2010) afirmaram terem encontrado uma predominância dos gêneros *Alteromonas* e *Marinobacter* em águas de injeção de petróleo no Brasil. Esses resultados são similares aos encontrados neste trabalho, e já eram esperados em virtude das características limitantes presentes nos ambientes salinos.

Os ambientes salinos são inóspitos para a maioria dos organismos. Ainda assim, nesses ambientes coexistem organismos tão díspares como crustáceos, eucariotos flagelados e grupos heterólogos de procariotos, constituindo este último a microbiota predominante (Rodríguez-Valera, 1993; Ventosa, *et al*.,1998b; Oren, 2002b; Ventosa, 2006).

Os micro-organismos que se especializaram em viver neste tipo de ambiente são chamados micro-organismos halofílicos (Kushner & Kamekura, 1988), sendo que os micro-organismos halofílicos moderados é o grupo predominante em ambientes com concentração salina intermediária (1,5-3 M de NaCl) e os micro-organismos halofílicos extremos predominantes em um ambiente com salinidade superior a 3 M de NaCl (Rodríguez-Valera, 1985; Kushner & Kamekura, 1988). Neste estudo, as linhagens isoladas apresentaram uma alta tolerância ao sal já que todas apresentaram crescimento em uma larga faixa de salinidade (Tabela 11).

**Tabela 11:** Tolerância ao sal pelas linhagens estudadas

| | 0,5% | 1% | 2% | 3% | 5% | 7.5% | 15% | 20% | 25% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Fenol 3** | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | - |
| **df2** | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | - |
| **df1** | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |
| **Paba 2** | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + |
| **ác. Benzóico** | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | - |
| **dP3** | + | + | + | ++ | +++ | +++ | + | + | - |
| **Paba 1** | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | + | - |

Ausência de crescimento (-), pouco crescimento (+), crescimento (++) e crescimento significativo (+++).

Nos últimos anos foram realizados a cabo numerosos estudos sobre micro-organismos halofílicos e suas possíveis aplicações biotecnológicas (Ventosa & Nieto, 1995; Ventosa *et al*., 1998b; Mellado & Ventosa, 2003; Oren, 2010). Alguns destes micro-organismos produzem exopolisacarídios que possuem a propriedade emulsificante, vicosante, estabilizante e quelante de

íons, apresentando um grande interesse tecnológico (Calvo *et al*., 2002; Quesada *et al*., 2004). Outros micro-organismos, para manterem o equilíbrio osmótico acumulam em seu interior uma grande variedade de solutos compatíveis e estes podem ser utilizados na tecnologia de enzimas, desenho de novos fármacos, cosmética, assim como na agricultura e Medicina (Da Costa *et al*.,1998; Cushman, 2001; Nieto & Vargas, 2002; Schnoor *et al*., 2004; Graft *et al*., 2008; Pastor *et al*., 2010). Recentemente, foi incrementada a aplicação destes micro-organismos no campo da alimentação, participações na elaboração de alimentos fermentados como molhos de soja, pescados e mariscos (Rooling & Verseveld, 1996; Yoon, *et al*., 2002; Satomi, *et al*., 2004). Ainda, o uso de micro-organismos halofílicos em determinados processos que produzem águas residuárias salinas, gera uma alternativa de grande importância para a biodegradação de resíduos (Oren, *et al*., 1992; 1993; Margesin & Schimer, 2001; Mellado & Ventosa, 2003; Borgne, *et al*., 2008), em concreto, o objetivo fundamental deste trabalho.

Outra alternativa promissora em biotecnologia é a capacidade dos micro-organismos halofílicos de produzir enzimas, como é o caso das amilases, proteases, DNAses, xilanases ou pululanases (Kamekura, 1986; Gomez & Steiner, 2004; Ventosa *et al*., 2005; Alqueres *et al*., 2007). Algumas delas apresentam a peculiaridade de serem ativas e estáveis em altas concentrações de sais, temperatura e pH, o que resulta em uma grande utilidade nos processos industriais em condições extremas (Mellado *et al*., 2004; Ventosa *et al*., 2005).

Os estudos de enzimas hidrolíticas procedentes de bactérias adaptadas a viverem em ambientes extremos contribuirão para a obtenção de novas enzimas com características diferentes das que atualmente são utilizadas nas indústrias. Enzimas capazes de atuar em meios com alta salinidade e, em outros casos com elevados valores de temperatura e pH. Por este motivo, as bactérias halofílicas isoladas neste trabalho foram submetidas a cultivo em diferentes meios, e a produção das diferentes enzimas hidrolíticas ( xilanase, pululanase; DNAse, protease e amilase) foi verificada.

Das sete linhagens isoladas, apenas uma apresentou produção de xilanase, pululanase protease e amilase. A única enzima com a qual mais de um micro-organismo apresentou atividade foi a DNAse (Tabela 12). Resultados similares foram obtido por Sánchez- Porro *et al*., (2003) que detectaram em seus estudos cepas produtoras de DNAse, ainda que em porcentagem pequena. Rohban, *et al*., (2009), observaram em seus estudos uma porcentagem maior de cepas produtoras de lípase em comparação com as amilolíticas, proteolíticas e também a atividade DNAse foi detectada em porcentagem pequena. Por outro lado, Baati *et al*., (2010), afirmaram que encontraram praticamente a mesma porcentagem de cepas produtoras de proteases, amilases e DNAse em uma coleta realizada nas salinas de Sfax (Tunisia).

Em geral, detectou-se uma baixa incidência de bactérias com atividades hidrolíticas combinadas. Das sete cepas isoladas somente a Paba 2 e a dP3 apresentaram produção de mais de uma enzima hidrolítica. Resultados similares foram obtidos em outros trabalhos como em Sánchez-Porro *et al*., (2003) e no de Baati *et al*., (2010), onde foi observado que praticamente a maioria das cepas halofílicas moderadas foram capazes de hidrolisar apenas um substrato, e 25% das cepas isoladas foram capazes de produzir dupla atividade hidrolítica e somente 5% mostram 3 das atividades combinadas. Cojoc *et al*., (2009), isolaram em sua maioria cepas capazes de hidrolizar apenas um substrato, mas isolaram também uma cepa capaz de hidrolizar 4 substratos diferentes. No entanto, Rohban *et al*., (2009) detectaram um elevado número de cepas halofílicas moderadas com atividade hidrolítica, sendo a maioria delas produtoras ao menos de duas enzimas e uma delas mostrou atividade em 9 substratos diferentes.

O isolamento de um elevado número de cepas produtoras de hidrolases pode estar relacionado à necessidade desses micro-organismos em desenvolverem mecanismos adicionais para conseguirem nutrientes do meio, dado que muitas vezes os substratos que estão nos ambientes naturais contêm grandes polímeros que as bactérias devem degradar para que passem a ser de fácil acesso. Esta propriedade de hidrolisar substrato pode ter sido adquirida mediante transferência gênica horizontal de outras espécies que convivem em ambientes salinos (Arber, 1999).

**Tabela 12:** Produção de enzimas hidrolíticas pelas bactérias isoladas de água de produção de petróleo.

| | Xilanase | Pululanase | DNAse | Protease | Amilase |
|---|---|---|---|---|---|
| **Fenol 3** | - | - | + | - | - |
| **df2** | - | - | - | - | - |
| **df1** | - | - | - | - | - |
| **Paba 2** | + | + | + | - | - |
| **ác. Benzóico** | - | - | - | + | - |
| **dP3** | - | - | + | - | + |
| **Paba 1** | - | - | - | - | - |

Ausência de atividade enzimática (-) e atividade enzimática (+).

## IV.1.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

### IV.1.2.1 Extração de DNA

Com o intuito de avaliar a diversidade taxonômica das cepas isoladas da água de produção de petróleo, foi realizada a extração do DNA genômico, utilizando o Kit AguaPure Genomic DNA Isolation Kit (III.8.1. do Material e Método). Após a obtenção do DNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose para verificar a eficácia do método. Como pode ser observado na Figura 15, a utilização deste método de extração foi efetivo para a obtenção do DNA genômico de todas as bactérias halofílicas moderadas.

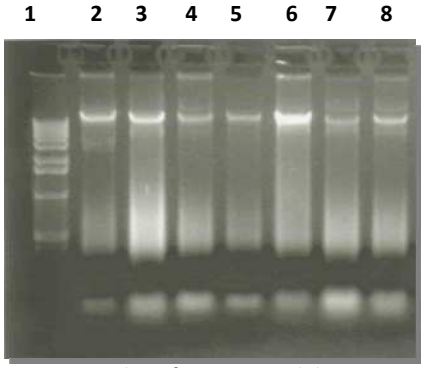



**Figura 15**. Eletroforese em gel de agarose a 1%(p/v) mostrando a presença do DNA das sete linhagens isoladas. **1,** ladder; **2,** Ácido Benzóico; **3,** dP3; **4,** Fenol 3; **5,** Paba 2; **6,** df1; **7,** df2; **8,** Paba1.

### IV.1.2.2 Amplificação do fragmento de DNA por PCR

Após a extração do DNA, foi realizada uma amplificação do gene RNA ribossomal 16S como descrito no item III.8.4. de Material e Método deste trabalho. Como pode ser observado na Figura 16, todas os DNAs das bactérias isoladas da água de produção de petróleo tiveram os seus fragmentos amplificados, sendo posteriormente enviados para sequenciamento.

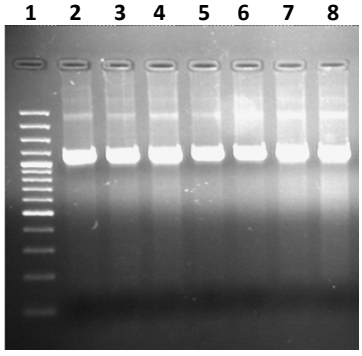



**Figura 16**. Eletroforese em gel de agarose a 1%(p/v) mostrando a amplificação do DNA das sete linhagens isoladas. **1,** ladder; **2,** Ácido Benzóico; **3,** dP3; **4,** Fenol 3; **5,** Paba 2; **6,** df1; **7,** df2; **8,** Paba1.

## IV.1.2.3 Análise das seqüências

A análise da diversidade dos micro-organismos cultiváveis da água de produção de petróleo, realizada por meio de comparação das sequencias obtidas com bancos de dados GenBank e RDP. Foi também construída uma arvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das sete linhagens de bactérias halofílicas isoladas foi construída (Figura 17).

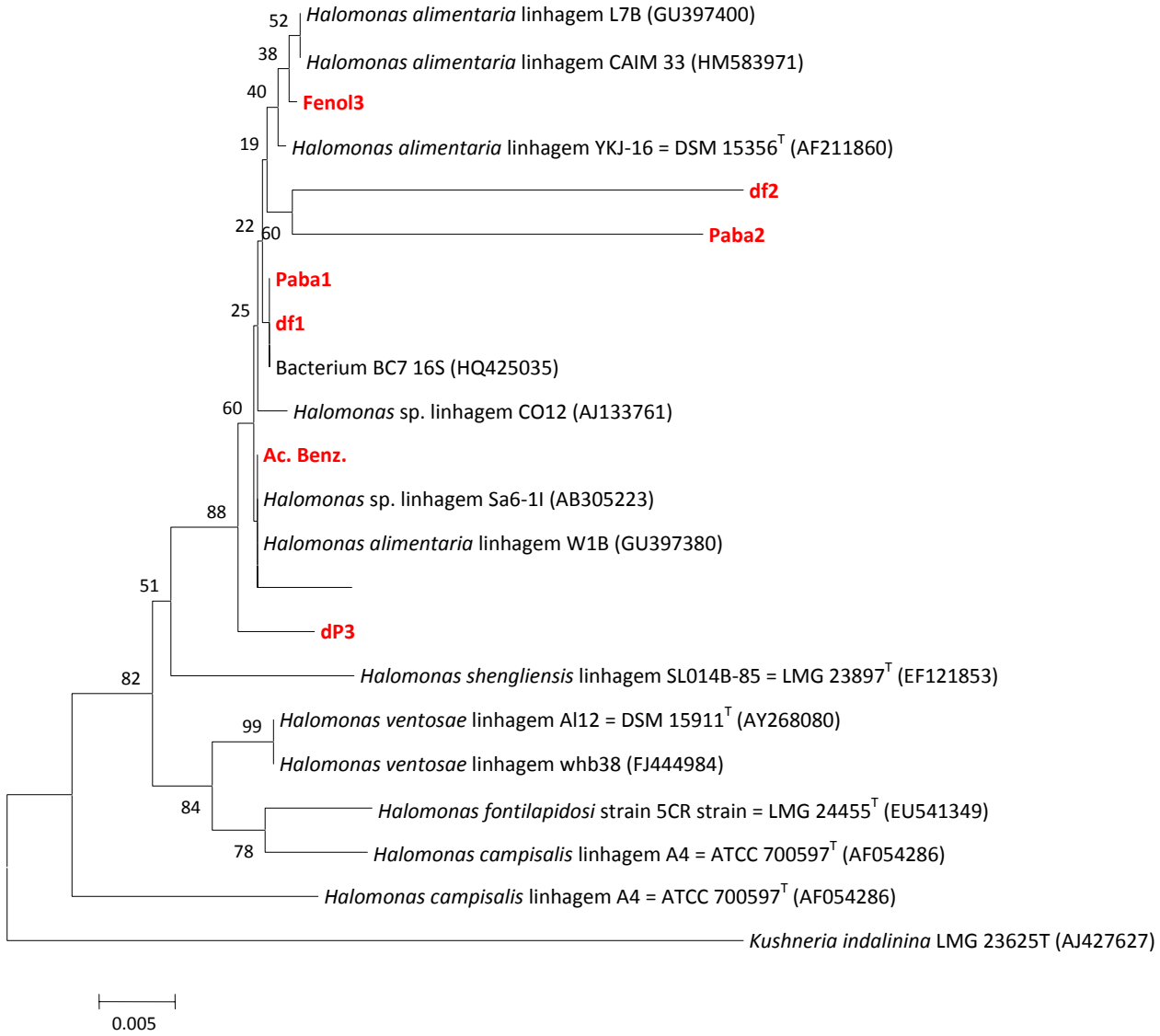



**Figura 17.** Árvore filogenética de sequências parciais do gene RNA ribossomal 16S das sete linhagens de bactérias halofílicas isoladas da água de produção e de microrganismos relacionados obtidos dos bancos de dados GenBank e RDP. As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Joining* com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Kushneria indalinina* foi utilizada como *outgroup*.

A análise filogenética dos isolados da água de produção de petróleo apresentou uma baixa diversidade, sendo que todos os integrantes encontrados pertenciam à família *Halomonacea*. Uma reduzida diversidade de bactérias em ambientes que apresentam uma alta seletividade em virtude das características inóspitas foram encontradas por Rolling *et al*., (2002) e Al-saleh *et al*.,(2009), em estudos realizados em água de produção de petróleo, onde somente *Bacillus* e *Pseudomonas* foram isolados. Em adição, estudos relataram em ambientes com uma alta quantidade de carga orgânica, apresenta uma grande densidade óptica, no entanto uma baixa diversidade (Dale *et al*., 1974; Cherrier *et al*., 1996; Hopkinson *et al*., 1998; Boudreau, 1999). Esse fato pode estar relacionado com o efeito da composição de nutrientes presentes no meio que muitas vezes faz falta para a comunidade microbiana (Head & Swannell, 1999).

Outra vertente que justifica a baixa diversidade, está no fato de que bactérias que vivem em associação com outros micr-organimos são na sua maioria não-cultivaveis, já que vivem em simbiose com outras bactérias e quando em meio de cultivo não conseguem manter o metabolismo e morrem (Brady *et al*., 2009).

## IV.2. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS ISOLADAS EM DIFERENTES COMPOSTOS

Bactérias halofílicas moderadas são micro-organismos extremos adaptados a viver em ambientes salinos. Atualmente, esses micro-organismos vêm sendo explorados em diferentes campos da biotecnologia principalmente a produção de enzimas extracelulares ou solutos compatíveis (Ventosa *et al*., 1998; Mellado & Ventosa, 2003). Os ambientes salinos são freqüentemente contaminados por compostos orgânicos como resultado da atividade industrial (Oren *et al*., 1992; Margesin & Schinner, 2001). A contaminação desses hábitats constitui um sério problema, principalmente devido à alta toxicidade apresentada por alguns compostos orgânicos. Em muitos casos a biodegradação constitui o mecanismo primário da remoção desses contamintes. No entanto, o processo de biodegradação é bastante dificultado pelas condições de salinidade (Oren *et al.,* 1992; Ward & Brock, 1978). Uma alternativa para a superação deste problema é o uso de bactérias halofílicas adaptadas a viverem em condições extremas. Muitos estudos estão sendo levados a cabo e demonstrando a degradação de compostos aromáticos por bactérias em condições salinas (Mellado & Ventosa, 2003; Margesin & Schinner, 2001; Piedad *et al*., 2000; Peyton *et al*., 2004; García *et al*., 2005).

Maltseva *et al*.,(1996), descreveu a primeira bactéria halofílica aeróbia capaz de degradar compostos cloroaromáticos. Além disso, a bactéria halofílica moderada *Arhodomonas aqueoli* que degradou óleo anaerobicamente também foi isolada de salmoura subterrânea (Adkins *et al*.,1993), e uma nova espécie do gênero *Marinobacter* foi descrita pela sua capacidade de degradar

hidrocarbonetos e alguns compostos presentes no petróleo (Gauthier *et al*., 1992; Hedlund *et al*., 2001).

Neste trabalho foi estudada a capacidade da comunidade bacteriana presente na água de produção de petróleo em crescer em distintos compostos e em alta salinidade. As sete linhagens em questão foram submetidas a crescimento em distintos compostos como detalhado no item III.9 dos Material e Método.

No primeiro ensaio, utilizando somente os compostos de interesse sem a utilização de nenhuma outra fonte de carbono de fácil acesso. Das sete linhagens estudadas, nenhuma apresentou crescimento significativo em meio contendo fenol como única fonte de carbono. Quando o composto em estudo foi o ácido benzóico somente a linhagem denominada Paba 1 obteve crescimento na condição empregada esta chegou a fase logarítmica com dois dias de inóculo alcançando uma absorbância de 0,2 nm. Por outro lado, quando a fonte de carbono disponibilizada foi o ácido p-hidroxibenzóico, os resultados foram semelhantes. Somente a cepa df2 apresentou crescimento, alcançando também a fase logarítmica com dois dias de cultivo (Figuras 18).

Em trabalho realizado por García *et al*., (2005), onde isolaram e caracterizaram bactérias halofílicas moderadas capazes de degradar diferentes compostos aromáticos, foi sugerido que poucos gêneros isolados são capazes de crescer em diferentes compostos selecionados em condições de alta salinidade. Os autores afirmaram ainda que um ponto relevante para a obtenção desses resultados é a restritiva condição causada pela alta salinidade. Esses resultados corroboram com os obtidos neste presente trabalho, onde pouco crescimento foi observado quando os isolados foram submetidos às mesmas condições de cultivo. No entanto, muitos autores afirmam que obtiveram crescimento com bactérias halofílicas moderadas em fenol quando estas foram mantidas em condições de anaerobiose (Woolard & Irvine, 1994) e mais recentemente Alva & Peyton, 2003 obtiveram os mesmos resultados. Maskow & Kleinsteuber (2004), reportaram o crescimento de uma *Halomonas haloalkalina* em fenol, descrevendo a síntese de solutos compatíveis para a manutenção do balanço osmótico. García *et al*., (2004), descreveram e caracterizaram uma nova espécie de bactéria halofílica moderada, denominada *Halomonas organivorans*, capaz de degradar diferentes compostos aromáticos. A discrepância de resultados encontrados pode estar relacionada com o catabolismo bastante versátil apresentado pelas bactérias halofílicas moderadas (Garcia *et al*., 2005). No entanto, essa capacidade catabólica em processos de biorremediação em ambientes salinos não é bem conhecida, podendo variar de acordo condições que estas sejam submetidas.

Ainda com relação ao trabalho realizado por García *et al*., (2005), podemos mencionar que as bactérias halofílicas obtiveram um maior crescimento em ácido benzóico e Paba, do que em Fenol. O mesmo foi verificado neste mesmo trabalho, sendo que as características organolépticas distintas apresentada por cada composto podem justificar a diferença na taxa de crescimento.

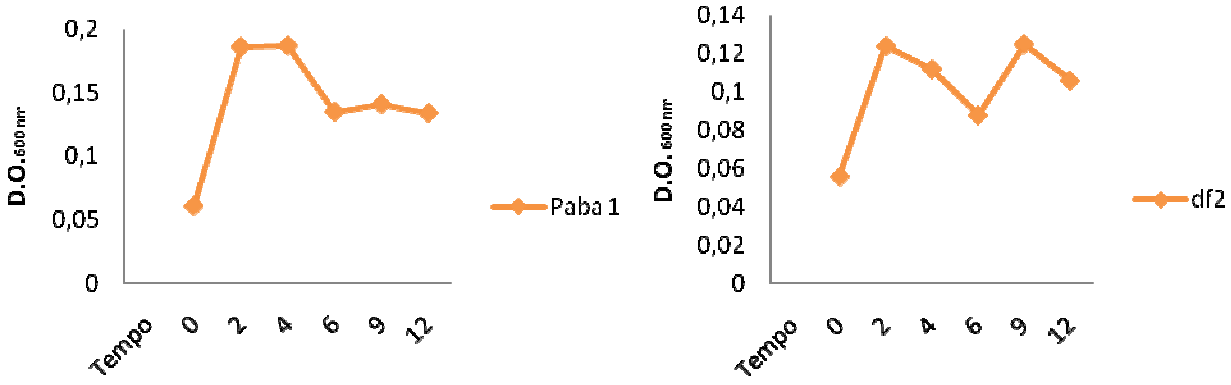



**Figura 18.** Crescimento das linhagens Paba1 e df2 em meio suplementado com ácido benzóico e ácido p-hidroxibenzóico como única fonte de carbono.

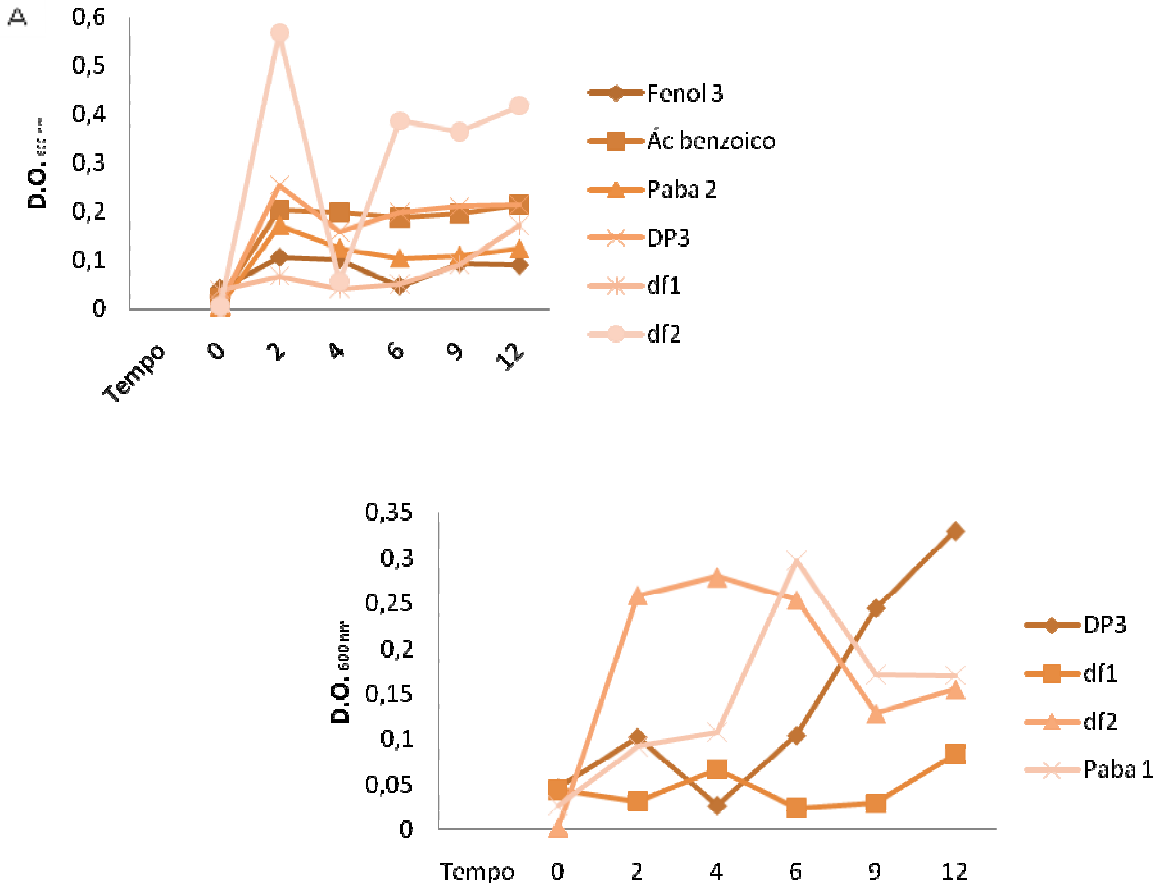
No segundo momento do experimento, onde as linhagens foram crescidas nos mesmos meios anteriormente mencionados, no entanto, acrescidos de 0,5% de extrato de levedura, um crescimento maior foi observado em todos os compostos analisados neste estudo.

O primeiro composto testado foi o fenol, e das sete cepas estudadas, seis apresentaram crescimento (feanol 3, AC. Benzóico, Paba 2, DP3, DF e df2), sendo que a linhagem df2 alcançou a maior densidade óptica (0,567) no segundo dia, tendo um decréscimo no quarto e aumentado novamente por volta do sexto dia de experimento. Esses resultados podem inferir que a linhagem utilizou compostos presentes em sua membrana e quando estes não estavam mais presentes houve uma queda na taxa de crescimento, sendo posteriormente revertido com a utilização dos compostos disponibilizados. Esses dados podem ser visualizados na Figura 19.

As outras cinco linhagens estudadas apresentaram uma curva de crescimento semelhante no que tange a utilização de fenol como fonte de carbono suplementado com extrato de levedura. Esses resultados estao apresentados na Figura 19-A.

O segundo composto a ser restado pelas bactérias halofílicas isoladas da água de produçao de petroleo, nas condições anteriormente mencionadas, foi o ácido benzóico. Quatro das sete linhagens estudadas apresentaram crescimento (DP3, df1, df2 e Paba1), sendo que a df2 obteve-se uma densidade óptica a 600nm de 0,3 no segundo dia de experimento (Figura 19-B).

**Figura 19.** A- Curva de crescimento das linhagens isoladas quando em presença de fenol e extrato de leveduracomo fonte de carbono e energia. B- Curva de crescimento das linhagens isoladas quendo em presença de ácido benzóico e extrato de levedura.




O ácido para-hidroxibenzóico foi o terceiro composto a ser testado, e com a suplementação com extrato de levedura cinco linhagens obteve-se crescimento (Fenol 3, ácido benzóico, dP3, Paba 2, df2). Das linhagens em questão, a denominada df2 foi a que apresentou a maior taxa de crescimento, alcançando uma densidade óptica de 0,3 a 600nm no quarto dia de experimento (Figura 20).

Com relação à capacidade individual de degradação foi observado que a linhagem df2 apresentou a maior taxa de crescimento nos três compostos de interesse. Sendo essa bactéria uma possível ferramenta na biorremediação de ambientes salinos contaminados com ácidos aromáticos.

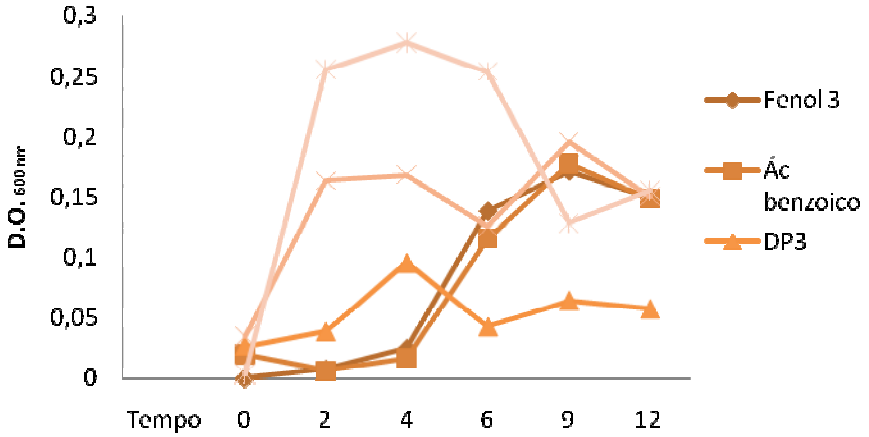



**Figura 20**. Curva de crescimento das bactérias halofílicas moderadas em ácido p-hidroxibenzóico suplementado com 0,5% de extrato de levedura.

Quando uma comparação foi realizada entre o crescimento obtido pela linhagem Paba1 em meio suplementado com uma fonte de carbono adicional ao ácido benzóico e sem nenhuma suplementação, obtivemos uma densidade óptica de 0,2 e 0,3 a 600nm, respectivamente (Figura 21). Esse fato vem a corroborar o trabalho de Juhasz & Naide (2000), que em estudos de degradação de compostos aromáticos com eubactérias verificaram uma maior degradação dos compostos quando adicionada ao meio outra fonte de carbono. Ye *et al.,* (1996), observaram que a concentração de benzo(a)pireno foi reduzida apenas 5% por *Shingomonas paucimobilis* após 168 horas, entretanto, com o acréscimo de 100 mg/L de extrato de levedura houve uma remoção de 40%. Chen et al.,(2001), tentaram identificar a mais eficiente fonte de nutriente que atenuasse sinergicamente com o fenol para obter uma ótima degradação do mesmo. Desta forma, o crescimento associado com a degradação de fenol usando vários nutrientes como bioestimuladores foram testados, chegando à conclusão de que o glicerol se mostrou ser o composto mais eficiente na bioestimulação de *Rastonia taiwanensis*.

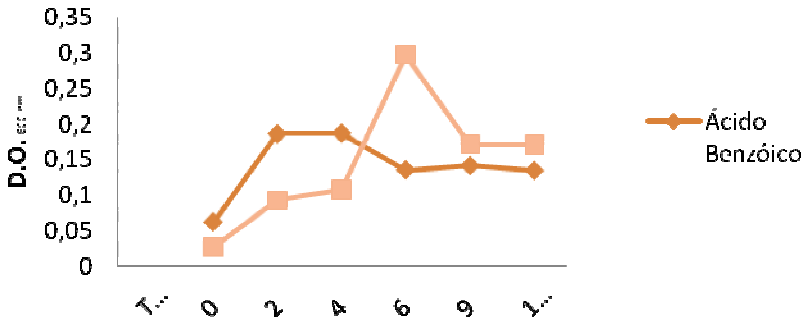



**Figura 21.** Comparação do crescimento da linhagem Paba 1 em meios contendo ácido benzóico suplementado ou não com extrato de levedura.

Seguindo o estudo realizado por Chen *et al*.,(2001), foram testados inúmeros compostos a fim de encontrar o que melhor bioestimulasse as bactérias isoladas da água de produção de petróleo. Para isso foi levada a cabo a metodologia descrita no item III.9 desta presente tese. Além dos resultados demonstrados por Chen *et al*.,(2001), a escolha dos compostos foi baseada no fato de que as condições ambientais podem afetar o crescimento e a utilização dos compostos presentes no meio. Quando ocorre um aumento na concentração de carbono observa se uma carência de nitrogênio e fósforo, sendo esses compostos essenciais no metabolismo bacteriano, visando uma compensação dos mesmos e um aumento na velocidade catabólica. Estudos vêm sendo realizado para identificar condições que favoreçam a degradação de compostos tóxicos e persistentes no meio ambiente.

Neste trabalho, não somente o nitrogênio foi adicionado na forma de cloreto de amônio, mas também diferentes aminoácidos que são precursores de enzimas. Das quatro condições testadas a que estimulou o crescimento do maior número de espécies foi o ácido D- glucurônico. Quando a fonte de carbono utilizada foi o ácido benzóico, seis das sete linhagens apresentaram crescimento, já quando o meio foi suplementado com acido p-hidroxibenzóico, apenas duas linhagens apresentaram crescimento; no caso do fenol, 4 das sete linhagens metabolizaram este composto. Neste ponto, é valido mencionar que quando submetese ao crescimento as cepas isoladas da água de produção em meios de cultivo utilizando somente o fenol como fonte de energia, nenhuma das bactérias estudadas saiu da fase lag. O segundo composto que mais estimulou as cepas testadas foi a alanina que nos diferentes compostos testados apresentou crescimento de 5, 3 e 2 linhagens quando em presença do acido benzóico, ácido p-hidroxibenzóico e fenol respectivamente. A D-lactose e a L-histina foram as menos efetivas na estimulação das linhagens estudadas (Tabelas 8, 9 e 10). Das linhagens isoladas da água de produção de petróleo a que obteve o melhor aproveitamento com os diferentes compostos foi a df2, que alcançou a fase logarítmica em 8 das 12 condições testadas, seguido pela Fenol 3, todos estes resultados estão sumarizados nas tabelas 13, 14 e 15.

Segundo Brooks *et al.,* (1998), diferentes espécies microbianas variam consideravelmente nas suas necessidades nutricionais, as diferenças nas exigências refletem diferenças na capacidade metabólica, esta afirmação corrobora com os resultados obtidos neste estudo, visto que cada linhagem apresentou uma necessidade frente a cada composto testado.

A capacidade de metabolizar compostos de cada micro-organismo está não somente relacionada com a fonte de carbono disponível, mas também com capacidade de contornar o efeito tóxico causado pela fonte de carbono disponibilizada, o aumento da velocidade de reação de uma dada rota metabólica, ou ainda sintetizar enzimas capazes de quebrar esses compostos.

**Tabela 13.** Crescimento das bactérias halofílicas em meio contendo 2mM de fenol suplementado com diferentes compostos.

| Fenol | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Linhagens | Fenol | Fenol + Solução de cloreto de amônio + ácido D-Glucoronico | Fenol + Solução de cloreto de amônio + D-Lactose | Fenol + Solução de cloreto de amônio + Alanina | Fenol + Solução de cloreto de amônio + L-histidina | Fenol + Extrato de levedura |
| **Ac. Benzóico** | - | - | + | - | - | + |
| **dP 3** | + | + | + | + | + | + |
| **Fenol 3** | - | + | - | - | - | + |
| **Paba 2** | - | - | - | - | - | + |
| **df 1** | - | - | - | - | - | + |
| **df 2** | - | + | - | + | + | + |
| **Paba 1** | - | + | - | - | - | - |

(-) sem crescimento; (+) com crescimento

**Tabela 14.** Crescimento das bactérias halofílicas em meio contendo 2mM de ácido benzóico suplementado com diferentes compostos.

| Ácido Benzóico | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Linhagens | ác. Benzóico | ác. Benzóico + Solução de cloreto de amônio + ácido D-Glucoronico | ác. Benzóico + Solução de cloreto de amônio + D-Lactose | Ac. Benzóico + Solução de cloreto de amônio + Alanina | Ac. Benzóico + Solução de cloreto de amônio + L-histidina | Acido benzóico+ Extrato de levedura |
| **Ac. Benzóico** | - | - | - | - | - | - |
| **dP 3** | - | + | - | + | - | + |
| **Fenol 3** | - | + | + | - | + | - |
| **Paba 2** | - | + | - | + | - | - |
| **df 1** | - | + | - | + | + | + |
| **df 2** | - | + | - | + | - | + |
| **Paba 1** | + | + | - | + | - | + |

(-) sem crescimento; (+) com crescimento

**Tabela 15.** Crescimento das bactérias halofílicas em meio contendo 2mM de ácido p-hidroxibenzóico suplementado com diferentes compostos.

| Ácido p-hidroxibenzóico | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Linhagens** | **Paba** | **Paba + Solução de cloreto de amônio + ácido D-Glucoronico** | **Paba + Solução de cloreto de amônio + D-Lactose** | **Paba + Solução de cloreto de amônio + Alanina** | **Paba + Solução de cloreto de amônio + L-histidina** | **Paba + Extrato de levedura** |
| **Ác. Benzóico** | - | - | - | - | - | + |
| **dP 3** | + | + | - | + | - | + |
| **Fenol 3** | - | - | - | + | + | + |
| **Paba 2** | - | - | - | - | + | + |
| **df 1** | - | - | - | - | - | - |
| **df 2** | + | + | - | + | + | + |
| **Paba 1** | - | - | - | - | - | - |

(-) sem crescimento; (+) com crescimento

## IV.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO DE DOFERENTES COMPOSTOS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO

Durante décadas, muitas pesquisas eram dedicadas à elucidação do metabolismo de bactérias não halofílicas frente diferentes compostos orgânicos. Radianingtyas *et al*.,2003, observaram que a espécie *Xanthomonas maltophila* é capaz de catabolizar 4- clorocatecol. Dentre todas as bactérias não- halofílicas estudadas a que obteve maior destaque foi membro do gênero *Pseudomonas*, que por muito tempo foram mantidas como modelo para estudos de biodegradação (García *et al*., 2005). Atualmente, em virtude da escassez de estudos com micro-organismos halofílicos e o aumento da presença de compostos aromáticos em ambientes salinos, muitos autores passaram a ver interesse neste campo de investigação, como é o caso de García *et al*., (2005) que propuseram a utilização da bactéria halofílica moderada *Halomonas* como modelo de estudo na degradação de compostos aromáticos em ambientes salinos. Os autores afirmaram, que o gênero em questão apresenta um baixo requerimento nutricional aliado com a habilidade de crescer em diferentes concentrações salinas.

Membros dos gêneros *Salinicoccus* e *Halobacillus* não foram descritos como espécies capazes de degradar compostos orgânicos em contaminantes ambientais, no entanto, em estudos realizado por García *et al.,(*2005), foram isoladas espécies com alta similaridade com *Salinococcus roseus* (Ventosa, et al., 1990) e outra espécie relacionada ao *Halobacillus truepri* (Spring *et al*., 1996), que foram capazes de metabolizar compostos orgânicos em condições de estresse osmótico.

Neste trabalho com o fim de conhecer a capacidade das bactérias halofílicas moderadas isoladas da água de produção de petróleo em catabolizar os compostos orgânicos presentes no meio ambiente e ainda, buscar possíveis espécies que pudessem ser utilizadas como modelo em estudos de biodegradação de ambientes contaminados com petróleo.

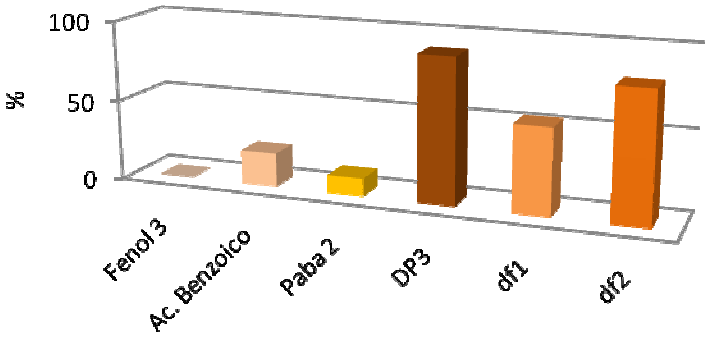



**Figura 22.** Degradação parcial de fenol, após 12 dias de experimento pelas linhagens isoladas da água de produção de petróleo

Como primeiro composto a ser testado pelas linhagens utilizou-se o fenol. De todas as linhagens, a DP3 foi a que apresentou maior taxa de degradação (90,04%), seguido pela df2 que, com doze dias

de experimento, degradou (80,53%) do fenol disponível. Esses resultados estão apresentados na Figura 25, e vêm a corroborar com resultados obtidos por outros pesquisadores.

Urszula *et al*., (2009), estudaram a capacidade da espécie *Stenotrophomonas maltophilia* em degradar cinco compostos monoaromáticos distintos (fenol; catecol, ácido benzóico, ácido protocatecoico e ácido vanílico) como única fonte de carbono e energia. Hinteregger & Streichsbier (1997) afirmaram que a bactéria halofílica moderada *Halomonas sp*. foi capaz de produzir o ácido cis, cis mucurônico, que é um metabólico secundário produzido quando ocorre a catabolização do fenol, em seis dias de experimento. Em outro estudo realizado mais recentemente por García et al., (2005), também afirmaram ter encontrado espécies de bactérias halofílicas moderadas, a maioria da família *Halomonadaceae,* capazes de degradar 2,5 mM de fenol em presença de 10 % de NaCl. Bactérias do gênero *Halomonas* são amplamente mencionadas como degradadoras de compostos aromáticos em ambientes salinos. A maioria dos trabalhos observados afirmaram terem isolado linhagens pertencentes a este gênero em diferentes dejetos indústrias. Neste trabalho, uma das sete linhagens isoladas pertencem ao gênero *Halomonas* e quando em presença de fenol foram capazes de catabolizar este composto, assim como observado nos trabalhos anteriormente mencionados. Outro fato interessante notado neste trabalho é que as bactérias df1 e df2, ápos catabolizarem o fenol, o meio de cultivo apresentou uma coloração marrom, o que pode ser explicado pela formação de catecol. Quando o fenol é catabolizado um possível composto metabólico produzido é o catecol e a produção deste é responsável pela mudança de coloração do meio de cultivo. Esse fato foi observado também por Garcia et al., (2004), que observaram a mudança da coloração do meio de cultura para marrom quando as linhagens foram crescidas em fenol, ácido cumárico, ácido salicílico, e p-hidroxibenzóico (Figura 23).

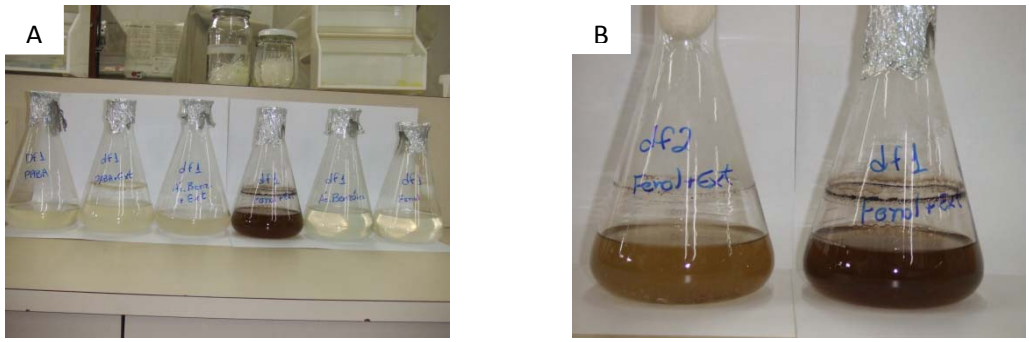



**Figura 23**. A - crescimento da linhagem df1 nos três diferentes compostos e a observação da mudança na coloração. B- Mudança na coloração no meio contendo fenol pelas linhagens df1 e df2.

O ácido benzóico foi o segundo composto a ser testado pelas bactérias halofílicas moderadas. As linhagens df2 e Paba1 estudadas apresentaram degradação de 99% do composto, seguidas pelas cepas df1 e DP3 que também apresentaram uma taxa de degradação deste composto (Figuras 25 e 26). Em estudos realizados por García *et al.,(*2005), foi observado que a linhagem A27.8, isolada de meio contendo como fonte de carbono ácido benzóico, foi capaz de degradar hidrocarbonetos. Esta linhagem apresentou similaridade com a espécie recentemente descrita *Marinobacter lipolyticus* (Martin *et al*., 2003) que já havia sido mencionada por outros pesquisadores como um modelo para estudos de degradação (Gauthier *et al*., 1992; Hedlund *et al*., 2001). Assim como ocorreu com o fenol foram encontrados trabalhos que evidenciaram a degradação de ácido benzóico por bactérias halofílicas moderada, como é o caso de Emerson *et al*., (1994), que documentaram a habilidade de micro-organismos halofílicos e halotolerantes em degradar ácido benzóico. García *et al*., (2004), isolaram inúmeras bactérias do gênero *Halomonas* capazes de degradar ácido benzóico, ácido salicílico e ácido fenilpropiônico. Más recentemente, o mesmo grupo de investigação observou que a bactérias halofílicas moderadas *Halomonas organivorans* degradam ácido benzóico utilizando a via do catecol 1,2 dioxigenase (Garcia *et al*., 2004).

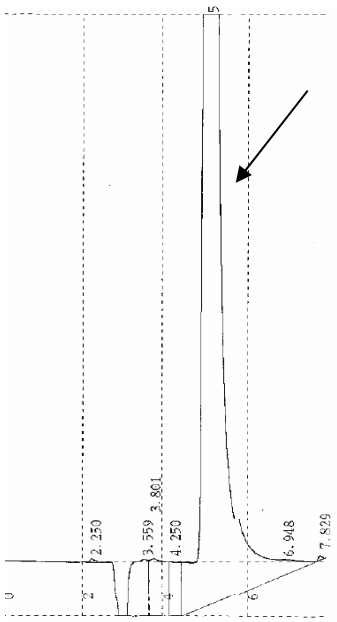



**Figura 24.** Curva padrão do ácido benzóico demonstrando que o tempo de retenção do composto é aproximadamente com 5.10 minutos de corrida com a fase móvel utilizada.

A Figura 24 apresenta a curva padrão do ácido benzóico obtida quando utilizadas as condições descritas no item III.10. O composto possui um tempo de retenção de 5,10 min. Os cromatogramas que se seguem apresentam a redução do composto que foi utilizado pela bactéria halofílica Paba 1 depois de 12 dias de experimento (Figuras 27 e 28). A mesma taxa de degradação foi observada quando o meio de cultura foi suplementado ou não com extrato de levedura (Figura 23). Não há um consenso no que tange à suplementação do meio com compostos que auxilie no metabolismo das bactérias, visto que inúmeros autores conseguiram obter uma alta taxa de degradação mesmo quando não suplementado com extrato de levedura. No entanto, Nilcholson & Fathepure (2003), afirmaram que quando o meio foi suplementado com elementos traços, vitaminas e extrato de levedura houve um aumento na taxa de degradação do ácido benzóico, sendo sugerido que os micro-organismos halofílicos possuem um maior requerimento nutricional quando em ambientes salinos, e que essa suplementação pode auxiliar o crescimento em condições de alta salinidade. Do ponto de vista industrial, quanto menor for o requerimento nutricional, mais facilmente ela poderá ser utilizada em processos biotecnológico, por isso a grande vantagem da cepa Paba 1 o qual alcançou a mesma taxa de degradação com e sem extrato de levedura.

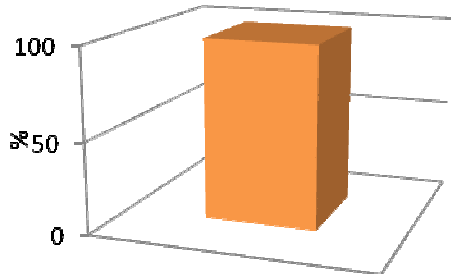
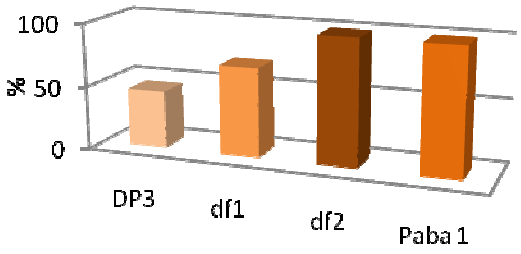



**Figura 25.** Taxa de degradação do ácido benzóico pela linhagem Paba 1 sem a suplementação de extrato de levedura.

**Figura 26.** Porcentagens de degradação do ácido benzóico obtidas pelas linhagens isoladas da água de produção de petróleo quando em presença de extrato de levedura.



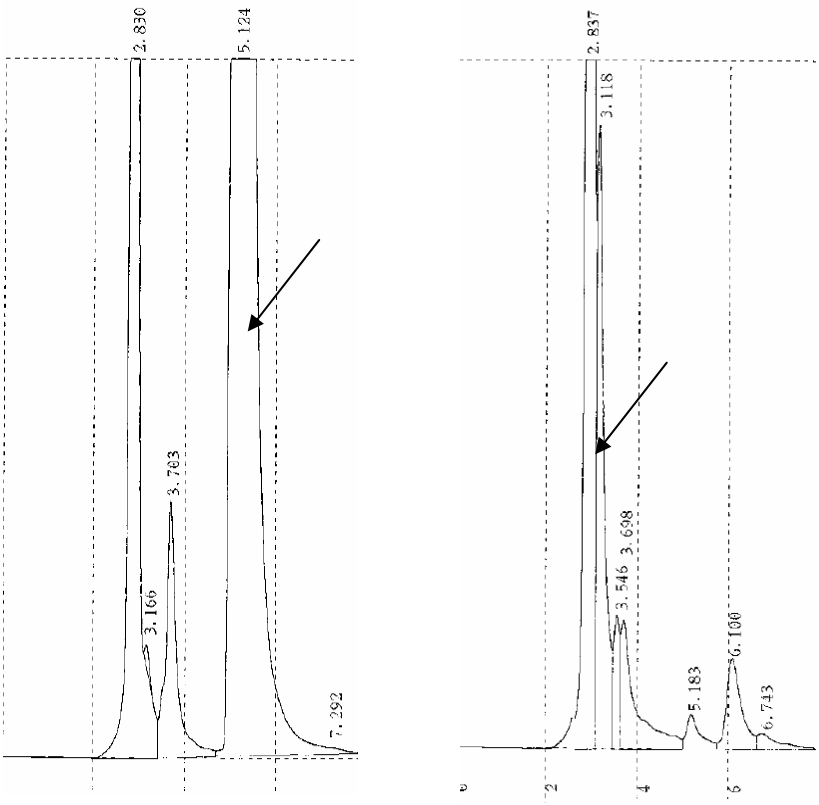



**Figura 27.** Cromatogramas ilustrando a degradação do ácido benzóico pela linhagem Paba 1 em meio não suplementado com extrato de levedura. O primeiro cromatograma ilustra a curva no tempo igual a 0 onde não havia começado o processo de degradação e o pico referente ao composto esta com uma área grande. Já no segundo cromatograma a visualização da degradação do composto correspondente à diminuição do pico.

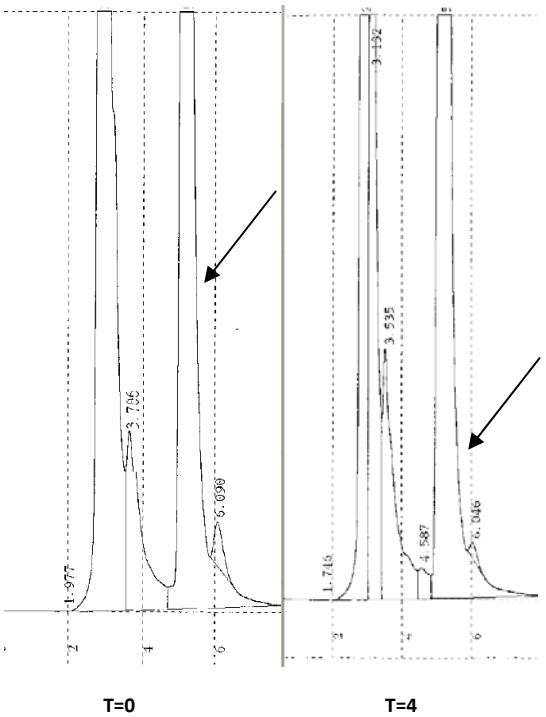



**Figura 28.** Cromatogramas ilustrando a degradação do acido benzóico pela linhagem Paba 1 suplementada com extrato de levedura. O primeiro cromatograma ilustrando o tempo 0 onde verifica-se uma alta concentração de acido benzóico no pico correspondente ao 5,10 minutos, já o segundo demonstrando a evolução após 4 dias de experimento e por último a degradação do composto visto pela diminuição do pico.

Ainda com relação ao potencial de degradação dos compostos monoaromáticos, a linhagem df2 degradou cerca de 70% de ácido p-hidroxibenzóico em 12 dias de experimento, sem que fosse necessária a suplementação com extrato de levedura, com extrato de levedura a mesma linhagem degradou 100% do composto (Figuras 29 e 30).

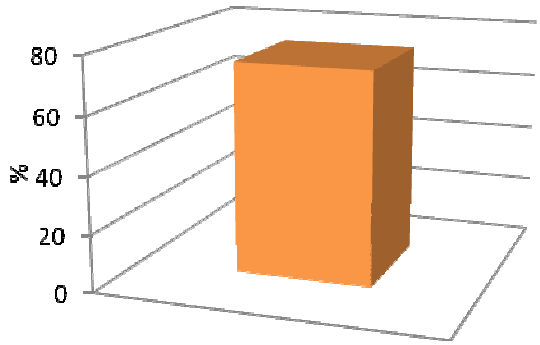



**Figura 29.** Degradação de Paba pela linhagem df2 sem a suplementação de extrato de levedura.

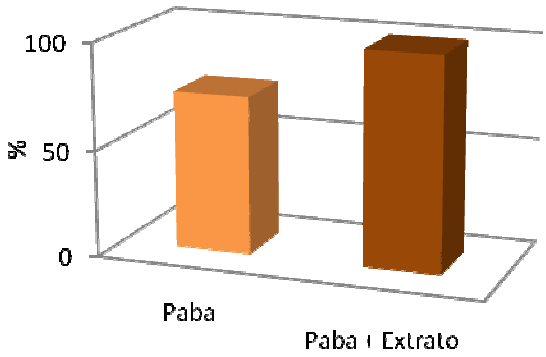



**Figura 30.** Variação da taxa de degradaçao de paba pela linhagem df2 quando em presença do extrato de levedura.

Das sete linhagens utilizadas nesse estudo a df2 foi a que apresentou a maior taxa de degradação do paba, seguida pela linhagem denominada ácido benzóico responsável por metabolizar 42% do composto e Fenol 3 que degradou 25% (Figura 31).

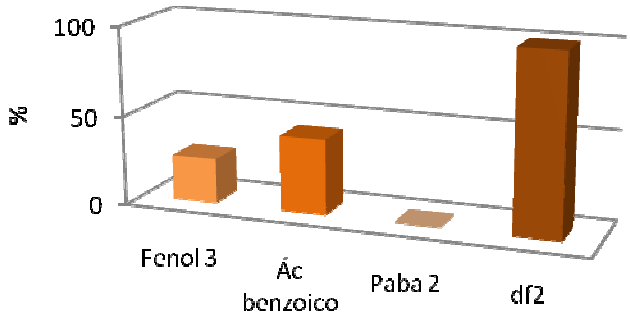



**Figura 31.** Taxas de degradaçao de paba pela diferentes linhagens estudadas.

Em 2005a, García e colaboradores estudaram 322 isolados de quatro diferentes ambientes salinos da Espanha – Estuário de Huelva, Isla Bacuta, Isla Cristina e São Fernando. Estes isolados foram estudados quanto à capacidade de crescer em diferentes compostos aromáticos tais como: ácido benzóico, ácido p-hidroxibenzóico, ácido cinâmico, ácido salicílico, ácido fenilacético, ácido

fenilpropiônico, fenol, ácido p-coumárico, ácido ferrúlico e ácido aminosalicílico. Destes isolados, 32 foram capazes de crescer em fenol como única fonte de carbono, 48 em ácido benzóico e 38 em ácido p-hidroxibenzóico; Dentre eles, uma espécie descrita pelo mesmo grupo em 2004 denominada *Halomonas organivorans* (García *et al.*, 2004).

Como já é sabido, a degradação de compostos tóxicos e recalcitrantes por micro-organismos halotolerantes ou halofílicos é de grande importância na aplicação de bioremediação de ambientes salinos. Com isso, cada vez mais o estudo de linhagens halofílicas com potencial para a degradação de compostos aromáticos tem sido uma ferramenta na busca de minimizar os impactos causados por indústrias em regiões salinas. O presente trabalho mostrou importantes resultados corroborando as citações anteriores descritas, já que foram isoladas linhagens com alta capacidade de degradação de compostos recalcitrantes de ambientes contaminados podendo estas serem empregadas em processos de biorremediação.

## IV.4. ESTUDO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Após a compreensão da capacidade de degradação de compostos aromáticos pelas bactérias halofílicas isoladas da água de produção de petróleo, a possível rota utilizada na metabolização desses compostos foi analisada.

Na rota de degradação do β- cetoadipato, catecol e protocatecol são clivados no segundo grupo hidroxi pela enzima catecol 1,2 dioxigenase (1,2-CTD) ou pela protocatecol 3,4 dioxigenase (3,4-PCD). No entanto, se a fissão ocorrer adjacente a um grupo hidroxial (extradiol clivagem), as principais enzimas envolvidas nessa fissão são a catecol 2,3 dioxigenase (2,3-CTD) e a protocatecol 4,5 dioxigenase (4,5-PCD). Essas rotas metabólicas já foram identificadas em muitas bactérias com capacidade de degradar compostos aromáticos, incluindo espécies do gênero *Acinetobacter, Alcaligenes, Bacillus* e *Pseudomonas* entre outros (Harwood & Parales, 1996). No entanto, a prevalência dessa rota catabólica em bactérias halofílicas moderadas não está totalmente elucidada (Garcia *et al* 2005). Nesse contexto, esta parte do trabalho teve como objetivo explorar o mecanismo catabólico usado na degradação de diferentes compostos aromáticos pelas bactérias halofílicas.

A atividade das enzimas-chave do metabolismo de compostos aromáticos: catecol 1,2 dioxigenase, catecol 2,3 dioxigenase e protocatecol 3,4 dioxigenase, foram determinadas em extrato liquido de células crescidas sob condições aeróbias em presença de diferentes compostos aromáticos. Esses resultados estão elucidados nas três Tabelas que se seguem 16, 17 e 18.

**Tabela 16.** Atividade enzimática obtida quando em presença de fenol.

| | Atividade enzimática produzida por indução com fenol | | | Atividade enzimática produzida por indução com fenol + extrato de levedura | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2.3-CTD | 3,4-PCD | 1,2-CTD | 2.3-CTD | 3,4-PCD | 1,2-CTD |
| Ac. Benzóico | - | - | - | + | - | - |
| dP 3 | - | - | - | + | + | + |
| Fenol 3 | - | - | - | - | - | + |
| Paba 2 | - | - | - | ++ | - | + |
| Df 1 | - | - | - | - | ++ | |
| Df 2 | - | - | - | ++ | - | + |
| Paba 1 | - | - | - | - | - | - |

**Tabela 17.** Atividade enzimática obtida quando em presença de ácido benzóico.

| | Atividade enzimática produzida por indução com ácido benzóico | | | Atividade enzimática produzida por indução com ácido benzóico + extrato de levedura | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2.3-CTD | 3,4-PCD | 1,2-CTD | 2.3-CTD | 3,4-PCD | 1,2-CTD |
| Ac. Benzóico | - | - | - | - | - | - |
| dP 3 | - | - | - | - | ++ | - |
| Fenol 3 | - | - | - | - | - | - |
| Paba 2 | ++ | + | - | - | - | - |
| Df 1 | - | - | - | - | - | ++ |
| Df 2 | - | - | - | ++ | - | |
| Paba 1 | - | - | - | - | - | - |

Tabela 18. Atividade enzimática obtida quando em presença de Paba.

| | Atividade enzimática produzida por indução com Paba | | | Atividade enzimática produzida por indução com Paba + extrato de levedura | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2.3-CTD | 3,4-PCD | 1,2-CTD | 2.3-CTD | 3,4-PCD | 1,2-CTD |
| Ac. Benzóico | - | - | - | - | ++ | - |
| dP 3 | - | - | - | - | ++ | - |
| Fenol 3 | - | - | - | - | - | - |
| Paba 2 | - | - | - | - | ++ | - |
| Df 1 | - | - | - | - | - | - |
| Df 2 | + | - | ++ | ++ | - | ++ |
| Paba 1 | - | - | - | - | - | - |

Quando as bactérias estudadas foram crescidas em Fenol, o extrato celular não apresentou atividade nos três grupos enzimáticos estudados, sendo que a maior taxa obtida foi na produção de 1,2 CTD seguida por 2,3 CTD quando adicionado extrato de levedura. Em estudos realizados com *Halomonas organivorans*, Garcia *et al*.,(2005), demonstraram que, quando crescida em fenol ,esta espécie apresenta maior atividade da enzima catecol 1,2-dioxigenase e apenas uma pequena produção da enzima protocatecol 3,4 dioxigenase. Esses resultados sugerem que o catecol é o possível intermediário metabólico na degradação deste composto. Ainda com relação à produção enzimática induzida pela presença de extrato de levedura e fenol, observou-se uma variação de acordo com a linhagem estudada. Este fato pode estar relacionado com os fatores abióticos em que as bactérias foram submetidas, tais como: temperatura, umidade, intensidade luminosa e também fator bióticos: distribuição dos micro-organismos, adaptação microbiana aos compostos e biodisponibilidade (Robert, 1992; Edward, 1993; Stapleton *et al* ., 1998).

Não há um consenso a respeito de qual rota catabólica é empregada para a degradação do ácido benzóico. Por um lado, Garcia e colaboradores (2005) e Jiménez (2002), defendem a hipótese que o ácido benzóico quando degradado pelo gênero *Halomonas* segue pela via catecol até chegar ao β-cetoadipato. Por outro lado, Buchan *et al*.,(2003) afirmam que o gênero *Roseobacter* utiliza a via do protocatecol para a degradação do mesmo composto. Há que se destacar que ambas as

bactérias mencionadas são halofílicas e possuem uma alta similaridade em seus genomas. Neste estudo encontramos atividades enzimáticas distintas de acordo com o gênero em questão. A linhagem DP3 representante do gênero *Halomonas* apresentou atividade da enzima protocatecol 3,4 dioxigenase, enquanto que a df1 membro do gênero *Marinobacter* utilizou a via catabólica do catecol.

Com respeito à via catabólica utilizada na degradação do ácido p-hidroxibenzóico, há um consenso no que tange a utilização da rota do protocatecol. Em nosso estudo a maioria das linhagens utilizaram essa via com exceção da df2 que produziu catecol 2,3 dioxigenase e catecol 1,2 dioxigenase.

Como mencionado por Garcia et al., (2005), a técnica utilizada para medir a atividade enzimática pode gerar erros em consequência da variação de parâmetros importantes, tais como: concentração do substrato, tampões e valores de pH ou ainda temperatura e concentração do extrato celular. Não obstante, o metabolismo microbiano apresenta inúmeras variantes que podem dificultar o entendimento do catabolismo de compostos aromáticos. Pode ser mencionado, primeiramente, o fato de o processo de degradação dos compostos aromáticos operarem em dois estágios, sendo que no primeiro ocorre oxidação inicial do anel benzênico, enquanto no segundo ocorre uma rearomatização para a formação de um derivado hidroxilado (Patel & Gilson, 1974). Nesta rearomatização, pode haver a formação de outros compostos metabólicos intermediários que não sejam o catecol ou protocatecol. Portanto, a ausência de uma dessas enzimas não significa necessariamente que os compostos não serão degradados, mas sim que outras enzimas podem estar participando do processo degradativo (Trenz *et al*.,1994), visto que quando as amostras foram analisadas por cromatografia liquida de alta eficiência, observamos a degradação dos compostos. Um segundo fator limitante nesse estudo é o tempo que as amostras foram coletadas, pois ao entrar em contato com os compostos indutores, os micro-organismos podem produzir enzimas necessárias para torná-lo acessível e, a partir desse momento, deixar de produzir-las. (Neilson, 1995).

## IV.5. BIORREMEDIAÇÃO DA ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO

A biorremediação é uma tecnologia que utiliza o potencial metabólico dos micro-organismos para limpar ambientes contaminados (Head, 1998; Watanabe, 2001). Desta forma, para a obtenção de bons resultados na biorremediação, é necessário o conhecimento do potencial de degradação dos poluentes presentes neste meio ou daqueles que se pretende utilizar neste processo. Estudos com esses microrganismos são tradicionalmente iniciados pelo isolamento, com subsequente caracterização fisiológica e uma posterior análise molecular (Watanabe *et al*., 2002). Todas essas análises são necessárias para conhecer a microbiota e assim conhecer sua necessidade. No presente estudo, todas as etapas posteriormente mencionadas foram realizadas e esses

conhecimentos aplicados para a realização da biorremediação. Existem dois processos utilizados na biorremediação, como já mencionado:

- ✓ **Bioaumentação:** técnica na qual micro-organismos degradadores são adicionados para suplementar a população microbiana já presente no meio ambiente que se pretende descontaminar.

- ✓ **Bioestimulação:** técnica na qual bactérias indígenas são estimuladas por adição de nutrientes ou outros substratos cuja ausência pode estar limitando o crescimento destes micro-organismos.

Ambas as técnicas foram estudadas na tentativa de biorremediar a água de produção de petróleo.

### IV.5.1. Utilização dos isolados na bioaumentação da água de produção

Apesar dos micro-organismos estarem abundantemente presentes na natureza, a bioaumentação é considerada uma estratégia para a biorremediação desde 1970. A adição racional de micro-organismos degradadores pode ajudar a microbiota indígena quando esta não é capaz de degradar a alta concentração de substrato (Leahy & Colwell, 1990). Outra condição que a bioaumentação pode ser considerada é quando a população indígena de degradadores apresenta-se baixa, o novo inóculo pode reduzir o tempo para iniciar o processo de degradação (Forsyth *et al*., 1995).

Para verificarmos a influencia das bactérias halofílicas moderadas na degradação de compostos presentes na água de produção de petróleo. As linhagens selecionadas,df2, Fenol3, ácido benzóico, df1, DP3 e Paba 1, inoculas separadamente e todas juntas.

Das linhagens isoladas da água de produção e subsequentemente re-inoculadas, a linhagem Paba 1 foi a que apresentou maior crescimento, seguida pela linhagem Fenol 3. Quando todas as linhagens foram juntamente inoculadas, a taxa de crescimento superou a densidade óptica de 0,2 nm (a 600nm) em dois dias de experimento. Esses dados estão apresentados na Figura 32.

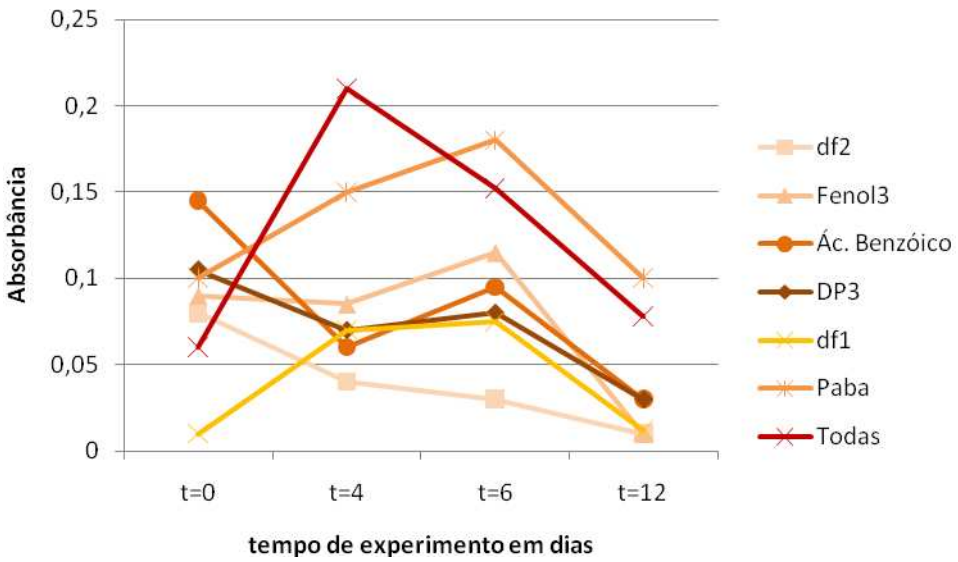



**Figura 32.** Verificação do crescimento das linhagens isoladas e selecionadas da água de produção de petróleo após terem sido submetidas a um re-inóculo.

### IV.5.1.1. Avaliação da bioaumentação da água de produção de petróleo através da DQO (Demanda Química de Oxigênio)

A DQO é, por definição, a quantificação de oxigênio necessário para a oxidação da matéria orgânica da amostra através da utilização do dicromato de potássio em meio ácido na presença de catalisador (Villen, 2001). Para a determinação da DQO, a técnica de micro-digestão vem sendo utilizada, esta técnica foi descrita por (Jirka & Carter, 1975). Para complementar este método, é realizada uma medida espectrométrica automatizada da liberação de cromo +3 após a digestão da amostra. Para medir o valor da DQO em uma faixa de 3-900mg/$L^{-1}$ a sensibilidade adequada é possível de ser obtida a um comprimento de onda de 600 nm, por meio do uso de uma célula de 50mm.

A partir dos resultados obtidos de DQO do efluente bruto (DQO inicial) e dos tratados com as diferentes linhagens de bactérias, foram calculadas as porcentagem de redução da DQO (Tabela 19). Todas as linhagens reduziram a DQO e, a mínima redução obtida foi de 14,21%, resultado apresentado pela linhagem fenol3. A maior taxa de redução observada corresponde ao inóculo da linhagem dF1, que utilizou 47,98% da matéria orgânica presente na água de produção de petróleo.

É interessante ressaltar que, atualmente, a indústria petroquímica adiciona peróxido de hidrogênio para a redução da carga orgânica deste efluente e é sabido que a redução através desse método é de 25,7%. Neste trabalho obteve-se uma redução duas vezes maior quando utilizamos a

bioaumentação na água de produção de petróleo. E por isso que, recentemente, foi testemunhado o crescimento da aplicação de bactérias para a degradação de dejetos de indústrias petroquímicas. Comparada com a estabilidade física e métodos químicos, a bioaumentação é uma técnica interessante em termos da alta eficiência, por ser ambientalmente segura e de baixo custo (Kästner & Marho, 1996; Swannell & Head, 1994).

**Tabela 19.** Taxa de redução de DQO das linhagens estudadas.

| Linhagens | DQO final | Redução |
|---|---|---|
| **Fenol3** | 3686,4 | 14,21% |
| **Ác. Benzóico** | 3482,9 | 18,96% |
| **DP3** | 2883,5 | 32,90% |
| **Df1** | 2239,0 | 47,98% |
| **Paba 1** | 3587,3 | 16,70% |
| **Todas** | 3188,9 | 25,23% |

Apesar de todas as linhagens inoculadas juntas na água de produção de petróleo terem apresentado as maiores taxas de crescimento, a redução da DQO não foi expressiva. Esse fato pode estar aliado à condição de seleção presente dentro de um determinado ambiente. As linhagens, quando inseridas dentro de ambiente com uma biota já definida, precisam de tempo para se adaptarem e também para se manterem vivas. Muitas vezes antes que isso ocorra, elas já não resistem e morrem.

Não há um consenso com relação à eficiência da bioaumentação como ferramenta para limpeza de ambientes contaminados. Inúmeros autores afirmam que, apesar da melhora na biodegradação de petróleo com a adição de micro-organismos em testes de laboratório, sua efetividade não foi demonstrada de maneira eficiente em campo. Em realidade, muitos estudos de campo indicaram que a bioaumentação não é eficaz na maioria dos processos de biodegradação de petróleo em costas marítimas, e a adição de nutrientes ou a bioestimulação da microbiota levou a efeitos melhores sobre a biodegradação de petróleo (Jobson*et al*., 1974; Lee & Levy, 1985; Lee *et al.,* 1997b; Venosa *et al.,* 1996). O fracasso da bioaumentação pode ser atribuído à competição que ocorre no ambiente entre as bactérias a serem inoculadas e as endógenas (Tagger et al., 1983; Lee

& Levy, 1989; Venosa et al., 1992). Portanto, é pouco provável que as bacterias recém inoculadas consigam persistir, mesmo quando em grandes quantidades. Por outro lado, Liu et al., 2011, reportaram a aplicação de um consórcio microbiano de *Enterobacter cloacae* e *Cunninghamella achinulata* na remediação de solos salinos contaminados por petróleo. Eles confirmaram em laboratório e no campo que quando adicionado o consórcio juntamente com palha de milho a degradação foi ainda maior pelos dois consórcios empregados (Zhang, et al., 2008). Neste trabalho, houve uma redução da carga orgânica demonstrando que a técnica ao menos quando aplicada *in sito* foi efetiva.

## IV.5.2. Teste de compostos para bioestimular a população natural a degradar os compostos presentes na água de produção

Inúmeros tratamentos foram utilizados visando à obtenção das melhores condições de crescimento e degradação dos compostos presentes na água de produção de petróleo. A Tabela 20 mostra quais foram esses tratamentos e ainda quando houve ou não estimulação da microbiota presente na amostra em estudo.

**Tabela 20.** Tratamentos realizados na água de produção de petróleo com o objetivo de biestimular a microbiota indígena.

| Tratamentos | Crescimento |
|---|---|
| Solução de vitaminas | - |
| Solução mineral | - |
| Solução de fosfato | - |
| Solução de nitrato de potássio | - |
| Solução de cloreto de amônio | + |
| Triptona | + |
| Extrato de levedura | - |
| Ácido D-glucorônico | - |
| D-lactose | - |
| Alanina | - |
| L-histidina | - |
| Solução de vitaminas + Ácido D- glucurônico | - |
| Solução de vitaminas + D- lactose | - |

| Tratamentos | Crescimento |
|---|---|
| Solução de vitaminas + Alanina | - |
| Solução de vitaminas + L-histidina | - |
| Solução mineral + Ácido D- glucurônico | + |
| Solução mineral + D-lactose | + |
| Solução mineral +Alanina | + |
| Solução mineral +L-histidina | + |
| Solução de fosfato + Ácido D-glucurônico | + |
| Solução de fosfato + D- lactose | - |
| Solução de fosfato + Alanina | + |
| Solução de fosfato + L-histidina | + |
| Solução de nitrato de potássio + Ácido D-glucorônico | - |
| Solução de nitrato de potássio + D- lactose | - |
| Solução de nitrato de potássio + Alanina | - |
| Solução de nitrato de potássio + L-histidina | + |
| Solução de cloreto de amônio + Ácido D- glucurônico | + |
| Solução de cloreto de amônio + D-lactose | - |
| Solução de cloreto de amônio + Alanina | + |
| Solução de cloreto de amônio + L-histidina | + |
| Triptona + Ácido D- glucurônico | + |
| Triptona + D-lactose | + |
| Triptona + Alanina | + |
| Triptona + L- histidina | + |
| Extrato de levedura + D-lactose | - |

Frente aos resultados obtidos, pode-se observar que há na microbiota presente na água de produção de petróleo uma maior necessidade de compostos que sejam fonte de nitrogênio, já que compostos como triptona, solução de cloreto de amônio, solução de nitrato e ainda solução mineral, foram os compostos que estimularam  microbiota. Dentre os compostos adicionados à água de produção, a L-histidina apresentou bons resultados, pois a microbiota foi estimulada na presença dela e de qualquer uma das outras soluções utilizadas. Um fato a ser ressaltado é que, ao

adicionarmos uma fonte de carbono de fácil acesso, como é o caso do extrato de levedura, a microbiota poderia ter sido estimulada, já que na água de produção somente encontramos compostos recalcitrantes. No entanto, não foi o que ocorreu: o extrato de levedura não fez com que aumentasse o crescimento da microbiota presente. Esse fato pode estar ligado a adaptação dos micro-organismos presentes nesse efluente a degradação e consumo dos compostos presentes nesta, sendo assim a biorremediação foi mais efetiva quando foram administrados compostos que poderiam auxiliá-los no metabolismo.

Na Tabela a seguir, encontram-se os valores de DQO finais obtidas após 4 e 12 dias de tratamento, com os compostos acima mencionados. As maiores porcentagens de remoção de DQO ocorreram no tempo de 12 dias incubação. Quando se trata de DQO, deve-se levar em consideração que com o passar do tempo os micro-organismos entraram em processo de respiração endógena e autólise, liberando material intracelular e aumentando a concentração de material solúvel na água. Vale ainda mencionar que pelo experimento ter sido mantido sob agitação e a 37 °C, a evaporação também contribuiu para que houvesse uma concentração dos compostos presentes, aumentando os valores finais obtidos.

Os resultados obtidos com o experimento de bioestimulação foram muito importantes para a determinação das necessidades da microbiota presente na água de produção. Esse estudo deve ser continuado para que assim, seja possível aplicar o que foi verificado em uma escala maior para a biorremediação de efluentes salinos como a água de produção.

**Tabela 21.** Tratamentos aos quais a água de produção de petróleo foi submetida e suas respectivas reduções de DQO.

| | 4 dias | | 12 dias | |
|---|---|---|---|---|
| | Valor | % de redução | Valor | % de redução |
| **Solução mineral** | **3301,9** | 27% | **3143,6** | 23% |
| **Solução de fosfato** | **00** | 00 | **3324,6** | 46% |
| **Solução de cloreto de amônio** | **00** | 00 | **00** | 00 |
| **Triptona** | **3516,8** | 44% | **2419,9** | 18% |
| **Solução mineral + D- lactose** | **00** | 00 | **4613,7** | 69% |
| **Solução mineral + Alanina** | **1153,4** | 22% | **3369,8** | 73% |

| | 4 dias | | 12 dias | |
|---|---|---|---|---|
| | Valor | % de redução | Valor | % de redução |
| **Solução mineral + L- histidina** | **00** | 00 | **00** | 00 |
| **Solução de Fosfato + ácido D- glucurônico** | **1390,9** | 42% | **2487,8** | 68% |
| **Solução de Fosfato + Alanina** | **983,8** | 14% | **3675,1** | **77%** |
| **Solução de Fosfato + L- histidina** | **00** | 00 | **00** | 00 |
| **Solução de Nitrato de Potássio+ L- histidina** | **1142,1** | 40% | **2589,5** | 73% |
| **Solução de cloreto de amônio+ ácido D-glucurônico** | **00** | 00 | **4455,4** | 50% |
| **Solução de cloreto de amônio + Alanina** | **00** | 00 | **00** | 00 |
| **Solução de cloreto de amônio + L- histidina** | **00** | 00 | **5201,7** | 31% |
| **Triptona + ácido D- glucurônico** | **00** | 00 | **00** | 00 |
| **Triptona + D- lactose** | **2035,4** | 35% | **2804,4** | 53% |
| **Triptona + Alanina** | **1730,1** | 12% | **3776,9** | 60% |
| **Triptona + L- histidina** | **2193,8** | 00 | **4907,7** | 49% |
| **Extrato de levedura + L-histidina** | **2612,1** | 00 | **00** | 00 |
| **Solução Mineral + ácido D-glucorônico** | **3279,3** | 15% | **3641,2** | 24% |

Como pode ser verificado na Tabela 21 a solução de fosfato + Alanina reduziu em 77% a carga orgânica presente na água de produção de petróleo, mostrando ser extremamente eficiente para a bioestimulaçao desse dejeto, tendo ainda outros tratamentos bastante efetivos para serem aplicados.

Comparando-se o maior valor da redução de DQO obtido, verifica-se que, com a utilização das linhagens, obtiveram resultados inferiores do que com a estimulação da microbiota

natural. A melhor taxa de remoção encontrada quando a água de produção foi inoculada com linhagens foi a alcançada pela df1 com 47, 98% de redução da carga orgânica, já os tratamentos de bioestimulação da degradação conseguiram obter reduções acima de 50%, o que vem a mostrar que, para esse tipo de efluente, é mais viável a utilização da bioestimulação.

## IV.6. CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS E ARQUÉIAS PRESENTES NA ÁGUA DE PRODUÇÃO DE PETRÓLEO

O petróleo é formado por uma mistura de compostos de difícil acesso aos micro-organismos, principalmente por esses serem capazes de metabolizarem uma limitada variedade de hidrocarbonetos individualmente. Para que a biorremediação de uma área contaminada com petróleo seja possível é necessária a presença de um grupo de micro-organismos ou consórcio funcional que seja capaz de degradar esses compostos. No entanto, quando se trata de uma contaminação de ambientes marinhos, um número limitado de bactérias é capaz de sobreviver e de catabolizar os compostos poluentes. Assim sendo, a grande maioria de bactérias encontradas nesses ambientes possui características halofílicas. Segundo Rozsak & Colwell (1987) e Amann *et al* (1995), a grande maioria dos micro-organismos encontrados nesses ambientes não é cultivável. Dessa forma, o uso de técnicas moleculares possibilita obter um maior conhecimento das comunidades microbianas em ambientes onde técnicas de microbiologia tradicionais de isolamento não revelariam a real diversidade do ambiente em estudo.

Nos estudo, tendo parte este trabalho e visando o conhecimento da diversidade presente na água de produção de petróleo, foram obtidos 396 clones para a biblioteca *do gene RNA ribossomal 16S* de arquéias e 96 para biblioteca de bactérias. Todos esses clones foram estocados a -80$^{o}$C e sequenciados, sendo posteriormente analisados. Os índices de cobertura e riqueza foram calculados, individualmente, para cada biblioteca genômica, utilizando o programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005). Este programa agrupa as sequências em unidades taxonômicas operacionias (UTOs) com base na distância evolutiva entre elas. Inicialmente, foi construída uma matriz de distância a partir do alinhamento obtido pelo programa ClustalX, usando o programa DNAdist (Falsenstein, 1989). Em seguida, esta matriz foi utilizada como entrada de dados para o programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005). O programa permitiu a construção de curvas de rarefação, bem como o cálculo do índice de diversidade de Shannon-Weaver e dos estimadores de riqueza não paramétricos ACE (abundance-based coverage estimator) (Chao et al., 1983) e Chao 1 (Chao et al., 1984) com nível de distância de 0,03 entre as sequências de RNAr 16S para cada biblioteca.

As unidades taxonômicas operacionais de cada biblioteca identificadas pelo programa DOTUR foram utilizadas para o cálculo do índice de diversidade Shanon e dos estimadores de riqueza Chao 1 e Ace. As curvas de rarefação foram obtidas para os diferentes níveis de distâncias taxonômicas (D) entre as sequências, sendo o valor 0,2 correspondente à distância filogenética

observada em nível de ordem, 0,05 em nível de gênero e 0,03 em nível de espécie. Foram identificadas 21 UTOs (16 singletons e 2 doubletons) e 15 UTOs (11 singletons) nas bibliotecas genômicas de bactérias e arquéias, respectivamente. O desenho das curvas de rarefação é uma forma de saber se a amostragem foi suficiente para revelar a diversidade total de uma comunidade (ROESCH, et al. 2007). Neste trabalho foram construídas curvas de rarefação representadas por 97% (espécie), 95% (gênero) e 90% (família) como critério de agrupamento (Figuras 33 e 34). Na distância considerada de 0,03 (nível de espécie), em ambas as bibliotecas, as curvas de rarefação não alcançaram um platô. Isto significa que o número de clones amostrado não foi suficiente para cobrir a diversidade de espécies da amostra de água de produção. Assim, se uma maior quantidade de clones fosse sequenciada, novas UTOs ainda seriam encontradas.

O índice de Shannon-Weaver é um índice geral de diversidade sensível à riqueza e à abundância relativa de espécies (Atlas & Bartha, 1998). Segundo Mugurran (2004), o valor do índice de Shannon, geralmente, está entre 1,5 e 3,5. Na biblioteca de arquéia o valor foi de 2,2528 e de bactéria 1,6285 (Tabela 17).

Os estimadores de riqueza não paramétricos, ACE e Chao 1 foram descritos para estimar a riqueza total de UTOs ou filotipos (sequências distintas) nas bibliotecas. Os valores encontrados para estes índices encontram-se na Tabela 22. Em ambas as bibliotecas os número estimado de filotipos em nível de espécie é bem maior do que os números observados (21 UTOs na biblioteca bactéria e 15 UTOs na biblioteca de arqueia (Tabela 22).

**Tabela 22.** Índice de diversidade e dos estimadores de riqueza das bibliotecas de bactéria e arquéias da amostra de água de produção de petróleo. A classificação das sequências foi baseada no valor de *cutoff* de 0,03 determinado pelo programa DOTUR.

| Bibliotecas | Nº de clones | Nº de UTOs | Shannon-Weaver | Índice de Ace | Índice de Chao |
|---|---|---|---|---|---|
| Bactérias | 56 | 21 | 2,2528 | 95,546 | 61 |
| Arquéias | 80 | 15 | 1,6285 | 73,345 | 70 |

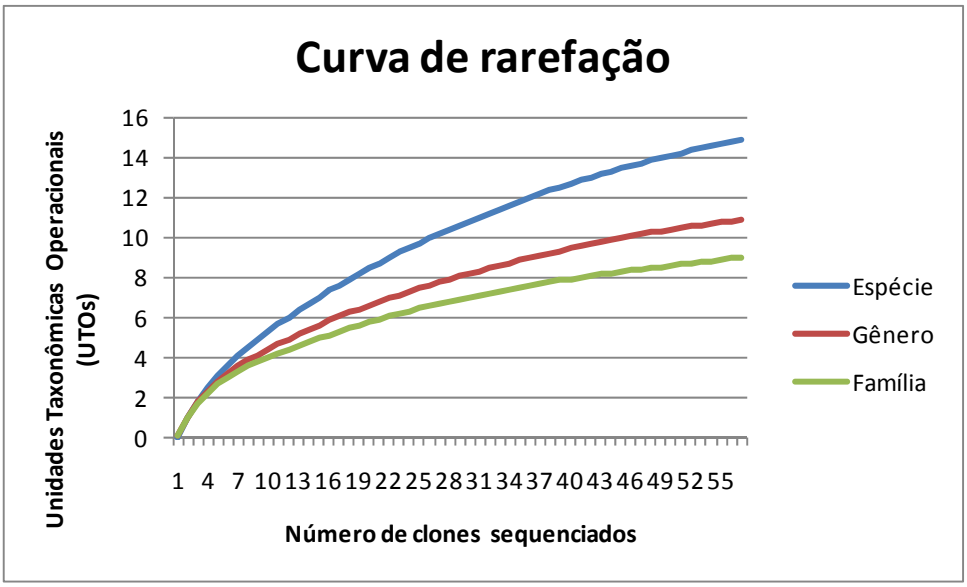



**Figura 33.** Curvas de rarefação calculadas pelo programa DOTUR usando 97%, 95% e 90% de similaridade para o agrupamento das sequências 16S rDNA da biblioteca de bactéria.

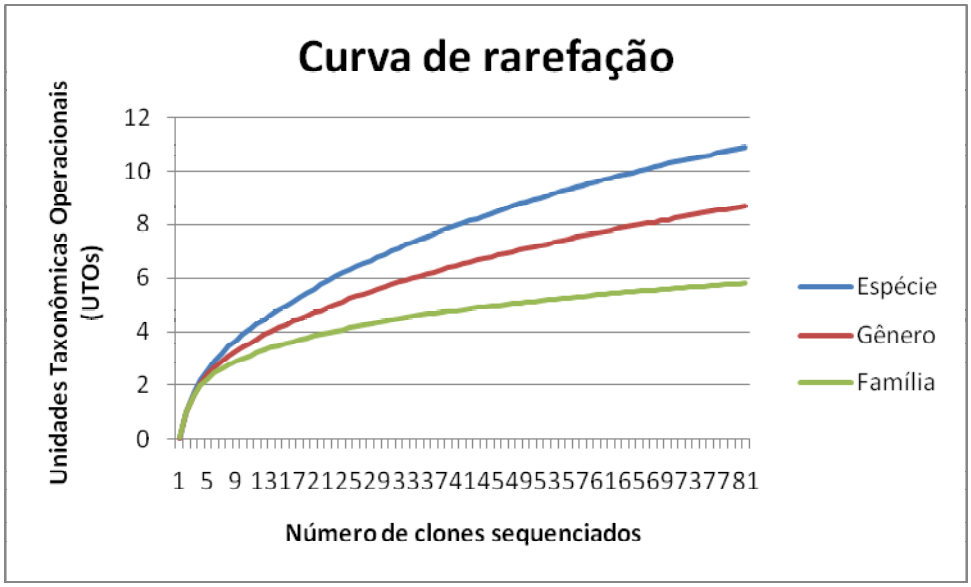
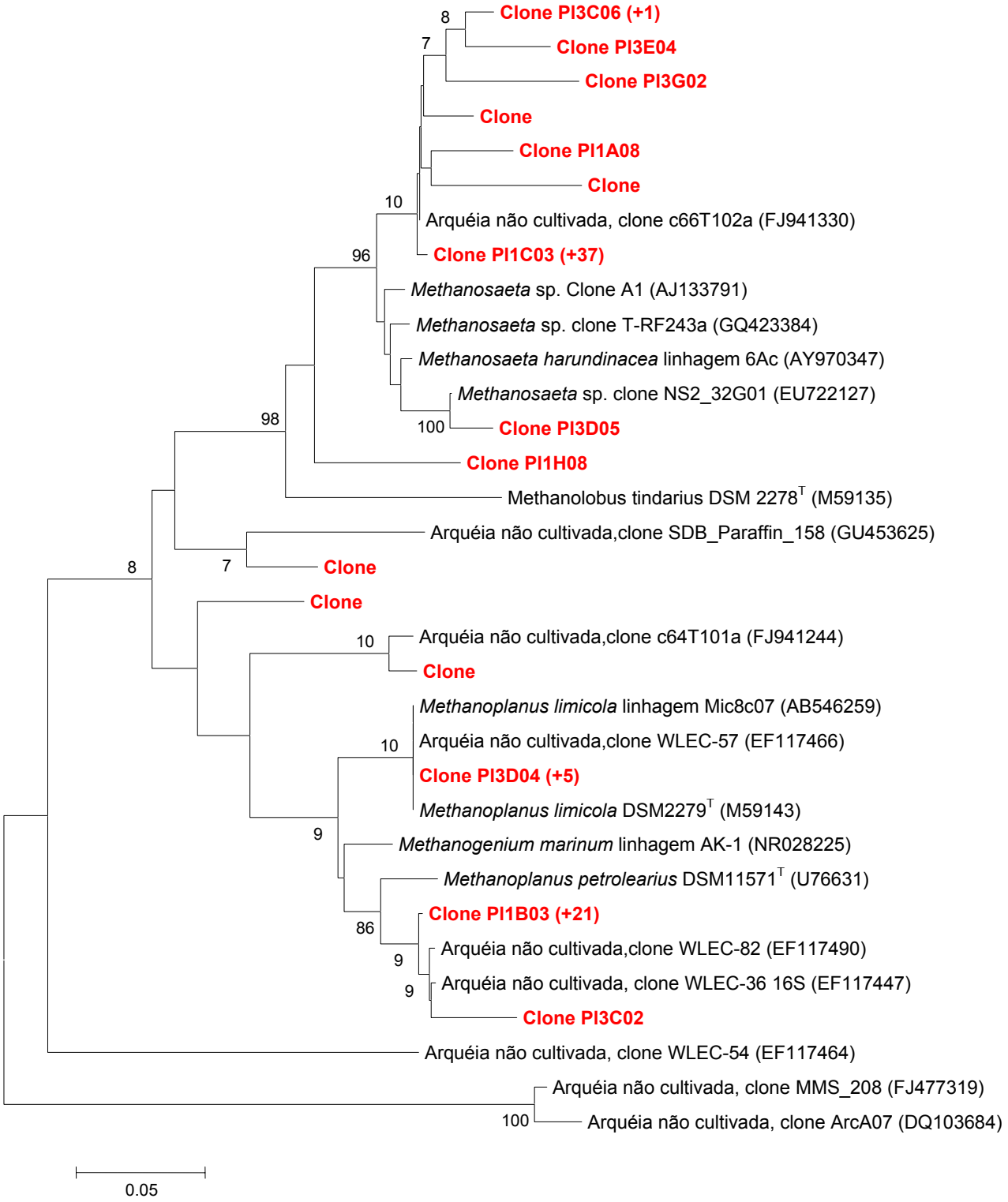



**Figura 34.** Curvas de rarefação calculadas pelo programa DOTUR usando 97%, 95% e 90% de similaridade para o agrupamento das sequências 16S rDNA da biblioteca de arquéia.

No que tange a diversidade de arquéias, as análises acima mencionadas revelaram a presença de micro-organismos pertencentes à ordem *Methanomicrobia*, com destaque para os gêneros: *Methanosaeta, Methanoplanus, Methanolobus e Methanogenium* (Figuras 35 e 36).

A maioria das seqüências de metanogênicas obtida da água de produção de petróleo corresponde a espécie *Methanosaeta harundinacea*, com uma variância de identidade (93% - 100%) e um clone apresentou uma baixa similaridade (90%). A espécie identificada neste estudo possui uma alta similaridade com a *Methanosaeta harundinacea*, recentemente identificada em um reator UASB na China. Esta espécie possui como característica, que a distingue dos outros membros do gênero, o exclusivo uso de acetato para a produção de metano (Ma *et al*., 2006). Em adição, essa espécie é favorecida em ambientes com baixa concentração de acetato (Huser *et al*., 1982). Somente duas espécies estão bem descritas no gênero *Methanosaeta, Methanosaeta concilli* ( Patel & Sprott, 1990; Ma *et al.*, 2006) e *Methanosaeta thermophila* (Kamagata *et al*., 1992; Boone & Kamagata, 1998); no entanto, investigações baseadas em biologia molecular indicaram que este gênero possui uma alta distribuição (Zengler *et al*., 1999).

Figura 35. Análise filogenética baseada nas sequências do gene RNA ribossomal 16S dos clones distintos da biblioteca de arqueia e micro-organismos relacionados recuperados das bases de dados. Valores de *bootstrap* acima de 70 estão representados nos nós. Números entre parênteses indicam clones adicionais com ≥ 97% de similaridade de sequência com o clone representado na árvore.



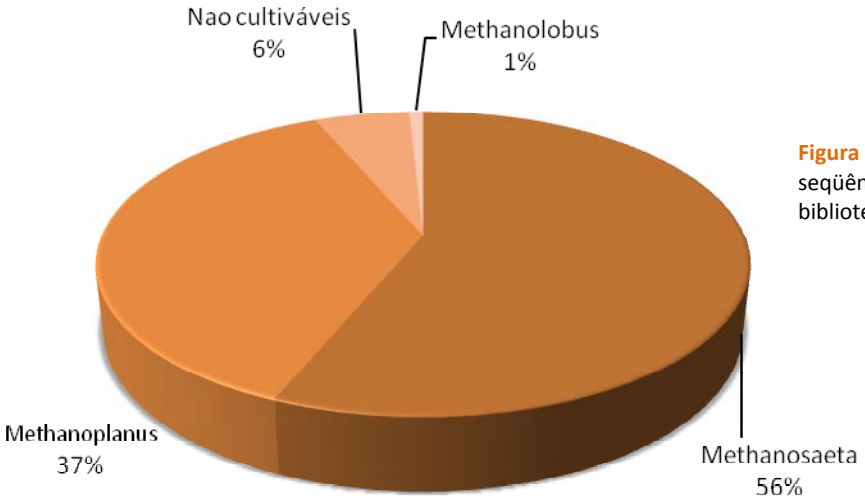



**Figura 36.** Distribuição filogenética das seqüências de 16S rRNA obtidas de uma biblioteca de clones de arqueias.

Em estudos prévios, foram demonstrados que membros do filo *Euryarchaeota* estão constantemente presentes em poços de petróleo (Zhang *et al.,* 2009; Kraan *et al* .,2010). Neste estudo, a grande maioria de aquéias encontradas (56%), são representantes deste filo, e afiliadas a ordem *Methanosarcinales*. Segundo Zhang *et al., (*2009), membros pertencentes a essa ordem utilizam metanol, metilamida e substratos relacionas com metil para a produção de metano. Estes resultados vêm a corroborar o estudo realizado por Yoshida *et al*.,(2005), onde encontraram clones relacionados aos gêneros *Methanosaeta* e *Methanoculleus* em borras de óleo bruto; enquanto que Kasai *et al.,* (2005), encontrou *Methanosaeta* a *Methanomethylovorans* pertencentes a ordem *Methanosarcinales* em solos contaminados com petróleo, mas não encontrou metanogênicas em solos não-contaminados. *Methanosaeta* a *Methanomethylovorans* foram novamente mencionadas por Watanabe et al., (2002), em águas subterrâneas contaminadas com petróleo. Muitos destes estudos detectaram *Methanosaeta acetoclástica*. A metanogênese acetoclática foi sugerida como o maior aceptor de elétrons terminal em processos associados com degradação anaeróbia de hidrocarbonetos.

O fato de distintos ambientes contaminados com petróleo apresentarem uma alta incidência de membros da ordem *Methanosarcinales* sujere que estas já estejam adaptadas a viver em ambientes com alta salinidade e catabolizarem os compostos presentes, ou ainda, segundo Yoshida *et al*., (2005), eles fazem parte da microbiota natural de reservatórios de petróleo e do óleo bruto, essa hipótese é reforçada por Li *et al*.,(2007), onde a alta presença obtida dessa ordem, em estudos realizados em poços de petróleo na China, permitiram afirmar que esses micro-organismos podem estar relacionados aos ciclos biogeoquímicos do reservatório. Obviamente esses filotipos são consistentes com as características fisicoquímicas do óleo, o que pode indicar que eles podem

ser endógenos nos poços de petróleo, contribuindo na produção de metano encontrado nesses ambientes.

O gênero *Methanoplanus,* identificado neste estudo, apresentou identidade com a espécie *Methanoplanus petrolearius* (99%- 91%), identificada pela primeira vez em um campo de extração de petróleo em Golfo de Ginea, oeste da África. Esta espécie diferentemente da *Methanosaeta harundinacea* não utiliza o acetato para a produção de metano, mas sim $H_2$ e $CO_2$. Por ser uma espécie metanogênica mesofílica, Li *et al*.,(2007), afirma que este grupo de micro-organismos não faz parte da microbiota endógena dos poços de petróleo, mas a razão principal da presença dessa espécie está no fato dos poços de petróleo operarem em um sistema aberto com uma continua operação de inundação, a constante recirculação de água não estéril injetadas nos poços de petróleo resultando na detecção de micro-organismos mesófilos na água de produção de petróleo.

A prevalência de filotipos metanogênicos na biblioteca de arquéia traz a conclusao de que micro-organismos metanogênicos termófilos podem constituir o grupo dominante nos reservatórios de petróleo.

A análise filogenética revelou que a comunidade bacteriana presente na água de produção de petróleo inclui uma notável predominância de clones afiliados a *Proteobacteria*, sendo o gênero *Marinobacter* o que apresentou maior destaque. Foram encontrados ainda clones membros do filo *Firmicutes.* Bactérias não-cultiváveis e *Thermotogae* também foram encontrados, no entanto apresentaram poucos representantes (Figura 37).

*Gamaproteobacteria* foram predominantemente encontrados na biblioteca de bactérias, sendo que clones dos gêneros *Marinobacter* e *Halomona,s* maioritariamente identificados (Figura 38 e 39). Membros desses gêneros são conhecidamente degradadores de hidrocarbonetos em inúmeros ambientes salinos, desde sedimentos marinhos, sólidos salinos e águas contaminadas com óleo (Liu *et al*., 2005)

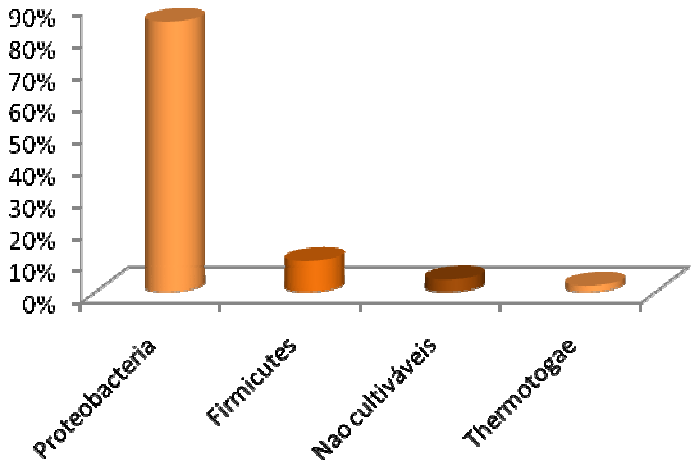



**Figura 37.** Distribuição de clones de bactérias em grupos filogenéticos.

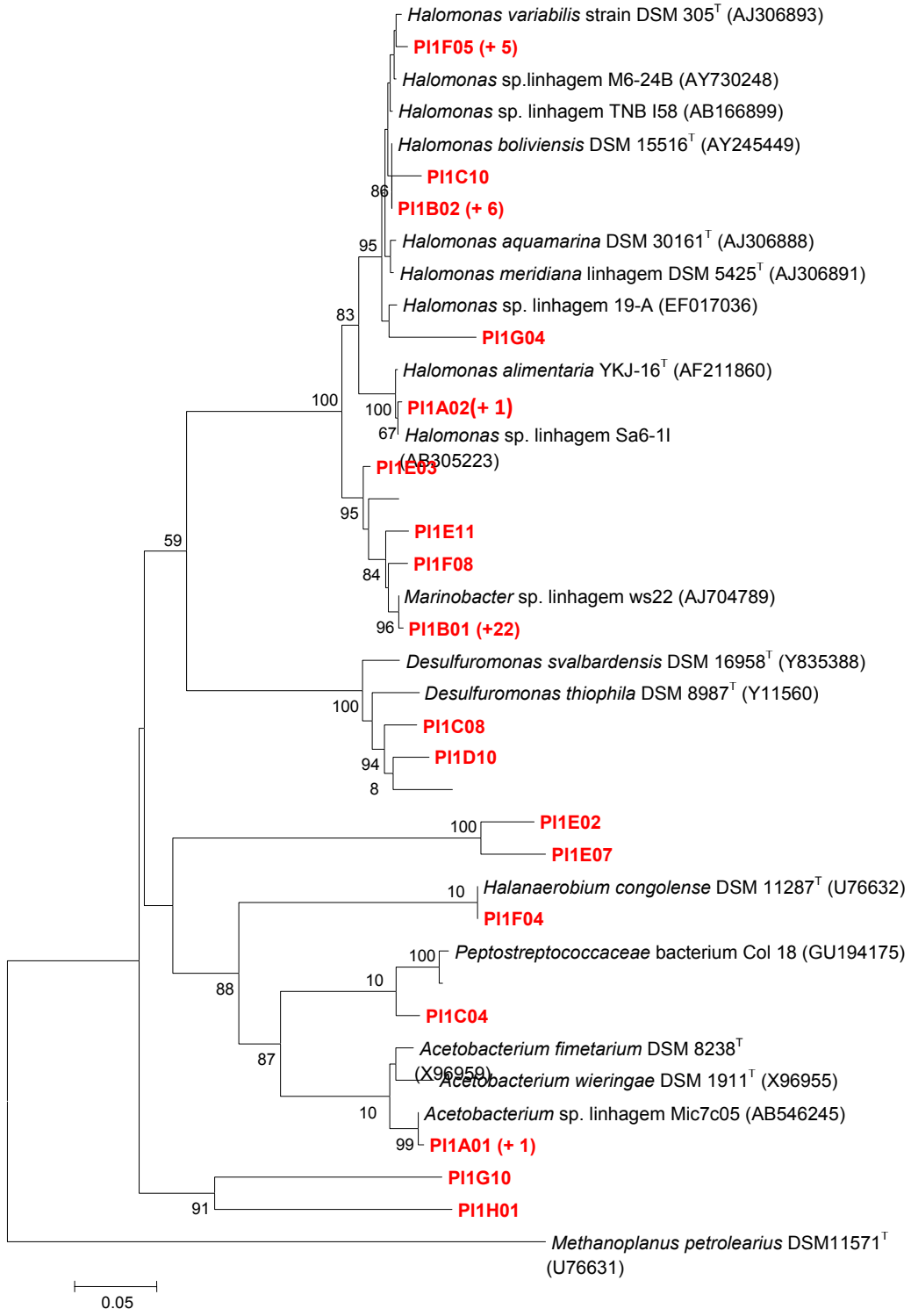



Figura 38. Análise filogenética baseada nas sequências do gene RNA ribossomal 16S dos clones distintos da biblioteca de bactéria e micro-organismos relacionados recuperados das bases de dados. Valores de *bootstrap* acima de 70 estão representados nos nós. Números entre parênteses indicam clones adicionais com ≥ 97% de similaridade de sequência com o clone representado na árvore. *Methanoplanus petrolearius* DSM11571$^T$ foi utilizada como outgroup.

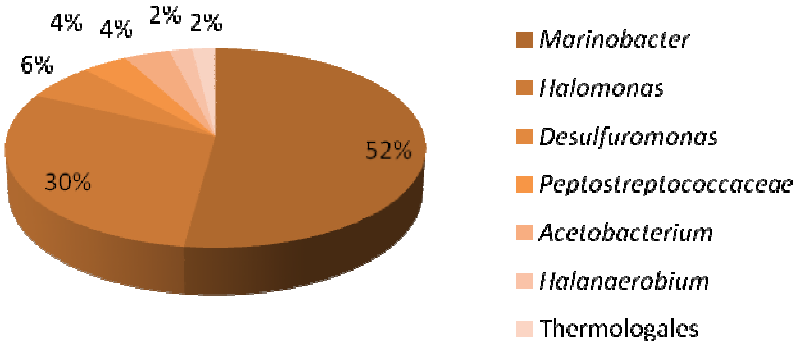



**Figura 39.** Distribuição filogenética das seqüências de 16S rRNA obtidas de uma biblioteca de clones de bactérias.

Poucos estudos foram anteriormente realizados, utilizando injeções ou re-injeções de água em poços de petróleo (Telang *et al*., 1997; Bodtker *et al*., 2008; Schwermer *et al*., 2008; Lysnes *et al*., 2009). Interessantemente, alguns resultados são congruentes com os obtidos nesse trabalho. Estudos realizados por Bodtker *et al*., (2008), Schwermer *et al*., 2008 e Van der Kraan *et al* ., 2010, como neste presente estudo, sugerem que *Marinobacter* é o micro-organismo predominante nos sistemas de injeção da água de produção de petróleo. A presença de *Marinobacter* é industrialmente relevante pelo risco de corrosão proporcionado por esse gênero (Lopez *et al* .; 2006; Schwermer *et al* ., 2008), resultado da produção de limo dessa bactéria. O fato desta bactéria ser degradadora de hidrocarbonetos, compostos aromáticos policíclicos e compostos isoprenóides acíclicos, sugere que a presença desse gênero pode causar a biodegradação das superfícies de metais e também do óleo, sendo um risco nas indústrias (Gorshkova *et al*., 2003; Powell *et al*., 2004).

O gênero *Marinobacter,* predominantemente identificada neste estudo, apresentou identidade com a espécie *Marinobacter vinirfimus* (99%- 92%), identificada pela primeira vez em dejetos de descalcificação de barris de vinho. Esta espécie pode habitar ambientes salinos por apresentar a capacidade de manter o balanço osmótico e resistir a desnaturalização causada pelo sal (Liebgot *et al*., 2006).

Membros do gênero *Halomonas* são versáteis e têm a capacidade de crescerem em uma ampla concentração salina, além de possuírem características semelhantes ao gênero *Marinobacter.* Muitos dos clones obtidos neste trabalho possuem similaridade com sequências de *Halomonas* isoladas de ambientes associados com sal e óleo, como descrito por Sette et al.,(2007) que encontraram exemplares deste gênero em poços de petróleo no Brasil, assim sendo foi encontrado ainda em campos de extração de petróleo na Colômbia.

Exclusivamente, um gênero foi encontrado dentro do grupo das *Deltaproteobacteria* (Figura 39). Três clones do gênero *Desulforomonas* foram encontrados na água de produção de petróleo. Esses micro-organismos possuem como característica a redução de sulfato, crescimento em altas temperatura e salinidade elevadas. As bactérias redutoras de sulfato foram, pela primeira vez, isoladas de reservatório de petróleo e são frequentemente recuperadas de ecossistemas subterrâneos (Birkeland, 2005). A atividade de redução de sulfato é freqüentemente associada com a biocorrosão de turbinas e tubulações e é por isso que muitas indústrias precipitam os sulfatos.

O gênero *Acetobacterium* foi detectado em clones obtidos de amostras da água de produção de petróleo. Estudos prévios demonstraram que membros do filo *Firmicutes* foram encontrados em distintos ambientes contaminados (Kotsyrbenko *et al*.; 1995; de Wildeman *et al*.; 2003). Mais recentemente, Grabowski *et al*.,(2005), afirmaram ter encontrado membros do gênero *Acetobacterium* em água de produção de petróleo em reservatório com baixa temperatura, situado no Canadá.

Espécies de *Acetobacterium spp*. competem eficientemente com bactérias hidrogenotrópicas metanogênicas por $H_2$, especialmente em ambientes metanogênicos a baixas temperaturas. No entanto, por apresentarem um metabolismo versátil, são capazes de crescer em sítios com outros substratos que não sejam $H_2$.

Arquéias e ou bactérias são capazes de crescerem na água de produção de petróleo em resultado de interações químicas, físicas e fatores biológicos. No entanto, nota-se uma reduzida diversidade de ambos os domínios. Esses resultados sugerem que a pressão seletiva ocasionada pela alta salinidade e pela composição da amostra estudada possam ser fatores limitantes para constituição de uma comunidade microbiana mais complexa.

No que tange à diversidade de bactérias encontradas na água de produção, foi observada uma disparidade quando comparado à técnica independente de cultivo e à tradicional. A distribuição filogenética das sequências de 16S rRNA obtidas na biblioteca de clones de bactérias, demonstrou a presença de bactérias do gêneros *Halomonas*, *Marinobacter*, *Desulforomonas,* dentre outras (Figura 40 ). Já no método dependente de cultivo, somente bactérias dos gêneros *Halomonas* e *Bacillus* foram encontradas, como pode ser visualizado nas Figuras 40 e 41.

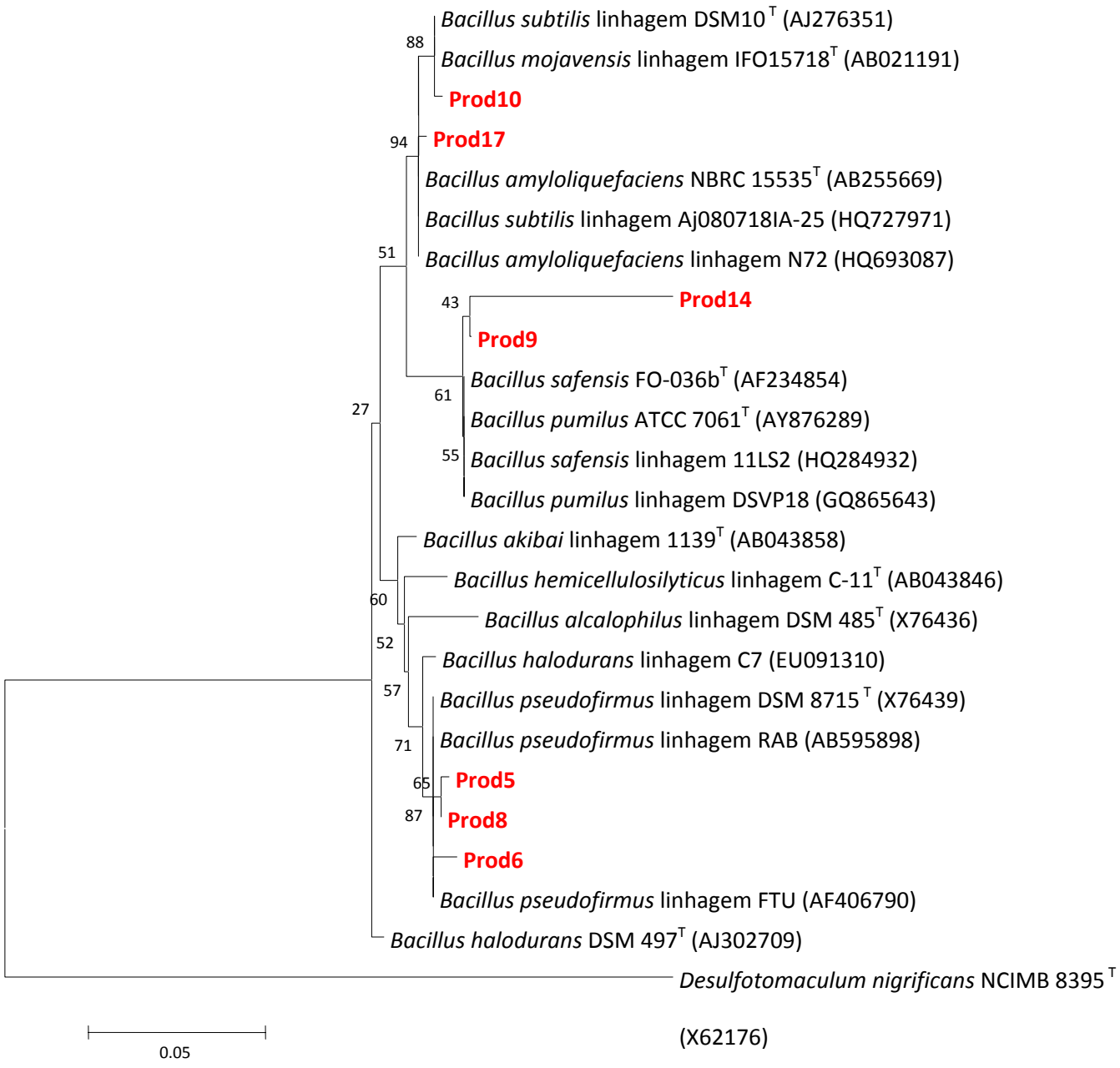



**Figura 40.** Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das linhagens de bactérias halofílicas isoladas da água de produção, representando membros do filo Firmicutes, e microrganismos relacionados recuperados dos bancos de dados GenBank e RDP. As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Desulfotomaculum nigrificans* linhagem foi usada como *outgroup.*

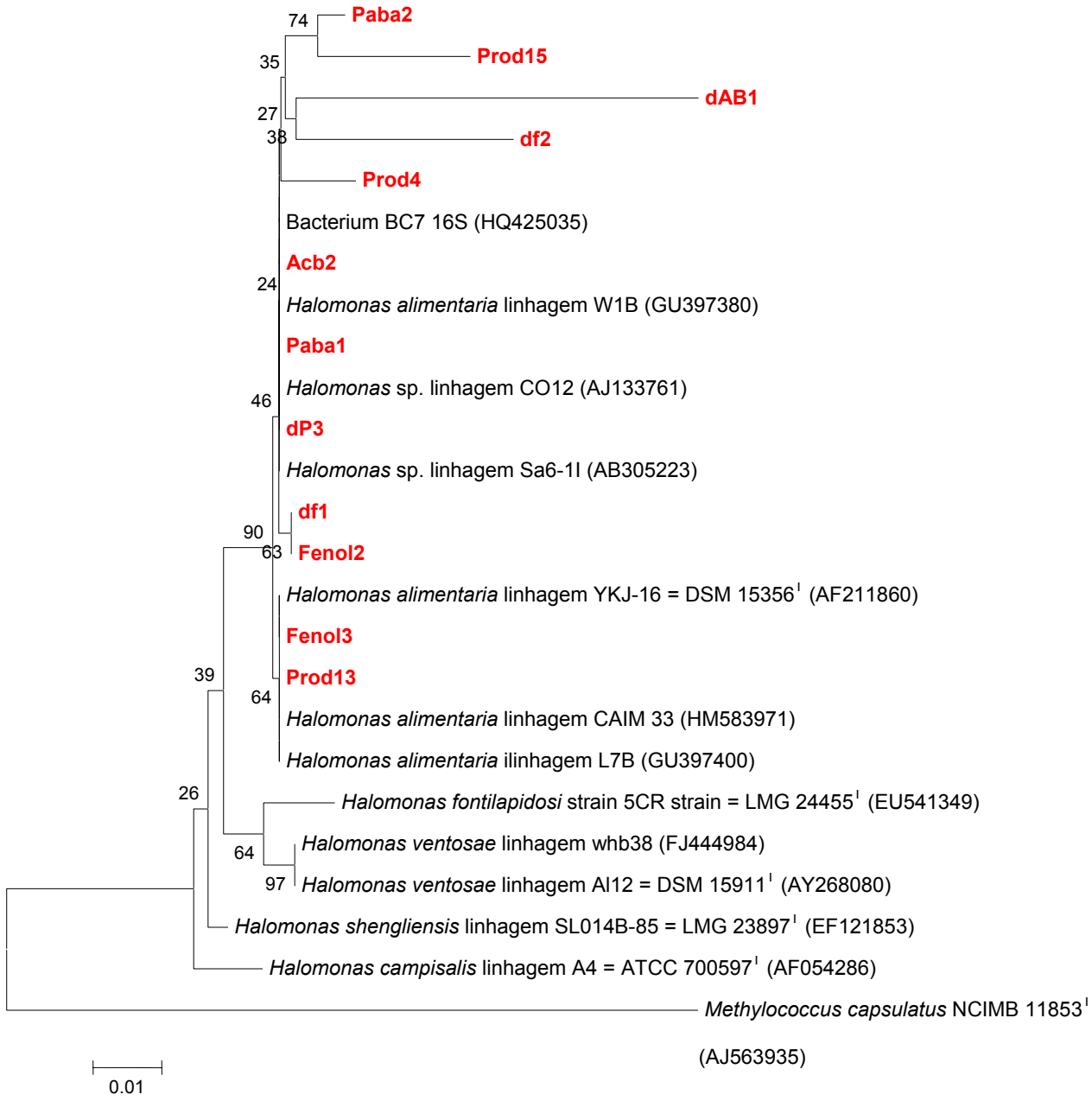



**Figura 41.** Árvore filogenética da sequência parcial do gene RNA ribossomal 16S das linhagens de bactérias halofílicas isoladas da água de produção, representando membros do filo *Gammaproteobacteria*, e microrganismos relacionados recuperados dos bancos de dados GenBank e RDP. As distâncias evolutivas foram baseadas no modelo Kimura e a construção da árvore filogenética foi obtida pelo método *Neighbor-Join* com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1000 re-amostragens. Os números de acesso GenBank estão descritos entre parênteses. A sequência do gene RNA ribossomal 16S da espécie *Methylococcus capsulatus* linhagem foi usada como *outgroup*.

Resultados parecidos foram relatados por Kaster *et al*., (2009), onde em amostras de água de produção, somente 3 dos 41 gêneros obtido foram encontrados em ambos os métodos utilizados. Os mesmos resultados já haviam sido observados por Suzuki *et al*., (1997) e Orphan *et al*., (2000). Esse fato pode estar relacionado ao método independente de cultivo poder ser afetado por possíveis contaminações inerentes ao reservatório de petróleo, abrindo assim o questionamento de que se todas as bactérias obtidas são realmente endógenas desse ambiente. Por outro lado, no método dependente de cultivo, somente uma pequena porcentagem dos micro-organismos são isolados e outros organismos oportunistas podem se aproveitar dos nutrientes presentes nos meios de cultivos enriquecidos. No entanto, os micro-organismos cultiváveis possuem uma vantagem por representarem organismos degradadores e adaptados a viverem em ambientes inóspitos.

O conhecimento da diversidade de um determinado ambiente é de grande importância na busca de ferramentas para a remediação de locais contaminados, busca de genes produtores de enzimas, antibióticos dentre outros compostos de importância. No entanto, para se obter um real entendimento dessa diversidade, inúmeras técnicas devem ser aplicadas para que uma possa suprir as limitações de outras.

# *Conclusoes*

- ✓ Sete linhagens foram obtidas pelo método de isolamento (Fenol 3, df2, df1, Paba 2, ác. Benzóico, dp3 e Paba1), sendo todas tolerantes a altas concentrações de sal. Das setes linhagens isoladas, apenas a Paba 2 apresentou produção de xilanse, pululanase e DNAse. A única enzima que o maior número de micro-organismos apresentou atividade foi a DNAse. Todas as bactérias isoladas foram caracterizadas molecularmente como pertencentes à família *Halomonadacea.*

- ✓ As sete linhagens isoladas utilizaram ácidos aromáticos como fonte de carbono. Sendo que a DP3 degradou cerca de 90% do fenol disponível; seguida pela df2, que degradou 80% desse mesmo composto. Quando a fonte de carbono disponibilizada foi o ácido benzóico, a df1 e DP3 degradaram 99% do composto disponível, 70% do ácido p-hidroxibenzóico foi degradado em 12 dias de experimento pela linhagem df2;

- ✓ Quando as bactérias foram submetidas ao crescimento em fenol, o extrato celular apresentou atividade nos três grupos enzimáticos estudados, sendo que a maior taxa obtida na produção de 1,2 CTD;

- ✓ Com relação à produção enzimática estimulada pelo ácido benzóico, variou de acordo com o gênero em questão, sendo que a linhagem DP3, representante do gênero *Halomonas,* apresentou atividade da enzima protocatecol; por outro lado, a df2 membro do gênero *Bacteruim* utilizou a via catabolica do catecol.

- ✓ Quando o composto em questão foi o ácido p-hidroxibenzóico, as linhagens utilizaram a via do protocatecol;

- ✓ Quando o meio de cultura foi suplementado com extrato de levedura, uma alta taxa de crescimento e degradação foi observada sendo essa maior que na ausência desse composto;

- ✓ O ácido D-glucurônico foi, dos compostos testados, o que mais estimulou o crescimento das bactérias halofílicas moderadas;

- ✓ Das linhagens halofílicas moderadas a que obteve o melhor crescimento em com o maior numero de compostos testados foi a linhagem df2;

- ✓ De todos os testes realizados na tentativa de biorremediar a água de produção de petróleo, a bioestimulação foi o mais efetivo, com diminuição de 77% da carga orgânica, quando adicionados solução de fosfato e alanina;

- ✓ A construção das bibliotecas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias e arqueias, a partir do DNA genômico da água de produção, resultou em 396 clones para a biblioteca de arquéias e 96 para biblioteca de bactérias;

- ✓ As sequências da biblioteca de bactérias revelaram uma prevalência dos gêneros *Marinobacter* e *Halomonas*, sendo esses já descritos como degradadores em ambientes salinos contaminados por compostos aromáticos;

- ✓ A comparação das seqüências da biblioteca de arquéias com as sequências do gene RNA ribossomal 16S presente nos bancos de dados GenBank e RDP revelaram a presença de micro-organimos pertencentes a ordem Methanomicrobia, com destaque para os gêneros: *Methanosaeta*, *Methanoplanus*, *Methanolobus*, *Methanocelleus* e *Methanogenium.* É possível observar que estes micro-organismos desempenham papel importante no metabolismo de metano, componente abundante em amostras de petróleo;

- ✓ Na comparação da técnica clássica de isolamento com a técnica independente de cultivo (biblioteca do gene RNA ribossomal 16S), foi encontrada uma maior diversidade de micro-organismos, a partir desta última técnica, já que os métodos clássicos, muitas vezes não conseguem reproduzir as características do ambiente na qual os micro-organismos se encontravam, limitando assim os seus isolamentos.

# *Referências Bibliográficas*

- ADAMS, M.W.M., JELLY, R.M. Enzymes from microorganisms in extreme environments. **Chem Eng News**. v 73 p. 32-42, 1995.

- ADKINS, J.P., MADIGAN, M.T., MANDELCO, L., WOESE, C.R., TANNER, R.S. *Arhodomonas aquaeolei* gen. nov., sp. nov., an aerobic, halophilic bacterium isolated from a subterranean brine. **Int. J. Syst. Bacteriol**. v. 43, p. 514–520, 1993.

- ALVA, V.A., PEYTON, B.M. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*: influence of pH and salinity. **Environ. Sci. Technol**. v. 37, p. 4397–4402, 2003.

- AMANN, R.I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, p. 143-169, 1995.

- ANDREA, M., JIRKÁ., MARK, J. Micro Semi-Automated Analysis of Surface and Wastewaters for Chemical Oxygen Demand. **Analytical Chemistry.** v. 47, n. 8, 1975.

- ANTÓN, J., LLOBET-BROSSA, E., RODRÍGUEZ-VALERA, F., AMANN, R. Fluorescence in situ hybridization analysis of the prokaryotic community inhabiting crystalizer ponds. **Environ Microbiol**. v 1, p. 517-523, 1999.

- ANTÓN, J., ROSELLÓ-MORA, R., RODRIGUÉZ- VALERA, F., AMANN, R. Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. **Appl. Environ Microbiol.** v. 66 p. 3052-3057, 2000.

- ANTÓN, J., OREN, A., BENLLOCH, S., RODRÍGUEZ-VALERA, F., AMMAN, R., ROSELLÓ-MORA, R. *Salinibacter ruber*, gen. nov., sp. nov., a novel, extremely halophilic member of the bacteria from saltern crystallized ponds. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. v. 52, p.485-491, 2002.

- ARIAS, S., DEL MORAL, A., FERRER, M.R., TALLON, R., QUESADA, E., BÉJAR, V. Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and intersting properties for biotechnology. **Extremophiles**. v. 7 p. 319-326, 2003.

- ARBER, W. involvement of genes products in bacterial evolution. Ann N Y Acad Sci. v. 870, p. 36-44, 1999.

- ATLAS, R. M. Petroleum Microbiology. **Macmillan Publishing Company**, New York. (ed.), 1984.

- AUSUBEL, F. M., R., KINSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J. A., STRHL, K. (eds.). Current Protocols in Molecular Biology. **Greene Publishing Associates**, New York**:** Jonh Wiley and Sons. (eds.), 1989.

- ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodiversity. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial ecology. **Menlo Park: Benjamim/Cummings Science**, p.27-57, 1998.

- AYALA-DEL-RIO, H.L., CALLISTER, S.J., CRIDDLE, C.S., TIEDJE, J. M. Correspondence between Community Structure and Function during Succession in Phenol- and Phenol-plus-Trichloroethene-Fed Sequencing Batch Reactors. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70 (8 p. 4950–4960, 2004.

- BAGGI, H., AMDOUNI, R., GHARSALLAH, N., SGHIR, A., AMMAR, E. Isolation and characterization of Moderately Halophilic Bacteria from Tunisian Solar Saltern. Curr Microbiol. v. 60, p. 157-161, 2010.

- BAGGI, G., BARBIERI, P., GALLI, E., TOLLARI, S. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades o-xylene. **Applied Environment Microbiology**. v. 53, p. 2129-2132, 1987.

- BARBIERI, S. M. Biodegradação de Compostos Aromáticos Policíclicos. In: MELO, I.S., AZEVEDO, J.L. ed. Microbiologia Ambiental, **Embrapa-CNPMA**, Jaguariúna, p. 243-268, 1997.

- BARTHA, R. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiol**. v.45, p.180-209, 1981.

- BÉJAR, V., CALVO, C., MOLIZ, J., DÍAZ-MARTÍNEZ, F., QUESADA, E. Effect of growth conditions on the rheological properties and chemical composition of *Volcaniella eurihalina* exopolysaccharides. **Appl Biochem Biotechnol**. v. 59, p. 77-86, 1996.

- BÉJAR, V., LLAMAS, I., CALVO, C., QUESADA, E. Characterization of exopolysaccharides produced by 19 halophilic strains of the species *Halomonas eurihalina*. **J Biotechnol**. v. 61, p. 135-141, 1998.

- BAKER, P. HARAYAMA, S., WATANABE, K. Bacterial populations occurring in trichloroethylene-contaminated aquifers during methane injection. **Environ. Microbiol**. v.3, p.187-193, 2001.

- BENLLOCH, S., ACINAS, S.G., LÓPEZ-LÓPEZ, A. LUZ, S.P., RODRÍGUEZ-VARELA, F. Archaeal Biodiversity in crystallizer ponds from a solar saltern: culture versus PCR. **Microbiol Ecol.** v. 41, p. 12-19, 2001.

- BENLLOCH, S., LÓPEZ-LÓPEZ, A., CASAMAYOR, E.O., OVREAS, L., GODDARD, V., DAEE, F.L., SMERDON, G., MASSANA, R. JOINT, L., THINGSTAD, F., PEDRÓS-ALIÓ, C., RODRÍGUEZ-VARELA, F. Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. **Environ Microbiol**. v. 4, p. 349-360, 2002.

- BERTRAND, J.C., ALMALLAH, M., AQUAVIVA, M.Y MILLE, G. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaebacterium. **Lett Appl Microbiol.** v. 11, p. 260-263, 1990.

- BIRKELAND, N. K. Sulafate-reducing bacteria and Archaea. In **Petroleum Microbiology.** B Ollivier and M Magot (eds.). Washington USA: ASM Press, p. 35-54, 2006.

- BLACKWOOD, C. B.; MARSH, T.; KIM, S-H.; PAUL, E. A. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data Analysis for Quantitative Comparison of Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 69 (2), p. 926–932, 2003.

- BODTKER, G.; THORSTENSON, T.; LILLEBO, B. L. P.; THORBJORNSEN. B. E.; ULVOEN. R. H.; SUNDE. E.; TORSVIK. T. The effect of long-term nitrate treatment on SRB activity, corrosion rate and bacterial community composition in offshore water injection systems. **J Ind. Microbiol Biotech.** v. 35, p. 1625-1636, 2008.

- BOONE, D.R., MATHRLUI, I.M., LIU, Y., MENAIA, J.A.G.F., MAH, R.A., BOONE, J.E. Isolation and characterization of *Methanohalophilus portucalensis* sp. nov. and DNA reassociation study of the genus Methonohalophilus. **Int. J. Syst Bacteriol**. v. 43 p. 430- 437, 1993.

- BOONE, D. R.; KAMAGATA, Y. Rejection of the species Methanothrix soehngenii and the genus Methanothrix as nomina confusa and transfer of *Methanothrix thermophila* to the genus Methanosaeta as Methanosaeta thermophila comb.nov. Request for an Opinion. **Int J Syst Bacteriol.** v. 48, p. 1079-1080, 1998.

- BOROWITZKA, M.A., SIVA, C.J. The taxonomy of the genus *Dunaliella* (Chlorophyta, Dunaliellales) with emphasis on the marine halophilic species. **J Appl Pycol**. v. 19, p. 567-590, 2007.

- BOUDREAU, B.P. A theoretical investigation of the organic carbon-microbial biomass relation in muddy sediments. Aquatic Microbiology and Ecology. v.17, p.181-189, 1999.

- BOWERS, K.J., MESBAH, N.M., WIEGEL, J. *Natranaerobius "grantii*" and *Natranaerobius "jonessi",* spp. nov., two anaerobic halophilic alkaliphiles isolated from the Kenyan-Tanzanian Rift. **Abst Gen Meet Am Soc Microbiol Boston**, MA I-007, 2008.

- BREMER, E. E KRÄMER, R. Coping with osmotic challenges: osmoregulation througt accumulation and release of compatible solutes in bacteria. En: *Bacterial stress responses*.

Storz, G., Hengge-Aronis, R. (ed.). **American Society for Microbiology**: Washington, p. 77-97, 2000.

- BROCK, T.D. Ecology of saline lakes. En: tof Microbiol life in Extreme Environments. Shilo, M. (ed.). **Verlag-Chemie:** Weinheim, p. 29-47, 1979.

- BROWN, A. D. Microbial water stress. **Bacteriol. Rev**. v. 40, p. 803-846, 1976

- BROWN, A. D. (ed.). Microbial Water Stress Physiology, Principles and Perspectives. Chichester: John Wiley and Sons, 1990.

- BRUCE, K. D. Analysis of mer gene subclasses sediments resolved by fluorescent-PCR restriction fragment length polymorphism profiling. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 63, p. 4914–4919, 1997.

- BURCHAN, A., NEIDLE, E. L., MORAN, M. A. Diverse Organization of Genes of the ß-Ketoadipate Pathway in Members of the Marine *Roseobacter* Lineage. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, p. 1658-1668, 2003.

- BURG, M., KWON, E., KÜLTZ, D. Regulation of gene expression by hypertonicity. Annu. **Rev. Physiol**. v. 59, p. 437-455, 1997.

- CALVO, C., FERRER, M.R., MARTÍNEZ-CHECA, F., BÉJAR, V., QUESADA, E. Some rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by Volcaniella eurihalina. **Appl biochem Biotechnol**. v. 55, p. 45-54, 1995.

- CALVO, C., DE LA PAZ, A.G., BÉJAR, V., QUESADA, E., RAMOS-CORMENZANA, A. Isolation and characterization of phage F-9 11 from a lysogenic Deleya halophila strain. **Curr Microbiol**. v. 17, p. 49-53, 1998.

- CALVO, C., MARTÍNEZ-CHECA, F., TOLEDO, F.L., PORCEL, J., QUESADA, E. Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by Halomonas eurihalina and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 60, p. 347-351, 2002.

- CARVALHO, D.; MARCHI, D. D.; DURRANT, L. R. Production of extracellular surface-ative compounds by microorganisms grown on hydrocarbons. In: International In Situ And On-Site Bioremediation Symposium, New Orleans. In situ and on site bioremediation. **Columbus: Battelle Press**, v. 4, p. 91 – 97, 1997.

- CASAMAYOR, E.O., MASSANA, R., BENLLOCH, S., OVREAS, L., DÍEZ, B., GODDARD, V.J., GASOL, J.M.; JOINT, RODRÍGUEZ-VALERA, F., PEDRÓS-ALIÓ, C. Changes in archaeal, bacterial

and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. **Environ Microbiol**. v. 4, p. 338-348, 2002.

- CAYOL, J.L., OLLIVIER, B., PATEL, B.K., AGERON, E., GRIMONT, P.A., PRENSIER, G., GARCIA, J.L. Haloanaerobium lacusroseus sp. nov., an extremely halophilic fermentative bacterium from the sediments of a hypersaline lake. **Int J Syst Bacteriol**. v. 45, p. 790-797, 1995.

- CHAMROENSAKSRI, N., TANASUPAWAT, S. AKARACHARANYA, A., VISESSANGUAN, W, KUDO, T., ITOH, T. *Salinivibrio siamensis* sp. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 59, p. 880-885, 2009.

- CHAO, A., MA, M.-C., YANG, MCK. Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates. **Biometrika**. v. 80, p. 193–201, 1983.

- CHAO, A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. **Scandinavian Journal of Statistics.** v. 11, p. 265–270, 1984.

- CHAUDHRY, G. R.; CHAPALAMADULU, S. Biodegradation of halogenated organic-compounds. **Microbiology Reviews.** v. 55, p. 59-79, 1991.

- CHERRIER, J., ELLEN, J. E., DRUFFER, R.M. Utilization and turnover of labile dissolved organic matter by bacteria heterotrophs in eastern North Pacific surface water. Marine Ecology Progress. v. 139, p.267-279, 1996.

- CHEN, Y. Li.J., Lu, S.Y. Biotechnological production of pyruvic acid. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 57, p.451–459, 2001.

- CIFUENTES, A., ANTÓM, J., DE WIT, R., RODRÍGUEZ-VALERA, F. Diversity of bactéria and archaea in sulphate-reducing enrichment cultures inoculates from dilution of Zostera noltii rhizosphere samples. **Environ Microbiol.** v. 5, p. 754-764, 2003.

- COWAN, D. A. Industrial enzymes. In: Biotechnology, The Sciences and The Business eds Moses, V and Cape, R.E. pp 311-340. Reading: Harwood Academic Publishers. 1991.

- COWAN, S.T., STEEL, K.J. Manual para la Identificación de Bacterias de Importancia Médica. C.E.C.S.A.: México, 1982.

- CUADROS-ORELLANA, S. Isolamento e Caracterização de Haloarqueas Cultivadas em Compostos Aromáticos e Construção de Ferramentas Moleculares para o Estudo da Secreção Protéica no Domínio Archaea. Tese apresentada à Universidade de Campinas, para obtenção do Título de Doutor, 2003.

- CUSHMAN, J. C. Osmoregulation in plants: Implications for agliculture. **Amer. Zool.** *v.* 41 p. 758-769, 2001.

- DA COSTA, M. S., SANTOS, H., GALINSKI, E. A. An overview of the role and diversity of compatible solute in Bacteria and Archaea. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol**. v. 61, p. 117-153, 1998.

- DALE, N.G. Bacteria in intertidal sediments: factors related to their distribution. Ligmnology and Oceanography. v.19, p. 509-518, 1974.

- DASSARMA, S., ARORA, P. HALOPHILES. Encyclopedia of life Sciences, **Nature Publishing Groups**, p. 1-9, 2001.

- DE FRANK, J.J., CHENG, T.C. Purification and proterties of an organophosphorus acid anhydrase from a halophilic bacteria isolate, **J Bacteriol.** v. 173, p. 1938-1943, 1991.

- DOJKA, M.A., HUGENHOLTZ, P, HAACK, S.K., PACE, N. R. Microbial diversity in a hydrocarbon and chlorinated solvent contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. Appl. Environ. Microbiol. v.64, p3869-3877, 1998.

- DUNDAS, I. The normal Halobacteriaceae, the general physiology and taxonomy of a well-adapted and highly successful group of microorganisms. En: Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms. Caplan, S.R. y Ginzburg. M. (eds.). **Elservier**: Amsterdam. p. 641-651, 1978.

- DUSSALT, H.P. An improved technique for staining red halophilic bactéria. **Journal of Bacteriology**, v. 70, p. 484-5, 1955.

- DYALL-SMITH, M., DANSON, M. The life of brine: Halophiles in 2001. **Genome Biology**. v. 2 (12), p. 4033. 1-4033. 3, 2001.

- EDER, W., LUDWIG, W., HUBER, R. Novel 16S rRNA gene sequences retieved from highly saline brine sediments of kebrit Deep, Red Sea. **Arch Microbiol**. v . 172, p. 213-218, 1999.

- EDGERTON, M.E., BRIMBLECOME, P. Thermodynamics of halobacterial environment. **Can J Microbiol.** v. 27, p. 899-909, 1981.

- EDWARD, J. C. Principles and Pestices for Petroelum Contaminates Soil. **Lewis Publishers**, New York, 1993.

- ELAZARI-VOLCANI, B. Genus XII. Halobacterium En: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7 edn. Breed, R.S., Murray, E.G.D. y Smith, N.R. (eds) The Williams & Wilkins Co: Baltimore, p. 207-212, 1957.

- ENSENBERG, H. Life in unusual environments: progress in understanding the structure and function of enzymes fron extreme halophilic bacteria. **Arch Biochem Biophys**. v. 318, p. 1-5, 1995.

- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M., GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research.** v. 8, p. 175-185, 1998.

- FAIRLEY, D. J.; BOYD, D. R.; SHARMA, N. D.; ALLEN, C. C. R.; MORGAN, P. LARKIN, M. J. Aerobic metabolism of 4-hydroxybenzoic acid in Archaea via an usual pathway involving an intamolecular migration shift (NIH shift). **Applied and Environmental microbiology**. v. 68 (12), p. 6246-6255, 2002.

- FALSENSTEN, J. PHYLIP-Phylogeny inference package (version 3.2). **Cladistics**. v. 5, p. 164-166, 1989.

- FELSENSTEIN, J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). **Cladistics**. v. 5 p. 164-166, 1989.

- FLOODGATE, G. The fate of petroleum in marine ecosystems. In Atlas (Ed), Petroleum Microbiology, **Macmillan Publishing Company**, New York, p. 355-398, 1984.

- FLYNN, S.A., BUTLER, E. J., VANCE, I. Produced water composition, toxicity, and fate. A review of recent BP North Sea studies. In ***Environmental Science Research*** 52: *Produced Water 2. Environmental Issues and Mitigation Technologies*, eds. M. Reed and S. Johnsen, Plenum Press, New York. p. 69–80, 1996.

- FORSYTH, J.V., TSAO, Y.M., BLEM, R.D. Bioremediation: when is augmentation needed? In Hinchee, R.E. et al. (eds) Bioaugmentation for Site Remediation. Battelle Press, Columbus, OH, p 1-14, 1995.

- FRANKLIN, R.B.; MILLS A.L. Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field. **FEMS Microbiol Eco.** v. 44, p. 335–346, 2003.

- FRANZMANN, P.D., STACKEBRANDT, E. SANDERSON , K., VOLKMAN, J.K., CAMERON, D.E., STEVENSON, P.L., MCMEEKIN, T.A., BURTON, H.R. *Halobacterium lacusprofundi* sp. Nov., a halophilic bacterium isolated from deep lake, Antarctica. **Syst Appl Microbiol**. v. 11, p. 20-27, 1988.

- FREIRE, D. D.C., CAMMAROTA, M.C., SANT' ANNA, J.R. Biological Treatment of High saline Produced water. **LABS 3**. Paper 34, 1998.

- FRITSCHE, W. & HOFRICHTER, M. Aerobic Degradation by Microorganisms. **Bio/technology**. v. 11b, p. 145-167, 2000.

- FUJISAWA, H., HAYAISHI, O. Protochatechuate 3,4- Dioxygenase. **Journal of Biology Chemical**. v.243, p 2673-2681, 1968.

- FUHRMAN, J.A., McCALLUM, K., DAVIS, A. A.Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific Oceans. v.59, p. 1294-1302, 1993.

- GALINSKI, E. A., TINDALL, B.J. Biotechnological prospects for halophiles and helotolerant microorganisms. En: **Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles**. Herbert, R.A. y Sharp, R.J. (eds.) Blackie: Glasgow, p. 76-114, 1992.

- GALINSKI, E. A. Compatible solutes of halophilic eubacteria: Molecular principles, water-solute interaction, stress protection. **Experientia**. v. 49, p. 487-495, 1993

- GALINSKI, E. A., TRÜPER, H.G. Microbiol behavior in salt-stressed ecosystems. **FEMS Microbiol Rev**. v. 15, p. 95-108, 1994.

- GALINSKI, E. A. Osmoadaptation in bacteria. **Adv. Microb. Physiol**. v. 37, p. 273-328, 1995.

- GARCIA, M.T., MELLADO, E., OSTOS, J.C., VENTOSA, A. *Halomonas organivorans* SP. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 54, p. 1723-1728, 2004.

- GARCIA, M. T.; GALLEGO, V., VENTOSA, A.; MELLADO, E. *Thalassobacillus devorans* gen. Nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading. Gram-positive bacterium. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 55, p. 1789-1795, 2005a.

- GARCIA, M. T.; VENTOSA, A.; MELLADO, E. Catabolic versatily of aromatic compound degrading halophilic bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 1 p. 97-109, 2005b.

- GAUTHIER, M.J., LAFAY, B., CHRISTEN, R., FERNANDEZ, L., ACQUAVIVA, M., BONIN, P., BERTRAND, J.C. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus gen. nov., sp. nov*., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium**. Int. J. Syst. Bacteriol**. v.42, p.568-576, 1992.

- GOLYSHIN, P.N., MARTINS DOS SANTOS, V.A., KAISER, O. e outros 8 autores. Genome sequence completed of *Alcanirovax borkumensis*, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role oil removal from marine systems. **J Biotechnol.** v. 106, p. 215-220, 2003.

- GOMES, J., STEINER, W. The Biocatalytic Potential of Extremophiles and Extremozymes. Food. **Tecnol Biotechnol** v. 42 p. 223-235, 2004.

- GONZÁLEZ, C., GUTIÉRREZ, C., RAMÍREZ, C. *Halobacterium vallismortis* sp. Nov. An amyloytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. **Can J Microbiol**. v. 24, p. 710-715, 1978.

- GONZÁLES-DOMENECH, C.M., BÉJAR, V., MARTÍNEZ-CHECA, F., QUESADA, E. *Halomonas nitroreducens* sp. nov., a novel nitrate-and nitrite-reducing species. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 58, p. 872-876, 2008a.

- GONZÁLES-DOMENECH, C.M., MARTÍNEZ-CHECA, F., QUESADA, E., BÉJAR, V. *Halomonas cerina* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifyng, exopolysaccharide-producing bacterium**. Int J Syst Evol Microbiol**. v. 58, p. 803-809, 2008b.

- GONZÁLEZ-TORIL, E., LLOBET-BROSSA, E., CASAMAYOR, E.O., AMANN, R., AMILS, R. Microbiol ecology of na extremely acidic environment. The Tinto River. **Appl Environ Microbiol.** v. 69, p. 4853-4865, 2003.

- GORSHKOVA, N.M.; IVANOVA.; E.P.; SERGEEV, A. F.; ZHUKOVA, N.V.; ALEXEEVA, Y.; WRIGHT, J. P.; NICOLAU, D. V.; MIKHAILOV, V.V.; CHRISTEN, R. *Marinobacter excellens* sp. Nov., isolated from sediments of the sea of Japan. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 53, p. 2073-2078, 2003.

- GRABOWSKI, A.; NERCESSIAN, O.; FAYOLLE, F.; BLANCHET, D.; JEANTHON, C. Microbial diversity in production water of a low-temperature biodegraded oil reservoir. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 54, p. 427-443, 2005.

- GRAF, R., ANZALI, S., BUENGER, J., PFLUECKER, F. Y DRILLER, H. The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. **Clin. Dermatol**. v. 26 p. 326-333, 2008.

- GRANT, W.D., ROSS, H.N. The ecology and taxonomy of halobacteria. **FEMS Microbiol Rev.** v. 39, p. 9-15, 1986.

- GRANT, W.D., MWATHA, W.E., JONES, B.E. Alkaliphiles: ecology, diversity and applications. **FEMS Microbiol Rev**. v. 75, p. 255-270, 1990.

- GRANT, W.D., GEMMELL, R.T., MCGENITY, T.J. Halophilis. En: Extremophiles: Microbial life in **Extreme Environment**. Horikoshi, K., Grant, W. D. (eds). Wiley- Liss: New York, p. 93-132, 1998.

- GRANT, W. D. Genus XII. Halobacterium. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2 edn. Boone, D.R. y Castenholz, R.W. (eds). Springer-Verlag: New York, p. 301-305, 2001.

- GRUBER, C., LEGAT, A., PFAFFENHUEMER, M.; RADAX, C., WEIDLER, G., BUSSE, H.J., STAN-LOTTER, H. *Halobacterium Noricense* sp. Nov., an archaeal isolate from a bore core of an

alpine Permian salt deposit, classification of *halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emendet description of H. salinarum. **Extremophiles.** v. 8, p. 431-439, 2004.

- GU, J., CAI, H., YU, S.-L., QU, R., YIN, B., GUO, Y.-F., ZHOO, J.-Y., WU, X.-L. *Marinobacter gudaonesis* sp. nov., isolated from an oil-polluted saline soil in a Chinese oilfield. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 57, p. 250-254, 2007.

- GUNDE-CIMERMAN, N., ZALAR, P., PETROVIC, U., TURK, M. KOGEJ, T., DE HOOG, G.S., PLEMENITAS, A. Fungi in the Salterns. Em: Halophilic Microorganims. Ventosa, A. (ed.). Springer-Verlag: Heidelberg, pp. 103-113, 2004.

- HAHN, D.R., SOLENBERG, P.J., BALTZ, R.H. Tn 5099 axyE promoter probe transposon for Streptomyces spp. **Jornal Bacteriology**. v. 173, p. 5573-5577, 1991.

- HANAHAN, D. J. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol. v.** 166 p. 558–580, 1983.

- HARAYAMA, S. REKIK, M. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families. **J. Biol Chem**., v. 264, p. 15328-15333, 1989.

- HARAYAMA, S., KOK, M., NEDLEID, A.V. Functional and evolutionary relationship amoung diverse oxygenases. **Annul Reviews Microbiology**. v. 46, p. 565-601, 1992.

- HARIKOSHI, K., GRANT, W.D. Extremophiles: Microbiol Life in Extreme Environments. Horikoshi, K. y Grant, W.D. (eds.). Wiley-Liss: New-York, p. 93-133, 1998.

- HARWOOD, C. S.; PARALES, R. E. The β-ketoadipate pathway and the biology of self-indentify. **Ann. Rev. Microbiol**. v. 50, p. 553- 590, 1996.

- HEAD, I.M.Bioremediation: Toward a credible technology. Microbiology. v.144, p.599-608, 1998.

- HEDI, A., SADFI, N., FARDEAU, M.L., REBIB, H., CAYOL, J.L., OLIVIER, B., BOUDABOUS, A. Studies on the Biodiverdity of Halophilic Microorganisms isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under Aerobic Conditions. **Int J Microbiol**, p. 17, 2009.

- HEDLUND, B. P., GEISELBRECHT, A. D., STALEY, J.T. Marinobacter strain NCE312 has a *Pseudomonas*-like naphthalene dioxygenase**. FEMS Microbiol Lett.** v. 201, p. 47–51, 2001.

- HEGMAN, G.D. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by *Pseudomonas putida*. **Journal of Bacteriology.** v.91, p. 1140-1154, 1996.

- HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER P.; SMALLA, K; WELLINGTON E. M. H. Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 63 (8) p. 3233–3241, 1997.

- HINTEREGGER, C., STREICHSBIER, F. *Halomonas sp*., a moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic wastewater**. Biotechnol. Lett.** v. 19, p. 1099–1102, 1997.

- HISCHIER-RÉA, A., MATHERON, R., RIFFAUD, C., MOUNÉ, S., EATOCK, C., HERBERT, R.A., WILLISON, J.C., CAUMETTE, P. Isolation and characterization of spirilloid purple phototropic bacteria forming red layers in microbial mats of Mediterranean salterns: description of *Holorhodospira neutrophila* sp. nov. and emendation of the genus *Haloshodospira*. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 53, p. 153-163, 2003.

- HOPKINSON, C.S., BUFFAM, I., HOBBIE, J., VALLINO, J., PERDUE, M:; EVERSMEYER, B., PRAHL, F., COVER, J., HODSON, R., MORAN, M.A., SMITH, E., BAROSS, J., CRUMP, B., FINDLAY, S., FOREMAN, K., Terrestrial inputs of organic matterto coastal ecosystems: anintercomparison of chemical characteristics and bioavailability. Biogeochemistry. v.43. p.211-234, 1998

- HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M.; PACE, N.R. Impact of Culture-Independent Studies On The Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. **J. Bacteriol**. v. 180, p. 4765-4774, 1998.

- HUSER, B. A.; WUHRMANN, K.; ZEHNDER, A. J. B. *Methanothrix soehngenii*. gen. nov., a new acetotrophic non-hydrogenoxidizing methane bacterium. **Arch Microbiol**. v. 132, p. 1-9, 1982.

- IMHOFF, J.F., PETRI, R., E SÜLING, J. Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic purple non-sulfur bacteria of the alpha-proteobacteria: description of the new genera *Phaeospirillum gen.* nov., *Rhodovibrio gen*. nov. *Rhodothalassium gen*. nov. And *Roseospira gen*. nov. as well as transfer of *Rhodospirillum fulvum* to *Phaeospirillum fulvum comb*. nov., of *Rhodospirillum molischianum* to *Phaeospirillum molischianum comb*. nov., of *Rhodospirillum salinarum* to *Rhodovibrio salexigens*. **Int J Syst Bacteriol**. v. 48, p. 793-798, 1998.

- JACOBUCCI, D. F. C. Estudo da influência de biosurfactantes na biorremediação de efluentes oleosos. Campinas, 117 p. Dissertação (mestrado) – FEA, UNICAMP, 2000.

- JAVOR, B.J. Hipersaline Environments. *En: Microbiology and Biogeochemistry*. Oren, A. (eds.). Springer-Verlag: Berlin, pp. 328, 1989.

- JAVOR, B.J. Hipersaline Environments. En: Microbiology and Biogeochemistry. Oren, A. (ed.). Springer-Verlag: Berlin. p. 328, 1989.

- JEFFRIES, C.D., HOLTMAN, D.F., GUSE, D.G. Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. **J. Bacteriol**. v. 73, p. 590-591, 1975.

- JIMÉNEZ, J. I., MIÑAMBRES, B.,GARCÍA, J.L., DÍAZ, E. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440 **Environmental Microbiology**. v. 4, p. 824-841, 2002.

- JOBSON, A.M., COOK, F.D., WESTLAKE, D.W.S. Effect of amendments on the microbial utilization of oil applied to soil. **Appl. Microbiol**. v. 27, p. 166-171, 1974.

- JONES, B.E., GRANT, W.D., DUCKWORTH, A.W., OWENSON, G.G. Microbiol diversity in soda lakes. **Expremophiles**. v. 2, p. 191-200, 1998.

- JUHASZ, A. L., NAIDU, R. Biorremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo(a)pyrene. **Internacional Biodeterioration.** v.45, p.57-88, 2000.

- KAMAGATA, Y., KAWASAKI, H.; OYAIZU, H.; NAKAMURA, K.; MIKAMI, E.; ENDO, G.; KOGA, Y.; YAMASATO, K. Characterization of three thermophilic strain of *Methanothrix* (" Methanosaeta") *thermophila sp*. nov. and rejection of *Methanothrix* ("Methanosaeta") thermoacetophila. **Int J Syst Bacteriol**. v. 42, p. 463-468, 1992.

- KAMEMURA, M. Production and funcion of enzymes of eubacteriol halophiles. **FEMS Microbiol Rev**. v. 39, p. 145-150, 1986.
- KASAI, Y.; TAKAHATA, Y.; HOAKI, T.; WATANABE, K. Physiological and molecular characterization of microbial community established in unsaturated, petroleum contaminated soil. **Environ Microbiol.** v. 7, p. 806-818, 2005.

- KÄSTNER, M., MARHO, B. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 44, p. 668–675, 1996.

- KEMPF, B., BREMER, E. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress response to higt-osmolarity environments. **Arch Microbiol**. v. 170 p. 319-330, 1998.

- KHARROUB, K., AGUILERA, M., QUESADA, T., MORILLO, J.A., RAMOS-CORMENZANA, A., BOULHAROUF, A., MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M. *Salicola salis sp*. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from Ezzemoul sabkha in Algeria. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 56, p. 2647-2652, 2006a.

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

- KLEINSTEUBER, S., MULLER, R.H., BABEL, W. Expression of the 2,4-D degradative pathway of pJP4 in an alkaliphilic, moderately halophilic soda lake isolate, *Halomonas sp*. EF43 **Extremophiles.** v. 5 p. 375-384, 2001.

- KOBAYASHI, T., KIMURA, B., FUJII, T. Stricthy anaerobic halophiles isolated from canned Swedish fermented henings ( Surstromming). **Int. J. Food Microbial**. v. 54 p. 81-89, 2002a.

- KOBAYASHI, T., KIMURA, B., FUJII, T. Differention of *Tetragenococcus* population occurring in the products and manufacturing processes of puffer fish ovaries fermented with recebram. **Int. J. Food Microbiol.** v. 56 p.211-218, 2002b.

- KORENBLUM, E., VALONI, E., PENNA, M., SELDIN, L. Bacterial diversity in water injection systems of Brasilian offshore oil platforms. **Environmental Biotechnology**. v.85, p. 791-800, 2010.

- KOTSYURBENKO, O. R.; SIMANANKOVA, M. V.; NOZHEVNIKOVA, A. N.; ZHILINA, T. N.; BOLOTINA, N.P.; LYSENKO, A.M.; OSIPOV, G.A. New specie of psychrophilic acetogens: *Acetobacterium bakii sp*., nov., *A. paludosum sp*. nov., A. *fimetarium sp*. nov. Arch. Microbiol. v. 163, p. 29-34, 1995.

- KUMAR, S., TAMURA, K., JAKOBSEN, I.B., NEI, M. Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA. **Bioinformatics, v.17**, p.1244-1245, 2001.

- KUSHNER, D.J. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. En: Microbial life in Extreme Environments. Hushner, D. J. (ed). **Academic Press**: London, p. 317-368, 1978.

- KUSHNER, D.J. The Halobacteriaceae. En: The Bacteria. Woese, C.R. y Wolfe, R.S. (eds). **Academic Press**: London, p. 171-214, 1985.

- KUSHNER, D. J., KAMEKURA, M. Physiology of halophilic eubacteria. En F. Rodríguez-Varela (ed.), **Halophilic Bacteria. Boca Raton: CRC Press**. p. 109-138, 1988.

- KUSHNER, D.J., Halophilic bacteria: life in and out salt. *En*: Recent Advances in Microbiol Ecology. HATTORI, T., ISHIDA, Y., MARUYAMA, Y., MORITA, R.Y. Y UHIDA, A. (Eds.). **Japan Scientific Society Press**: Tokio, p. 60-64, 1989.

- LAFFERTY, R.M., KORSATKO, B., KORSATKO, W. Microbiol production of poly-βhydroxybutyric acid. En: Biotechnology. Rhem, H.I. y Reed, G. (eds.). **VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim**, p. 136-176, 1988.

- LANE, D J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. (eds.). Nucleic acid techniques in **Bactérial systematics**. Chichester, England: Academic Press; p. 115–175, 1991.

- LANYI, J.K. Salt-dependent properties of protein fron extremely halophilic bacteria. **Bacterial Rev.** v. 38, p. 372-290, 1974.

- LARSEN, H. Halophilism. En: **The Bacteria. Gunsalus**, I.C. Y STAINER, R.Y. (eds.). Academic Press: New York, p 297-342, 1962.

- LAWYER, F. C., STOFFEL, S., SAIKI, R. K., MYAMBO, K. D., DRUMMOND, R., GELFAND, D. H. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from the Thermus aquaticus. **J. Biol. Chem.** v. 264, p. 6427-6437, 1989.

- LEAHY, J.G., COLWELL, R.R. Microbial Degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbial Reviews**. v. 53 (3), p. 305-315, 1990.

- LEE, K., LEVY, E. M., Enhanced biodegradation of light crude oil in Sandy beaches. In: Proceedings, 1987 **Oil Spill Conf**. (pp 411-479). Am. Petroleum Inst. Washington, DC. 1987.

- LEE, K., LEVY, E. M. Biodegradation of Petroeleum in the environment and enhancement. In: **Aquatic Toxicology and Water Quality Management** (pp 217-243). New York. 1989.

- LEE, K., TREMBLAY, G.H., GAUTHIER, J., COBANLI, S.E., GRIFFIN, M. Bioaugmentation and biostimulation: a paradox between laboratory and field results. Proceedings of 1997 International Oil Spill Conference. American Petroleum Institute, Washington DC, p 697-705, 1997b.

- LEE, J-W., NAM, J-H., KIM, Y-H., LEE, K-H., LEE, D-H. Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. **The Journal of Microbiology**. v. 46 (2), p. 174-182 2008.

- LEE, S., FUHRMAN, J.A. DNA hybridization to compare species compositions of natural bacterioplankton assemblages. v.56, 739-746

- LI, H., YANG, S., MU. B. Phylogenetic Diversity of the Archaeal community in a continental high temperature, water flooder Petroleum reservoir. **Curr Microbiol**. v. 55, p. 382-388, 2007.

- LIEBGOTT, P.P., CASALOT, L., PAILLARD, S.; LORQUIN, J., LABAT, M. *Marinobacter vinifirmus sp*. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a wine-barreldecalcification wastewater. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 56, p. 2511–2516, 2006.

- LILLO, J.G., RODRÍGUEZ-VALERA, F. Effects of cultura conditions on poly-β-hydroxybutyric acid production by *Haloferax mediterranei*. **Appl Environ Microbiol.** v. 56, p. 2517-2520, 1990.

- LITCHFIELD, C.D., IRBY, A., VRELAND, R.H. The microbiol ecology of solar salt plant. *En:* Microbiology and Biochemistry of Hypersaline Envirnments, Oren, A. (ed.). CRC Press: Boca Raton, pp. 39-52, 1992.

- LITCHFIELD, C.D., GILLEVET, P.M. Microbiol diversity and complexity in hypersaline environments: a preliminary assessment. **J. In Microbiol Biotechnol.** v. 28, p. 48-55, 2002.

- LIU, W.T., MARSH, T.L., FORNEY, L.K. Determination of the microbial diversity of anaerobic-aerobic activated sludge by a novel molecular biological technique. **Water Sci. Technol**. v. 37, p. 417–422, 1998.

- LIU, W-T, MARSH, TL, CHENG, H, FORNEY, LJ. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63, p. 4516-4522, 1997.

- LOPEZ, M.A., DE LA SERNA, F.J.Z.D., JAN-ROBLERO, J., ROMERO, J.M., HERNANDEZ-RODRIGUEZ, C. Phylogenetic analysis of a biofilm bacterial population in a water pipeline in the gulf of Mexico. **FEMS Microbiol Ecol.** v. 58, p. 145-154, 2006.

- LOUIS, P., TRÜPER, H.G., GALINSKI, E.A. Survival of Escherichia coli during drying and storage in the presence of compatible solutes. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 41, p. 684-688, 1994.

- LOVELL, C. R., ERIKSEN, N.T., LEVITUS, A.J., CHEN, Y. P. Reistance of the Marine Diatom Thalassionsera sp to Toxicity of Phenolic Compounds. **Marine Ecology- Progress Serus**, v. 229, p. 11-18, 2002.

- LUKOW, T., DUNFIELD, P.F., LIESACK, W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. **FEMS Microbiol Ecol.** v. 3, p. 241–247, 2000.

- LYSNES, K., BODTKER, G., TORSVIK, T., BJOMESTAD, EO, SUNDE, E. Microbiol response to reinjectionof produced water in an oil reservoir. **Environ Biotechnol.** v. 83, p. 1143-1157, 2009.

- MA, K., LIU, X., DONG, X. *Methanosaeta harundinacea sp*. Nov., a novel acetate-scavenging methanogen isolated from a UASB reactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.** v. 56, p. 127-131, 2006.

- MADIGAN, M.T. MARTINKO, J.M., PARKER, J. Brock Microbiologia de los Microorganismos, 10 edn. **Editorial Pearson-Prentice Hall**: Espanã, 2003.

- MAGURRAN, AE. Measuring Biological Diversity, **Blackwell Science**, Oxford. 256 p. 2004.

- MAH, J.H. CHANG, Y.H., HWANG, H.J. *Paenibacillus tyraminigenes sp*. nov., isolated from Myeolchi-jeotgal, a traditional Korean salted and fermentad anchovy. **In J Food Microbiol**. v. 127, p. 209-214, 2008.

- MALTSEVA, O., MACGOWAN, C., FULTHORPE, R., ORIEL, P. Degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by haloalkaliphilic bacteria. **Microbiology**. v. 142, p. 1115-1122, 1996.

- MARGESIN, R., SCHINNER, F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. **Extremophiles.** v. 5 p. 73-83, 2001.

- MARSH T. L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. **Curr Opin Microbiol**. v. 2, p. 323–327, 1999.

- MARSH, T. L., LIU, W.T., FORNEY, L.J., CHENG, H. Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge. **Water Sci. Technol. Technol.** v. 37, p. 455–460, 1998.

- MARSH, T. L., SAXMAN, P., COLE, J., TIEDJE, J. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 66, p. 3616–3620, 2000.

- MARTIN, S., MARQUEZ, M. C., SANCHEZ-PORRO, C., MELLADO, E., ARAHAL, D. R., VENTOSA, A. Marinobacter lipolyticus sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. v. 53, p.1383-1387, 2003.

- MARTÍNEZ-CHECA, F., CALVO, C., CABA, M.A., FERRER, M.R., BÉJAR, V., QUESADA, E. Effect of nutritional condictions on the viscosity and emulsifying capacity of V2-7 biopolymer from *Volcariella e eurihalina*. **Microbiologia SEM**. v. 12, p. 55-60, 1996.

- MARTÍNEZ-CHECA, F., TOLEDO, F.L., VILCHEZ, R., QUESADA, E., CALVO, C. Yield production, chemical composition, and functional properties of emulsifier H28 synthesized by *Halomonas eurihalina* strain H-28 in media containing various hydrocarbons. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 58, p. 358-363, 2002.

- MARTÍNEZ-CHECA, F., BÉJAR, V., DEL MORAL, A., QUESADA, E. *Alteromonas hispnica* sp. nov., a polyunsaturated-fatty-acid-producing, halophilic bacterium isolated from fuente de Piedra, southem Spain. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 55, p. 2385-2390, 2005a.

- MARTÍNEZ-CHECA, F., BÉJAR, V., MARTÍNEZ-CÁNOVAS, M.J., LLAMAS, I., QUESADA, E. *Halomonas almeriensis sp*.nov., a moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacterium from Cabo de Gata, Almería. South-east. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 55, p. 2007-2011, 2005b.

- MARTÍNEZ-CHECA, F., QUESADA, E., MARTÍNEZ-CÁNOVAS, M.J., LLAMAS, I., BÉJAR, V. *Palleronia marisminoris gen*. Nov., SP. Nov., a moderately halophilic, isolated fron a saline soil. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 55, p. 2525-2530, 2005c.

- MARTINS, L.O., HUBER, R., STETTER, K.O., DA COSTA, M.S, SANTOS, H. Organic solutes in Hiperthermophilic Archaeda. **Appl Environ Microbiol.** v. 63, p. 896-902, 1997.

- MASKOW, T., KLEINSTEUBER, S. Carbon and energy fluxes during haloadaptation of *Halomonas* sp. EF11 growing on phenol. **Extremophiles. v.** 8, p. 133–14, 2004.

- MASSANA R, MURRAY A.E, PRESTON CM MARTÍNEZ-CHECA, F., CALVO, C., CABA, M.A., FERRER, M.R., BÉJAR, V., QUESADA, E., DELONG E.F. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Arquéia in the Santa Barbara Channel. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63, p. 50–56, 1996.

- MATURRANO, L., VALENS-VADELL, M., ROSELLÓ-MORA, R., ANTÓN, J. *Salicola marasensis gen*. nov., sp. nov., an extremely halophilic bacterium isolated from the Maras solar salterns in Perú**. Int J Syst Evol Microbiol.** v. 56, p. 1685-1691, 2006b.

- MCGENITY, J.J., GRANT, W.D. Transfer of *Halobacterium saccharovorum*. *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium frapanic* um NRC 34041 and *Halobacteium lacusprofund* to the genus *Holorubrum gen.* nov. as *Halorubrum saccharovorum comb*. Nov. *Holorubrum sodomense comb*. Nov., *Holorubrum trapanicum comb*. Nov., and *Halorubrum lacusprofundi comb*. nov**. Syst Appl Microbiol**. v. 18, p. 237-243, 1995.

- MCMEEKIN, T.A., NICHOLS, P.D., NICHOLS, S.D., JUHASZ, A. E FRANZMANN, P.D. Biology and biotechnological potential of halotolerant bacteria from Antarctic saline. **Experientia**. v. 49, p. 1042-1046, 1993.

- MELLATO, E., VENTOSA, A. Biotechnological potential of moderately and extremely halophilic microorganisms**. In Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production**. p. 233–256. 2003. Edited by J. L. Barredo. Kerala, India: Research Signpost.

- MELLADO, E., SÁNCHEZ-PORRO, C., MARTÍN, S., VENTOSA, A. Extracellular hydrolytic enzymes produced by moderately halophilic bacteria. En: Halophilic Microorganisms. Ventosa, A. (ed.) **Spinger-Verlag: Heidelberg**, p. 285-295, 2004.

- MESBAH, N.M. HEDRICK, D.B., PEACOCK, A.D., ROHDE, M., WIEGEL, J. *Natranarobius thermophilus gen*. nov., sp. nov., a halophilic, alkalithermophilic bacterium from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt, and proposal of *Natranaerobiaceae fam*. nov. and *Natranaerobiales ord*. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 57, p. 2507-2512, 2007.

- MESBAH, N.M., WIEGEL, J. *Natronovirga wadinatrunensis gen*. nov., sp. nov. and *Natranaerobius trueperi* sp. nov., halophilic, alkalithermophilic micro-organisms from soda lakes of the Wadi An Natrun, Egypt. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 59, p. 2042-2048, 2009.

- MILLER, J.H. Experimental in Molecular Genetics. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press. (ed.), 1972.

- MORGAN, P., WATKINSON, P.J. Hydrocarbon degratadion in soils and methods for soil biotreatment. **CRC critical Rev. Biotech**. v.8, p. 305-353, 1989.

- MULLAKHANBHAI, M.F., LARSEN, H. *Halobacterium volcani spec*. nov. a Dead Sea Habolacterium with a moderate salt requirement. **Arch Microbiol**. v. 104, p. 207-214, 1975.

- MULLER, V., SPANHIMER, R., SNATOS, H. Stress response by soluye accumulation in archaea. **Curr. Opin. Microbiol**. **8**:729-736, 2005.

- MULLINS, T. D., BRITSCHGI, T. B., KREST, R. L., GIOVANNONI, S. J. Genetic comparisons reveal the same unknown bacterial lineages in Atlantic and Pacific bacterioplankton communities. **Limnol Oceanogr.** (ed.). 40, p. 148±158, 1995.

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

- MUMMEY, D.L.; STAHL, P.D. Spatial and temporal variability of bacterial 16S rDNA-based T-RFLP patterns derived fromsoil of two Wyoming grassland ecosystems. **FEMS Microbiol Ecol.** v. 46, p. 113–120, 2003.

- MUÑOZ, J.A., PÉREZ-ESTEBAN, B., ESTEBAN, M., DE LA ESCALERA, S., GÓMEZ, M.A. MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V., GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Growth of moderately halophilic bactéria isolated from sea water using phenol as the sole source. **Folia Microbiol (Praha)**. v. 46, p. 297-302, 2001.

- MUYZER, G; WAAL, E.C; UITTERLINDEN, A G. Profiling Of Complex Microbial Populations By Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis Of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding For 16s Rrna. **Appl Environ Microbiol**. v. 59 (3), p. 695-700, 1993.

- NAMWONG, S., TANASUPAWAT, S., VISESSANGUAN, T. K., IYOH, T. *Halococcus thailandensis* sp. Nov., from fish sauce Thailand, **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 57, p. 2199-2203, 2007.

- NICHOLSON, C.A., FATHERPURE, B.Z. Aerobic biode- gradation of benzene and toluene under hypersaline conditions at the Great Salt Plains, Oklahoma**. FEMS Microbiology Letters.** 245: 257–262. 2005.

- NIELSEN, P.H., BJERG, P.L.,NIELSEN, P.,SMITH, P.,CHRISTENSEN, T.H. *In Situ* and Laboratory Determined First-Order Degradation Rate Constants of Specific Organic Compounds in an Aerobic Aquifer. *Environ. Sci. Technol.* v. *30*, p. 31–37, 1995

- NIETO, J.J., FERNÁNDEZ-CASTILLHO, R., MÁRQUEZ, M.C., VENTOSA, A., QUESADA, E., RUIZ-BERRAQUERO, F. Survey of metal tolerance in moderately holophilic eubacteria. **Appl Environ Microbiol**. v. 52, p. 2385-2390, 1989.

- NIETO, J.J., VARGAS, C. Synthesis of osmoprotectants by moderately halophilic bacteria: Genetic and applied aspects, En Monteville, A. (ed.), **Recent Research Developments in Microbiolog.** vol. 6, Trivandrum: Research Signpost, p. 403-418. 2002

- NORTON, C.F., GRANT, W.D. Survival of halobacteria within fluid inclusions in salt cristal, **J. Gen Microbiol**, v. 121, p. 259-262, 1988.

- OLIVEIRA, R.C.G., OLIVEIRA, M.C.R. Remoção de contaminantes tóxicos dos efluentes líquidos oriundos da atividade de produção de petróleo no mar. **Bol. Tec. Petrobras**, v. 43 (2), p. 129-136, 2000.

- ORELLANA, S. C. Isolamento e Caracterização de Haloarqueas Cultivadas em Compostos Aromáticos e Construção de Ferramentas Moleculares para o Estudo da Secreção Protéica no Domínio Archaea. Tese apresentada à Universidade de Campinas, para obtenção do título de Doutor, 2003.

- OREN, A. GINZBURG, M., GINZBURG, B.Z., HOCHSTEIN, L.I., VOLCANI, B.E. Haloarcula marismortui (Volcani) sp. nov., nov, rev., na extremely halophilic bacterium fron the Dead Sea. **In J Syst Bacteriol**. v. 40, p. 209-210, 1990.

- OREN, A. Estimation of the contribution of archaebacteria and eubacteria to the bacterial biomass and acitivity in hypersaline ecosystems: novel approaches. En: General an Applied Aspects of Halophilic Bacteria. Rodríguez-Valera, F. (ed.). Plenum Press: New York, pp. 25-31, 1991.
- OREN, A., GUVERICH, P., AZACHI, M., HENIS, Y. Microbiol degradation of pollutants at high salt concentrations. **Biodegradation**. v. 3, p. 387-398, 1992.
- OREN, A. Ecology of extremely halophilic microorganisms. En: **The Biology of Halophilic Bacteria.** Vreeland, R.H. y Hochstein, L.J. (eds.). CRC Press: Boca Raton, p. 25-53, 1993.
- OREN, A., GUVERICH, P., AZACHI, M., HENIS, Y. Microbiol degradation of pollutants at high salt concentrations. En: **Microorganisms to Combat Pollution**. Rosenberg, E. (ed.). Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, p. 267-274, 1993.
- OREN, A. The ecology of extremely halophilic archaea. **FEMS Microbiol Rev.** v. 13, p. 415-440, 1994.
- OREN, A. Bioenergetics aspects of halophilism. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 63, p. 334-348, 1999.
- OREN, A. Change of the namos *Haloanaerobiales, Haloanaerobiaceae* and *Haloanaerobium* to *Halanaerobiales, Halanaerobiaceae* and *Halanaerobium*, respectively, and further nomenclatural changes within the order Halanaerobiales. **In J Syst Evol Microbiol**. v. 50, p. 2229-2230, 2000.
- OREN, A., MANA, L. Aminoacid composition of bulk protein and salt relationship of selected enzymes of *Salinibacter ruber*, an extremely halophilic bacterium. **Extremophiles** v. 6 p.217-223, 2002.
- OREN, A. Change of the names *Haloanaerobiales, Haloanaerobiaceae* and *Haloanaerobium* to *Halanaerobiales, Halanaerobiaceae* and *Halanaerobium,* respectively, and further nomenclatural changes within the order Halanaerobiales. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 50, p. 2229-2230, 2002.
- OREN, A. Diversity of halophilic microorganisms: environments. Phylogeny, physiology, and applications. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v. 28, p. 58-63, 2002a.
- OREN, A. Molecular Ecology of extremely halophilic *Archaea* and *Bacteria*. **FEMS Microbial Ecol**. v. 39, p. 1-7, 2002b.
- OREN, A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. **Environ Technol.** v. 31, p. 825-834, 2010.

- OSBORN, A. M.; MOORE, E. R. B; TIMMIS, K. N. An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. **Environmental Microbiolog.** v. 2(1), p. 39-50, 2000.

- PACE, N.R. A Molecular View Of Microbial Diversity And The Biosphere. **Scienc.** v. 276, p. 734-740, 1997.

- PÁEZ, R. Producción de xantano y gelano a partir de coproductos de la industria azucarera. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 2004.

- PATEL, G.B.; SPROTT, G. D. *Methanosaeta concilii* gen. nov., SP. nov. ("Methanothrix concilii") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. ver., comb.nov. **Int J Syst Bacteriol**. v. 40, p. 79-82, 1990.

- PATEL, T. R., GILBSON, D. T. Purification and properties of (+) cis-naphthalene dihydrodiol dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. **Jornal Bacteriology.** v. 119, p. 879-888, 1974.

- PASTOR, J.M., SALVADOR, M., ARGANDOÑA, M., BERNAL, V., REINA-BUENO, M., CSONKA, L.N., IBORRA, J.L., VARGAS, C., NIETO, J.J., CÁNOVAS, M. Ectoines in cell stress protection: uses and biotechnological production. **Biotechnology Advances***. v.* 6 p. 782-801, 2010.

- PERDESEN, K., NILSSON, E., ARLINGER, J., HALLBECK, L., O'NEILL, A.. Distribution, diversity and activity of microorganisms in the hiper-alkaline sring waters of Magarin in Jordan. **Extremophiles***.* v. 8, p. 151-164, 2004.

- PÉREZ-FERNÁNDEZ, M.E., QUESADA, E., GÁLVEZ, J., RUÍZ, C. Effect of Exopolysaccharide V2-7, isolated from *Halomonas eurihalina* on the proliferation in vitro of human peripheral blood lymphocytes. **Immunopham immunotoxicol**. v. 22, p. 131-141, 2000.

- PEYTON, B.M., MOMILE, M.R., ALVA, V., OIE, C., ROBERTO, F., APEL, W.A., OREN, A. Biotransformation of toxic organic and inorganic contaminants by halophilic bacteria. En: **Halophilic Microorganisms**. Ventosa, A. (ed.). Springer-Verlag: Ney York, p. 315-333, 2004.

- PFLÜGER, K., MÜLLER, V. Transport of compatible solutes in extremophiles. **J. Bioenerg. Biomemb.** v. 36, p. 17-24, 2004.

- PIEDAD DIAZ, M., GRIGSON, S.J., PEPPIATT, C.J., BURGESS, J.G. Isolation and characterization of novel hydrocarbondegrading euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. **Mar. Biotechnol**. v. 2, p. 522–532, 2000.

- PHITHAKPOL, B., VARANYANOD, W., REUGMANEEPAITOON, S., WOOD, H. The Traditional Fermented Foods of Thailand. **ASEAN Handling Bureau Level 3: Kuala Lumpur**, 1995.

- POST, F.J. The microbial ecology of the Great Salt Lake. **Microbiol Ecol.** v. 3, p. 143-165, 1977.

- POWELL, S.M.; BOWMAN, J. P. SNAPE, I. Degradation of nonane by bacteria from Antarctic marine sediment. **Polar Biol**. v. 27, p. 573-578, 2004.

- PRITCHARD, P.H., COSTA, C. F. EPA's Alaska oil-spill bioremediation project. **Environ Sci Technol**. v. 25, p. 372–379, 1991.

- QUESADA, E., VENTOSA, A., RODRÍGUEZ-VALERA, F., RAMOS-CARMENZANA, A. Types and poroperties of some bacteria isolated from hypersaline soils. **J. Appl Bacteriol**. v. 53, p. 155-161, 1982.

- QUESADA, E., BÉJAR, V., CALVO, C. Exopolysaccharide production by Volcaniella Eurihalina. **Experientia.** v. 49, p. 1037-1041, 1993.

- QUESADA, E., BÉJAR, V., FERRER, M.R., CALVO, C., LLAMAS, I., MARTÍNEZ-CHECA, F., ARIAS, S., RUÍZ-GARCÍA,. C., PÁEZ, R., MARTÍNEZ-CÁNOVAS, M.J., DEL MORAL, A. Moderately halophilic exopolysaccharide-producing bacteria. En: **Halophilic Microorganisms**. Ventosa, A. (ed.) Spinger-Verlag: Heidelberg, p. 297-314, 2004.

- RADIANINGTYAS, H., ROBINSON, G.K., BULL, A.T. Characterization of a soil-delived bacterial consortium degrading 4-chloroaniline. Microbiology. v. 149, p. 3279-3287, 2003.

- RIBEIRO, C. M.S. Ozonização de Efluentes da Indústria de Petróleo. 1995.

- RÍOS, M., NIETO, J.J., VENTOSA, A. Numerical taxonomy of heavy metal-tolerant nonhalophilic bacteria isolated from hypersaline environments. **Int Microbiol**. v. 1 p. 45-51, 1998.

- ROBERT, E. R. Bioremediation of Petroleum contaminated sites. **CK Smoley Publishers**, New York. 1992.

- ROBERTS, M. Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. **Saline Systems**. v. 1, p.5, 2005.

- RODRÍGUEZ-VALERA, F. Halobacterium. **Investigación y Ciencia**. v. 80, p. 94-102, 1983.

- RODRÍGUEZ-VALERA, F., RUÍZ-BARRAQUERO, F. Halobacterias. **Investigación y Ciencia**. v. 80, p. 94-102, 1983.

- RODRÍGUEZ-VALERA, F., VENTOSA, A., JUEZ, G., IMHOFF. J.F. Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multipond saltem. Microbial Ecol. v. 11, p. 107-115, 1985.

- RODRÍGUEZ-VALERA, F. Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. En F. Rodríguez-Valera (ed.), Halophilic Bacteria. Boca Raton: CRC Press. p. 3-30, 1988.

- RODRÍGUEZ-VALERA, F. Introduction to saline environments. En: **The Biology of Halophilic Bacteria**. Vreeland, R.H. y Hochstein. L. (eds.). CRC Press: Boca Raton, p. 1-23, 1993.

- RODRÍGUEZ-VALERA, F., ACINAS, S.G., ANTÓN, J. Contribution of molecular techniques to the study of microbial diversity in hypersaline environments. En: **Microbiology and Biogeochemistry of Hipersaline Environments.** Oren. A. (ed.). CRC Press: Boca Raton, p. 27-38, 1999.

- ROE, T.I., JOHNSEN, S. Discharges of produced water to the North Sea. In *Environmental Science Research* 52*: Produced Water 2.* ***Environmental Issues and Mitigation Technologies***, eds. M. Reed and S. Johnsen. p. 13–25 1996.

- ROEBLER, M., MÜLLER, V. Quantitative and physiological analyses of chloride dependence of growth of Halobacillus halophilus. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 64 p. 3813-3817, 1998.

- ROESCH, L.F., FULTHORPE, R.R., RIVA. A., CASELLA. G., HADWIN, A.K., KENT, A.D. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **ISME J. V.** 1 P. 283–290, 2007.

- ROH, S.W., NAM, Y.-D., CHANG, H.-W., SUNG, Y., KIM, K.H., OH, H.-M., BAE, J.-W. *Halalkalicoccus jetotgali* sp. Nov., a halophilic archaeon from shrimp jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 57, p. 2296-2298, 2007a.

- ROH, S.W., NAM, Y.-D., CHANG, H.-W., SUNG, Y., KIM, K.H., LEE, H.-J., OH, H.-M., BAE, J.-W. *Natronococcus Jeotgali sp*. Nov., an halophilic archaeon isolated from shrimp jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 57, p. 2129-2131, 2007a.

- ROHBAN, R., AMOOZEGAR, M.A., VENTOSA, A. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracelular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. **J Ind Microbiol Biotechnol**. v.3, p.333-340, 2009.

- RÖLING, W.F.M., MILNER, M. G., JONES, D.M., LEE, K., DANIEL, F., SWANNELL, R. P.J., HEAD, I.M. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill oil spill bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, p.5537-5548, 2002.

- RÖLING, W.F.M., VAN VERSEVELD, H. Characterization of *Tetragenococcus halophila* population in indonesian soy mash (kecap) fermentario. **Appl Environ Microbiol**. v. 62 p. 1203-1207, 1996.

- ROSENBERG, E., RON, E.Z Bioremediation of petroleum contamination, In R.L. Crawford and D.L. Crawford (Eds.), **Bioremediation: principles and Applications**, Cambridge University Press, UK, 100-124, 1996.

- ROZSAK, D.B., COLWELL, R.R., Survival strategies of bacteria in the natural environment. **Microbiological Reviews**, v. 51, p. 365-379, 1987.

- RUSSELL, N. J. Adaptative modifications y membranes of halotolerant and halophilic microorganisms**. J. Bioenerg. Biomembr.** v. 21, p. 3-113, 1989.

- RUSSELL, N. J. Lipids of halophilic microorganisms, p. 163-210. En R. H. Vreeland y L. I. Hochstein (eds.) The Biology of Halophilic Bacteria. Boca Raton: CRC Press, 1993.

- SAIKI, R. K., SCHARF, S. J., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science.** v. 230, p. 1350-1354, 1985.

- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**. v. 239, p. 487-491, 1988.

- SAISITHI, P., KASEMSARN, B., LISTON, J., DOLLAR, A.M. Microbiology and chemistry of fermented fish. **J Food. Sci** v. 31, p. 105-110, 1996.

- SAITOU, N., NEY, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tress. **Mol Biol Evol**. v. 4 p. 406-425, 1987.

- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Harbour Laboratory Press**, New York: Cold Spring Harbor, (eds.). 2001.

- SÁNCHEZ-PORRO, C., MARTÍN, S., MELLADO, E., VENTOSA, A. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. **J Appl Microbiol**. v. 94, p. 295-300, 2003.

- SATOMI, M. KIMURA, B., MIZOI, M. SATO, T., FUJII, T. *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermentad squid liver sauce. **Int J Syst Bacteriol**. v. 47, p. 832-836, 1997.

- SATOMI, M. KIMURA, B., HAYASHI, M., OKUZUMI, M., FUJII, T. *Marinospirilum insulare* sp. nov., a novel halophilic helical bacterium isolated from Kusaya gravy**. Int J Syst Bacteriol**. v. 54, p. 163-167, 2004.

- SAUER, T. C., Volatile liquid hydrocarbon characterization of underwater vents and formation waters from offshore production operation. **Environmental Science & Technology**, v.15, n. 8, p. 917-923, 1991.

- SCHLOSS, P.D., HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 71 (3) p. 1501-1506, 2005.

- SCHNOOR, M., VOSS, P., CULLEN, P., BOKING, T., GALLA, H-J., GALINSKI, E.A., LORKOWSKI, S. Characterization of the synthetic compatible solute homoectoine as a potent PCR enhancer. **Biochem Biophys Res Commun**. v. **322 p.** 867-72, 2004.

- SCHÜTTE, U. M. E.; ABDO, Z.; BENT, S. J.; SHYU, C.; WILLIAMS, C. J.; PIERSON, J. D.; FORNEY, L. J. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 80, p. 365–380, 2008.

- SCHWERMER, C. U.; LAVIK, G.; ABED, R.M.M.; DUNSMORE, B.; FERDELMAN, T.G.; STOODLEY, P.; GIESEKE, A DE BEER, D. Impact of nitrate on thestructure and function of bacterial biofilm communities inpipelines used for injection of seawater into oil fields. **Appl Environ Microbiol.** v. 74, p. 2841-2851, 2008.

- SETTE, L.D., SIMIONI, K.C., VASCONCELLOS, S.P., DUSSAN, L.J., NETO, E.V., OLIVEIRA, V.M. Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore Brazil-ian basin. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 91 p. 253–266, 2007.

- SILVA, I. S. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos Policíclicos utilizando consórcios microbianos Visando a biorremediação de solos contaminados. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos, 2007.

- SOROKIN, D.Y., TOUROVA, T.P., GALINSKI, E.A., BELLCOH, C., TINDALL, B.J. Extremely halophilic denitrifying bacteria from hypersaline inland lakes. *Holovibrio denitrificans sp*. nov. and *Halospina denitrificans gen*. nov., sp. nov., and evidence that the genus name Halovibrio Fendrich 1989 with the type species *Halovibrio variabilis* should be associated with DSM 3050. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 56, p. 379-388, 2006.

- SOROKIN, D.Y., TOUROVA, T.P., GALINSKI, E.A., MUYZER, G., KUENEN, J.G. *Thiohalorhabdus denitrifican* gen. nov., sp. nov. and extremely halophilic, sulfur-oxidizing. Deep-lineage

gammaproteobacteria from hypersaline habitats. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 58, p. 2890-2897, 2008a.

- SOROKIN, D.Y., TOUROVA, T.P., MUYZER, G., KUENEN, J.G. *Thiohalospira halophila gen*. nov., sp. nov. and *thiohalospira alkaliphila* sp. nov., novel obligately chemolithoautotrophic, halophilic, sulfur-oxidizing gammaproteobacteria from hypersaline habitats. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 58, p. 1685-1692, 2008b.

- SPRING, S., LUDWIG, W., MARQUEZ, M.C., VENTOSA, A., SCHLEIFER, K. H. *Halobacillus* gen. nov., with descriptions of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. **Int J Syst Bacteriol.** v. 46, p. 492–496, 1996.

- STAPLETON R. D.; SAVAGE, D. C.; STACEY, G. Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment. **Applied Environment Microbiology.** v. 64, p.4180-4184.

- SUBOW, N.N. (1931). Oceanographical tables. **Commisariat**, 1998.

- Sutherland. I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends Biotechnol**. v. 16, p. 41-46, 1998.

- SUTHERLAND. I.W. Biotechnology of exopolysaccharides. **Cambridge university Press**: New York, p. 20-38, 1990. (ed.).

- SUTTON, G. C., RUSSELL, N. J., QUINN, P. J. The effect of salinity on the phase behaviour of total lipids extracts and binary mixtures of the major phospholipids isolated from a moderately halophilic eubacterium. **Biochim. Biophys**. **Acta.** v. 1061 p. 235-246, 1991.

- SUZUKI, M.; RAPPE, M.S.; GIOVANNONI, S.J. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 64, p. 4522-4529, 1998.

- SUZUKI, M.T.; GIOVANNONI, S. J. Bias caused by template annealing in the ampliÆcation of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology.** v.62, p. 625-630, 1996.

- SWANNELL, R. P., HEAD, I. M. Nature, v. 368, p. 396–397, 1994.

- TAGGER, S., BIANCHI, A., JULLIARD, M., LE PETIT, J., ROUX, B. Effect of microbial seeding of crude oil in seawater. **Marine Biology.** v. 78(1), p. 13-21, 1983.

- TAKESHI TERAHARA, T; HOSHINO, T, TSUNEDA, S, HIRATA, A. INAMORI, Y. Monitoring the Microbial Population Dynamics at the Start-Up Stage of Wastewater Treatment Reactor by

Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Based on 16S rDNA and rRNA Gene Sequences. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 98, p. 425-428, 2004.

- TANASUPAWAT, S., KOMOGATA, K. Lactic acid bactéria in femented foods in Southeast Asia. *En*: Microbiol Diversity in Asia Techonology and prospects. Naga B.H., Tan, H.M. y Suzuki, K-I. (eds.). **World Scientific Publishing Co. Pte**.: Singapore, p. 43-59, 2001.

- TANASUPAWAT, S., PAKDEETO, A. NAMWONG, S., THAWAI, C., KUDO, T., ITOH, T. *Lentibacillus halophilus* sp. nov., from fish sauce in Thailand. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 56, p. 1859-1863, 2006.

- TANASUPAWAT, S., NAMWONG, S., KUDO, T., ITOH, T. *Piscibacillus salipiscarius gen*. nov., sp., nov., a moderately halophilic bacterium from fermented fish (pla-ra) in Thailand**. Int J Syst Evol Microbiol**. v. 57, p. 1413-1417, 2007.

- TAPINGKAE, W., TANASUPAWAT, S., ITOH, T., PARKIN, K.L., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W. *Natrinema gari sp*. nov., a halophilic aschaeon isolated fish sauce in Thailand. **In J Syst Evol Microbiol**. v. 58, p. 2378-2383, 2008.

- TELANG, A. J., EBRTZ. S., FOGHT, J. M., WESTLAKE, D. W. S., JENNEMAN, G. E., GEVERTZ. D., VOORDOUW. G. Effect of nitrate injection on the microbial community in an oil field as monitored by reverse sample genoma probing. Appl. **Environ Microbiol**. v. 63, p. 1785-1793, 1997.

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

- TENCHOV, B., VESCIO, E. M., SPROTT, G. D., ZEIDEL, M. L. E MATHAI, J. C. Salt tolerance of archaeal extremely halophilic lipid membranes. **J. Biol. Chem.** v. 281, p. 3275-3287, 2006.

- THOMPSON, J.D. HIGGINS, D.G. GIBSON, T.J. CLUSTAL, W. Improving the sensitiviy of progressive multiple alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v. 22, p. 4673-4680, 1994.

- THONGTHAI, C. E SUNTINANALERT, P. Halophiles in Thai fish sauce (nam pla). En: **General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms**; Rodríguez-Valera, F. (ed.). Plenum Press: New York, pp. 381-388, 1991.

- TIEDJE, J. M.; ASUMING-BREMPONG, S.; NUSSLEIN, K.; MARSH, T. L.; FLYNN, S. J. Opening the black box of soil microbial diversity. **Appl. Soil Ecol.** v. 13, p. 109-122, 1999.

- TIQUIA, S. M. Microbial community dynamics in manure composts based on 16s and 18s rDNA T-RFLP profiles. **Environmental Technology.** v. 26, p. 1101-1113, 2005.

- TOMLINSON, G.A., HOCHSTEIN, L.L. *Halobacterium sacharovorum sp*. nov. a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. **Can J Microbiol**. v. 22, p. 587-591, 1976.

- TORREBLANCA, M. RODRÍGUEZ-VALERA, F., JUEZ, G., VENTOSA, A., KAMEKURA, M., KATES, M. Cassification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *haloarcula gen*. nov. *Haloferax gen* nov. **Syst Appl Microbiol**. v. 8 p. 89-99, 1986.

- TRENZ, S. P., ENGESSER, K. H., FISHER, P., KNACKMUSS, H-J. Degradation of fluoreno by brevibacterium sp starin dpo-1361- a novel c-c bond- cleavage mechanism via 1,10-dihydro 1,10- dihydroxyfluoren-9-one **Journal Bacteriology.** v.176, p. 789-795, 1994.

- UCHIDA, K., KANBE, C. Occurrence of bacteriophages lytic for *Pediococcus halophilus*, a halophilic lactic-acid bacterium, in soy saude fermentation. **J Gen Appl Microbiol**. v. 39, p. 429-437, 1993.

- URSZULA, G., IZABELA, G., DANUTA, W., SYLWIA, T. Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation. Brazilian Journal of Microbiology. v.40, 2009.

- VALENZUELA-ENCINAS, C., NERIA-GONZÁLEZ, I., ALCÁNTA-HERNÁNDEZ, R.J., ENRÍQUEZ-ARAGÓN, J.A., ESTRADA-ALVARADO, I., HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C., DENDOOVEN, L., MARSCH R. Phylogenetic analysis of the archaeal community in na alkaline-saline soil of the former lake Texcoco (Mexico). **Extremophiles**. v. 12, p. 247-254, 2008.

- VAN DE KRAAN, G. M.; BRUINING, J.; LOMANS, P. B.; VAN LOOSDRECHT, M. C.M.; MUYZER, G. Microbial diversity of an oil-water processing site and its associated oil field: the possible role of microorganisms as information carriers from oil-associated environments. **FEMS Microbial Ecol.** v. 71, p. 428-443, 2010.

- VAN DE PEER, Y., CHAPELLE, S., DEWACHTER, R. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. **Nucl. Acid Res. Res.** v. 24, p. 3381–3391, 1996.

- VARGAS, C., NIETO, J. J. Genetic tools for the manipulation of moderately halophilic bacteria of the family Halomonadaceae, p. 183-208. En A. Lorence y P. Balbás (eds.), Methods in Molecular Biology, vol 267, Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols, 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2004.

- VENOSA, A.D., HAINES, J.R., AND ALLEN, D.M. Efficacy of commercial inocula in enhancing biodegradation of crude oil contaminating a Prince William Sound beach. **J. Ind. Microbiol.** v. 10, p. 1-11, 1992.

- VENOSA, A. D., SUIDAN, M. T., WRENN, B. A., STROHMEIER, K. L., HAINES, J. R., EBERHART, B. L, KING, D.W., HOLDER, E. Bioremediation of experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. **Environmental Science and Technology.** v. 30, p. 1764-1775, 1996.

- VENOSA, A.D. Oil spill bioremediation on coastal shorelines: a critique. In: S.K. Sikdar & R.I. Irvine (Eds.), Bioremediation: Principles and Practice. Vol. III. Bioremediation Technologies. Technomic, Lancaster, PA, p 259-301, 1998.

- VENTOSA, A., MARQUEZ, M.C., RUÍZ-BERRAQUERO, F. AND KOCUR, M. *Salinicoccus roseus gen*. nov., a new moderately halophilic Gram-positive coccus. **Syst. Appl. Microbiol**. v. 13, p. 29–33, 1990.

- VENTOSA, A., NIETO, J.J. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. **World journal of microbiology and biotechnology.** v. 11, p. 85-94, 1995.

- VENTOSA, A., OREN, A. *Halobacterium salinarum nom*. Corrig., a name to replace halobacterium salinarum (Elazari-Volcani) and to include halobacterium halobium and halobacterium cutirubrum. **Int J Syst Bacteriol.** v. 46, p. 347, 1996.

- VENTOSA, A., MÁRQUEZ, M.C. GARABITO, M.J. E ARAHAL, D.R. Moderately halophilic Gram positive bacterial diversity in hypersaline environments. **Extremophiles.** v. 2, p. 297-304, 1998a.

- VENTOSA, A., NIETO, J. J. Y OREN, A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**. v. 62, p. 504-544, 1998a.

- VENTOSA, A., SÁNCHEZ-PORRO, C., MARTÍN, S., MELLADO, E. Halophilic archaea and bactéria as a source of extracellular hydrolytic enzymes. En: Adaptation to Life at High Salt Concentrations in Archaea, Bacteria, and Eukarya. Gunde-Cimerman, N., Oren, A. y Plemenitas, A. (eds.). Spinger-Verlag: Heidelberg, pp. 339-354, 2005.

- VENTOSA, A. Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. Em: **Prokaryotic Divertiy: Mechanisms and Significance**. Logan, N.A.; Lappin-Scott, H.M. y Oyston, P.C.F. (Eds.). Combrigge University Press: Combridge, p. 223-253, 2006.

- VON SPERLING, M. Lodos Ativados. Princípios do tratamento biológico de Águas Residuárias, 2ª Ed. v. 4, 1997.

- WANG, Y.-N., CAI, H., CHI, C.-Q., LU, A.-H., LIN, X.-G., JIANG, Z.-F., WU, X.-L. *Halomonas shengliensis* sp. Nov., a moderately halophilic, denitrifyng, crude-oil utilizing bacterium. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 57, p. 1222-1226, 2007a.

- WARD, D.M., BROCK, T.D. Hydrocarbon degradation in hypersaline environments. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 35, p. 353–359, 1978.

- WARD, D.; BATESON, M.; WELLER, R.; RUFF-ROBERTS, A. Ribosomal RNA Analysis Of Microorganisms As They Occur In Nature. **Adv. Bacter. Ecol.** v. 12, p. 219-286, 1992.

- WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 16s Rnar Sequences Reveal Numerous Uncultured Microorganisms In A Natural Community**. Nature**. v. 345, p. 63-65, 1990.

- WATANABE, K.; KODAMA, Y.; HAMAMURA, N.; KADU, N. Diversity, abundance and activity of archaeal populations in oil contaminated groundwater accumulated at the bottom of an underground crude oil storage cavity. **Appl. Environ. Microbiol**. v. 68, p. 3899-3907.

- WATANABE, K., FUTAMATA, H. AND HARAYAMA, S. Understanding the diversity in catabolic potential of microorganisms for the development of bioremediation strategies. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 81, p. 655–663, 2002.

- WELSH, D. T. Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: From single cells to global climate. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 24, p. 263-290, 2000.

- WHITELEY, A.S., BAILEY, M.J. Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation system. **Appl. Environ Microbiol**. v.66, p.2400-2407, 2000.

- WILDEMAN, S.; NEUMANN, A.; DIEKERT, G.; VERSTRAETE, W. Growth-substrate dependent dechlorination of 1,2 dichloroethane by a homoacetonic bacterium. **Biodegradation**. v. 14, p. 241-247, 2003.

- WILLIAMS, W.D. Inland salt lakes: an introduction. **Hydrobiology**. v. 81, p. 1-14, 1981.

- WOESE, C.R., FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary hingdoms. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 74, p. 5088-5090, 1977.

- WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiol Rev**. v. 51, p. 221-271, 1987.

- WOOLARD., IRVINE. Biological treatment of hypersaline wasterwater by a biofilm of halophilic bacteria. **Water environment research**. v.66, n. 3, 1994.

- WU Z, DONG H, ZOU L, LU D, LIU Z. Appl Biochem Biotechnol. Feb 18, 2011.

- YACHAI, M., TANASUPAWAT, S., ITOH, T., BENJAKUL, S., VISESSANGUAN, W. Y VALYASEVI, R. *Halobacterium piscisalsi sp*. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 58, p. 2136-2140, 2008.

- YANCEY, P. H. Compatible and counteracting solutes, p. 81-109. *En* K. Strange (Ed.), Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. Boca Raton: CRC Press, 1994.

- YANCEY, P. H. Organic osmolytes as compatible solutes, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other estresses. **J. Exp. Bot.** v. 208, p. 2819-2830, 2005.
- YE, D., SIDDIQI, M.A., MACCUBBIN, A.E., KUMAR, S., SIKKAR, H, C. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis.* **Environmental Science & Technology**, v.30,p.136-142, 1996.

- YOON, J.H., LEE, K.C., KHO, Y.H., KANG, K.H., KIM, C.J, PARK, Y. H. Halomonas alimentaria sp. nov., isolalet from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 52, p. 123-130, 2002.

- YOON, J.H., YEOM S.H., OH, T.K., PARK, Y. H. *Psychrobacter alimentarius sp*. nov., isolated from squid jeotgal, a traditional Korean fermentad seafoof. **Int J Syst Evol Microbiol**. v. 55, p. 171-176, 2005.

- YOSHIDA, N., YAGI, K., SATO, D., WATANABE, N., KUROISHI, T., NISHIMOTO, K., YANAGITA, A., KASURAGI, T., KANAGAWA, T., KURANE, R., TANI, Y. Bacterial communities in petroleum oil stockpiles, **J. Biosci. Bioeng.** v. 99, p. 143-149, 2005.

- YU, I.K., KAWAMURA, F. *Halomethanococcus doii gen*. nov., sp. nov.: an obligately halophilic methanogenic bacterium from solar salt ponds. **J Gen Appl Microbiol.** v. 33, p. 303-310, 1988.

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

- ZHANG, K., HUA, X. F., HAN, H. L., WANG, J., MIAO, C. C., XU, Y. Y., et al. Chemosphere, 73, 1387–1392. Enriched Microbial Community in Bioaugmentation of Petroleum-Contaminated Soil in the Presence of Wheat Straw, 2008.

- ZHILINA, T.N.; ZAVARZIN, G.A. Extremely halophilic, methylotrophic, anaerobic bacteria. **FMS Microbial Rev.** v. 87, p. 315-322, 1990.

- ZHILINA, T.N.; ZAVARZIN, G.A., DETKOVA, E.N., RAINEY, F.A. **Natroniella acetigena gen**. nov. sp. nov., an Extremely Haloalkaliphilic, Homoacetic Bacterium: A New Member of Haloanaerobiales. **Curr Microbiol.** v. 32, p. 320-326, 1996.

# *PARTE III: CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DA BACTÉRIA <u>HALOMONAS ORGANIVORANS</u> ENVOLVIDOS NA DEGRADAÇÃO DO FENOL*

# *INTRODUÇÃO*

Até pouco tempo atrás, a biorremediação de ambientes extremos não havia recebido muita atenção, embora muitos dos ecossistemas contaminados apresentassem temperaturas altas ou baixas e fossem extremamente ácidos ou alcalinos, possuem pressão alta e alta salinidade. Os micro-organismos extremófilos estão adaptados para crescerem em tais ambientes hostis e por isso, constituem uma potencial ferramenta para a remediação desses ambientes contaminados (Margesin & Schinner, 2001)

Os ecossistemas salinos são considerados os habitats extremos mais submetidos à contaminação, em virtude de atividades indústrias e também de efluentes urbanos (Borgne *et al*., 2008). A concentração de sal nesses ambientes pode variar de 3,5% (p/v), do total de sais dissolvido. Além disso, diferentes indústrias tais como as petrolíferas geram uma quantidade enorme de borras oleosas e águas residuárias salinas (salmouras oleosa e águas de produção), com salinidade de até 10% (p/v). Os principais contaminantes destas águas de produção são compostos aromáticos e hidrocarbonetos, incluindo compostos fenólicos (Alva & Peyton, 2003).

Os micro-organismos convencionais são incapazes de manter seu metabolismo em ambientes com altas salinidades (Oren, 2002; Pieper & Reineke, 2000), sendo a capacidade de degradar compostos diminuída com o aumento da salinidade. Assim, para que o tratamento biológico de efluentes industriais salinos e a biorremediação de ambientes com altas salinidades sejam efetivos, é necessários a utilização do potencial metabólico dos micro-organismos halofílicos. Não há muitos relatos sobre estudos de maneira sistemática da degradação ou transformação de poluentes orgânicos por microrganismos halofílicos ou halotolerantes, e poucos estudos relataram o potencial biotecnológico deste grupo de extremófilos na descontaminação de ambientes salinos (Margesin & Schinner, 2001; Mellado & Ventosa, 2003; Borne *et al*., 2008). Os micro-organismos halofiílicos moderados (crescimento ótimo em 7,5-10% (p/v) NaCl) constituem o grupo mais versátil para serem utilizados nos processos de descontaminação biológica ( Ventosa *et al*.,1998).

A maioria das informações sobre a degradação de poluentes em ambientes salinos diz respeito a estudos ecológicos realizados nestes ambientes contaminados; porém, escassas informações são encontradas com relação à prevalência das vias catabólicas envolvidas na degradação da matéria orgânica por micro-organismos halófílicos moderados. Na verdade, exceto sequências parciais dos genes responsáveis pela produção da enzima catecol 2,3 - dioxigenase obtidos a partir de isolados em lagos salinos (Brusa *et al*., 2001), e a caracterização dos genes que codificam enzimas para a degradação de ácido benzóico e de p-hidroxibenzóico por *Chromohalobacter* sp. HS-2 (Kim *et al*., 2001), não há mais dados disponíveis sobre os genes de degradação de compostos aromáticos por bactérias halofílicas moderadas.

Em um estudo ecológico em ambientes salinos contaminados com compostos aromáticos, visando o isolamento de linhagens de bactérias halofílicas moderadas, as quais poderiam ser úteis no desenvolvimento e otimização dos processos de biorremediação, um importante grupo de 11 cepas com a capacidade de degradar compostos aromáticos, incluindo compostos fenólicos foi caracterizado, mostrando uma grande afinidade com o gênero *Halomonas* (Garcia *et al*.,2004). Uma nova espécie chamada *Halomonas organivorans* foi proposta como espécie modelo para estudos de degradação em ambientes salinos pela sua capacidade em degradar compostos aromáticos, utilizando estes como única fonte de carbono e energia (Garcia *et al*., 2005).

Embora haja muitos relatos sobre a mineralização total do fenol e também sobre a descrição de inúmeras vias catabólicas em bactérias, (Mellado & Ventosa, 2003; Nieto *et al*., 1989; Oren, 2002), esta informação carece de mais estudos no que tange as de bactérias halofílicas. Em bactérias não-halofílicas, quando estas catabolizam compostos aromáticos, como o fenol, esses são convergidos pela via de degradação do catecol (Pieper & Reineke, 2000). A cisão do anel aromático é catalisada por dioxigenases e ocorre através das rotas *orto* ou *meta* clivagem, que é seguido por medidas de melhoria da via catabólica, que finalmente convertendo os metabólitos produzidos em intermediários do ciclo do ácido cítrico (cilclo de Krebs).

# *OBJETIVOS*

Esta parte do trabalho teve como objetivo:

- ✓ Caracterizar a rota catabólica da linhagem *Halomonas organivorans* na degradação de compostos aromáticos;

- ✓ Demonstrar a via de degradação utilizada no rota do β-ketoadipato e as enzimas envolvidas através do conhecimento dos genes codificados.

# *MATERIAL E MÉTODO*

## II. 1. LINHAGEM, PLASMÍDIO E MEIO DE CULTURA ULTILIZADOS

A linhagem *Halomonas organivorans* foi, rotineiramente, cultivada em meio salino (SW), com uma concentração final de 10% (p/v) de sais (SW-10), suplementado com 0,5% (p/v) de extrato de levedura (Difco) (Nieto *et al.*,1989), Para as análise de RT-PCR, a mesma linhagem foi crescida em meio mínimo M63 (Csonka, 1982), contendo 5 mM de ácido benzóico ou glicose ou 2,5 mM de fenol como única fonte de carbono. O pH dos meios foi ajustado para 7,2 com KOH. *Escherichia coli* DH5α foi utilizada para a subclonagem de rotina sendo utilizado o meio Luria-Bertani (LB) do meio (Sambrook *et al*., 1989); e quando necessário, meio sólido foi produzido com 1,8% (p/v) de ágar bacteriológico (Difco). Quando necessário, os antibióticos ampicilina (30 mg ml-1) e canamicina (50 mg ml-1) foram adicionados aos meios. O vetor pGEM-T Easy (Promega) (resistente à ampicilina) foi utilizado para subclonagem dos produtos de PCR e os fragmentos de DNA de enzimas de restrição. O hospedeiro de clonagem do vetor PEZ seq (Lucigen) (resistente à canamicina) foi usado para construir uma biblioteca genômica de *H. organivorans.* Todas as enzimas de restrição (Amersham Biosciences) foram utilizados como recomendado pelos fabricantes. Os *primers* foram sintetizados por MWG Biotech. O padrão de protocolos de biologia molecular foram seguidos como descrito por Sambrook & Rusell, 2001.

## II.2 MANIPULAÇÃO DO DNA

Os procedimentos de manipulação do DNA e o isolamento do DNA plasmidial foram realizados de acordo com Sambrook, *et al*., 1989. As análises de *Southern blot* foram realizadas utilizando sondas marcadas com digoxigenina, de acordo com as instruções do fabricante (Roche).

## II.3. AMPLIFICAÇÃO DO GENE 1,2-CTD

A presença de genes catabólicos que codificam enzimas-chave das vias metabólicas da *H. organivorans* foi detectada através de amplificação por PCR utilizando *primers* degenerados para o gene 1,2-CTD. Os primers para a amplificação foram os seguintes:

| ***Primers*** | **Sequencias** |
|---|---|
| cat1 | 5'-ACCATCGARGGYCCSCTSTAY-3 |
| cat 3 | 5`-GTTRATCTGGGTGGTSAG-3` |

Os primers foram projetados a partir de duas regiões diferentes conservadas de 1,2-CTD, abrangendo os resíduos 100-106 e 232 -237 de *Acinetobacter radioresistens* (Acesso No. AAG16896). Cada reação de PCR continha: 5 µl de tampão de reação 10x (Promega), 2,5 µl de 25 mM MgCl2, 8 µl de dNTPs (200 mM cada), 50 pmol dos *primers* apropriados, 0,25 µl de Taq polimerase (Promega) e água destilada estéril para ajustar o volume total de 50 µl. As condições de PCR para a amplificação do gene que codifica a 1,2-CTD consistiu de um ciclo inicial de 5 min a 95 °C, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. Os produtos amplificados foram analisados em géis de agarose a 1% (p/v) e fotografados com iluminação UV.

## II.4. ANÁLISE FILOGÉNETICA

O 16S RNAr dos nucleotídeos (c. 1500 pb correspondente às posições 1-1500 do gene 16S rRNA de *Escherichia coli*) e as seqüências dos nucleotídeos *cat* A (c. 840 pb) a partir de γ, β,-α Proteobacteria e dos filos *Actinobacteria* foram recuperados de bancos de dados com os seguintes números de acesso: *Chromohalobacter sp*. HS-2 [GenBank: EU045305] / [GenBank: EU155151, as posições 15199-16173], *Marinobacter Coryrhynchus* DSM 16394T [GenBank: AJ294359] / [GenBank: NZ_ABCP01000005, posições 73.804-74.094], *Marinomonas sp*.MWYL1 [GenBank: EF094505] / [GenBank: NC_009654, posições 3434825-3435742], *Pseudomonas* sp. MT1 [GenBank: DQ026293] / [GenBank: DQ026294, posições 7076-7999], *Acinetobacter* sp. ADP1 [GenBank: AY289925] / [GenBank: NC_005966, posições 1439848-1440783], *Bordetella petrii* DSM 12804 [GenBank: NC_010170, posições 3503937-3502452] / [GenBank: NC_010170, posições 3957681-3958436], *Ralstonia metallidurans* DSM 2839 [GenBank : NC_007973, posições 3617953-3616427] / [GenBank: NC_007973, posições 1543053-1.543.976], *Paracoccus denitrificans* PD1222 [GenBank: NC_008687, posições 141979-143453] / [GenBank: NC_008687, posições 1147377-1148315], *Xanthobacter autotrophicus* Py2 [GenBank : NC_009720, posições 2150387-2151864] / [GenBank: NC_009720, posições 4830443-4831357] e *Rhodococcus erythropolis* PR4 [GenBank: NC_012490, posições 4279557-4281076] / [GenBank: NC_012490, posições 5872478-5873317].

As sequências foram alinhadas com o 16S rRNA do gene cat A de *Halomonas organivorans,* usando o software ClustalW (versão. 1.81) com BLOSUM62, sendo as matrizes editadas manualmente. A árvore filogenética foi construída usando o método Neighbour-joining.

## II.5. CONSTRUÇÃO E TRIAGEM DA BIBLIOTECA DE GENES DA *H.ORGANIVORANS* EM *E.COLI*

O banco genético da *Halomonas organivorans* foi construído no vetor PEZ seq (Lucigen). O DNA genômico da *H. organivorans* foi parcialmente digerido com BamHI e os fragmentos de DNA separados e clonados no sítio BamHI de seq Pez. As alíquotas da reação foram usado as para

transformar células de *E. coli* DH10B (Invitrogen), que sequencialmente foram cultivadas em placas contendo LB Agar, acrescido de canamicina para a seleção de clones recombinantes. Estes foram selecionados aleatoriamente. A triagem da biblioteca foi realizada com base na hibridização direta das colônias, usando uma sonda marcada com digoxigenina e um kit de detecção específica (Boehringer Mannheim). Como sonda, um fragmento de 412 pb do gene da *cat*A foi amplificado utilizando os *primers* específicos cat1 e cat.

## II.6. OBTENÇÃO DO RNA, PREPARAÇÃO DE cDNA e RT-PCR

Para a obtenção do RNA da *Halomonas organivorans*, 5 mL de culturas na fase exponencial do crescimento(D.$O_{600nm}$ = 0,5-0,7) em meio mínimo M63, contendo ácido benzóico, glicose (5 mM) ou fenol (2,5 mM) foram colhidas. O RNA foi extraído usando o High Pure RNA Isolation Kit (Roche). O DNA contaminantes na preparação do RNA foi tratado duas vezes com DNase (Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de RNA foram armazenadas a -80□C até o momento do uso. Foram tomadas precauções durante o experimento para manter um ambiente livre de RNase. A retrotranscripição foi realizada com 5 mg do RNA extraído em um volume total de 20 µl utilizando um transcritor First Strand cDNA Synthesis Kit com *primers* hexâmero randômico (Roche). O cDNA resultante foi armazenado a -20□C para os experimentos de PCR. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se 30 ciclos de 45 a 96□C, 30 segundos a 60□C e 45 seg a 72□C. Três pares de *primers* foram desenhados com base em regiões CatB-CATC, CATC-cata e Bena-benB respectivamente: RT-1F/RT-1R, RT-2F/RT-2R e RT-4F/RT-4R (tamanhos esperados 881 pb, 866 pb e 197 pb). Os controles positivos e negativos foram incluídos em todos os ensaios.

| ***Primers*** | **Sequencias** |
|---|---|
| RT-1F | GGCGATCGGGCAAGCGTCAG |
| RT-1R | GCTGTCGTCGTCACGGATCG |
| RT-2F | GAAACTGCCGCCGGAGATGC |
| RT-2R | CTCGGCGTCGGTGATGATCG |
| RT-4F | GGGGCTCTCTACGTGCTGCAC |
| RT-4R | CAGGTCAGCCATTCGTCCCAC |

## II.7. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

Para a análise das sequências pesquisas foram realizadas utilizando o banco de dado, Blastx programa do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast). As (ORFs) foram identificadas com o programa ORF Finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.htlm). O alinhamentos de proteínas e nucleotídeos foram realizados usando o programa ClustalW (versão 1.81) da EBI (European Bioinformatics Institute). A análise de proteínas foi realizada utilizando os programas do Proteomics ExPASy Server (Expert Protein Analysis System), incluindo PROTPARAM (http://www.expasy.ch/tools/protparam.html), e a busca por domínios conservados foi realizada com CDD (http : / www.ncbi.nlm.nih.gov / gorf / Estrutura / cdd.shtlm / CDD).

# *RESULTADOS*

## *III. 1.* ISOLAMENTO E CLONAGEM DOS GENES CAT EM *H.ORGANIVORANS*

Para isolar os genes responsáveis pelo catabolismo dos compostos fenólicos pela *H. organivorans*, foi construída uma biblioteca de genes utilizando o vetor PEZ, A catecol 1,2-dioxigenase constitui uma enzima-chave na via *β-ketoadipate*. Assim, *primers* degenerados foram desenhados baseados em seqüências de genes conservados 1,2-CTD de várias bactérias com potencial de degradação. Para amplificar um fragmento conservado interno do gene que codifica a 1,2-CTD, foram utilizados DNA total da *H. organivorans* e os *primers* degenerados cat1 e cat3. Um fragmento de 412 pb foi amplificado, clonado e posteriormente e sequenciado, revelando homologia com sequências de nucleotídeo dos genes 1,2-CTD de *Chromohalobacter sp*. HS2, *Pseudomonas sp*. MT1 e *Pseudomonas fluorescens* SBW24 (79%, 75% e 72% de identidade, respectivamente). A seleção da biblioteca, foi usado fragmentos de DNA amplificados com 412 pb como sonda. Quatro clones de *E. coli* foram positivos e designados A1, D14, H7 e P20. Esses clones foram analisados sendo insertados em plasmídeos. Os plasmídeos pHA1 e pHD14 (5,555 e 3,971pb fragmento insertado, respectivamente) foram selecionados para o sequenciamento e caracterização mais detalhadamente.

## III.2 SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DOS GENES CAT E REGIÕES FRANQUEADAS

Após sequenciamento dos plasmídeos pHA1 e pHD14, uma região de 4.265 pb foi analisada e foram encontradas 6 ORFs. De acordo com pesquisas de similaridade de sequência, essas ORFs correspondem a genes *cat* e *ben*. Análises no BLAST indicaram alta similaridade com os genes *cat*A, c*at*B, *ca*tC e o um regulador *cat*R. Esses genes codificam a 1,2-CTD, cis, cis-cycloisomerase muconato, muconolactona, delta-isomerase e um regulador de LysR tipo de transcrição, respectivamente.

## III.3. ANÁLISE DOS GENES CATABÓLICOS EM *H. ORGANIVORANS*

O *cat*A codifica uma proteína de 324 resíduos de aminoácidos com um peso molecular calculado de 35,38 kDa. A análise das sequência, utilizando BLAST, revelou que o gene *cat*A codifica a 1,2-CTD, mostrando alta similaridade com o 1,2-CTD de *Chromohalobacter sp*. HS2, *Marinobacter Coryrhynchus* DSM 16394T e *Marinobacter sp*. ELB17 (87%, 78% e 75%, respectivamente). Análise das seqüências de aminoácidos de 1,2 CTD de *H. organivorans* revelaram a presença de domínios conservados, incluindo os sítios ativos, Fe - ligantes e sites de lipídios de ligação como em destaque na Figura 42.

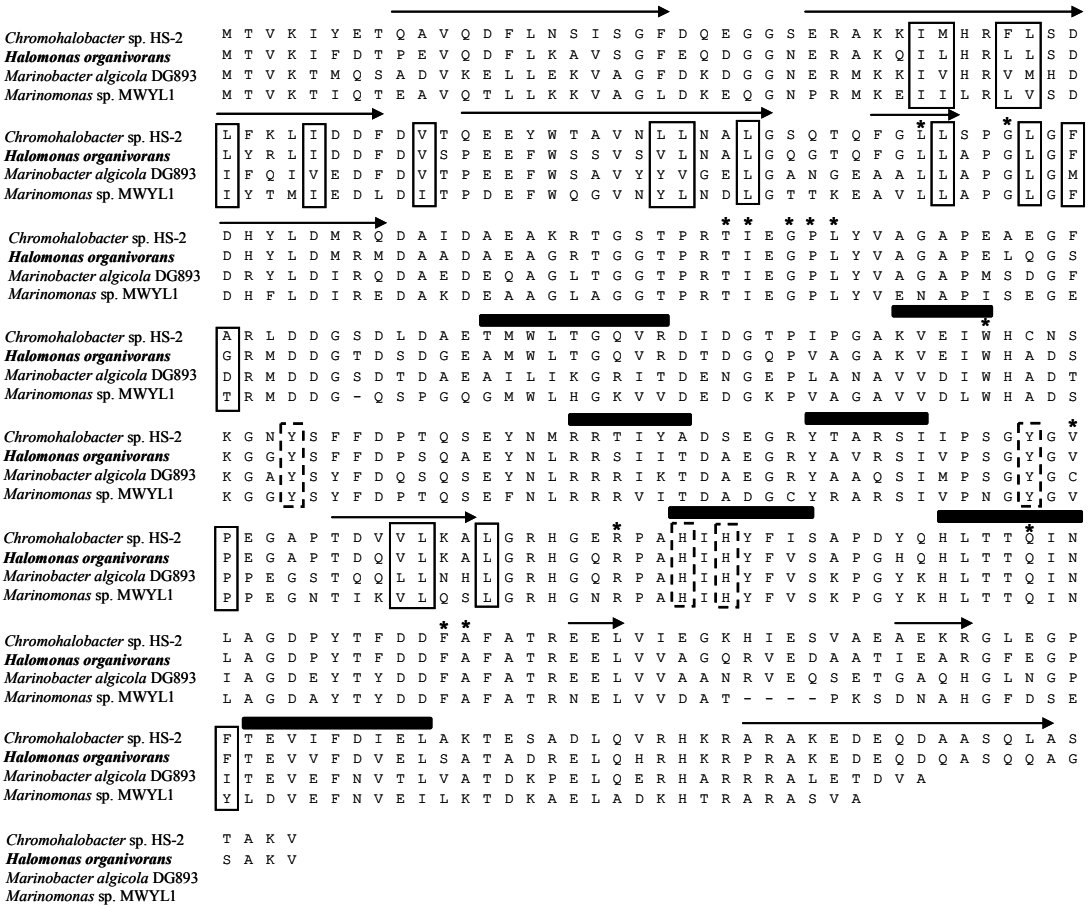



**Figura 42.** Alinhamento das sequências da catecol 1,2-dioxigenase da *Halomonas organivorans* com genes relacionados de outras bactérias halofílicas.

Três sítios ativos (Leucina 73, Glicina 106 e Ile 104) foram identificados no catabolismo da dioxigenases intradiol. Além disso, na posição 77, a Alanina é conservada no gene que codifica 1,2-CTD, sendo sabido que este está envolvido na ligação entre hélices D e E da proteína (Earhart *et al.,* 2005). No entanto, em *H. organivorans* e em outras bactérias halofílicas, a alanina é encontrada na posição 77, sendo então não conservada e substituída por um resíduo de glicino. Na posição 200, o alinhamento mostrou a presença de uma valina em 1,2 CTD da *H. organivorans,* no entanto, em outras espécies a cisteína foi o resíduo localizado nessa posição. Esse resíduo pode estar envolvido na formação de uma bolsa na qual gira outros resíduos sobre substrato de ligação. Como mostrado na Figura 42, nos quatro alinhamentos da 1,2-CTD, apenas em *Marinobacter coryrhynchus* DG893T a cisteina é encontrada na posição 200, sendo substituído por uma valina nas enzimas das outras bactérias halofílicas degradadoras analisadas. Sabe-se que as substituições na posição de aminoácidos determinam a dobradura de hélices e folhas.

No que diz respeito aos domínios conservados de Fe-ligantes, na enzima 1,2-CTD de *H. organivorans*, o ferro não-heme esta supostamente ligado por duas tirosinas (Tyr 164 e Tyr 198) e duas histidinas (His 222 e His 224) como nas dioxigenases intradiol estudadas. A sequência de aminoácidos de 1,2-CTD de *H. organivorans* evidenciaram também a presença de sítios de ligação de lipídios (dados não mostrados). O *cat*B codifica a cis, cis-cycloisomerase muconato (89% de similaridade com a sequência de aminoácidos do produto gênico *cat*B de *Chromohalobacter sp* HS-2 e 82% de semelhança com *cat*B produto do gene *Marinobacter coryrhynchus* DSM 16394T), já o gene identificado como *cat*C codifica a muconolactone delta-isomerase (91% de similaridade com a sequência de aminoácidos do produto do gene da *cat*C da *Chromohalobacter* sp. HS-2 e 89% de semelhança com *cat*C produto do gene *Marinobacter coryrhynchus* DSM 16394T). A montagem do cluster do gene *cat*BCA. Uma ORF incompleta designado *cat*R é transcrito divergentemente e codifica um regulador LysR do tipo de transcrição com alta similaridade (75%) para os reguladores catR de γ-Proteobacteria (*Chromohalobacter* sp HS-2 e *Marinobacter algicola* DSM 16394). O gene *ben*A codifica o grande subunidade do benzoato 1,2 dioxigenase e mostrou uma significativa similaridade com a proteína (94%, 84% e 83%) das bactérias Gram-negativas degradadoras de ácido benzóico, pertencentes às espécies *Chromohalobacter sp* HS-2, Marinobacter algicola DSM 16394 e Marinobacter sp ELB17, respectivamente. O *ben*B codifica a pequena subunidade de benzoato 1,2 dioxigenase, mostrando 90% de semelhança com o produto do gene *ben*B de *Marinobacter coryrhynchus* DSM 16394T, 88% de semelhança com a de *Paracoccus denitrificans* PD1222 e 83% de semelhança com o produto do gene *ben*B de *Chromohalobacter sp* HS-2.

## III.4. ORGANIZAÇÃO DOS GENES *CAT* E *BEN* EM *HALOMONAS ORGANIVORANS* E A COMPARAÇÃO COM GENES CATABÓLICOS DE OUTRAS BACTÉRIAS

Em *Halomonas organivorans*, os genes responsáveis pela degradação de compostos aromáticos utilizando a via do catecol provaram ser organizados no operon *cat*BCA com o gene *cat*R localizados antes do gene *cat*B, porem, na orientação oposta. Os genes *ben*AB nesta bactéria é contíguo com o operon *cat*. A organização dos agrupamentos de genes de *cat* e *ben* analisados em *H.organivorans* foi comparada com a de outros grupos equivalentes de bactérias selecionadas (Figura 43). A organização do cluster *cat*BCA gene cat foi semelhante ao dos genes catabólicos identificados em *Chromohalobacter sp* HS-2 (Kim, et al., 2008). *Marinomonas sp* MWYL1 [GenBank: NC_009654], *Paracoccus denitrificans* PD1222 [GenBank: NC_008686] e *Pseudomonas putida* KT2440 (Camara *et al*., 2007)e estão apresentados na Figura 43. No filo *Actinobacteria* como espécies *Rhodococcus erythropolis* PR4, a organização destes genes é *cat*ABC que forma uma unidade reguladora responsável pela degradação de catecol de β-ketoadipate enol-lactona (Veselý et al., 2007) e similares genes homólogos foram encontrados em *Rhodococcus opacus* 1CP (Eulberg & Schomann, 1998).

Em *Pseudomonas aeruginosa* PAO1c a organização descrita é *cat*CBA.

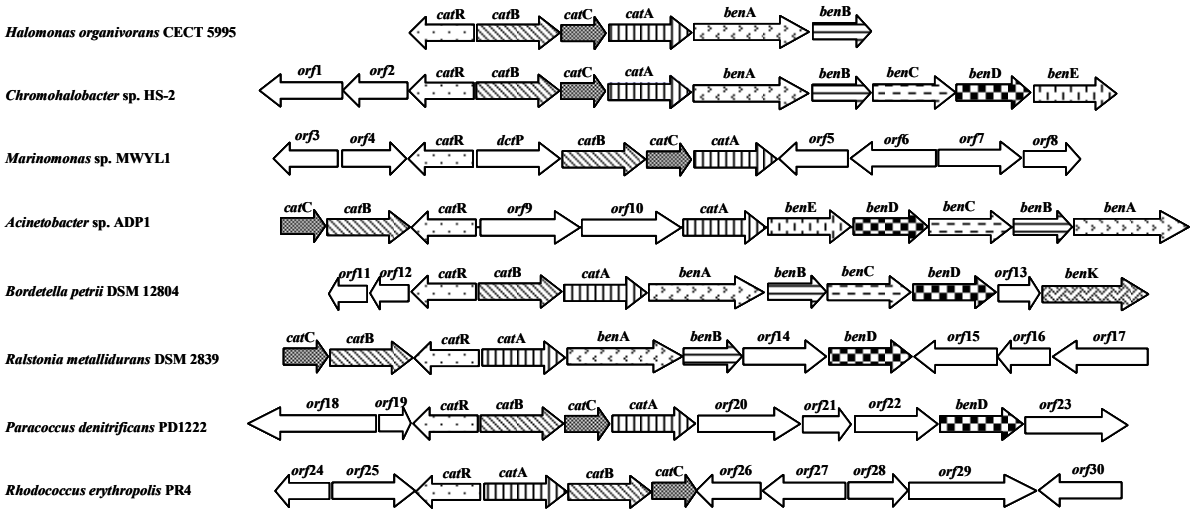



**Figura 43.** Organização gênica dos genes *cat* e *ben* em *Halomonas organivorans* e a comparação com equivalentes genes catabólicos de outras bactérias de diferentes filos. A direção da transcripção é indicada pelas setas. Cat A: catecol 1,2-dioxigenase; catB: cis,cis, muconato cicloisomerase; catC: mucolactona deltaisomerase; catR: regulador transcripicional tipo Lys; ben: benzoato 1,2-dioxigenase subunidade maior; benB: benzoato 1,2-dioxigenase subunidade menor; benC: benzoato 1,2 dioxigenase redutase; benD: 1,6-dihidroxi ciclohexe-2,4-diene-1-carboxylato desidrogenase; benE: MFS família de transportador de membrana; benK: transportador de proteína.

## III.5. ANÁLISE FILOGÉNETICA BASEADA NO 16S rRNA E GENES catA DE *HALOMONAS ORGANIVORANS* E OUTRAS BACTÉRIAS DEGRADADORAS

O 16S rRNA e o gene *cat*A da bactéria halofílica H. organivorans foram, filogeneticamente, comparados com os genes de outras bactérias degradadoras. Para isso, dez sequências disponíveis nos bancos de dados correspondentes aos genes 16S rRNA e *cat*A foram selecionados, incluindo micro-organismos pertencentes a α, β e γ-Proteobacteria e filos *Actinobacteria* (descrita em Material e Métodos), foram selecionados para serem alinhados e as árvores filogenética construidas (Figura 44). A árvore filogenética do gene catA apresentou dois ramos principais, com sequências de propagação de filos diferentes ao longo deles e não mostrando nenhuma correlação com a árvore do gene 16S RNAr baseada na que apresentou a topologia congruente esperada com a afiliação filogenética clássica em que Proteobacteria agrupou os diferentes grupos (α , β e γ) e do representante *Actinobacteria erythropolis* como outgroup.

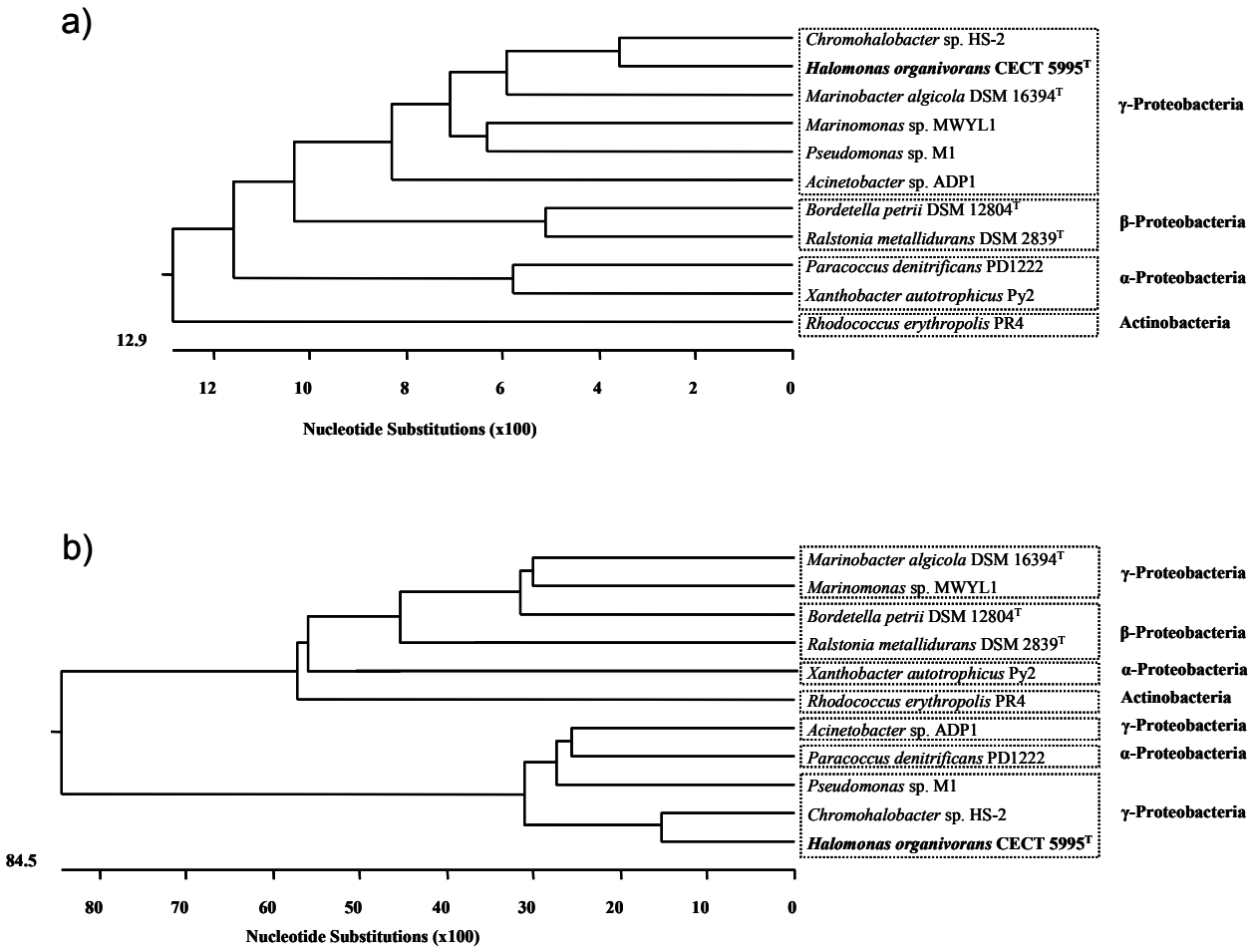



**Figura 44.** Árvores filogenética dos genes 16S rRNA e *cat*A. (**A.)** árvore filogenética baseada na análise da sequencia de nucleotídeo de 1500pb do gene 16S rRNA da *Halomonas organivorans* e outras linhagens relacionadas. (**B.**) Árvore filogenética baseada na comparação do gene catA de 840pb da *Halomonas organivorans* e outros genes catA de microrganismos com potencial de degradação. As arvores foram construídas usando o Clustal W.

## III.6. IDENTIFICAÇÃO DO INDUTOR DOS GENES DE DEGRADAÇÃO DE FENOL E ÁCIDO BENZOÍCO

Para confirmar que os genes de degradação são especificamente expressos na presença de fenol e ácido benzóico, foi realizada a transcrição reversa RT-PCR. Ensaios de RT-PCR com *primers* baseados na região intergênica dos genes foram realizadas, utilizando RNA total extraído de células de *H. organivorans*. Para este experimento, a linhagem *H. organivorans* foi cultivada em meio mínimo salino, utilizando fenol ou ácido benzóico como a única fonte de carbono. A fim de confirmar que os genes de degradação são induzidos por esses dois compostos orgânicos, uma cultura de controle de glicose foi realizado. Os *primers* foram desenhados para gerar produtos de PCR específico dos agrupamentos de genes. Três produtos de tamanhos esperados foram

amplificados com os pares de primers que abrange as regiões intergênicas de *cat*B-*cat*C (881 pb), *cat*A-*cat*C (866 pb) e *ben*A-*ben*B (197 pb). Conforme mostrado na Figura 45, todos os sets de *"primer"* gerou produtos de RT-PCR de tamanho esperado do DNA a partir das celeulas crescidas em fenol e ácido benzóico o que não ocorreu quando a indução foi realizada com glicose. Resultados de RT-PCR usando o sets de *"primer" cat*B-*cat*C e *cat*C-*cat*A mostraram que os genes *cat* são induzidos por fenol e ácido benzóico e são co-transcritos em um único *operon*. Os resultados obtidos com o par de *primers ben*A-*ben*B demonstraram a indução do gene *ben* na presença de fenol e ácido benzóico, mostrando também a co- transcripçao de ambos os genes (*ben*AB).

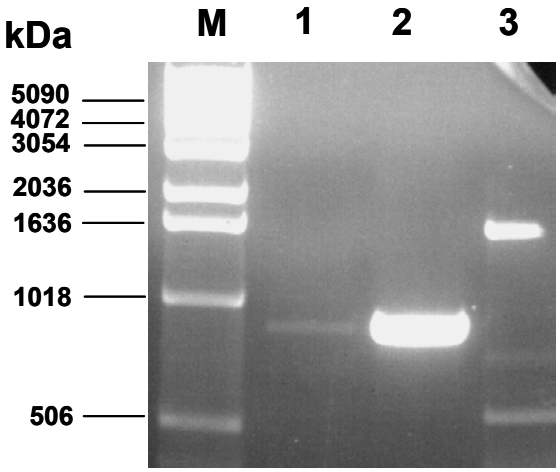



**Figura 45.** Resultado do RT-PCR. O produto de PCR foi amplificado com o cDNA e provado que os genes *cat* e *ben* são transcritos em uma só unidade transcripcional. **1.** *cat*C-*cat*A (866pb); **2.** *cat*B-*cat*C (881pb); **3.** *cat*A-*ben*A (1542pb).

## III. 7. NÚMERO DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDIOS

A sequência de nucleotídeo reportada neste trabalho foi submetida ao banco de dados EMBL/GenBank/DDBJ e o seu número de acesso é FN997643-FN997647.

# *DISCUSSÃO*

Durante décadas, muitas pesquisas foram realizadas na tentativa de elucidar o metabolismo de diferentes compostos orgânicos por bactérias não halofílicas, como é o caso da *Pseudomonas*, um gênero considerado modelo de estudo da biodegradação. No entanto, poucas informação estão disponíveis sobre o catabolismo de compostos orgânicos em bactérias halofílicas (Le Borgne *et al*., 2008).

A presença da rota catecol (cat) e da rota do protocatecol (pca) na via β-cetoadipato foi descrita em *H. organivorans* ( García *et al*., 2005). Em diferentes bactérias não-halofílicas, como a *Pseudomonas* ou *Acinetobacter*, o catecol é o intermediário metabólico- chave na rota do catecol, e esse é convertido em cis, cis-muconato, através dioxigenação e clivagem do anel do benzênico pela enzima 1,2-CTD (Earhart *et al*., 2005; Valley *et al*., 2005; Camara *et al*., 2006; Wang *et al*., 2007). A via da *orto* clivagem é freqüentemente cromossomicamente codificada e está amplamente distribuída em bactérias e fungos do solo, constituindo a principal via de catabolismo de compostos aromáticos nestes organismos (Harwood & Parales, 1996; Jimenez *et al*., 2002).

Os genes *cat* são normalmente organizados em um único cluster (Harwood & Parales, 1996). Relatou-se nesse trabalho os genes arquétipo catRBCA da bactéria halofílica moderada *H. organivorans* incluindo genes que codificam uma muconato cis, cis-cycloisomerase, delta muconolactona isomerase e 1,2-CTD, mostrando ainda que o *cat*R é um gene de regulação. Os genes cat e Ben se encontram seguidos em *Halomonas* (Figura 43). Embora os clusters dos genes *ben* e *cat* estejam separados em genomas de algunas bactérias como a *Pseudomonas putida* KT2440 (Jimenez *et al*., 2002), encontram organização semelhante ao da *Halomonas* em *Chromohalobacter sp.* HS-2, *Acinetobacter sp* ADP1, *Bordetella petrii* DSM 12804, *Ralstonia metallidurans* DSM 2839 e *Pseudomonas fluorescens* (Cowles *et al*., 2000; Jiménez *et al*.,2002; Kim *et al*., 2008). Além disso, os conjuntos de genes *ben* e *cat* foram encontrados intimamente ligados em *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia pseudomallei* (Jimenez *et al*., 2002). Por analogia com os genes de cat descrito em *Chromohalobacter* sp HS-2 e outros, catR (Lys- proteína tipo reguladora) podem ativar a expressão de genes em catBCA em *H. organivorans* como resposta ao indutor cis, cis-muconato (Kim *et al*., 2008).

O fenol é um poluente ambiental liberado por indústrias químicas ou refinarias de petróleo. A degradação deste composto orgânico tem sido extensivamente estudada em bactérias não-halofílicas e diferentes vias catabólicas têm sido descritas para este composto (Duffner et al., 2000; Heinaru, *et al*., 2002). Os resultados deste presente trabalho indicaram que, na bactéria halofílica *H. organivorans*, o fenol é degradado através da rota intermediária do catecol, através da via metabólica do *β-cetoadipato*. Neste trabalho, é reportado de maneira inédita os genes catabólicos envolvidos na degradação de fenol em bactérias halofílicas moderadas.

A seqüência de aminoácidos descrita de *cat*A que codifica a 1,2-CTD em *H.organivorans*, mostrou a presença de resíduos ativos idênticos aos encontrados nas catecol-dioxigenases, já previamente estruturadas. No entanto, dois tipos de resíduos, Gly 77 e Val 200, estão conservadas no 1,2-CTD de halofílicos estudados, sugerindo uma implicação no caráter halofílico. Os resultados obtidos a partir da busca de Fe-ligantes sugerem que o 1,2-CTD de *H. organivorans* poderia apresentar uma geometria trigonal bipiramidal idêntica a outras intradiol dioxigenases cujas estruturas foram estudadas por meio de ensaios cristalográficos (Earhart *et al.,* 2005). Por outro lado, Vetting *et al.,(*2007), descreveram que catecol-dioxigenase intradiol dimérica são proteínas que possuem lipídios vinculativos. Nesse sentido, o estudo da estrutura do 1,2-CTD de *Pseudomonas arvilla* revelou a presença de picos com massa consistente a lipídios (Earhart *et al.,* 2005). A presença de sítios de ligação de lipídios na seqüência de aminoácidos de *H. organivorans* como mostrado na Figura 42, sustenta esta característica geral lipídica vinculativa, embora a função fisiológica para os lipídios nesta família de enzimas seja desconhecida.

O uso do gene *cat*A como um marcador molecular filogenético, foi descrito previamente (Táncsics *et al*., 2008; Shen *et al*., 2009) uma comparação entre *cat*A do 16S rRNA de *Halomonas organivorans* e outras bactérias degradadoras foi realizada. No entanto, as árvores filogenéticas construídas com base no genes 16S rRNA e *cat*A de micro-organismos representante recuperados do banco de dados Genbank não revelou nenhuma correlação entre eles. Os resultados obtidos com as sequências do gene *cat*A mostraram uma distribuição dos ramos com dois grupos principais em que não há o agrupamento das espécies nos subgrupos bem conhecidos dos filos *Proteobateria*. Portanto, pode-se concluir que genes 16S RNAr e *cat*A evoluíram de forma independente. Há evidência indicando que a transferência horizontal de genes é um mecanismo comum para a introdução de vias catabólicas em genomas bacterianos (Top, *et al*., 2003). A utilidade da sequência de *cat*A para diferenciar os micro-organismos em nível inter-espécies, complementando as informações gerais filogenética tem sido proposto anteriormente (Táncsics *et al*., 2008; Shen *et al*., 2009) Por outro lado, El Azhari *et al*., (2010), indicaram a ausência de congruência entre os dados de 16rRNA e sequências de genes *cat*A, que sugerem a transferência horizontal dos genes *cat*A.

# *Conclusões*

Historicamente, o gênero *Halomonas* foi descrito como um modelo de bactéria halofílica, moderada para estudos de biodegradação. Neste trablho foi estudado a rota catabolica da *H. organivorans* na degradação de compostos aromáticos em condições salinas. Demonstrou-se que a degradação do fenol e do ácido benzóico em *H. organivorans* segue a via do catecol na rota do β-cetoadipato compreendendo a codificação de diferentes enzimas por *cat*RBCA. O entendimento do mecanismo metabólico envolvido na degradação de poluentes por bactérias halofílicas é fundamental para a elaboração de sistemas eficientes para a remediação de ambientes salinos contaminados.

# *Referências Bibliográficas*

- ABD-El-HALEEM,D., MOAWAD, H., ZAKI, E.A., Zaki, S. Molecular Characterization of Phenol-Degrading Bacteria Isolated from Different Egyptian Ecosystems. **Microbial Ecol.** v. 43,p. 217-224, 2002.

- ALVA, V.A., PEYTON, B.M. Phenol and catechol biodegradation by the haloalkaliphile *Halomonas campisalis*, influence of pH and salinity. **Environ Sci Technol.** v. 19, p. 4397-440, 2003.

- BASHA, K.M., RAJENDRAN, A, THANGAVELU, V. Recent advances in the Biodegradation of Phenol, A review. **Asian J Exp Biol Sci**. v**.** 1, p. 219-234, 2010

- BRUSA, T., BORIN, S., FERRARI, F., SORLINI, C., CORSELLI, C., DAFFONCHIO, D. Aromatic hydrocarbon degradation patterns and catechol 2,3-dioxygenase genes in microbial cultures from deep anoxic hypersaline lakes in the Eastern Mediterranean sea. **Microbiol Res**. v. 156, p. 49-58, 2001.

- CÁMARA, B., BIELECKI, P., KAMINSKI, F., MARTINS DOS SANTOS, V., PLUMEIER, I., NIKODEM, P., PIEPER, D.H. A Gene Cluster Involved in Degradation of Substituted Salicylates via *ortho* Cleavage in *Pseudomonas* sp. Strain MT1 Encodes Enzymes Specifically Adapted for Transformation of 4-Methylcatechol and 3-Methylmuconate. **J Bacteriol**. v. 189, p. 1664-1674, 2007

- COWLES, C.E., NILCHOLS, N.N., HARWOOD, C.S. BenR, a XylS Homologue, Regulates Three Different Pathways of Aromatic Acid Degradation in *Pseudomonas putida***. J Bacteriol**. v. 182, p.6339-6346, 2000.

- CSONKA, L.N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiol Rev**. v. 53, p. 121-147, 1989.

- DUFFNER, F.M., KIRCHNER, U., BAUER, M.P., MULLER, R. Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7, cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. **Gene.** v. 256, p. 215-221, (2000)

- EARHART, C.A., VETTING, M.W., GOSU, R., MICHAUD-SORET, I., QUE, L.J., OHLENDORF, D.H. Structure of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas arvilla*. **Biochem Biophys Res Commun.** v.1, p.198-205, 2005

- El AZHARI, N., DVERS_LAMRANI, M., CHATAGNIER, G., ROUARD, N., MARTIN_LAURENT, F. Molecular analysis of the catechol-degrading bacterial community in a coal wasteland heavily contaminated with PAHs. **J Hazard Mater** . v.177, p.593-601, 2010.

- EULBERG, D., SCHOMANN, M. The putative regulator of catechol catabolism in *Rhodococcus opacus* 1CP an IclR-type, not a LysR-type transcriptional regulator. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 74, p. 71-82, 1998.

- GARCÍA, M.T., MELLADO, E., OSTOS, J.C., VENTOSA, A. *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 54, p. 1723-1728, 2004.

- GARCÍA, M.T., VENTOSA, A., MELLADO, E. Catabolic versatility of aromatic compound-degrading halophilic bacteria. **FEMS Microbiol Ecol**. v. 1 ,p. 97-109, 2005.

- HARWOOD, C.S., PARALES, R.E. The beta-ketoadipate pathway and the biology of self-identity. **Annu Rev Microbiol** .v. 50, p.553-590, 1996.

- HEINARU, E,, TRUU, J., STOTTMEISTER, U., HEINARU, A. Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and pcresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. **FEMS Microbiol Ecol.** v. 31, p. 195-205, 2000.

- JIMÉNEZ, J,I., MiÑAMBRES, B., GARCÍA, J.L., DÍAZ, E. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. **Environ Microbiol**. v 4, p. 824-841, 2002.

- KIM, D., KIM, S.I., CHOI, K.Y., LEE, J.S., KIM, E. Molecular cloning and functional characterization of the genes encoding benzoate and *p*-hydroxybenzoate degradation by the halophilic *Chromohalobacter* sp. strain HS-2. **FEMS Microbiol Lett**. v. 280, p. 235-241, 2008.

- KUKOR JJ, OLSEN RH, BALLOU DP Cloning and expression of the catA and catBC gene clusters from *Pseudomonas aeruginosa* PAO. **J Bacteriol.** v. 10, p. 4458-4465, 1988.

- LE BORGNE S, PANIAGUA, D., VAZQUEZ-DUHALT, R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. **J Mol Microbiol Biotechnol.** v. 15, p. 74-92. 2008.

- MARGESIN, R., SCHINNER, F. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 56, **p.** 650-663, 2001.

- MELLADO, E., VENTOSA, A. Biotechnological potential of moderately and extremely halophilic microorganisms. In, Barredo JL, editor. **Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production.** Kerala, Research Signpost. p. 233-256, 2003.

- NIETO, J.J., FERNÁNDEZ-CASTILLO, R., MÁRQUEZ, M.C., VENTOSA, A., QUESADA, E., RUIZ-BERRAQUERO, F. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. **Appl Environ Microbiol**. v. 52, p. 2385-2390, 1989.

- OREN, A. Diversity of halophilic microorganisms, environments, phylogeny, physiology and applications**. J Ind Microbiol Biotechnol**. v. 28, p. 56-63, 2002.

- PIEPER, D.H., REINEKE, W. Engineering bacteria for bioremediation. **Curr Opin Biotechnol.** v. 3, p. 262-270, 2000.

- SAITOU, N., NEI, M. The Neighbour-joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol. v.** 4, p. 406-425, 1987.

- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2001.

- SANDHU, A., HALVERSON, L.J., BEATTIE, G.A. Identification and Genetic Characterization of Phenol-Degrading Bacteria from Leaf Microbial Communities. **Microbial Ecol**. v. 57, p. 276-285, 2009.

- SHEN, F-T., LIN, J-L., HUANG, C-C., HO, Y-H., ARUN, A.B., YOUNG, L-S., YOUNG, C-C. Molecular detection and phylogenetic analysis of the catechol 1,2-dioxygenase gene from *Gordonia* spp. **Syst Appl Microbiol. v.** 32, p. 291-300, 2009.

- TÁNCSICS, A., SZOBOSZLAY, S., KRISZT, B., KUKOLYA, J., BAKA, E., MÁRIALIGETI, K., RÉVÉSZ, S. Applicability of the functional gene catechol 1,2-dioxygenase as a biomarker in the detection of BTEX-degrading *Rhodococcus* species. J Appl Microbiol. v. 105, p. 1026-1033, 2008.

- TOP, E.M., SPRINGAEL, D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. **Curr Opin Biotechnol**, v. 14, p. 262-269, 2003.

- VALLEY, M.P., BROWN, C.K., BURK, D.L., VETTING, M.W., OHLENDORF, D.H., LIPSCOMB, J.D. Roles of the equatorial tyrosyl iron ligand of protocatechuate 3,4-dioxygenase in catalysis. **Biochemistry**. v. 33, p. 11024-11039, 2005

- VENTOSA, A., NIETO, J.J., OREN, A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. **Microbiol Mol Biol Rev**. v. 62, p. 504-544, 1998.

- VESELÝ, M., KNOPPOVÁ, M., NEŠVERA, J., PÁTEK, M. Analysis of *catRABC* operon for catechol degradation from phenol-degrading *Rhodococcus erythropolis*. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 76, p. 159-168, 2007.

- VETTING, M.W., OHLENDORF, D.H. The 1.8 A crystal structure of catechol 1,2-dioxygenase reveals a novel hydrophobic helical zipper as a subunit linker. **Structure**. v. 4, p. 429-440, 2000.

- WANG, C-H., LU, J-W., WEI, H-H., TAKEDA, M. Functional model for intradiol-cleaving catechol 1,2-dioxygenase, Synthesis, structure, spectra, and catalytic activity of iron(III) complexes with substituted salicylaldimine ligands. **Inorg Chim Acta**. v. 360, p. 2944-2952, 2007.

# *PARTE IV: Conclusões Gerais*

# *Conclusões*

Os estudos realizados, demostraram que a maioria dos micro-organimos cultivavéis da água de produção de petróleo pertencem a família Halomononeacea. Membros dese grupo ultilizam a via de degradação do catecol quando em presença de fenol ou ácido benzóico, além dos genes responssavéis pela produção dessas enzimas estarem em um mesmo operon e por isso são trancriptos juntos.

No processo de biorremediação da água de produção de petróleo, a bioestumulação da microbiota já presente foi mais efetiva que a bioaumentação.